

**Budapesti Corvinus Egyetem
Élelmiszertudományi Kar
Mikrobiológia és Biotechnológia Tanszék**

Kén-anyagcserében sérült szelenát rezisztens

***Schizosaccharomyces pombe* mutánsok előállítása és vizsgálata**

Doktori értekezés tézisei

Bánszky Luca

Budapest
2004

A doktori iskola

megnevezése: **Élelmiszertudományi Doktori Iskola**

tudományága: **Élelmiszertudományok**

vezetője: **Fekete András, DSc.**
egyetemi tanár
BCE, Élelmiszertudományi Kar,
Fizika - Automatika Tanszék

Témavezető: **habil. Maráz Anna, CSc.**
egyetemi tanár
BCE, Élelmiszertudományi Kar,
Mikrobiológia és Biotechnológia Tanszék

A jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, az értekezés műhelyvitájában elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, azért az értekezés nyilvános vitára bocsátható.

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

1 BEVEZETÉS

1.1 Előzmények

Régóta ismert, hogy a *Schizosaccharomyces pombe* hasadólesztő bizonyos törzsei nagy hatékonysággal bontják az almasavat a malo-etanolos fermentációs úton. A *Schizosaccharomyces pombe* malo-etanolos fermentációja (MEF) a számos nehézséget magában hordozó tejsavbaktériumos malo-laktikus fermentáció (MLF) alternatívája lehetne a biológiai almasavbontásban. Számos tanulmány foglalkozott a *Schiz. pombe* borászati technológiai felhasználásának lehetőségével, de alkalmazása még erősen vitatott. A fermentációs folyamat legnagyobb hátránya a vizsgált törzsek által termelt kellemetlen aromák, köztük H₂S és egyéb kéntartalmú illékony vegyületek (pl. merkaptánok, diszulfidok) megjelenése.

Ez a dolgozat egy olyan törzsjavítási program része, amelynek célkitűzése az volt, hogy a borászat számára optimális tulajdonságokkal bíró élesztőtörzset fejlesszünk, amely kiváló almasavbontó aktivitással, csökkent szulfid (kénhidrogén) termelő képességgel, valamint jó flokkulációs tulajdonságokkal rendelkezik. Kutatócsoportunkban Geleta Anna (1996) *Schiz. pombe* és *Schiz. octosporus* izolátumok között nagy fenotípusos eltéréseket talált, ezeket a törzseket az etanol tolerancia, almasavbontás és kénhidrogén termelés alapján csoportosította, majd jó almasavbontó aktivitással rendelkező flokkulens törzset fejlesztett, amely borban a 12%-os etanol koncentrációt tolerálta, azonban a törzs kénhidrogén termelését nem szabályozták.

A fermentáció során a törzsek által termelt kénhidrogén- és a kéntartalmú kénhidrogén-származékok mennyiségét több tényező is befolyásolja (pl. nitrogén ellátottság és egyébek), de elsősorban az alkalmazott élesztőtörzs kén metabolizmusának genetikai jellemzői, a törzs genetikai hajlama.

Annak ellenére, hogy a *Schiz. pombe* fiziológiájáról és genetikájáról sokat tudunk, kén metabolizmusa még nem tisztázott. A szulfát metabolizmust *Saccharomyces cerevisiae*-nél, valamint néhány fonalas gomba fajnál, mint a *Neurospora crassa* és *Aspergillus nidulans*, már behatóan tanulmányozták.

A szulfát, amely sok szervezet számára a legfontosabb kénforrás, specifikus transzport rendszer segítségével jut a sejtbe. A sejten belüli akkumulációt követően a szulfát asszimilációs anyagcsereúton enzimatis reakciókkal szulfiddá redukálódik majd beépül a

szerves vegyületekbe. Az élesztőgombában a szulfát asszimilációs anyagcsereút a szulfát anion két lépésben történő aktiválásával kezdődik: először az ATP adenozil-foszforil gyöke a szulfáthoz kapcsolódik és adenilil szulfát (APS = 5'-adenozin-foszfo-szulfát) keletkezik, amely azután foszforilálódik és foszfoadenilil szulfát (PAPS = 3'-foszfo-adenozin-5'-foszfoszulfát) keletkezik. A két lépést sorra az ATP szulfuriláz és az APS kináz enzimek katalizálják. A cisztein és metionin bioszintéziséhez az aktivált szulfát először a PAPS reduktáz enzim hatására szulfittá redukálódik, amely azután a szulfít reduktáz segítségével tovább redukálódik szulfiddá. A folyamat végén a redukált kénatom képes a megfelelő szénláncokba beépülni.

