

ZÁRÓ SZAKMAI BESZÁMOLÓ A
„KAROTINOK TERMELTETÉSÉNEK BEFOLYÁSOLÁSA ÉS FOKOZÁSA JÁROMSPÓRÁS
GOMBÁKBAN”

CÍMŰ POSZTDOKTORI OTKA PÁLYÁZATHOZ

OTKA azonosító: PD 48537

Témavezető: Dr. Papp Tamás

Kutatási időszak kezdete: 2004. 10. 01

Kutatási időszak vége: 2007. 09. 30.

A pályázati program célja az volt, hogy rekombináns technikákat, valamint a genetikai transzformáció különféle eljárásait alkalmazva egyes karotintermelő járomspórás gombák, különösen a *Mucor circinelloides*, karotinoid bioszintézisét módosítsuk, továbbá, hogy az így létrehozott rendszerben vizsgáljuk a bioszintetikus út lefolyását és a karotintermelés mértékét.

A kutatási program részeként munkatervben a következő konkrét célkitűzések szerepeltek:

- 1. A karotinoid termelés befolyásolása a mevalonsav-izoprén bioszintézis út genetikai módosításával (*Mucor circinelloides* genetikai transzformációja HMG-CoA reduktáz és *carG* géneket tartalmazó vektorok segítségével).**
- 2. Heterológ gének (β -karotin hidroxiláz, β -karotin ketoláz) expressziója *Mucor circinelloides*ben, asztaxantin termelés lehetősége *Mucor*ban**
- 3. Transzformációs kísérletek egyéb karotintermelő járomspórás gombákkal.**

A pályázati időszak alatt elért eredmények:

1. Részletesen jellemeztük az általunk izolált *Rhizomucor miehei* HMG-KoA reduktáz gént (*hmgR*).

Elvégeztük az izolált gén szekvencia és funkcionális elemzését, valamint kidolgoztunk egy erre a génre alapozott, direkt szelekciót biztosító transzformációs rendszert. Az azonosított gén nukleotidsorrendjét és a megfelelő fehérje aminosav sorrendjét depozitáltuk az EMBL Nucleotide Sequence Database adatbázisban (Accession no.: AJ568024).

Vágvölgyi Cs, Lukács Gy, Nyilasi I, **Papp T** (2004) Development of a lovastatin resistance-based transformation system for *Rhizomucor miehei*. *Clin. Microbiol. Inf.* 10(S3), 507.

Készítettünk a *hmgR* gént hordozó transzformáló vektorokat, melyekben a *hmgR* a saját, vagy *Mucor* szabályozó régiók kontrollja alatt áll. Heterológ transzformációval expresszáltattuk a *hmgR* gént *M. circinelloides*ben és sikerült fokozni a módosított *Mucor* törzsek sztatinokkal (HMG-KoA reduktáz gátlókkal) szembeni rezisztenciáját, jelezve a *hmgR* gén termékének kifejeződését. Ezen expressziós vizsgálatokból jelenleg egy publikáció áll összeállítás alatt, melyet még ez év első felében szeretnénk közzéadni.

Lukács, Ács, **Papp T**, Somogyvári F, Csernetics Á, Vágvölgyi Cs (2008) The 3-hydroxi-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene of the zygomycete fungus, *Rhizomucor miehei*. (in preparation)

