

XXXI. OTDK Biológia Szekció
2013

**TÖBBSZÖRÖSEN TELÍTETLEN ZSÍRSAVAKAT TERMELŐ
MORTIERELLA FAJOK FILOGENETIKAI ÉS FIZIOLÓGIAI
VIZSGÁLATA**

Kovács Aranka Stella
Biológus MSc
1. évfolyam

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR
MIKROBIOLÓGIAI TANSZÉK



Témavezetők: Dr. Nyilasi Ildikó, Tudományos munkatárs
Dr. Papp Tamás, Egyetemi docens

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	3
2. BEVEZETÉS	4
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	5
3.1. A járomspórás gombák általános jellemzése és rendszerezésük áttekintése	5
3.2. A <i>Mortierellales</i> rend általános jellemzése és rendszerezésük áttekintése....	6
3.3. A többszörösen telítetlen zsírsavak és egészségben betöltött szerepük.....	8
3.4. Mikrobiális zsírsavtermelés	10
3.4.1. A mikrobiális zsírsavtermelés előnyei	10
3.4.2. <i>Mortierella</i> fajok, mint alternatív zsírsavforrások	10
3.5. Többszörösen telítetlen zsírsavak bioszintézise <i>Mortierella</i> fajokban	11
4. CÉLKITŰZÉSEK	14
5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	15
5.1. Felhasznált gombatörzsek.....	15
5.2. Tenyésztési körülmények	15
5.3. Felhasznált anyagok	15
5.3.1. Alkalmazott szénforrások	15
5.3.2. HPLC analízisnél alkalmazott standardok	16
5.4. Alkalmazott módszerek.....	16
5.4.1. A szénforrás-hasznosítás vizsgálata	16
5.4.2. Genomi DNS kivonás	16
5.4.3. A 18S riboszómális DNS régió felszaporítása	17
5.4.4. DNS gélelektroforézis	17
5.4.5. Az SSU szekvenciák filogenetikai analízise.....	17
5.4.6. Zsírsavkivonás	18
5.4.7. HPLC analízis	19
5.4.7.1. Származékképzés.....	19
5.4.7.2. Referencia standardok előkészítésének kalibrációja	19
5.4.7.3. Folyadékkromatográfia (HPLC) paraméterek	19
5.4.8. A $\Delta 9$ deszaturáz gén felszaporítása.....	20
5.4.9. DNS izolálása gélből	21
5.4.10. DNS fragmentumok klónozása.....	21
5.4.11. Kompetens <i>Escherichia coli</i> sejtek készítése	21
5.4.12. <i>E. coli</i> sejtek transzformációja	21
5.4.13. Plazmid DNS tisztítás	22
5.4.14. A $\Delta 9$ deszaturáz szekvenciák elemzése	22
6. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK.....	23
6.1. Filogenetikai vizsgálatok.....	23
6.2. Szénforrás-hasznosítás vizsgálata	25
6.2.1. Szénasszimilációs spektrumok felvétele és kiértékelése.....	25
6.2.2. A szénasszimilációs profil fajon belüli variabilitásának vizsgálata	27
6.3. A zsírsavtermelés és a zsírsav-bioszintézis vizsgálata	29
6.3.1. A zsírsavtermelés vizsgálata a <i>Mortierellales</i> rend izolátumainál.....	29
6.3.2. A $\Delta 9$ deszaturáz gén azonosítása <i>Mortierella</i> izolátumokban	31
7. ÖSSZEFOGLALÁS	34
8. IRODALOMJEGYZÉK.....	36
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	42
10. MELLÉKLETEK.....	43
11. NYILATKOZAT	58

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AA	arachidonsav
ALA	α -linolénsav
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures, The Netherlands
DGLA	dihomo- γ -linolénsav
DHA	dokozahexaénsav
DPA	dokozapentaénsav
EPA	eikozapentaénsav
ETA	eikozatetraénsav
FSU	Friedrich Schiller University, Jena
GLA	γ -linolénsav
ITS	Internal Transcribed Spacer
LA	linolsav
MEA	Malt extract agar (malátás táptalaj)
ML	Maximum Likelihood
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NRRL	Agricultural Research Service Culture Collection, USA
nrLSU	nukleáris riboszómális RNS (28S) nagy alegység
nrSSU	nukleáris riboszómális RNS (18S) kis alegység
OA	olajsav
P	palmitinsav
PCR	polimeráz láncreakció
PUFA	Polyunsaturated Fatty Acid (többszörösen telítetlen zsírsav)
rDNS	riboszómális DNS
<i>rpb1</i>	RNS polimeráz b alegység
RPM	percenkénti fordulatszám
SZMC	Szeged Microbial Collection, Hungary
<i>tef</i>	transzlációs elongációs faktor
YNB	Yeast nitrogen base (élesztő nitrogénforrás)

2. BEVEZETÉS

A Mortierellales rend a járomspórás gombák egyik klasszikus csoportja, ezen belül a *Mortierella* a legnagyobb fajszámmal rendelkező nemzetsége. Az ide tartozó fonalas gombák kozmopolita, szaprotróf szervezetek. Micéliumuk magas lipidtartalma miatt az olajtermelő organizmusok közt tartják számon őket. Ezt kihasználva egyes képviselőiket (pl. *Mortierella alpina*) többszörösen telítetlen zsírsavak (pl. arachidonsav) termeltetésére használják az iparban.

Gyakorlati és ökológiai jelentőségük ellenére rendszertanuk meglehetősen elhanyagolt és szinte kizárólag morfológiai bélyegeken – elsősorban az aszexuális szaporító képletek vizsgálatán – alapul. Mivel a fajok laboratóriumban a hosszú tárolás alatt elveszíthetik spórázó képességüket pontos, csak morfológiai bélyegek alapján történő meghatározásuk problémás. Az utóbbi évek molekuláris filogenetikai vizsgálataiban ugyan tanulmányozták a járomspórás gombák magasabb szintű kapcsolatait, de a vizsgálatok kevés *Mortierella* izolátum bevonásával történtek és nem terjedtek ki a Mortierellales renden belüli filogenetikai viszonyok tisztázására.

Az ipari zsírsavtermelésben alkalmazott *Mo. alpina*-val meglehetősen sok tanulmány foglalkozott. Vizsgálták a különböző *Mo. alpina* törzsek zsírsavtermelését, mutánsok segítségével feltárták a zsírsav-bioszintézis egyes enzimatis lépéseit, illetve azonosították az enzimeket kódoló géneket. Néhány faj (pl. *Umbelopsis isabellina*) zsírsavtermelését szintén tanulmányozták, azonban a *Mortierella* nemzetség többi tagjának zsírsavprofiljáról, illetve a termelés hátterében álló bioszintetikus folyamatokról nagyon kevés információval rendelkezünk.

Munkánk célja az volt, hogy az egész nemzetségre kiterjedő fiziológiai és molekuláris vizsgálatok segítségével tisztázzuk a *Mortierella* nemzetség filogenetikai helyzetét, valamint a Mortierellales rend többi nemzetségéhez fűződő viszonyát. Továbbá célul tűztük ki a *Mortierella* és rokon nemzetségek zsírsavtermelésének vizsgálatát, további telítetlen zsírsavtermelő törzsek azonosítását, illetve a zsírsavtermelés diverzitásának tanulmányozását a Mortierellales renden belül. Terveink közt szerepelt a zsírsav-bioszintézisben résztvevő $\Delta 9$ deszaturáz enzimet kódoló gén azonosítása is a zsírsavtermelő izolátumokban.