A *S. cerevisiae* és az *Asp. nidulans* gombákkal ellentétben a *Schiz. pombe* élesztőben két enzim – a cisztationin β -szintáz és a cisztationin γ -liáz – aktivitása hiányzik a metionintól a cisztein felé vezető reverz transz-szulfurilációs anyagcsereútban (Brzywczy and Paszewski, 2002). Ennek következtében a *Schiz. pombe* a metionint közvetlenül nem metabolizálja ciszteinné, így a metionin nem egy hatékony kénforrás e gombafaj számára.

A szelenát a szulfát toxikus analógja, sejbe való transzportja és metabolizmusa a szulfát anyagcseréhez kötődik. Arst (1968) azt találta, hogy bizonyos szulfátot nem hasznosító *Asp. nidulans* mutánsok párhuzamosan erős szelenát rezisztenciával jellemezhetők. Ezek a mutánsok két genetikai komplementációs csoportba tertoztak: *sB* és *sC*. Az *sB* gén a szulfát permeáz, az *sC* pedig az ATP szulfuriláz enzimet kódolja. Az *sB* mutánsok kromát rezisztens fenotípusúak, míg az *sC* mutánsok a kromáttal szemben ugyanolyan érzékenységek voltak, mint a vad típusú sejtek. A PAPS reduktáz enzimben sérült mutánsok kisebb mértékű szelenát toleranciát mutattak, az APS kináz sérülése pedig szelenát hiperszenzitivitással járt együtt. Breton és Surdin-Kerjan (1977) szelenát- és kromát rezisztens *S. cerevisiae* mutánsokat izoláltak és tanulmányoztak. A szulfát redukciós anyagcsereútban szereplő első három enzim bármelyikének mutációja szelenát rezisztenciát okozott, de az ATP szulfurilázban sérült mutánsok 20-50-szer magasabb szelenát koncentrációt toleráltak, mint az APS kináz vagy PAPS reduktáz aktivitásában gátolt mutánsok.

1.2 Célkitűzések

- *Schizosaccharomyces* nemzetséghez tartozó élesztő izolátumok molekuláris jellemzése RAPD-PCR (Random Amplified Polimorphic DNA) és rDNS RFLP ("ribotipizálás" / Restriction Fragment Length Polymorphism of Amplified rDNA sequences) analízis

segítségével, valamint annak vizsgálata, hogy a törzsek Geleta (1996) által korábban tanulmányozott élettani jellemzői (almasav-bontás, szaporodási ráta, H₂S-termelés) mennyiben korrelálnak a molekuláris "ujjlenyomatok" eredményeivel

- a szulfát metabolizmus vizsgálata *Schiz. pombe*-ban a szulfát asszimilációs anyagcsereúton sérült szelenát rezisztens mutánsok indukciója, izolálása és analízise által
- H₂S-t nem termelő, megfelelő almasavbontó aktivitással rendelkező *Schiz. pombe* törzs szelektálása borászati alkalmazás céljára

2 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

2.1 Törzsek

A munka során autentikus *Schiz. pombe* törzseket (L.972 h⁻ = CBS 7264, L.975 h⁺ = CBS 7265) és azok auxotróf mutánsait (0-82 h⁻ *ade5*, 0-44 h⁻ *arg4*, h⁺ *leu1*, h⁺ *lys1*, stb.) használtam, valamint különböző gyűjteményekből származó *Schizosaccharomyces* törzseket, amelyek többnyire mustból illetve borból származó izolátumok. A B573, B578, B579 törzseket kéndioxiddal tartósított mustból izolálták.