2. Izoláltuk a *M. circinelloides* izopentenil pirofoszfát izomeráz génjét (*Mclpp*).

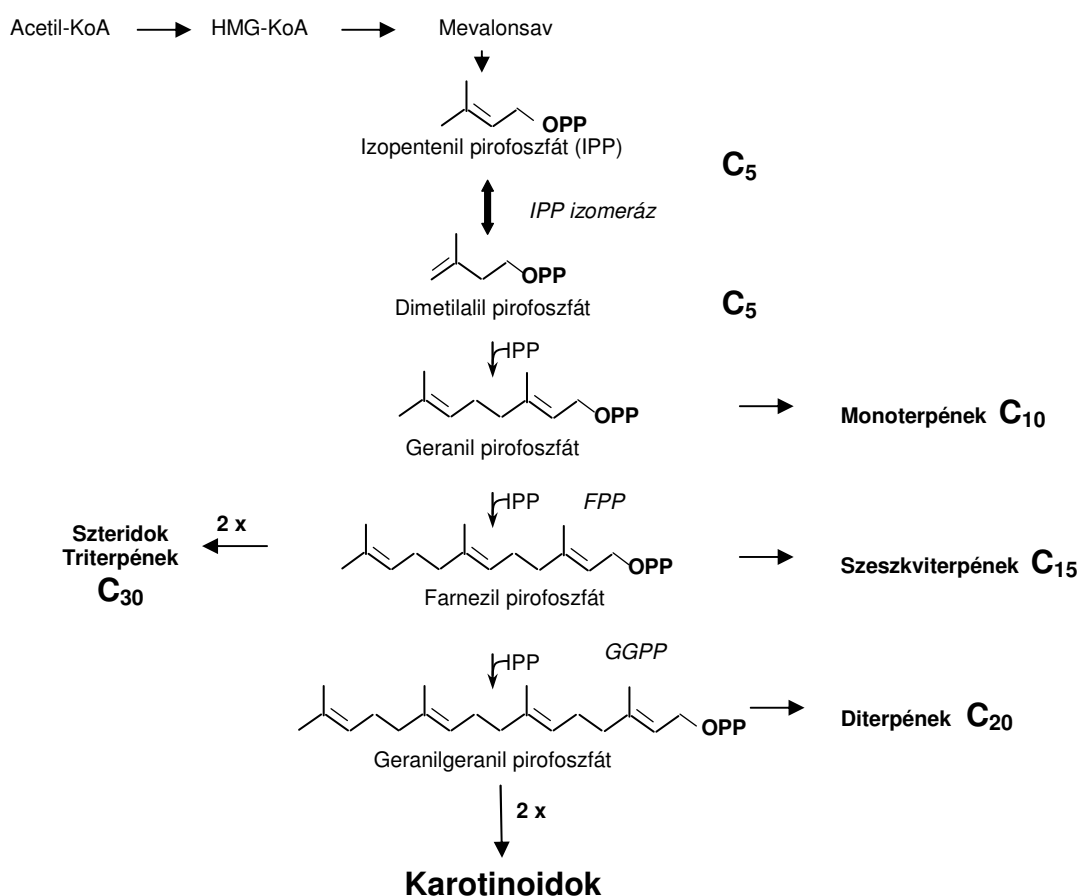
Izoláltuk és meghatároztuk a *Mucor* izopentenil pirofoszfát izomeráz gén és a határoló szakaszainak szekvenciáját. Elvégeztük az *Mclpp* gén részletes funkcionális elemzését, melynek során megállapítottuk, hogy szemben más eddig vizsgált szervezetekkel szemben (pl. módosított karotintermelő *Candida*, vagy *Xanthophyllomyces*) a gén terméke sebesség-meghatározó a *Mucor* karotintermelése szempontjából. Az izolált génre alapozva transzformáló vektorokat szerkesztettünk a további, a karotin termelés módosítását célzó

kísérletekhez (lásd 3. pont), majd elvégeztük a transzformációs kísérleteket. A gén és a megfelelő fehérje szekvencia adatait elhelyeztük az EMBL nukleotid szekvencia adatbázisban (Accession no.: AM903092). A génizolálással és elemzéssel kapcsolatos eredményekről eddig nemzetközi konferencián számoltunk be, illetve jelenleg egy további publikáció áll benyújtás előtt:

PappT; Iturriaga EA; Csernetics Á; Molina R; Álvarez MI; Eslava AP; Vágvölgyi Cs: *Cloning and analysis of the gene isopentenyl pyrophosphate isomerase in Mucor circinelloides*, ECFG-8. Vienna, Austria. Abstracts 229., 2006

3. A mevalonát-izoprén bioszintézis út géndózis hatáson alapuló túlműködtetésével karotintúltermelő *M. circinelloides* törzseket hoztunk létre.

A mevalonsav-izoprén bioszintézis utak módosítását célzó kísérletekkel a *M. circinelloides* β -karotin termelésének fokozását kívántuk megvalósítani. A karotinoidok izoprénvázis vegyületek, specifikus bioszintézisük a közös izoprén útról ágazik le (**1. Ábra**).



1. Ábra. Az általános mevalonsav-izoprén bioszintézis út.

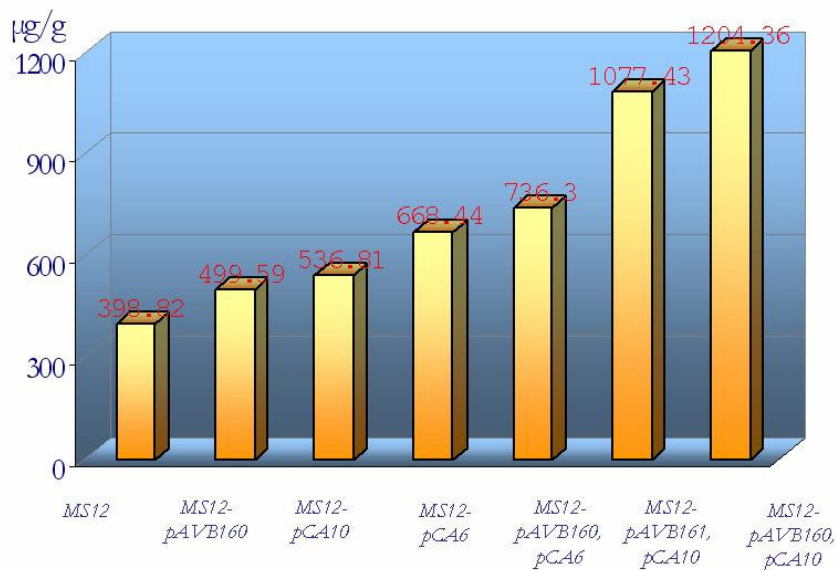
Célunk az volt, hogy megvizsgáljuk, hogy ezen nem-specifikus izoprén út túlműködtetésével fokozható-e és milyen mértékben a karotinoidok termelése a vizsgált gombákban. Számos az izoprén bioszintézis módosítását lehetővé tevő expressziós vektort készítettünk, az általunk izolált HMG-KoA reduktáz (*hmgR*), izopentenil pirofoszfát izomeráz (*McIpp*) és a *Mucor* farnezil pirofoszfát szintáz (*isoA*) és a geranylgeranyl pirofoszfát szintáz (*carG*) génekre alapozva. Tanulmányoztuk a bioszintézis út módosításának hatását a karotintermelésre. Expressziós vizsgálatokat végeztünk az egyes részletesen analizált struktúrgénekkkel, valamint különböző génkombinációkkal, különböző szabályozó szekvenciák alkalmazásával. Az egyes