Kulcsszavak: *Mortierella*, $\Delta 9$ deszaturáz, nrSSU, filogenetika, szénforrás-hasznosítás, többszörösen telítetlen zsírsavak.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. A járomspórás gombák általános jellemzése és rendszerezésük áttekintése

A járomspórás gombák elnevezés a valódi gombák (Eumycota), azon belül pedig a szárazföldi gombák egyik nagy csoportját jelöli. Nevüket az ivaros szaporodásuk során keletkező spóra (zigospóra vagy járomspóra) jellegzetes alakjáról kapták. Ismertebb nemzetségeik, melyeket gyakorlati és élettani hatásaik alapján többször vizsgáltak: *Absidia*, *Gilbertella*, *Micromucor*, *Mucor*, *Mortierella*, *Phycomyces*, *Rhizomucor* és *Rhizopus*. Többségük szaprotróf életmódot folytat (pl. *Mortierellales* és *Kickxellales*). Sejtfaluk fő építőeleme a kitin és kitozán. Vegetatív telepük jól fejlett, intenzív növekedésük miatt nagy tömegű hifaképzésre képesek. Micéliumuk általában cönocitikus vagy szabálytalanul szeptált. Ivartalan szaporodásuk során a micéliumokról nyeles sporangiumok differenciálódnak, az ezekben képződő sporangiospórák passzívan terjedő aplanospórák (Benjamin, 1979; Benny és mtsi., 2001). Megfelelő környezeti körülmények között és kompatibilis partner esetén ivarosán is képesek szaporodni.

A járomspórás gombák felhasználása számos területen kiemelkedő. Az élelmiszer- és gyógyszeriparban extracelluláris enzimek (pl. proteázok és lipázok) és különböző metabolitok (pl. β -karotin, likopin, arachidonsav, γ -linolénsav) termelésére (Outtrup és Boyce, 1990; Godtfredsen, 1990), ezen kívül szteránváz vegyületek sztereospecifikus hidroxilálására használják őket (Madyastha és Srivatsan, 1987). Néhány fajuk (*Mucor*, *Actinomucor* és *Rhizopus*) megtalálható speciális fermentációval készülő távol-keleti ételek starter kultúrájában (Han és mtsi., 2001). Nem elhanyagolható azonban, hogy élelmiszeripari termékek (Devoyod, 1988) és mezőgazdasági termények károsításában (Michailides és Ogawa, 1985) is részt vehetnek elsősorban raktári kártevőként. Zigomikózist okozó fajaik, mint opportunistá patogének érdemelnek figyelmet (Ribes és mtsi., 2000; Walsh és mtsi., 2004; Chayakulkeeree és mtsi., 2006). Laboratóriumokban fontos modellszervezetekként használják őket, a leggyakrabban alkalmazott fajok a következők: *Mo. alpina*, *Mucor mucedo*, *Mu. rouxii*, *Mu. circinelloides*, *Phycomyces blakesleeanus* (Jackson és mtsi., 1998; Cerdá-Olmedo, 2001).

A járomspórás gombák tradicionális osztályozása és a fajok meghatározása főként az aszexuális (sporangium, sporangiolum) és a szexuális (zigospóra) szaporító képletek morfológiája alapján történt. A morfológiai alapú osztályozás idő- és laborigényes, ezen kívül a morfológiai jellegek, például a zigospórák hiánya miatt téves eredményekhez vezethet. Az ITS (Internal Transcribed Spacer) a magi SSU (nrSSU nukleáris riboszómális RNS (18S) kis alegység) és LSU (nrLSU nukleáris riboszómális RNS (28S) nagy alegység) régió, valamint az

aktin gének vizsgálata megfelelő módszernek bizonyult a járomspórás gombák evolúciós és filogenetikai kapcsolatainak tanulmányozására faj- és nemzetség szinten egyaránt (Kwaśna és mtsi., 2006). A járomspórás gombák filogenetikai helyzetével foglalkozó publikáció (Hibbet és mtsi., 2007) az utóbbi években jelent meg, mely alapján a polifiletikus Zygomycota törzset négy monofiletikus alcsoportra osztották fel: Mucoromycotina, Kickxellomycotina, Zoopagomycotina és Entomophthoromycotina. A Mucorales, Endogonales és Mortierellales rendeket a Mucoromycotina altörzsbe sorolták. A Mucorales és a Mortierellales rendbe gyorsan növény, spórázó fajok tartoznak. A két csoport elkülönítésére szolgáló morfológiai bélyeg a sporangiumtartó csúcsán lévő kolumella megléte (Mucorales) vagy hiánya (Mortierellales).

3.2. A Mortierellales rend általános jellemzése és rendszerezésük áttekintése

A Mortierellales rend a járomspórás gombák egyik legnagyobb fajszámmal rendelkező, morfológiai és ökológiai szempontból is figyelemre méltó csoportja. A fajok többsége az erdei talajok humuszképzésében résztvevő szaprofita szervezet. A csoport egyaránt tartalmaz meleg- és hidegkedvelő fajokat. A *Mo. wolfii* az egyetlen opportunistá patogén faj közöttük, mely szarvasmarhákban okozhat vetélést, tüdőgyulladást (mortierellózis) (Johnson és mtsi., 1990). Színtenyészetben vattaszerű vagy felszínre tapadó telepeket képeznek, bizonyos táptalajokon jellegzetes ún. rozettás telepmorfológiát mutatnak (1. ábra).



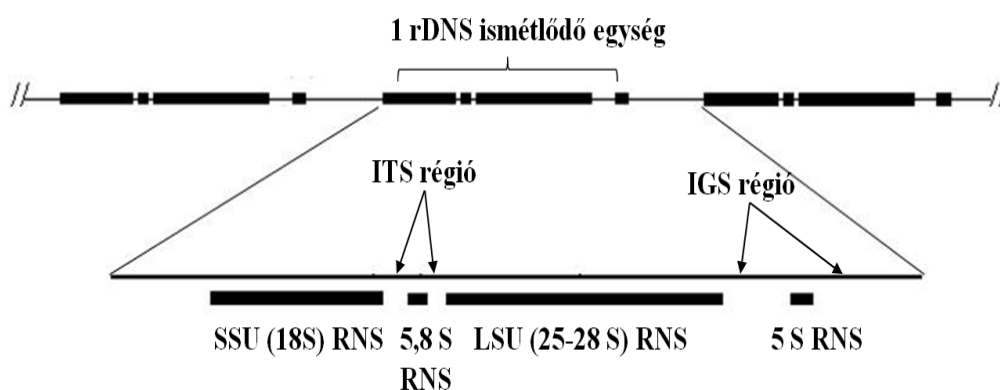
1. ábra: *Mo. capitata* CBS 648.68 izolátum rozettás növekedést mutató telepe MEA táptalajon (21 °C-on 7 napos inkubáció után).

A telepek színe változó lehet: jellemzően fehér, halványrózsaszín, lila, barna vagy szürke; azonban ez sok esetben függ a tenyésztés korától és a tápközegtől is. Micéliumaik pókháló finomságúak, jellegzetes hagyma vagy fokhagyma illatot áraszthatnak. Aszexuális szaporodásuk

egy- és/vagy sokspórás sporangiummal történik, a kolumella szinte mindig hiányzik vagy fejletlen (Taylor és mtsi., 2004).

A legtöbb *Mortierellales* renddel foglalkozó molekuláris filogenetikai tanulmány elsősorban a csoport *Mucorales* rendhez fűződő viszonyát vizsgálta, például a transzlációs elongációs faktor $\alpha 1$ (*tef*), az aktin, illetve a magi riboszómális gének (ITS, nrSSU, nrLSU) szekvenciái alapján (Voigt és Wöstemeyer, 2001). A régebbi rendszerek a *Mortierella* fajokat is tartalmazó *Mortierellaceae* családot a *Mucorales* rendbe sorolták (Zycha és mtsi., 1969; Hesseltine és Ellis, 1973; Hawksworth és mtsi., 1995). Azonban az utóbbi évek molekuláris filogenetikai vizsgálatai szerint Cavalier-Smith (1998) egy új járomspórás gombarend, a *Mortierellales* rend bevezetését ajánlotta, amit a későbbi tanulmányok szintén megerősítettek (Voigt és mtsi., 1999; Voigt és Wöstemeyer, 2001). A szétválasztást alátámasztotta az extracelluláris poliszacharidok (Ruiter és mtsi., 1993), valamint az nrSSU és nrLSU szekvenciák tanulmányozása (Voigt és mtsi., 1999; Tanabe és mtsi., 2000; O'Donnell és mtsi., 2001; Voigt és Wöstemeyer, 2001). A 2. ábrán a magi riboszómális RNS gének (rDNS) ismétlődő egységei, illetve egy kinagyított egység részletezése látható.