2.2 Táptalajok

Az élesztőtörzseket komplett táptalajban (YEPD: 1% glükóz, 0.5% élesztőkivonat, 0.5% pepton), vagy minimál táptalajban (1% glükóz, 0.5% (NH₄)₂SO₄, 0.1% KH₂PO₄, 0.05% MgSO₄·7H₂O, 1 ml/L Wickerham vitaminoldat) tenyésztetem az esetenként szükséges kiegészítésekkel (pl. megfelelő aminosavak). A *szulfátmentes minimál táptalaj* összetétele: 1% glükóz, 0.5% NH₄Cl, 0.1% KH₂PO₄, 0.05% MgCl₂·H₂O. Az ivaros hibridizációt *YED tápagaron* (1% glükóz, 0.5% élesztőkivonat, 2% agar), illetve *SPA agarlemezen* (0.1% KH₂PO₄, 1% glükóz, 1 ml/L Wickerham vitaminoldat, 2% agar) indukáltam.

2.3 A kísérleti módszerek rövid ismertetése

DNS izolálást Hoffman and Winston (1987) publikált módszere alapján végeztem.

RAPD-PCR analízishez 4 random primert (P1, P2, P3, P4) alkalmaztam, amelyek eltérő GC mol%-kal rendelkeztek és különböző optimális annealing hőmérséklettel jellemezhetők ($t_{opt_{AN}} = 36 - 42^{\circ}\text{C}$). A PCR reakció termoparaméterei a következők voltak: elődenaturáció 94°C-on 5 perc, 35 ismétlődő ciklus: 94°C-on 30 másodperc, $t_{opt_{AN}}$ -on 45 másodperc, 72°C-on 45 másodperc, majd a ciklusok után a végső lánchosszabbítás 72°C-on 7 perc.

Az rDNS szekvencia RFLP analízise ("ribotipizálás") során a specifikus ITS4 és NS1 (White et al., 1990) primer-pár alkalmazásával amplifikált rDNS szakasz tartalmazta a teljes

nukleáris (magi) kis rDNS-t, az 5.8S rDNS-t, két ITS régiót és egy kis darabot a nukleáris (magi) nagy rDNS-t génből. Az amlifikált DNS szakasz restriktációs emésztését 4 endonukleázzal - *Hae* III, *Msp* I, *Scrf* I és *Sau* 3AI – végeztem.

A RAPD-PCR analízis során amplifikált illetve a ribotipizálásnál amplifikált majd hasított DNS fragmentumokat agaróz gélen elektroforézissel szeparáltam, etidium-bromiddal festettem és UV fényben vizualizáltam. A géleképek értékeléséhez és a dendogramok készítéséhez a “Molecular Analyst Fingerprint” (BIO-RAD) szoftvert használtam.

Mutagén kezeléseket többféle módon végeztem: *UV besugárzással* (10^7 sejt/ml sűrűségű sejtuszpenziót Petri csészében) illetve kémiai mutagének használatával: 25 µg/ml *N-metil-N'-nitro-N-nitrozoguanidin (MNNG)* vagy 30 mg/ml *etil-metán-szulfonát (EMS)* oldatban kezelve a sejteket. A kémiai mutagéneket $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ oldattal inaktiváltam. Az 5-10%-os túléléshez tartozó mutagéndózissal indukáltam a mutációt.

A *szenenát rezisztens mutánsok izolálását* 0.4 mM nátrium-szenenát tartalmú YEPD komplett táptalajon végeztem. A nátrium-szenenát minimális gátló koncentrációja (MIC): 0,1-0,2 mM volt a különböző törzseknél.

A *mutánsok szulfát hasznosítási képességét* kénforrásként egyedül 0,5% ammónium-szulfátot tartalmazó minimál táptalajon való növekedési képességük alapján határoztam meg. Pozitív kontrollként a 0,01% ciszteint - mint általánosan jól hasznosítható kénforrást - tartalmazó minimál táptalajt alkalmaztam.

A *szenenát rezisztens mutánsok kromát rezisztenciáját* 2,5 ill. 3,0 és 3,5 mM K_2CrO_4 koncentrációjú YEPD táptalajon való növekedéssel teszteltem. (K_2CrO_4 MIC értéke: 2.5 mM volt).

A *szenenát rezisztens, szulfátot nem hasznosító mutánsok komplementációját ivaros hibridizációval* vizsgáltam, amelyben a komplementáló auxotrófia mutációkat hordozó, ellentétes mating típusú törzseket kereszteztem.

A *sejtek szulfát transzportját* radioaktívan jelölt ^{35}S -tartalmú szulfát felvételével követtem. A radioaktivitást Packard szcintillációs berendezéssel mértem.