gének kópiaszámának autoreplikatív plazmiddal történő emelése mintegy másfél-kétszeresére növelte az összkarotinoid produkciót. Megfelelő génkombinációk bevitelével azonban, az általunk előállított törzsekben, több mint háromszorosára sikerült a β -karotin tartalmat emelni az eredeti vad típusú törzshöz képest (**2. Ábra**).

Papp T; Csernetics Á; Velayos A; Iturriaga EA; Eslava AP: *Over-expression of isoprene biosynthetic enzymes in the β -carotene producer zygomycete *Mucor circinelloides**, J. Biotechnol. 118(S1): 153, 2005

Csernetics Á; **Papp T**; Velayos A; Iturriaga EA; Eslava AP; Vágvolgyi Cs: *Carotene production with genetically modified *Mucor circinelloides* strains*, Acta Microbiol. Hung. 52 (S): 22, 2005

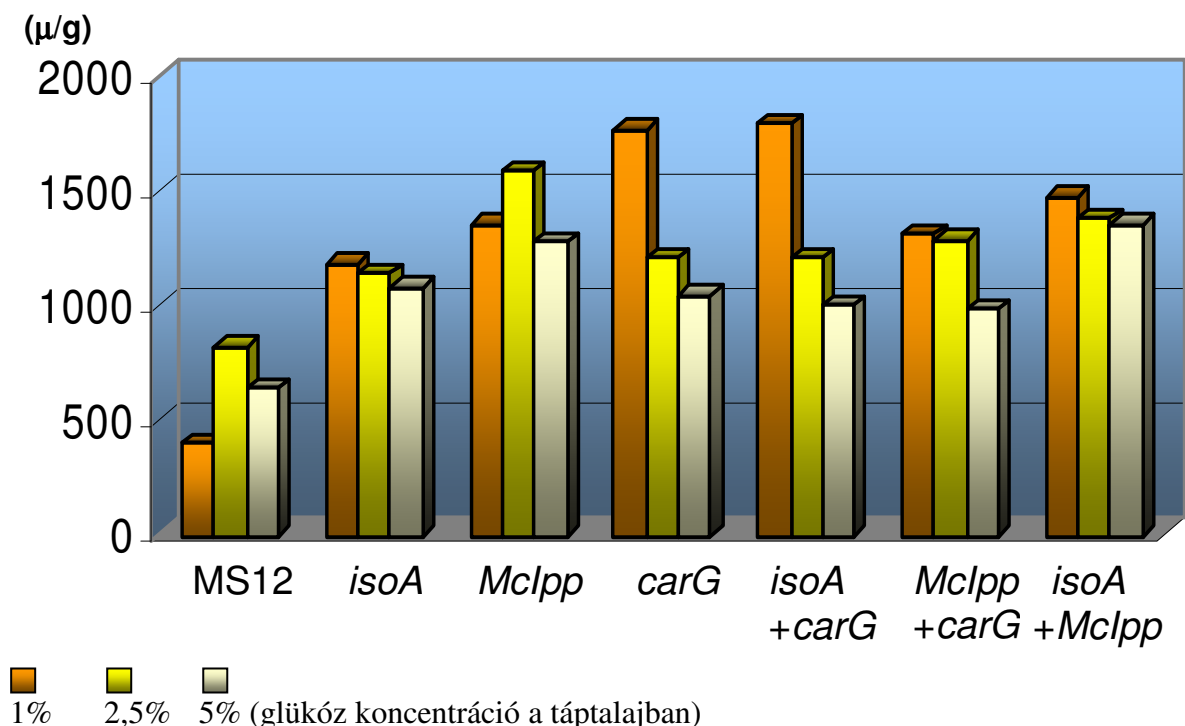
Papp T; Iturriaga EA; Csernetics Á; Eslava AP; Vágvolgyi Cs: *Improvement of the carotene production in *Mucor circinelloides**, Acta Microbiol. Hung. 53, 328, 2006



2. Ábra. Különböző autoreplikatív vektorkonstrukciókkal kapott transzformánsok összkarotinoid tartalma Szárazanyagtartalomra vonatkoztatva. Az egyes konstrukciók a következő géneket tartalmazzák: pAVB160: *isoA*, pAVB161: *carG*; pCA6: *carG*; pCA10: *MclPP*.