A *tef* és az aktint kódoló gének vizsgálata alapján bebizonyosodott az is, hogy mind a *Mortierellales*, mind a *Mucorales* rend monofiletikus csoportok (Voigt és Wöstemeyer, 2001). Ezt egyébként alátámasztják egyes morfológiai karakterek is, mint például a kolumella jelenléte/hiánya, a hifa válaszfalak és a zigospórák morfológiája.



2. ábra: A kis (18S) és nagy (28S) riboszómális RNS alegységet kódoló génszakasz. (<http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>)

A *Mortierella* nemzetség rendszerezése sokáig kizárólag aszexuális tulajdonságaik alapján történt (Gams, 1977). A sporangiofórok elágazásai alapján a nemzetséget két alnemzetségre osztották fel: *Micromucor* és *Mortierella*. A *Micromucor* alnemzetséget más

szerzők *Isabellina* szekcióként különböztették meg (Zycha és mtsi., 1969; Meyer és Gams, 2003). Az ITS 1/2 régió PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) analízise és az ITS 1 szekvenciák alapján készült filogenetikai vizsgálatok bebizonyították, hogy a *Micromucor* – *Isabellina* (syn. *Umbelopsis/Micromucor*) csoport monofiletikus és a Mucorales rendbe tartozó gombákkal áll közelebbi rokonságban (Meyer és Gams, 2003). Ezért javasolták e gombák számára az *Umbelopsis* nemzetség és az *Umbelopsidaceae* család bevezetését és áthelyezését a Mucorales rendbe. A morfológiai karakterek jellegzetességei szintén azt mutatják, hogy az *Umbelopsis* nemzetség a Mucorales rend tagja (Zycha és mtsi., 1969; Hesseltine és Ellis, 1973; Hawksworth és mtsi., 1995; Voigt és Wöstemeyer, 2001).

A Mortierellales rend közel 120 fajával az eddig leírt járomspórás gombák 10 százalékát foglalja magába (Hawksworth és mtsi., 1995). A *Mortierellaceae* családba jelenleg hat nemzetséget sorolnak, ezek a *Mortierella*, *Aquamortierella*, *Lobosporangium*, *Gamsiella*, *Dissophora* és *Modicella* (Benny, 2005). Az utóbbi években tehát több publikáció is megjelent, amelyben a Mortierellales rend magasabb filogenetikai kapcsolatait vizsgálták. A teljes Mortierellales rendre kiterjedő filogenetikai és morfológiai tanulmányokat azonban eddig nem végeztek. Jelen vizsgálatunk célja éppen ennek a hiánynak a pótlása.

3.3. A többszörösen telítetlen zsírsavak és egészségben betöltött szerepük

A Mortierellales rendbe tartozó gombákat micéliumuk magas lipidtartalma miatt az olajtermelő organizmusok közt tartják számon és egyes képviselőiket többszörösen telítetlen zsírsavak termeltetésére alkalmazzák. A zsírsavak különböző hosszúságú szénhidrogénláncból és egy terminális karboxil csoportból állnak. Megkülönböztetünk telített zsírsavakat (mint például a palmitinsav), amelyek nem tartalmaznak kettős kötések, illetve telítetlen zsírsavakat, melyek legalább egy kettős kötést tartalmaznak. A kettős kötésben szereplő két hidrogénatom állása szerint beszélhetünk *cisz*- vagy *transz*-zsírsavakról. Azokat a zsírsavakat, amelyek egynél több kettős kötést tartalmaznak többszörösen telítetlen zsírsavaknak (Polyunsaturated Fatty Acid, PUFA) nevezzük. A kettős kötések elhelyezkedése a láncon belül nagy jelentőséggel bír. A kötések helyét meghatározhatjuk a karboxil csoporttól, azaz a delta végtől számítva, vagy az ellenkező végi metil csoporttól, az ún. *omega*-szénatomtól. Ez utóbbi névhasználat esetében beszélünk *omega*-3, *omega*-6 és *omega*-9 zsírsavakról, attól függően, hogy a végtől számított hányadik szénatomon található az első kettős kötés. A legismertebb többszörösen telítetlen zsírsavakat az 1. táblázatban tüntettük fel szénatomszámuk és kettős kötések elhelyezkedése szerint csoportosítva őket.

1. táblázat: Többszörösen telítetlen zsírsavak csoportosítása a szénatomszám és a kettős kötés elhelyezkedése szerint.

	ω9 zsírsavak	ω6 zsírsavak	ω3 zsírsavak
18 szénatomszámú zsírsavak	OA=olajsav (C18:1)	LA=linolénsav (C18:2)	ALA=α-linolénsav (C18:3)
	6,9-oktadekadiénsav (C18:2)	GLA=γ-linolénsav (C18:3)	sztearidonsav (C18:4)
20 szénatomszámú zsírsavak	8,11-eikozadiénsav (C20:2)	DGLA=dihomo-γ-linolénsav (C20:3)	ETA=eikozatetraénsav (C20:4)
	MA=5,8,11-eikozatriénsav (C20:3)	AA=arachidonsav (C20:4)	EPA=eikozapentaénsav (C20:5)
22 szénatomszámú zsírsavak	-	adrénsav (C22:4)	DPA=dokozapentaénsav (C22:5)
		DPA=dokozapentaénsav (C22:5)	DHA=dokozahexaénsav (C22:6)

Zárójelben a szénatomok száma és a kettős kötések száma látható.

A többszörösen telítetlen zsírsavak szerkezetükből adódóan fontos szerepet töltenek be a membránok felépítésében, dinamikájában, permeabilitásában, ezen kívül a membránkapcsolt fehérjék, receptorok, ATP-ázok, transzportfehérjék és ioncsatornák modulációjában (Horrobin, 1995). Emellett bizonyos gének, például az adipocita zsírsavkötő fehérje (Amri, 1991; Distel és mtsi., 1992), a glükóz transzporter 4 (Tebbey és Buttke, 1994), és a sztearoil-KoA deszaturáz (Landschulz és mtsi., 1994; Ntambi, 1992) kifejeződésének kontrollálásával szabályozzák a szervezetben a zsírsavak bioszintézisét és a koleszterin transzportját (Sessler és Ntambi, 1998). A többszörösen telítetlen zsírsavak számos metabolit, például a prosztaglandinok, leukotriének és hidroxizsírsavak prekursoraiként is fontos szerepet játszanak (Innis, 1991). Széleskörű biológiai hatásuk miatt hiányuk bőrrendellenességeket, illetve az ideg-, keringési-, hormon-, légző- és szaporodási rendszer, valamint az immunrendszer és a gyulladásos folyamatok szabályozásának zavarát okozhatja (Certik és Shimizu, 1999). Az *omega-3* zsírsavak hiánya általában szív- és érrendszeri problémákat okoz, míg az *omega-6* zsírsavak a gyulladásos folyamatokban bírnak jelentős szereppel (Din és mtsi., 2004). Emellett az arachidonsav az alloxán okozta cukorbetegség kialakulásának esélyét csökkenti, valamint védi a különféle szöveteket az oxidatív stressz okozta káros hatásoktól (Suresh és Das, 2006). Az anyatej tartalmazza a csecsemők idegrendszerének és retinájának egészséges fejlődéséhez szükséges arachidonsavat és dokozahexaénsavat (Gill és Vaivety, 1997; Ward és Singh, 2005). A γ-linolénsavat, a dihomog-linolénsavat és az eikozapentaénsavat az arachidonsav és a dokozahexaénsav mellett szintén alkalmazzák élelmiszerek adalékanyagként (Innis, 1991; Ward és Singh, 2005; Suresh és Das, 2003). Az emberi szervezet nem képes kettős kötést helyezni az *omega-6* és *omega-3* helyekre, ezért nem képes az olajsavat linolsavvá illetve α-linolénsavvá alakítani. Ezeket esszenciális zsírsavaknak nevezzük, melyeket a táplálékkal kell a szervezetbe juttatnunk (Certik és Shimizu, 1999).