A *különböző kénforrás hasznosítási vizsgálatokban* a törzsek szaporodását mértem szervetlen (szulfát, tioszulfát, szulfid) és szerves (glutathion, cisztein, metionin) kénvegyületek jelenlétében.

Az *almasavtartalmat* enzimes UV teszt (Boehringer-Mannheim) segítségével határoztam meg.

A *sejtek kénhidrogén termelését* egyrészt egy szemikvantitatív módszerrel (ólom-acetáttal átitatott papírcsíkok feketedésének vizsgálatával), másrészt egy precíz analitikai

módszerrel mértem, amelyben a felszabadult H₂S-t kadmium-hidroxid csapdába vezettem, majd egy kék színreakcióba vittem (Jiranek et al., 1995). A színintenzitás arányos az elnyelt H₂S mennyiségével.

Erjedési aromaspektrumok gyors összehasonlítására szilárd fázisú mikroextrakciós (SPME) mintavételt alkalmaztunk egy PDMS (polidimetil-sziloxán) apoláris szálon. Az illékony aromakomponensek szeparálását és meghatározását GC-MS eljárással végeztük.

3 EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

A *Schiz. pombe* és *Schiz. octosporus* törzsek RAPD-PCR analízise során két nagy, egymással csupán 30%-os hasonlóságot mutató csoport különült el, amelyek megfelelnek a két fajnak. A *Schiz. pombe* fajon belül a törzsek két nagy klasztert – "A" és "B" csoport – alkottak, illetve 2 törzs egyedi, eltérő mintázatot mutatott. A RAPD mintázat alapján a kénezett mustból izolált három *Schiz. pombe* törzs (B 573, B 578, B 579) teljesen azonosnak tűnt. Ez az eredmény korrelált egyéb fiziológiai jellemzőik hasonlóságával: jó almasavbontási ráta, rövid generációs idő és kiváló etanol tolerancia. Az erős almasav-bontó törzsek a RAPD-B csoportba tartoznak és ezen csoporton belül is 89%-os hasonlóságot mutatnak. A gyengébb almasavbontásra képes törzsek az A csoportba esnek, illetve az eltérő mintázatú két *Schiz. pombe* törzs almasav degradációja is igen gyenge.

Az rDNS szekvencia RFLP analízise három jól elkülönülő klasztert eredményezett, amelyek megfeleltek a nemzetség jelenleg elfogadott három fájának. Az *ScrI* és *MspI* enzimekkel kapott restrikciós mintázat csak a *Schiz. japonicus* törzsek elkülönítését tette lehetővé a többi *Schizosaccharomyces* fajtól, míg a *HaeIII* és *Sau3AI* restrikciós enzimek a *Schiz. pombe* és *Schiz. octosporus* fajoknál is eltérő mintázatot adtak. Fajon belül a ribotípus vizsgálat semmiféle különbséget nem mutatott, az eljárás tehát a *Schizosaccharomyces* nemzetségen belül fajok közti differenciálásra alkalmas. A *Schiz. pombe* fajon belül korábban nyilvántartott változatok (alfajok: *var. pombe* és *var. malidevorans*) nem különültek el egymástól a klaszter-analízis során.

Számos, a kén anyagcsere tekintetében vad típusú prototróf és aminosav auxotróf *Schiz. pombe* törzsből UV besugárzással illetve MNNG- és EMS-kezeléssel *szelenát rezisztens mutáns törzseket indukáltam és izoláltam* 0,4 mM nátrium-szelenát tartalmú YEPD táptalajon. A mutánsok rezisztencia mutációja stabil volt és a nátrium-szelenát MIC érték 50-200-

szorosát tolerálták. A rezisztencia kialakulása minden izolált *Schiz. pombe* mutáns esetében együtt járt a szulfát-hasznosítás képességének elvesztésével. Eszerint a mutáció a szulfát asszimilációs anyagcsereútban történt – hasonlóan a szelenát rezisztens *Asp. nidulans* (Arst, 1968), *S. cerevisiae* (Breton és Surdin-Kerjan, 1977) és *Asp. fumigatus* (De Lucas et al., 2001) törzsekhez.