Az említett izoprén szintézis gének felhasználásával, olyan plazmidokat is konstruáltunk, ahol a géneket a fokozottabb expressziót lehetővé tevő gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz 1 gén (*gpd1*) promóterrel és terminális régióval építettük össze. A *Mucor gpd1* erősen kifejeződő gén, indukciója függ a tápközeg glükóz tartalmától. E transzformáló vektorokat is úgy építettük meg, hogy a géneket kombinációkban is be tudjuk vinni a recipiens törzsbe. A transzformációt minden lehetséges kombinációban elvégeztük. A transzformánsokban sikerült tovább emelni a karotinoid produkció mértékét (**3. Ábra**). Tanulmányoztuk továbbá a *gpd1* promóter expresszióját (pl. a glükóz koncentráció változtatásának hatását a gének a fúziós gének expressziójára) és alkalmazhatóságát ebben a rendszerben. Génkombinációkkal végzett kísérletekkel elemeztük, hogy melyek a korai izoprén bioszintézis út a karotintermelés szempontjából legfontosabb sebesség-meghatározó lépései. Egy *carG* → *MclPP* → *isoA* sorrendet lehetett felállítani a karotintermelésre gyakorolt hatás alapján. Mindezen eredményekről, terveink szerint, még ebben az évben (az *MclPP* izolálásával együtt) egy folyóiratcikkben szeretnénk beszámolni. E a munkánkat az elmúlt évben egy szakmai konferencián meghívott előadóként ismertethettem az Eurofung Project (<http://eurofung.net>) európai konzorcium gyűlésén:

Papp T; Iturriaga EA; Csernetics Á; Eslava AP; Vágvolgyi Cs: *Improvement of the carotene production in *Zygomycetes fungi**, Eurofungbase, Wageningen, The Netherlands, Abstracts 24., 2007

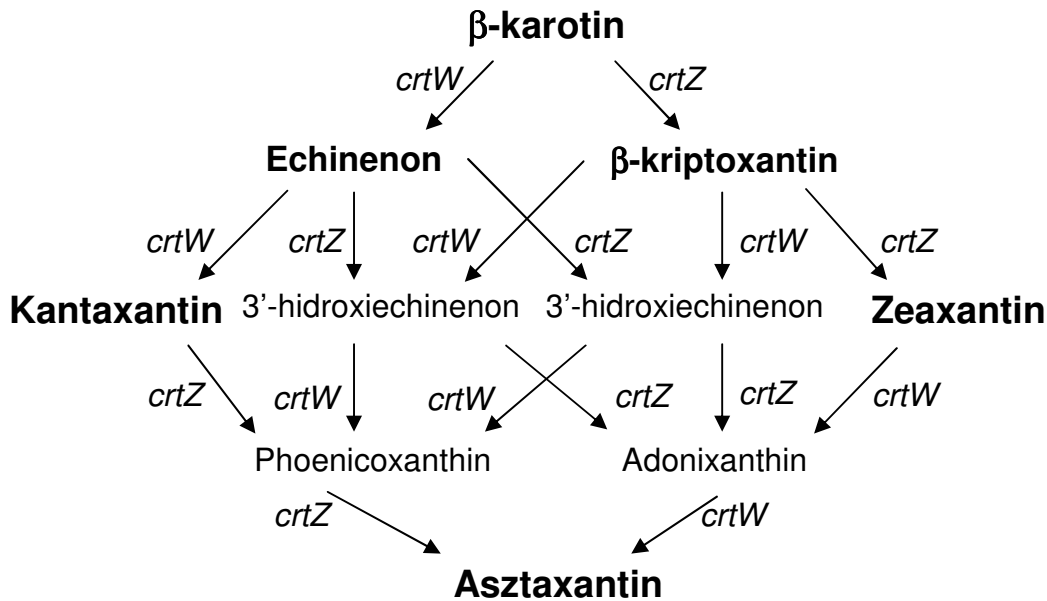


3. Ábra. Különböző a *gpd1* gén szabályozó régióival összeépített géneket tartalmazó vektorkonstrukciókkal kapott transzformánsok összkarotinoid tartalma szárazanyagtartalomra vonatkoztatva. (A gének rövidítései azt jelölik, hogy mely módosított géneket vittük be transzformációval az adott törzsbe.)

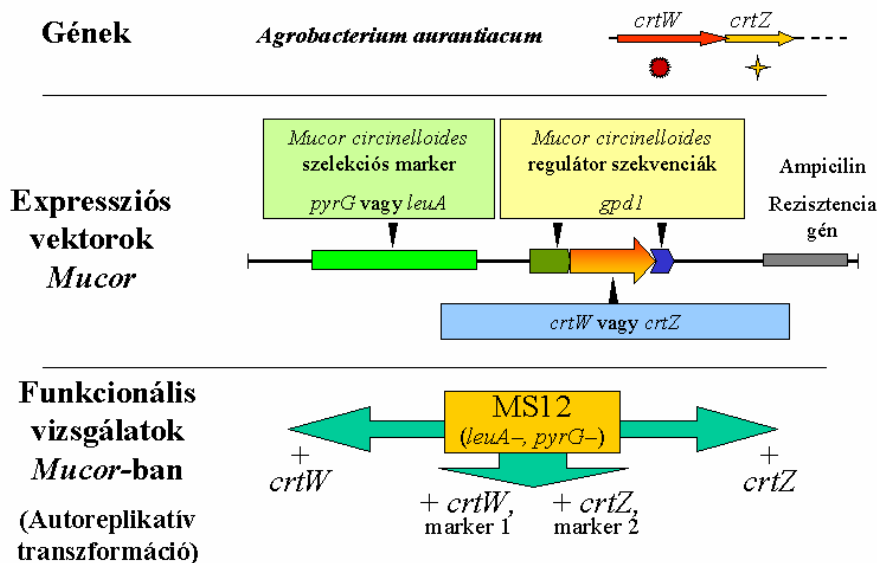
4. Heterológ génexpresszióval többféle megváltozott karotinoid összetételű *Mucor circinelloides* törzset hozunk létre.