3.4. Mikrobiális zsírsavtermelés

3.4.1. A mikrobiális zsírsavtermelés előnyei

A γ -linolénsav nagyrészt az iparban növényi magvakból nyerik ki (szákszorszép és borágó), azonban a növényekből hiányoznak a 18 szénatomszám feletti telítetlen zsírsavak kialakulásáért felelős enzimek (Certik és Shimizu, 1999). Az állati forrásból származó olajok (pl. halolaj) hosszabb szénláncú zsírsavakat is tartalmaznak, azonban alkalmazásuknak számos hátránya van. Az egyik hátrány, hogy a halolajnak kellemetlen íze és illata van, valamint el kell távolítani az olajban lévő szennyeződések és a koleszterint (Certik és Shimizu, 1999). Ezért a figyelem régóta az úgynevezett olajtermelő mikrobák felé fordult, amelyek képesek hosszabb szénláncú (20 vagy 22) zsírsavak szintézisére is. Bizonyos gombák, tengeri baktériumok, heterotróf és fototróf mikroalgák, valamint moszatok termelnek különféle, többszörösen telítetlen zsírsavakat, melyek alternatív zsírsavforrások lehetnek az élelmiszeripar számára (Radwan, 1991; Leman, 1997; Singh és Ward, 1997; Certik és Shimizu, 1998; Vazhappilly és Chen, 1998).

Az olajtermelő mikroorganizmusokra jellemző, hogy száraztömegük 50%-ban lipideket tartalmaznak (Higashiyama és mtsi., 2002). Számos előnnyel rendelkeznek a növényi és az állati eredetű zsírsavforrásokkal szemben, melyek a következők: **(a)** aktív lipid-szintetizáló apparátussal rendelkeznek; **(b)** a mikrobiális olajok magasabb értékűek, mint például a napraforgóolaj vagy a pálmaolaj; **(c)** a mikrobák magas növekedési rátával rendelkeznek, valamint számos szubsztrátot képesek hasznosítani, így előállításuk olcsó; **(d)** a zsírsavtermelés folyamatosan végezhető évszaktól, időjárástól függetlenül; **(e)** a mikrobákkal ellenőrzött minőségű, koncentráltabb, analitikailag tisztább zsírsavak állíthatók elő; **(f)** egyszerű felépítésük miatt megfelelő modellszervezeteknek bizonyultak a lipid-bioszintézis és a metabolikus szabályozás vizsgálatához (Certik és Shimizu, 1999).

3.4.2. *Mortierella* fajok, mint alternatív zsírsavforrások

A járomspórás gombák közül a Mucorales rendbe tartozó fonalas gombák is termelnek többszörösen telítetlen zsírsavakat, azonban ezek a gombák gyakran okoznak opportunistá fertőzéseket emberekben (mukormikózisok), ezért használatuk élelmiszer adalékanyagként nem lenne biztonságos, így a figyelem a Mortierellales rend felé fordult. (Dyal és Narine, 2005). A Mortierellales rendbe tartozó fonalas gombákat az olajtermelő organizmusok közé soroljuk mivel biomassájuk több mint 25%-ban lipideket tartalmaz, melyeket lipid testekben halmoznak fel valamilyen környezeti stressz hatására (Murphy, 1991). A *Mo. alpina* szárazsúlyának akár

50%-át is kiteheti a triacilglicerol olaj, aminek a 40%-át hosszúlancú, többszörösen telítetlen zsírsavak alkotják (Wongwathanarat és mtsi., 1999). Számos tanulmány bemutatta, hogy a *Mortierella* fajok ígéretesek lehetnek az *omega*-6 zsírsavak gyártásában, beleértve a 20 szénatomszámú arachidonsavat, melynek egyik legfontosabb ipari termelője a *Mo. alpina* (Higashiyama és mtsi., 2002). A *Mo. alpina* az arachidonsavon kívül képes még linolsavat, γ -linolénsavat, dihomo- γ -linolénsavat, eikozapentaénsavat és dokozahexaénsavat is előállítani a hőmérséklet csökkentése (Bajpai és mtsi., 1991) vagy külsőleg hozzáadott olajok alkalmazásakor (Jang és mtsi., 2005; Shinmen és mtsi., 1992), ami azt jelzi, hogy ez a gomba mind az *omega*-3, mind az *omega*-6 zsírsavak tekintetében potenciális forrás lehet (Ho és mtsi., 2007). A *Mo. alpina* 1S-4 ipari törzs az egyik legjobban vizsgált zsírsavtermelő mikroorganizmus. Számos zsírsav előállítására, ezen kívül külsőleg hozzáadott zsírsavak átalakítására is képes. A törzs zsírsav-bioszintézisben hibás mutánsai is rendelkezésre állnak, amelyek különböző többszörösen telítetlen zsírsavak előállítására képesek (Sakuradani és Shimizu, 2009). A *Mo. alpina* által termelt arachidonsavat élelmiszer adalékanyagként is felhasználják, mivel kimutatták, hogy a gomba biztonságosan alkalmazható (Strekeestra, 1997; Hempenius és mtsi., 2000; Hempenius és mtsi., 1997). Mivel a *Mo. alpina* egy talajból izolálható fonalas gomba, ezzel az emberek gyakran találkozhatnak. A zsírsavtermelő gomba nem patogén, a spórái nem allergének, valamint mikotoxinokat sem termel.

Habár az iparban alkalmazott *Mo. alpina* részletesen jellemzett, a *Mortierella* nemzetség többi tagjának zsírsavtermeléséről meglehetősen hiányosak ismereteink. Munkánk célja ezért új zsírsavtermelő *Mortierella* törzsek azonosítása, valamint a zsírsavtermelés diverzitásának vizsgálata a *Mortierellales* renden belül.