A szelenát rezisztens mutánsok komplementációs analízisét egymás auxotrófia mutációit ”kioltó” és ellentétes mating típusú (h^+ és h^-) törzsek ivaros hibridizációjával végeztem. A genetikai komplementáció lejátszódott, kénforrásként ciszteint tartalmazó táptalajon prototróf hibrideket izoláltam minden keresztezésből, azonban a szulfátot a mutánsok hibridjei sem hasznosították, nem komplementálták egymás szelenát-rezisztencia mutációját. Az eredmény arra utal, hogy a vizsgált mutánsok a szulfát asszimilációs anyagcsereút azonos génjében sérültek.

A mutánsok kromát érzékenysége (toleranciája) nem változott a vad törzsekéhez képest. Ez az eredmény a következő lehetőségekre engedett következtetni: az általam izolált mutánsok esetében a sérülés nem a szulfát-permeáz kódoló génben történt (hasonlóan az *Asp. nidulans* sC⁻ mutánsokhoz), vagy a *Schiz. pombe* több kromát-permeázzal rendelkezik.

További kísérleteim során ³⁵S-szulfát felvételét vizsgáltam 2-2 vad (B 579 és 0-82) és szelenát rezisztens mutáns (B 579 Se^R-2 és 0-82 Se^R-2) törzs esetében. Azt tapasztaltam, hogy az 1 órás inkubációt követően szignifikáns különbség adódik a rezisztens mutánsok és a vad típusú sejtek szulfát felvételében: a B 579 Se^R-2 és a 0-82 Se^R-2 mutáns törzsek szulfát akkumulációja 54 illetve 20%-os a megfelelő B 579 és 0-82 vad törzsekéhez viszonyítva.

Ezután megvizsgáltam, hogy a rezisztens mutánsok esetében nem az extracelluláris akkumulációt (a sejtfaon adszorbeálódott szulfát mennyiségét) mérjük-e. A jelzett szulfát bemérését megelőzően mertioláttal - egy nem specifikus metabolikus inhibitorral – kezeltem a sejteket. Az 50 µg/ml koncentrációban mertioláttal kezelt mintáknál a vad- és a rezisztens mutáns törzsnél is teljes gátlást tapasztaltam. Ebből arra következtettünk, hogy a rezisztens mutánsok esetében mért csökkent szulfát akkumuláció egy csökkent mértékű intracelluláris akkumuláció, és permeáz által közvetített szulfát transzport létezésére utal a *Schiz. pombe* esetében. Ha a szulfáttól a szulfitig tartó redukciós anyagcsereút lépéseit katalizáló enzimek aktivitása a mutáció következtében nem változott, akkor a szelenát rezisztens mutánsok csökkent mértékű szulfát felvétele a szulfáton való szaporodást lehetővé tenné. Mivel azonban a mutáns törzsek egyike sem volt képes egyedüli kén-forrásként a szulfátot hasznosítani, ezért arra kell következtetnünk, hogy a csökkent szulfát felvétel nem a szulfát-permeáz gén ”leaky” mutációjának tulajdonítható, vagy esetlegesen a *Schiz. pombe*-ban is jelenlévő több szulfát-

permeáz egyikének az inaktivációja miatt tapasztalható. Sokkal valószínűbb, hogy a mutáció következtében a sejten belül a szulfát aktiválásáért felelős ATP-szulfuriláz, a keletkező APS foszforilálásáért felelős APS-kináz vagy a keletkező PAPS redukciójáért felelős PAPS-reduktáz enzimet kódoló gén inaktiválódott (Bánszky et al., 2003). A szulfitig tartó redukció elmaradása következtében a szulfát az intracelluláris térben felhalmozódik és gátolja a további transzport folyamatot, ahogyan azt a *S. cerevisiae* esetében is tapasztalták (Logan és tsai, 1996).