Autoreplikatív expressziós vektorokat hoztunk létre, amelyek lehetővé teszik az *Agrobacterium aurantiacum* asztaxantintermelő baktérium β -karotin-asztaxantin átalakulásért felelős géneinek (β -karotin ketoláz, *crtW* és β -karotin hidroxiláz, *crtZ*) *M. circinelloides*ben történő kifejeződését. A **4. Ábra** a β -karotin-asztaxantin konverzió lehetséges lefolyását és a keletkező köztitermékeket, az **5. Ábra** pedig a transzformációs kísérletek stratégiáját szemlélteti. A bakteriális géneket a *Mucor gpd1* szabályozó szakaszaival építettük össze. A létrehozott expressziós vektorokkal, különböző kombinációkban, transzformációs kísérleteket végeztünk autoreplikatív rendszerben. Sikerült a β -karotin értékes keto- (asztaxantin, kantaxantin, echinenon) és hidroxiszármazékainak (β -kriptoxantin, zeaxantin) termelődését kiválasztani, illetve fokozni a transzformánsokban. Elsőként bizonyítottuk, hogy a β -karotin hidroxilációja *Mucor*ban is lejátszódik, melynek során természetes körülmények közt is kimutatható mennyiségben termelődnek a hidroxilált származékok (a zeaxantin és a β -kriptoxantin). Tehát az asztaxantin termelés eléréséhez elegendő csak egy heterológ gént, a β -karotin ketolázt bevinni. Ezen eredményekről az *Applied Microbiology and Biotechnology* című folyóiratban számoltunk be:

Papp T; Velayos A; Bartók T; Eslava AP; Vágvolgyi Cs; Iturriaga EA: *Heterologous expression of astaxanthin biosynthesis genes in Mucor circinelloides*, *Applied Microbiology and Biotechnology* 69: 526-531, 2006



4. **Ábra.** Az *A. aurantiacum* asztaxantin szintéziséért felelős génjei által meghatározott átalakulási lépések és a lehetséges köztitermékek. (*crtW*: β -karotin ketoláz gén; *crtZ*: β -karotin hidroxiláz gén)

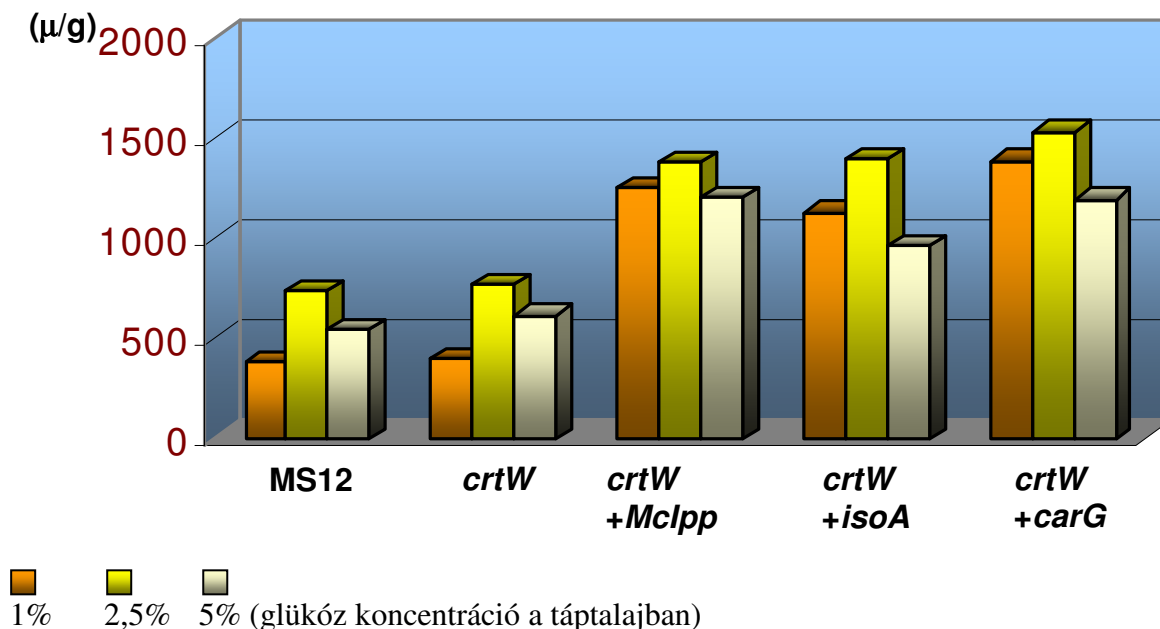


5. **Ábra.** Az *A. aurantiacum* asztaxantin szintéziséért felelős géneket tartalmazó *Mucor* expressziós vektorok szerkesztésének és a transzformációs kísérletek elve (MS12: a transzformációs kísérletekben recipiens törzsként használt *M. circinelloides* karotintermelő, uracil⁻, leucin⁻ kettős auxotróf mutáns törzs; *crtW*: β -karotin ketoláz gén; *crtZ*: β -karotin hidroxiláz gén).