3.5. Többszörösen telítetlen zsírsavak bioszintézise *Mortierella* fajokban

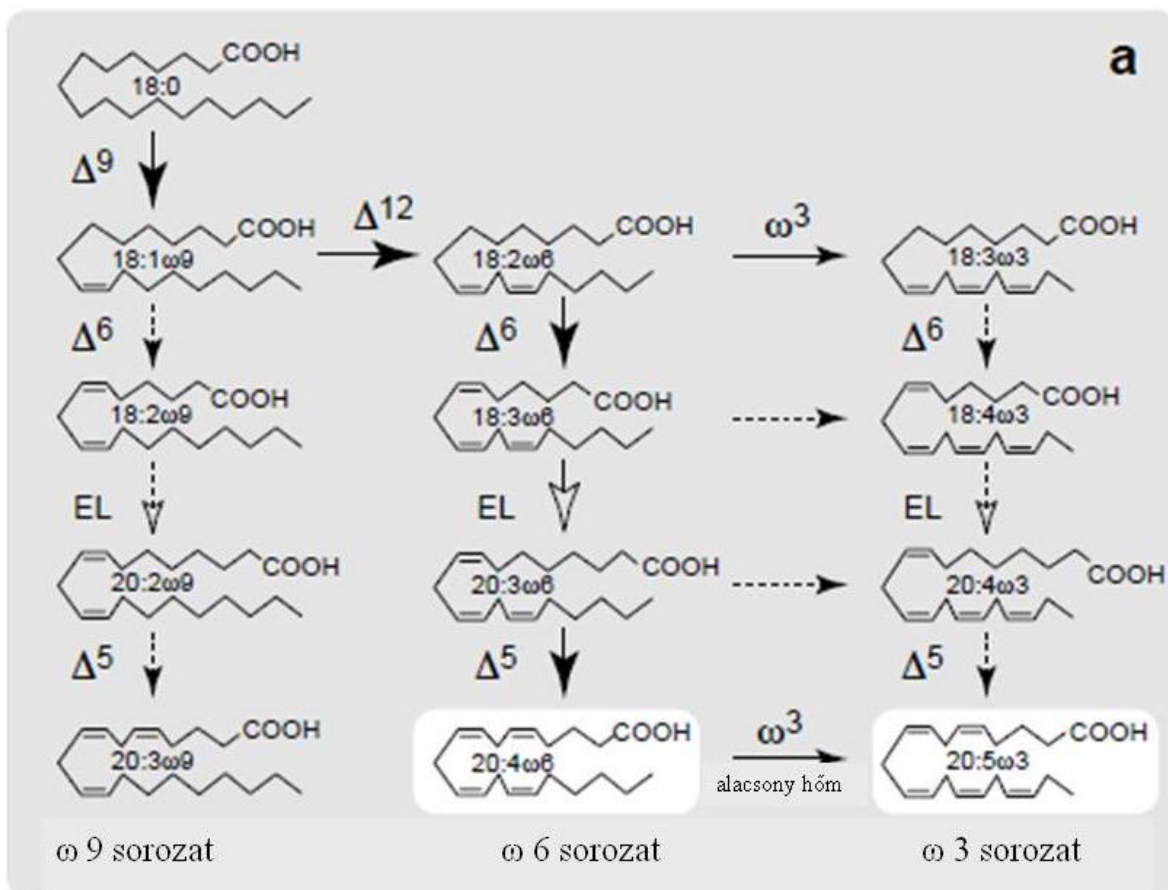
A többszörösen telítetlen zsírsavak bioszintézise telített és telítetlen zsírsavak módosításával történik, amely során a deszaturáz enzimek kettős kötéseket helyeznek a megfelelő szénatomokra, az elongázok pedig egy metilén (CH_2) egységgel hosszabbítják meg a szénláncot (Ward és Singh, 2005). A gombákból izolált zsírsav deszaturázok mindegyike az endoplazmatikus retikulum membránjához kötött enzim (Shanklin és mtsi., 1994). A zsírsav deszaturáció aerob útjához 3 fehérje szükséges: NAD(P)H-citokróm b_5 reduktáz, citokróm b_5 és deszaturáz. A deszaturázoknak három típusa van: az acil-KoA deszaturázok, az acil-ACP deszaturázok és az acil-lipid deszaturázok (Sakuradani és mtsi., 1999). Az aerob útvonalnál az első telítetlen kötés kialakítása mindig a KoA-hoz kapcsolt telített zsírsavak (palmitinsav és sztearinsav) $\Delta 9$ pozíciójában történik, amelyet ennek megfelelően a $\Delta 9$ deszaturáz végez el. A

Mo. alpina-ból izolált $\Delta 9$ deszaturázok karboxil végén egy citokróm b_5 -szerű alegység található. A *Mo. alpina*-ban három $\Delta 9$ deszaturáz gént azonosítottak. Mindhárom $\Delta 9$ deszaturáz fehérjére jellemző, hogy 8 hisztidint tartalmaznak, amelyek 3 konzervált hisztidin klusztert alkotnak, emellett mindhárom gén esetén az intron az általános eukarióta génekre jellemző 5'GT nukleotidok helyett 5' GC nukleotidokkal kezdődik (Sakuradani és mtsi., 1999). A $\Delta 9$ deszaturáz egyes ($\Delta 9$ -1) és kettes ($\Delta 9$ -2) kópiák aminosav sorrendje 86%-ban megegyezik, mindkettőben egy intron található, azonban szubsztrátspecifitásuk eltér, mivel a $\Delta 9$ -2 fő szubsztrátja a 16 szénatomszámú palmitinsav, míg a $\Delta 9$ -1 deszaturázé a 18 szénatomos sztearinsav. A $\Delta 9$ -3 deszaturáz aminosav sorrendje 56%-ban egyezik meg a $\Delta 9$ -1 és 58%-ban a $\Delta 9$ -2 deszaturázzal, azonban szubsztrátként a 24, illetve 26 szénatomszámú zsírsavakat részesíti előnyben. Ezen kívül tartalmaz egy második intront is és valószínűleg a $\Delta 9$ -1 és $\Delta 9$ -2 deszaturáz gén duplikációjával jött létre (Abe és mtsi., 2006).

Az elongázok több alegységből felépülő, membránkapcsolt enzimek. Az elongáció 4 lépésben zajlik: a folyamat az acil csoport kondenzációjával kezdődik malonil KoA-vá, eközben ketoacil keletkezik, valamint CO_2 redukció történik a γ -hidroxil csoporton, a következő lépés a dehidratáció, majd a második redukció végeredményeképp kialakul a meghosszabbított zsírsav (Ward és Singh, 2005).

A többszörösen telítetlen zsírsavak bioszintézisének mindhárom útvonala (*omega*-9, *omega*-6, *omega*-3) a $\Delta 9$ deszaturáz reakciójával indul, így sztearinsavból olajsav (OA) jön létre. Az *omega*-9 zsírsavak esetén a második kettős kötés a Δ végtől számított 6. szénatomra kerül a $\Delta 6$ deszaturáz által, kialakítva így a 6,9 oktadekadiénsavat. A következő lépésben elongáció történik, így kialakul a 20 szénatomszámú 8,11-eikozadiénsav, amire a $\Delta 5$ deszaturáz az 5-ös pozícióban lévő szénatomon kialakítja a harmadik kettős kötetést, így létrejön az 5,8,11-eikozatriénsav (Certik és Shimizu, 1999). Az *omega*-6 zsírsavak útvonala során az olajsav Δ végtől számított 12. szénatomján a $\Delta 12$ deszaturáz alakítja ki a második telítetlen kötetést, így létrehozva a linolsavat (LA), amire a már említett $\Delta 6$ deszaturáz helyezi a harmadik telítetlen kötetést létrehozva a γ -linolénsavat (GLA). Ezt a lépést elongáció követi, amelyben a γ -linolénsavból 20 szénatomszámú dihomó- γ -linolénsav (DGLA) keletkezik. A DGLA-ból a $\Delta 5$ deszaturáz arachidonsavat (AA) készít, ami általában az *omega*-6 bioszintézis út végterméke *Mo. alpina*-nál (Certik és Shimizu, 1999). Az *omega*-3 zsírsavak többféle módon is kialakulhatnak. A kezdőlépések a már jól ismert sztearinsav $\rightarrow$ olajsav $\rightarrow$ linolsav átalakulások, majd a linolsavra a $\Delta 15$ deszaturáz helyezi a 3. telítetlen kötetést kialakítva az α -linolénsavat (ALA), amelyből a $\Delta 6$ deszaturáz sztearidonsavat készít. A következő elongáció során 20 szénatomszámú, 4 telítetlen kötetést tartalmazó eikozatetraénsav (ETA) keletkezik. Az

eikozatetraénsavat a $\Delta 5$ deszaturáz alakítja eikozapentaénsavvá (EPA). Azonban az eikozapentaénsav alacsony hőmérsékleten arachidonsavból is keletkezhet a $\Delta 17$ deszaturáz segítségével (Certik és Shimizu , 1999). A $\Delta 15$ és a $\Delta 17$ deszaturázokat gombákban $\omega 3$ deszaturázként említik, ezért a 3. ábrán is így jelöltük őket, melyen a többszörösen telítetlen zsírsavak bioszintézisének három útvonala látható.



3. ábra: Többszörösen telítetlen zsírsavak bioszintézisének útvonalai *Mo. alpina*-ban (EL = elongáz, $\Delta 5$, $\Delta 6$, $\Delta 9$, $\Delta 12$, $\omega 3$, = deszaturázok, 18:0 = sztearinsav, 18:1 ω 9 = olajsav, 18:2 ω 9 = 6,9 oktadekadiénsav, 18:2 ω 6 = linolsav, 18:3 ω 6 = γ -linolénsav, 18:3 ω 3 = α -linolénsav, 18:4 ω 3 = sztearidonsav, 20:2 ω 9 = 8,11-eikozadiénsav, 20:3 ω 9 = 5,8,11-eikozatriénsav, 20:3 ω 6 = dihomó- γ -linolénsav, 20:4 ω 6 = arachidonsav, 20:4 ω 3 = eikozatetraénsav, 20:5 ω 3 = eikozapentaénsav (Certik és mtsi., 1998).

4. CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk fő célkitűzése a Mortierellales renden belüli rokonsági viszonyok tanulmányozása fiziológiai és molekuláris vizsgálatok segítségével nagyszámú izolátum bevonásával. Célunk a *Mortierella* nemzetségen belüli főbb fajcsoportok, valamint a kevés izolátummal reprezentált fajok helyzetének pontosítása is. Ezen kívül terveink között szerepelt a *Mortierella* és rokon nemzetségek zsírsavtermelésének vizsgálata, új többszörösen telítetlen zsírsavakat termelő fajok, valamint a zsírsav-bioszintézisben résztvevő gének azonosítása.

Munkánk során ezért a következő konkrét célokat tűztük ki:

1. A 18S riboszómális RNS régiót (nrSSU) kódoló génszakasz felszaporítása nagyszámú *Mortierella* és rokon izolátum bevonásával.
2. Az nrSSU szekvenciák kombinálása a korábban meghatározott nrLSU, ITS, *tef* és az RNS polimeráz b alegységét kódoló *rpb1* szekvenálásából nyert adatokkal, illetve a kombinált adatsorok filogenetikai elemzése.
3. Nagyszámú *Mortierella* és rokon nemzetségbe tartozó izolátum szénforrás-hasznosításának vizsgálata. A szénasszimilációs profil és a filogenetikai eredmények összevetése.
4. A *Mortierella* és rokon nemzetségek zsírsavtermelésének vizsgálata új telítetlen zsírsavtermelő törzsek azonosításának, illetve a zsírsavtermelés Mortierellales renden belüli diverzitásának tanulmányozása érdekében.
5. A zsírsavtermelő izolátumokban a többszörösen telítetlen zsírsavak bioszintézisének kezdő lépéséért felelős $\Delta 9$ deszaturázt kódoló gén azonosítása.

5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

5.1. Felhasznált gombatörzsek

A szénforrás-hasznosításhoz és a molekuláris vizsgálatokhoz használt törzseket úgy válogattuk össze, hogy lefedjék a teljes Mortierellales rendet. Vizsgálatainkba 105 *Mortierella*, 6 *Dissophora*, 3 *Umbelopsis*, 2 *Micromucor*, 1 *Lobosporangium* és 1 *Gamsiella* izolátumot vontunk be. A vizsgált izolátumok részletes felsorolását az 1. melléklet tartalmazza. A zsírsavtermelés vizsgálatába 67 törzset vontunk be, míg a $\Delta 9$ deszaturáz gént eddig 15 törzsből azonosítottuk. Ezeket a törzseket szintén az 1. mellékletben jelöltük.

5.2. Tenyésztési körülmények

A gombatörzseket malátás táptalajon (MEA: 1% glükóz, 0,5% élesztőkivonat, 0,5% malátakivonat, 2% agar) tartottuk fenn 4 °C-on. A törzseket izolátumtól függően a növekedésük szempontjából optimális hőmérsékleten (20, 24 vagy 37 °C) inkubáltuk 7 napig. A szénforrás-hasznosítási vizsgálatokhoz minimál táptalajt (MM: 0,5% (NH₄)₂ SO₄, 0,1% KH₂PO₄, 0,05% MgSO₄, 2% agar) használtunk, melyet 0,2% szénforrással egészítettünk ki. Néhány törzs esetén nitrogénforrásként 0,05% YNB-t használtunk ammónium-szulfát helyett. A szénforrás-hasznosítás vizsgálatakor a törzseket szintén a növekedésük szempontjából optimális hőmérsékleten (20, 24 vagy 37 °C) inkubáltuk 7 napig. A DNS kivonáshoz malátás tápoldatot használtunk (MEA: 1% glükóz, 0,5% élesztőkivonat, 0,5% malátakivonat), a törzseket a növekedésüknek megfelelő hőmérsékleten (20, 24 vagy 37 °C) 5-7 napig, 200 rpm-mel rázattuk. A zsírsavtermeléshez glükóz-élesztő tápoldatot (GY: 2% glükóz, 1% élesztőkivonat, pH 6,5) használtunk, melybe 10⁵ spórát oltottunk, majd 10 napig 20 °C-on, 150 rpm-mel rázattuk. A kompetens sejtek készítéséhez, valamint a plazmid kivonáshoz alkalmazott *Escherichia coli* TOP10⁺ törzset Luria-féle tápoldatban (LB: 1% NaCl, 1% tripton, 0,5% élesztőkivonat) neveltük. A tápoldatot a plazmid kivonás esetében 100 µg/ml ampicillinnel egészítettük ki a megfelelő szelekció miatt. Luria-féle táptalajt (LB: 1% NaCl, 1% tripton, 0,5% élesztőkivonat, 2% agar) használtunk a baktérium transzformációhoz, illetve a transzformáns baktériumok fenntartásához, amit 100 µg/ml ampicillinnel egészítettünk ki a megfelelő szelekció miatt.

5.3. Felhasznált anyagok

5.3.1. Alkalmazott szénforrások

A szénforrás-hasznosítási tesztekben a következő vegyületeket használtuk egyedüli szénforrásként: D-glükóz, D-szacharóz, D-lixóz, D-xilóz, D-fruktóz, D-galaktóz, D-mannóz, L-

arabinóz, maltóz, L-szorbóz, L-ramnóz, laktóz, xilán, dextrán, vanillin, mio-inozit, cellobióz, raffinóz, keményítő, szorbit, xilit, L-glutamin, L-prolin, L-aszparagin, L-glutaminsav, L-glicin, L-leucin, L-valin, L-izoleucin, L-fenilalanin, L-triptofán, L-lizin, L-szerin, L-treonin, L-cisztein, L-hisztidin, L-alanin, L-metionin, L-arginin, L-tirozin, ornitin, glicerol-l-monohidrát, borostyánkősav, glükonsav, inulin, L-almasav, fumársav, etanol, glicerol, eritrit, galaktit, L-citrullin, cisz-akonitsav, inozin, orotsav, galluszsav, l-metilmannozid, keto-izovaleriánsav, gentizinsav, piroszőlősav, aszkorbinsav, protokatechusav, α -metil-D-xilozid, melibióz, glicerol-l-monoacetát, mannit.

5.3.2. HPLC analízisnél alkalmazott standardok

A zsírsavtermelés vizsgálatakor a HPLC analízis során a következő standardokat alkalmaztuk: palmitinsav (P, C16:0); palmitolénsav (PO, C16:1 ω -7); sztearinsav (S, C18:0); olajsav (OA, C18:1 ω -9); linolsav (LA, C18:2 ω -6); linolénsav (ALA, C18:3 ω -3); γ -linolénsav (GLA, C18:3 ω -6); arachidonsav (AA, C20:4 ω -6); eikozapentaénsav (EPA, C20:5 ω -3); dokozahexaénsav (DHA, C22:6 ω -3). Belső kontrollként a margarinsavat (C17:0) alkalmaztuk.

5.4. Alkalmazott módszerek

5.4.1. A szénforrás-hasznosítás vizsgálata

A vizsgálatba bevont izolátumokból spóraszuszpenziót készítettünk: a spórákat 3 ml desztillált vízzel steril körülmények között lemostuk a MEA ferde agarok felszínéről. Különböző, az alap táptalaj (MM) mellett csak egy-egy szénforrást tartalmazó táplemezeket, illetve kontrollként szénforrásmentes táplemezeket öntöttünk, majd a szuszpenziókból minden csészére 20 μ l-t pipettáztunk a táplemezek közepére. A leoltott táplemezeket a törzseknek megfelelő hőmérsékleten (20, 24 vagy 37 °C) inkubáltuk egy hétig. Az inkubációs idő letelte után a szénforrásmentes és a glükóz tartalmú táptalajhoz viszonyítva vizsgáltuk a törzsek növekedését.