A mutánsok szerves és szervetlen kénforrás asszimilációját tekintve azt tapasztaltam, hogy a vad törzsek nagyon jól szaporodtak 250 µg/ml szulfát tartalmú táptalajon. A rezisztens mutánsok, ahogyan már említettem, nem képesek egyedüli kénforrásként szulfáton növekedni. Azonban a másik két szervetlen kénforrást, a tioszulfátot és a szulfidot továbbra is fel tudták használni a vad törzsekhez hasonló mértékben. A szerves kénvegyületek (glutathion, ciszteín és metionin) jelenlétében a vad törzsek jól szaporodtak, de a glutathion illetve ciszteín alapvetően jobban hasznosítható kénforrásnak bizonyult a *Schiz. pombe* törzsek számára, mint a metionin. Ez a megfigyelés összhangban van Brzywczy és Paszewski (1994) azon eredményeivel, amelyekben *Schiz. pombe*-ban a metionintól a ciszteín felé vezető reverz transz-szulfurilációs anyagcsereút hiányát mutatták ki. Érdekes módon a szelenát rezisztens mutánsok elvesztették metionin hasznosítási képességüket, ezzel azt jelezve, hogy a metionin kénatomjának szerves vegyületekbe való beépülése elsősorban a szulfát asszimilációs anyagcsereúton keresztül történik. Nagyon valószínű, hogy a metionin SH- csoportja a *Schiz. pombe*-ban egy degradációs úton szulfáttá oxidálódik, ahogyan azt *S. cerevisiae* esetében a glutathionnál is kimutatták (Miyake et al., 1999). Ez a szulfát "készlet" az egyedüli kénforrás abban az esetben, amikor kénforrásként csak metionin áll a sejtek rendelkezésére, amit a szelenát rezisztens törzsek a szulfát – szulfid redukció hiánya miatt nem tudnak hasznosítani.

A törzsek kénforrás asszimilációja azonos volt nem csak az izogenikus törzsek esetében (pl. L.972 és L.975 és ezek auxotróf mutánsainál), hanem az egyéb forrásokból származó törzsekben is. Ez azt mutatja, hogy a szulfát asszimiláció metabolikus útjai és a metionin beépülésének anyagcsereútjai a *Schiz. pombe* fajon belül egységesek.

A mutánsok borászati szempontból fontos tulajdonságait tekintve kimutattam, hogy a vizsgált szelenát rezisztens törzsek (B 579 Se^R-2 és 0-82 Se^R-2) H₂S termelése nem detektálható, míg a szelenát szenzitív vad típusú sejtek nagy mennyiségű szulfidot termeltek komplett táplevesben, mustban és borban. A mutánsok almasavbontó képessége nem változott és a fermentációs aroma spektrumuk is hasonló volt a vad törzsekéhez. Az említett

mutánsokkal végzett malo-etanolos fermentáció után a kezelt borok organoleptikus vizsgálatával megállapítottuk, hogy a mutánsok a bor savasságát csökkentették, míg kellemetlen mennyiségű idegen aromát és kén-hidrogént nem termeltek.

4 ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

- (1) A PCR alapú molekuláris genotipizálással megállapítottam, hogy a *Schiz. pombe* fajon belül különböző RAPD-csoportok (klaszterek) határolódnak el egymástól, amelyek a törzsek bizonyos fenotípusos tulajdonságaival (pl. almasavbontási képesség) korrelálnak. Az *Schiz. octosporus* törzsek fenotípusos tulajdonságaikban megnyilvánuló eltéréseiknek megfelelően a RAPD-PCR analízis alapján is nagyon kismértékű hasonlóságot (30%) mutatnak a *Schiz. pombe* törzsekkel.
- (2) Az rDNS RFLP-n alapuló molekuláris identifikálással a *Schizosaccharomyces* nemzetség jelenleg elfogadott mindhárom faja identifikálható, de a vizsgálat fajon belül a törzsek között nem mutatott ki különbségeket. A restriktációs hasítóhelyek összehasonlítása alapján a *Schiz. pombe* és a *Schiz. octosporus* fajok genetikailag közelebb állnak egymáshoz, mint a *Schiz. japonicus* fajhoz.
- (3) Sikeresen indukáltam és izoláltam elsőként számos szelenát rezisztens, szulfátot nem hasznosító *Schiz. pombe* mutáns törzset. A mutáció stabil volt és a mutánsok a nátrium-szelenát MIC érték 50-200-szorosát tolerálták.
- (4) Megállapítottam, hogy az izolált mutánsok egy genetikai komplementációs csoportba tartoznak. Eredményeim alapján arra következtettem, hogy a *Schiz. pombe* szulfát transzport folyamatát permeáz irányítja. A mutáció következtében nem a transzport folyamat sérült, hanem a szulfát asszimilációs anyagcsereútban az ATP-szulfuriláz, az APS-kináz, vagy a PAPS-reduktáz enzimeket kódoló gének valamelyike.
- (5) A szelenát rezisztens mutáns törzsek a metionint nem képesek hasznosítani. Ebből arra következtettem, hogy *Schiz. pombe*-ban a metionin kénatomjának beépülése egyéb szerves vegyületekbe a szulfát redukciós anyagcsereúthoz kötött.
- (6) A szulfát asszimilációs út sérülése pozitív hatással volt a *Schiz. pombe* törzsek káros kéntartalmú aroma termelésére, mivel a B579 Se^R-2 és a 0-82 Se^R-2 mutáns törzsek kén-hidrogén termelése analitikai vizsgálatokban nem volt detektálható, ugyanakkor jó almasavbontó képességük és erjedési aromaszpektrumuk nem változott hátrányosan a vad törzsekéhez képest.