Megkezdttük a két párhuzamosan futó kutatási irány – (i) a xantofilok termeltetését célzó heterológ expressziós kísérletek és (ii) az izopren szintézis út fokozására irányuló kutatások – egyesítését. Ennek érdekében olyan autoreplikatív transzformációs rendszereket hoztunk létre, melyekkel lehetővé vált a homológ izoprenoid gének, valamint a xantofilok termeléséért felelős módosított bakteriális gének együttes bevitele. Az így kapott xantofill termelő transzformánsokat részletesen jellemeztük, egyes törzsekben jelentős összkarotin szint emelkedést (6. **Ábra**) és azon belül is kiugró kantaxantin és echinenon szintet sikerült elérni.

E kísérleteket jelenleg is végezzük, az eddigi eredményeinkről a múlt évben egy szakmai konferencián számoltunk be:

Papp T; Csernetics Á; Szekeres A; Iturriaga EA; Eslava AP; Vágvölgyi Cs: *Modification of Mucor circinelloides for production of oxygenated beta-carotene derivatives.*, Power of microbes in industry and environment, Zadar, Croatia Abstracts 62., 2007



6. Ábra. Az összkarotin szint növekedése a *crtW* gén és az izoprén bioszintézis gének kombinációival kapott ko-transzformáns törzsekben, szárazanyagtartalomra vonatkoztatva. (A gének rövidítései azt jelölik, hogy mely módosított géneket vittük be transzformációval az adott törzsebe.)

Olyan további vektorokat is szerkesztettünk, amelyek az *A. aurantiacum crtW* génjének a *Mucor* genomba történő integrálását teszik lehetővé; ezekben a vektorokban is a *Mucor gpd1* szabályozó régiói biztosítják az expressziót. Többféle vektort készítettünk, melyek a genom különböző helyeire történő integrációt biztosítják. Elvégezve a transzformációs kísérleteket, elemeztük a bevitt gének kifejeződésének mértékét a transzformánsokban, illetve vizsgáltuk karotinoid összetételüket, valamint a produkció mértékét. A **7. Ábra** három integratív transzformáns telepét ábrázol, valamint az eredeti MS12 törzset. Több eltérő karotinoid összetételű transzformánst szelektáltunk, egyes transzformánsokban az oxigenált származékok szintjét sikerült több mint tízszeresre emelni. Ezek a kísérletek befejező szakaszukba jutottak, jelenleg az új transzformánsok termelőképességét, a tápközeg karotinoid összetételre gyakorolt hatását vizsgáljuk. Reményeink szerint eredményeinket a 2008-as év folyamán publikáljuk, illetve idén konferencián is szeretnénk eredményeinket ismertetni:

Papp T; Iturriaga EA; Csernetics Á; Szekeres A; Eslava AP; Vágvölgyi Cs: *Production of oxygenated beta-carotene derivatives by modified Mucor circinelloides.*, ECFG-09 Edinburgh, United Kingdom (accepted), 2008

4. Vizsgáltuk a karotintermelés fokozására alkalmas tenyésztési, fermentációs körülményeket, valamint az eddig összegyűlt ismeretek alapján megkezdtük az izoprén bioszintézis gének, valamint a HMG-CoA gén karotintermelésre gyakorolt hatásának, valamint a termelés fokozására való felhasználhatóságának összehasonlító elemzését. A járomspórás gombák karotintermelésének befolyásolására, új törzsek előállítására vonatkozó

eredményeink egy részét és ismereteinket egy „review” jellegű könyvfejezetben is publikáltuk:

Iturriaga EA; **Papp T**; Breum J; Arnau J; Eslava AP: *Strain and culture conditions improvement for β -carotene production in *Mucor**, Microbial Processes and Products, Methods in Biothenology series – Vol. 18, 2005



7. Ábra. Három integratív transzformációval előállított törzs (2-3) és az eredeti MS12 izolátum (1) telepszíne.
1: MS12; 2: MS12+pCA8/1; 3: MS12+pCA8/2; MS12+pCA9/1

5. Különböző járomspórás gombák karotinoid termelésének vizsgálata.

Mivel a járomspórás gombák közül csak néhánynak ismerjük a részletes karotinoid összetételét, nagyszámú törzs bevonásával mintegy 30, a *Mucor*, *Blakeslea*, *Backusella* és a *Gilbertella* nemzetségekbe tartozó, járomspórás gombafaj karotinoid összetételét és termelőképességét elemeztük. Vizsgáltuk a különböző környezeti feltételek (fény, hőmérséklet, szénforrás) hatását is a karotinoid produkcióra. Sikerült az eddigi modellorganizmusokhoz képest eltérő karotinösszetételű, illetve intenzívebben termelő törzseket azonosítani. Több igen nagy produkcióra képes törzset találtunk, köztük olyanokat is, amelyek figyelemere méltó mennyiségben termelik az értékes zeaxanthint és β -kriptoxanthint is:

Csernetics Á; **Papp T**; Barta K; Vágvölgyi Cs: *Carotenoid production of different Zygomycetes fungi*, Acta Microbiol. Hung. 53, 255-256, 2006

Papp T; Csernetics Á; Szekeres A; Vágvölgyi Cs: *Carotenoid content of different species belonging to the class Zygomycetes.*, ECFG-09 Edinburgh, United Kingdom (accepted), 2008

E munka keretében egyes kiválasztott izolátumok karotinoid termelését részletesebben is megvizsgáltuk, valamint tanulmányozzuk, hogyan vonhatók be ezen új izolátumok a karotinoid termelés megváltoztatását célzó kísérletekbe. Ennek során izoláltuk és jellemeztük a *Gilbertella persicaria* farnezil pirofoszfát szintáz génjét, mely az izoprén bioszintézis egyik fontos kulcsenzimét kódolja. Az ezzel kapcsolatos eredmények egy részét már egy konferencián bemutattuk, de a közeljövőben folyóiratcikk formában is szeretnénk publikálni.

Péteri Zs; Barta K; Csernetics Á; Vágvölgyi Cs; **Papp T**: *Cloning and partial sequence analysis of the Gilbertella persicaria farnezyl pyrophosphate synthase gene.*, Acta Microbiol. Immunol. Hung. 54: 101, 2007

6. A transzformációs kísérletek kiterjesztése egyéb karotintermelő járomspórás gombákra; új integratív eljárások kifejlesztése.

Transzformációs rendszereket – köztük az integratív transzformációt biztosító *Agrobacterium tumefaciens*-mediált eljárás járomspórás gombákra adaptált változatát – dolgoztunk ki és optimalizáltunk *M. circinelloides*re és más eddig ilyen vizsgálatokra nem használt karotintermelőkre – ilyen pl. a *Backusella lamprospora*, melynek karotintermelését szintén a

pályázati program keretében elemeztünk (lásd 5. pont). Új integratív transzformációs vektorokat és eljárásokat fejlesztettünk ki, illetve adaptáltunk járomspórás gombákra PEG-mediált transzformációs rendszerekhez is. E munkákból a pályázat időtartama alatt több folyóiratcikk és konferencián bemutatott anyag született:

Nyilasi I; Ács K; **Papp T**; Vágvölgyi Cs: *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Mucor circinelloides*, *Folia Microbiologica*. 50, 415-420, 2005

Nyilasi I; **Papp T**; Nagy E; Vágvölgyi Cs: *Applicability of the Agrobacterium-mediated transformation in Zygomycetes*, *Acta Microbiol. Hung.* 53, 324-325, 2006

Nyilasi I; **Papp T**; Csernetics Á; Vágvölgyi Cs: *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the *zygomycete fungus, Backusella lamprospora.*, *J. Basic Microbiol.* 48: 59-64., 2008

Nyilasi I; **Papp T**; Csernetics Á; Vágvölgyi Cs: *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation: a new technique for genetic modification of *Zygomycetes*, 4th Hungarian Mycological Conference, Debrecen, Hungary (accepted), 2008

Papp T; Csernetics Á; Nagy G; Szekeres A; Vágvölgyi Cs: *Integrative transformation systems in Zygomycetes.*, 4th Hungarian Mycological Conference, Debrecen, Hungary (accepted), 2008

7. Egyéb eredmények.

A járomspórás gombák karotin termelésének vizsgálata, a mutánsok előállítása során szerzett tapasztalatokat más karotinoid termelő gombákkal (pl. *Phaffia*, *Xanthophyllomyces*) kapcsolatos kutatásainkban is sikerrel fel tudtuk használni.

Palágyi Zs; **Papp T**; Takó M; Nagy Á; Pesti M; Vágvölgyi C: *Genetic variability of astaxanthin-producing yeasts: random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of Phaffia rhodozyma and Xanthophyllomyces dendrorhous*, *Acta Biol. Szeged.* 48: 35-38, 2004

Lukács Gy; Kovács N; **Papp T**; Vágvölgyi Cs: *The effect of vegetable oils on carotenoid production of Phaffia rhodozyma*, *Acta Microbiol. Hung.* 52: 267, 2005

Takó M; Vágvölgyi Cs; Palágyi Zs; Linka B; **Papp T**: *Characterization of carotenoid over-producing Xanthophyllomyces dendrorhous mutants*, *Acta Microbiol. Hung.* 52 (S): 161, 2005

Vágvölgyi Cs; Lukács Gy; Takó M; Csernetics Á; **Papp T**: *The effect of vegetable oils on astaxanthin production of Phaffia rhodozyma and Xanthophyllomyces dendrorhous*, *J. Biotechnol.* 118(S1): 153, 2005

Palágyi Zs; Linka B; **Papp T**; Vágvölgyi Cs: *Isolation and characterization of Xanthophyllomyces dendrorhous mutants with altered carotenoid content.*, *Acta Aliment. Hung.* 35, 223-228., 2006