5.4.2. Genomi DNS kivonás

10 mg micéliumot dörzsmozsárban elporítottunk cseppfolyós nitrogén hozzáadása mellett. A porrá dörzsölt micéliumból a DNS-t a MasterPure Yeast DNA Purification Kit (Epicentre) segítségével tisztítottuk a gyártó utasításainak megfelelően. A DNS mintákat kloroform-izoamilalkohol 1:1 arányú keverékével tisztítottuk. Centrifugálás után (13000 rpm, 10 perc, Hettich) a vizes fázist 2,5-szeres mennyiségű 96%-os etanollal kicsaptuk, majd 2-12 óra inkubáció után centrifugálással (20 perc, 13000 rpm, Hettich) üleptítettük. A kiüleptített DNS-t

70%-os etanollal mostuk, majd vákuum alatt beszárítottuk. Ezt követően a DNS-t 50 µl desztillált vízbe feloldottuk, majd további felhasználásig -20 °C-on tároltuk.

5.4.3. A 18S riboszómális DNS régió felszaporítása

A PCR reakcióelegy összetétele (25 µl végtérfogatban):

1x *Dupla-Taq* puffer (ZenonBio)
2,5 mM MgCl₂ (ZenonBio)
0,2 mM dNTP mix (Fermentas)
0,2 µM NS1 primer
0,2 µM NS4 primer
1 U *Dupla-Taq* DNS polimeráz (ZenonBio)
20-50 ng genomi DNS

Az amplifikálás körülményei:

1 ciklus: 94 °C, 3 perc, denaturálás
35 ciklus: 94 °C, 20 mp, denaturálás
60 °C, 30 mp, primer kötődés
72 °C, 90 mp, lánchosszabbítás
1 ciklus: 72 °C, 10 perc, láncelvarrás

Az amplifikálás során alkalmazott primerek (White és mtsi.,1990):

NS1 primer 5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3'
NS4 primer 5'-CTTCCGTCAATTCCTTTAAG-3'

Az amplifikálásokat T3 Thermocycler (Biometra) segítségével végeztük.

5.4.4. DNS gélelektroforézis

A nukleinsavak elválasztása agaróz gélelektroforézissel történt. A mintákat 1/5 mennyiségű mintapuffer hozzáadása után 0,8%-os agaróz/TAE gélen választottuk el. A nukleinsavak detektálása etídium-bromidos festést követően (0,5 µg/ml) UV fényben történt. Az amplifikált fragmentumok mérete 1100-1200 bázispár között volt. Az amplifikálás után a mintákból 1-1 µl-t futtattunk meg a PCR termék ellenőrzéséhez.

5.4.5. Az nrSSU szekvenciák elemzése és filogenetikai analízise

A PCR technika segítségével felszaporított DNS fragmentumok szekvenálását az LGC Genomics (Berlin) végezte, ahol szekvenálás előtt a mintákat ExoSAP-IT (Affymetrix) kit segítségével tisztították. A kapott szekvenciákat egyesével összehasonlítottuk adatbanki (NCBI GenBank) szekvenciákkal a BLAST alkalmazás segítségével. Az összehasonlítás alapján igazoltan *Mortierella* (vagy rokon) nemzetségbe tartozó izolátumok ellentétes irányból meghatározott szekvenciáiból kontig-ot készítettünk a Staden programcsomag PreGap és Gap4 programjainak felhasználásával (Staden és mtsi., 2000), majd a kontigokból CLUSTAL-W (Thompson és mtsi., 2002) algoritmus alapján a BioEdit (Hall, 1999) program segítségével

illesztéseket készítettünk, szükség esetén manuális javítással. Az ITS, *tef* és *rpb1* szekvenciák esetében, azok magas indel tartalma miatt az ilyen evolúciós eseményeket jobban figyelembe vevő, kifinomultabb illesztési módszerre volt szükség. A végső, öt gén szekvenciájának adataiból készült illesztést ezért a Probalign algoritmus (Roshan és Livesay, 2006) segítségével végeztük. A manuális korrekciókra elsősorban az esetlegesen előforduló szekvenálási hibák és az indel szakaszok ellenőrzése miatt volt szükség. Előbbit a szekvenálásból kapott kromatogramokkal való összevetés alapján végeztük. A szekvencia túlnyúlásokat kizártuk a vizsgálatból. Az elemzéseket a kizárólag nrSSU szekvenciákat tartalmazó adatsor esetében Maximum Likelihood, a kombinált (ITS + nrLSU + nrSSU + *tef* + *rpb1*) szekvencia adatsor során pedig Bayes-féle megközelítéssel végeztük. Kulcsoportként a *Rhizopus oryzae* egy izolátumának (NRRL 28631) adatbankból letöltött nrLSU és nrSSU szekvenciáit választottuk.

A Maximum Likelihood (ML) becslést Phyml v2.4.4 szoftverrel (Guindon és Gascuel, 2003) végeztük a GTR+ Γ (General Time Reversible) szubsztitúciós modellt használva. A kapott Maximum Likelihood fa kládjainak megbízhatóságát Bootstrap analízissel vizsgáltuk. Ezt 1000 ismétlésben, a fenti körülményeket használva végeztük, 70% feletti bootstrap értékeket tekintve erős támogatottságnak. A Bayes-féle analízist a MrBayes 3.1.2 szoftver MPI verziójával (Alteckar és mtsi., 2004) végeztük. A felhasznált evolúciós modell megegyezett az ML analízis során használttal. Különbség volt az ML analízishez képest, hogy az illesztést öt partícióra osztottuk (teljes ITS régió, nrLSU, nrSSU, *tef*, *rpb1*), mivel azt tapasztaltuk, hogy a likelihood értékek így szignifikánsan javultak és a kapott eredmények jobban illeszkedtek adatainkhoz. A Markov láncokat addig futtattuk, amíg azok el nem érték a stacionárius fázist. Ezt a két futás közötti eltérés vizsgálatából és a likelihood értékek változásából tudtuk megállapítani. A futtatás 10^7 generáción keresztül, 6×10^6 generációs burn-in értékkel történt. A láncokból minden századik generáció után vettünk mintát. A Bayes-féle analízisben a 0,95 feletti poszterior valószínűség értékeket tekintettük szignifikánsnak.

5.4.6. Zsírsavkivonás

A vizsgálatba bevont izolátumokból spóraszuszpenziót készítettünk: a spórákat 3 ml desztillált vízzel steril körülmények között lemostuk a MEA ferde agarok felszínéről. A spóraszuszpenziók koncentrációját Bürker-kamra segítségével határoztuk meg, majd a szuszpenziókat 10^5 spóra/ml töménységűre hígítottuk. 10^5 spórát oltottunk 100 ml GY tápoldatot tartalmazó 250 ml térfogatú lombikokba, majd a lombikokat 10 napig 20 °C-on, 150 rpm-mel ráztuk. Az inkubációs idő letelte után a micéliumokat leszűrtük, majd desztillált vizes mosást követően a nedves tömeget lemértük. Ezután a micéliumokat 70 °C-on 24 órán keresztül

szárítottuk, majd szárítást követően meghatároztuk a minták száraztömegét. A szárított micéliumot dörzsmozsárban eldörzsöltük, majd 20 mg micéliumhoz 1 ml 5%-os KOH tartalmú metanolt adtunk. Ezt kiegészítettük 10 µl 1 mg/ml koncentrációjú margarinsav belső standarddal, majd a mintákat alapos vortexelés után 5 órán keresztül 70 °C-on inkubáltuk. A szaponifikáció után a mintákhoz 100 µl 37%-os sósavat adtunk, amivel a minták pH-ját 2-esre csökkentettük, ezáltal a zsírsavakhoz kapcsolódott kálium hidrogénre cserélődött. A zsírsavakat ezek után 3 x 1 ml kloroformmal extraháltuk. Minden extrakciót követően a mintákat 1 percig vortexeltük, majd 15 percig, 4000 rpm-mel, 4 °C-on centrifugáltuk (Hettich). Az első extrahálás előtt a mintákhoz 1 ml desztillált vizet is adtunk a fázishatárok könnyebb szétválása végett. A kloroformban extrahált minták beszáritását nitrogén gáz alatt végeztük.