5 AZ EREDMÉNYEK FEJLESZTÉSI ÉS HASZNOSÍTÁSI ÉS LEHETŐSÉGEI

- Az eredmények fejlesztése tekintetében a mutánsoknál érdemes lenne a sérült gént azonosítani, a mutáció pontos helyét meghatározni.
- A *Schiz. pombe* fajnál a transz-szulfurilációs anyagcsereút két enzimének hiányában nincs lehetőség a metionin közvetlen ciszteinné alakulására. A megfelelő anyagcsere további kutatása egy pontosabb képet adna a metionin metabolikus útjáról *Schiz. pombe*-ban.
- A eredmények alapján megállapítottam, hogy a tesztelt szelenát rezisztens mutáns törzsek alkalmazhatóak lennének biológiai almasavbontásra, mivel az almasavat jól bontották mustban és borban, valamint nem termeltek sem műszeres méréssel, sem pedig érzékszervi minősítéssel detektálható mennyiségű kénhidrogént
- A malo-etanolos savcsökkentés technológiai műveletének szempontjából elsősorban a szükséges sejttömeg megfelelő felszaporításának kivitelezése, valamint az almasavbontást követően a sejtek fermentációs közegből való gyors és költséghatékony eltávolítása vizsgálandó. Utóbbi szempontból érdemes lenne tesztelni a mutáns sejtek immobilizálásának lehetőségét, vagy költségcsökkentés céljából a *Schiz. pombe* flokkulációs tulajdonságát kihasználni. Ajánlatos lenne borászati célra egy megfelelő ipari törzs fejlesztése, szelenát rezisztens (kénhidrogént nem termelő), jó almasavbontó törzs illetve flokkulens törzs keresztezésével.

6 TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK

Impakt faktoros folyóiratcikkek

Bánszky, L., Simonics, T. and Maráz, A. (2003) Sulphate metabolism of selenate-resistant *Schizosaccharomyces pombe* mutants. J. Gen. Appl. Microbiol., **49**, 271-278

Raspor, P., Fujs, S., **Bánszky, L.**, Maráz, A. and Batic, M. (2003) The involvement of ATP sulfurylase in Se(VI) and Cr(VI) reduction processes in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Appl. Microbiol. Biotechnol., **63**, 89-95

Tóth-Markus, M., Magyar, I., Kardos, K., **Bánszky, L.** and Maráz, A. (2002) Study of tokaji aszú wine flavour by solid phase microextraction method. Acta Aliment., **31**, 343-354

Impakt faktor nélküli folyóiratcikkek

Simonics, T., **Bánszky, L.** and Maráz, A. (2002) Genetics of sulphate assimilation in *Schizosaccharomyces pombe*. Acta Microbiol. Immun. Hung., **49**, 279-283

Simonics Tibor, **Bánszky Luca**, Maráz Anna (2001) A *Schizosaccharomyces pombe* élesztőgomba kénmetabolizmusának genetikai vizsgálata. Rodosz-tanulmányok, II, 91-101

Konferencia kiadványok nemzetközi konferenciákról (angol nyelvű összefoglaló)

Bánszky, L., and Maráz, A. (1999) Characterization of strains belonging to the *Schizosaccharomyces* genus by RAPD fingerprinting and ribotyping. 13th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Budapest

(Abstract:

Bánszky, L. and Maráz, A. (2000) Characterization of strains belonging to the *Schizosaccharomyces* genus by RAPD fingerprinting and ribotyping. Acta Microbiol. Immun. Hung. **47**, 338)

Maráz Anna, Simonics Tibor, **Bánszky Luca**, Geleta Anna (2002) Development of fission yeast strains for wine deacidification. Yeast in food processing-tradition and future. Wroclaw (Lengyelország)