Csernetics Á; Beáta L; Vágvölgyi Cs; **Papp, T**: *Increased carotenoid content of Xanthophyllomyces dendrorhous cultivated in plant oil supplemented media.*, *Acta Biol. Szeged.* 51: 43-46, 2007

Blaskó A; Belágyi J; Dergez T; Deli J; Papp G; **Papp T**; Vágvölgyi Cs; Pesti M: *Investigation of plasma membrane dynamics of Xanthophyllomyces dendrorhous by EPR and the effect of various carotenoids.*, *Eur. Biophys. J. Biophys.* (accepted, in press), 2008

Hasonlóképpen a járomspórás gombákkal kapcsolatosan, a génizolálásra, azok funkcionális elemzésére vonatkozó eredményeket és egyes a munka során előállított expressziós vektorokat más járomspórás gombákkal kapcsolatos munkákban is sikerrel alkalmaztuk:

Linka B; **Papp T**; Nyilasi I; Vágvölgyi Cs: *Cloning and molecular analysis of the catalase 1 gene from the opportunistic pathogen Rhizopus oryzae*, *Acta Microbiol. Hung.* 53, 310., 2006

Takó M; Linka B; **Papp T**; Vágvölgyi Cs: *A novel β -glucosidase gene from Rhizomucor miehei.*, ECFG-8. Vienna, Austria. Abstracts 257., 2006

Galgóczy L; **Papp T**; Leiter É; Pócsi I; Vágvölgyi Cs: *Interactions between statins and Penicillium chrysogenum antifungal protein (PAF) to inhibit the germination of sporangiospores of different sensitive Zygomycetes.*, *FEMS Microbiol. Lett.* 270: 109-115, 2007

Vágvölgyi Cs; Manczinger L; Krisch J; Takó M; **Papp T**: *New microbial enzymes: Clues for environment friendly biorefinery technologies.*, *Acta Biol. Szeged.* 51: 43-46, 2007

Nyilasi I; **Papp T**; Csernetics Á; Krizsán K; Nagy E; Vágvölgyi Cs: *High-affinity iron permease (FTR1) gene sequences-based molecular identification of clinically important Zygomycetes.*, *Clin Microbiol Inf* (accepted, in press) Published online; doi: 10.1111/j.1469-0691.2007.01932.x, 2008

Összefoglalva a fentieket, elmondható, hogy a kitűzött célokat megvalósítottuk. A kutatási program eredményeként:

Több mint húsz megváltozott karotinösszetételű, asztaxantin és/vagy kantaxantin valamint más xantofillok termelésre képes, illetve karotinoid túltermelő *M. circinelloides* törzset állítottunk elő és jellemeztünk részletesen. Több eljárást dolgoztunk ki járomspórás gombák genetikai módosítására, valamint létrehoztunk egy módosított karotinoid termelésű mutánsparkot. Az eredmények felhasználhatók a további alap- és alkalmazott kutatásokban pl. ipari termelő törzsek kifejlesztésére.

Azonosítottuk és részletesen jellemeztük a *Rhizomucor miehei* HMG-KoA reduktáz, valamint a *Mucor circinelloides* izopentenil pirofoszfát izomeráz génjét.

Nagyszámú, a karotintermelés módosítását lehetővé tevő transzformációs vektort készítettünk, melyek a további törzsnemesítésben felhasználhatók.

Mintegy 30 járomspórás gombafaj különböző törzseinek karotintermelését elemeztük különböző környezeti feltételek (fény, hőmérsékelt, szénforrás) mellett. Több új, nagy karotinoid produkcióra képes, illetve új karotinösszetételű törzset azonosítottunk, melyek a további munkákban felhasználhatók. A *M. circinelloides* genetikai transzformációja során alkalmazott technikák, vektorok, gének ezeknél a gombáknál is alkalmazhatók.

Új, a későbbi alap- és alkalmazott kutatásokban is felhasználható eljárásokat, protokollokat dolgoztunk ki elsősorban a járomspórás gombák genetikai transzformációjára, a karotin termeltetés körülményeire (tenyésztés, fermentáció) és a termelés fokozására vonatkozóan.

Noha a kutatási szerződésben vállalt feladatokat teljesítettük, az eredmények egy részének publikálása áthúzódik a 2008. évre. Ez azért történt, mert eredményeinek szeretnénk nagyobb cikkekben, megfelelően rangos folyóiratban publikálni. Ugyanakkor fontos megemlíteni, hogy az OTKA pályázat keretében megvalósított kutatást – elsősorban a túltermelő mutánsok előállítását és jellemzését – folytatni szándékozunk szélesebb, konzorciális keretek közt. Ehhez segítséget nyújtanak azok a nemzetközi együttműködések, melyek épp a jelen kutatási program megvalósítása során és a támogatás segítségével mélyültek el. Ezek közül is ki kell emelnünk Arturo Perez Eslava professzor (Salamancai Egyetem, Spanyolország) kutatócsoportját, amely a járomspórás gombák (azon belül is a karotinoid bioszintézis) kutatásának egyik legelismertebb csoportja Európában, valamint a járomspórás gombák transzformációjában és filogenetikai kapcsolatainak vizsgálatában szintén elismert Kerstin Voigt által vezetett csoportot (F. Schiller Egyetem, Jéna, Németország).