Maráz Anna, **Bánszky Luca**, Simonics Tibor, Geleta Anna (2002) Potential application of fission yeast in biotechnology. Power of microbes in industry and environment, Opatija (Horvátország)

Simonics Tibor, **Bánszky Luca**, Maráz Anna (2002) Molecular and physiological characterization of selenate resistant mutant strains of *Schizosaccharomyces pombe*. Power of microbes in industry and environment, Opatija (Horvátország)

Simonics Tibor, **Bánszky Luca**, Maráz Anna (2002) Cloning and functional analysis of ATP-sulphurylase gene of *Schizosaccharomyces pombe*. IUMS konferencia, Párizs

Bánszky L., Ujhelyi, G., Pomázi, A., and Maráz A. (2003) Population dynamics of *Candida stellata* during botrytized wine fermentation. ISSY, Budapest

Konferencia kiadványok magyar konferenciákról (angol nyelvű összefoglaló)

Bánszky, L. and Maráz, A. (1996) Szelenát rezisztens *Schizosaccharomyces pombe* mutánsok indukciója és analízise. Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Nyíregyháza

(Abstract:

Bánszky, L. and Maráz, A. (1997) Induction and analysis of selenate-resistant mutants of *Schizosaccharomyces pombe*. Acta Microbiol. Immun. Hung., **44**, 63-64)

Bánszky, L., Geleta, A., Podgornik, A., Raspor, P. and Maráz, A. (1997) A sejtfelületi molekulák szerepe a *Schizosaccharomyces pombe* RIVE 4-2-1 törzs flokkulációjában. Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Szekszárd

(Abstract:

- Bánszky, L.**, Geleta, A., Podgornik, A., Raspor, P. and Maráz, A. (1997) The role of cell surface molecules in the flocculation of *Schizosaccharomyces pombe* RIVE 4-2-1 strain. *Acta Microbiol. Immun. Hung.*, **44**, 412-413)
- Bánszky, L.**, and Maráz, A. (1998) Szelenát-rezisztens *Schizosaccharomyces pombe* mutánsok ³⁵S-szulfát felvétele. Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Miskolc
(Abstract:
Bánszky, L. and Maráz, A. (1999) S³⁵-sulphate uptake of selenate-resistant *Schizosaccharomyces pombe* mutants. *Acta Microbiol. Immun. Hung.* **46**, 142-143)
- Bánszky, L.**, and Maráz, A. (1998) Szelenát-rezisztens *Schizosaccharomyces pombe* mutánsok indukciója. Lippay-Vas Nemzetközi Kertészeti, Tájépítészeti és Élelmiszertudományi Szimpózium, Budapest
(Abstract:
Bánszky, L. and Maráz, A. (1998) Induction of *Schizosaccharomyces pombe* selenate-resistant mutants and the analysis of their S³⁵-sulphate uptake. Lippay-Vas Intern. Sci. Symposium, Budapest. Abstracts, p.179)
- Tóth-Markus, M., Magyar, I., Maráz, A., Kardos, K. and **Bánszky, L.** (2001) Study of Tokaji Aszu Wine Flavour by SPME Technique. Balaton Symposium, High Performance Separation Methods, Siófok
- Bánszky L.**, Capece, A., Pomázi, A., Magyar, I. and Maráz A. (2002) Aszuber erjesztésében résztvevő élesztőgombák populációdinamikájának vizsgálata. Magyar Mikológiai Konferencia, Szeged
- Simonics Tibor, **Bánszky Luca**, Maráz Anna (2002) A *Schizosaccharomyces pombe* szulfát hasznosításának genetikai vizsgálata. A Magyar Mikológiai Társaság II. konferenciája, Szeged
- Simonics Tibor, **Bánszky Luca**, Maráz Anna, Magyar Ildikó, Tóth-Márkus Mariann (2002) Szulfát hasznosításban sérült *Schizosaccharomyces pombe* mutánsok malotanolos fermentációjának vizsgálata. A Magyar Mikrobiológiai Társaság éves közgyűlése, Balatonfüred

Elektronikus folyóiratcikkek

- Lopandic, K., Zelger, S., **Bánszky, L. K.**, Eliskases-Lechner, F. and Prillinger, H. (2001) Phenotypic and genotypic identification of yeasts from milk products. *Forum Life Science Austria*. BOKU, Wien, p.1-5