5.4.7. HPLC analízis

5.4.7.1. Származékképzés

A bepárolt mintákhoz 50±1 mg kálium-karbonátot adtunk, majd felvettük 0,250 ml acetonitrilben és hozzáadtunk 0,125-0,125 ml acetonitrilben elkészített koronaéter (1 µg/ml, Sigma) és BrDMEQ (250 µg/ml, Dojindo) oldatot. Az elegyet tartalmazó üveget teflon-betétes kupakkal szorosan lezártuk, majd 1 perc homogenizálást követően 20 percig, fénytől elzártan, 80 °C-on inkubáltuk (Heating block, Cole-Palmer). A minták lehűlése után a reakcióelegyből 0,4 ml-t 1,5 ml-es mintatartó fiolákba (Vialab) pipettáztunk.

5.4.7.2. Referencia standardok előkészítése, kalibráció

A vizsgálandó komponensek azonosítására és mennyiségi meghatározására alkalmazott referencia vegyületeket és a módszer optimalizált paramétereit a 2. táblázat tartalmazza. A vegyületekből acetonitrilben külön-külön 1 mg/ml-es törzsoldatokat készítettünk, majd ezek egyesítésével és hígításával állítottuk elő a kalibrációs szintek előállításához alkalmazott 10 µg/ml koncentrációjú törzsoldatot. A kalibráció törzsoldatait a következő koncentrációkban készítettük el 5000 ng/ml, 1000 ng/ml, 500 ng/ml, 100 ng/ml, 50 ng/ml, 10 ng/ml és 1 ng/ml. A meghatározások során margarinsavat alkalmaztunk az extrakció és a meghatározás ellenőrzésére belső standardként.

5.4.7.3. Folyadékkromatográfiás (HPLC) paraméterek

A származékképzett zsírsavak analízisét Shimadzu LC-10 moduláris HPLC rendszerrel végeztük, mely egy rendszervezérlőből (SCL-10AVp), automata mintaadagolóból (SIL-10ADVp), két LC-20ADVp pumpából, egy eluens gáztalanítóból (DGU-14A), egy oszloptermosztátból (CTO-10ASVp) és egy fluoreszcens detektorból (RF-20A) állt.

2. táblázat: A meghatározásba bevont zsírsav komponensek kromatográfiás paraméterei.

Zsírsav komponens	Rt (min)	Merekség	Tengelymetszet	R ²	LOQ (ng/ml)
Eikozapentaénsav	11,42	0,000052	-3,08	0,9998	10
α -linolénsav	11,72	0,000452	-25,37	0,9996	1
γ -linolénsav	11,81	0,000399	-25,51	0,9995	1
Dokozahexaénsav	11,91	0,003993	-14,62	0,9994	10
Arachidonsav	12,36	0,000839	-37,26	0,9997	10
Palmitoleinsav	12,46	0,000544	-32,19	0,9996	10
Linolsav	12,85	0,000413	-64,12	0,9993	10
Palmitinsav	14,39	0,001397	-9083,93	0,9796	100
Olajsav	14,74	0,000360	-72,75	0,9993	10
Margarinsav,ISTD	15,99	0,000564	-37,28	0,9997	10
Sztearinsav	18,08	0,000368	-2071,1	0,9947	100

Az elválasztást 35 °C-on termosztált reverz fázisú 150 mm x 4,6 mm-es Kinetex C-18 (Phenomenex) 2,6 μ m-es szemcseátmérőjű oszlopon, grádiens eluensárammal valósítottuk meg 1,2 ml/min áramlási sebességgel. Az A eluens HPLC minőségű víz (Millipore), a B eluens acetonitril (VWR) volt. A grádiensprogram 0,5 percig tartó 30% B eluens tartalommal indult, mely 8,5 perc alatt lineárisan 90%-ra emelkedett és ezen az értéken maradt 10 percig, majd 2 perc alatt visszaállt a kiindulási értékre és a nyomás stabilizálásáig (4 perc) ezen az értéken maradt. A teljes futásidő így 25 perc volt. A mintákból 5 μ l-t injektáltunk és a fluoreszcens detektálást 350 nm excitációs és 450 nm emissziós hullámhosszaknál valósítottuk meg.

5.4.8. A *A9* deszaturáz gén felszaporítása

A PCR reakcióelegy összetétele (20 μ l végtérfogatban):

1x PCR Master Mix (0.05 U/ μ l *Taq* DNS polimeráz, 1x reakció puffer, 4 mM MgCl₂, 0,4 mM dNTP mix) (Fermentas)
1 μ l Frw2 primer
1 μ l Rev1 primer
20-50 ng genomi DNS

Az amplifikálás körülményei:

1 ciklus: 94 °C, 3 perc, denaturálás
3 ciklus: 94 °C, 1 perc, denaturálás
37 °C, 1 perc, primer kötődés
lassú hőmérséklet emelkedés (0,23°C/mp 2°C/mp helyett)
72 °C, 2 perc, lánchosszabbítás
35 ciklus: 94 °C, 1 perc, denaturálás
50 °C, 1 perc, primer kötődés
72 °C, 2 perc, lánchosszabbítás
1 ciklus: 72 °C, 2 perc, láncelvarrás

Az amplifikálásokat T3 Thermocycler (Biometra) segítségével végeztük. Az amplifikálás során alkalmazott degenerált primerek:

Frw2 primer 5'-GGTTCTAGAGGNYTNGGNATHACNGC-3'

Rev1 primer 5'-GGTCTCGAGTGRAARTTRTGRTANCCYTC-3'

Aláhúzással a primerre tervezett restriktációs endonukleázok (*Xba*I, *Xho*I) hasítóhelyeit jelöltük.
N= A,T, C, G; Y= C, T; H= T, C, A; R= A, G

5.4.9. DNS izolálása gélből

A PCR során kapott DNS fragmentumokat tartalmazó gél részletet steril szikével UV lámpa alatt vágtuk ki a 0,8% agarózt tartalmazó gélből. A kivágott gélből a DNS-t a DNA Extraction Kit (Fermentas) segítségével nyertük ki a gyártó utasításainak megfelelően.

5.4.10. DNS fragmentumok klónozása

A DNS fragmentumokat a pTZ57R/T (InsT/AcloneTM PCR Cloning Kit, Fermentas) vagy a pJET1.2/blunt vektorokba (CloneJETTM PCR Cloning Kit, Fermentas) ligáltuk. A ligálást T4 DNS ligázzal (Fermentas) 20 percig szobahőmérsékleten végeztük.

5.4.11. Kompetens *Escherichia coli* sejtek készítése

E. coli TOP10F⁻ törzsének 14 órás LB tápoldatban nevelt tenyészetéből 1 ml-t 100 ml LB tápoldatba átoltva a baktériumokat OD₆₀₀=0,6 érték eléréséig növesztettük (200 rpm, 37 °C). A tenyészetet centrifugáltuk (4000 rpm, 10 perc, 4 °C, Hettich), majd a sejteket azonos mennyiségű 4 °C-os, 100 mM-os CaCl₂ oldatban szuszpendáltuk. Az előbbi műveletet megismételtük, majd a 100 mM-os, 4 °C-os CaCl₂ oldatban felvett sejteket 1 órán át jégfürdőben inkubáltuk, ezt követően újra centrifugáltuk (4000 rpm, 10 perc, 4 °C, Hettich). A kiülepedett sejteket 1/20 térfogatú, 100 mM-os, 20% glicerol tartalmú hideg CaCl₂ oldatban szuszpendáltuk fel és 200 µl mennyiségenként Eppendorf csövekbe osztottuk szét, ezeket -70 °C-on fagyasztva tároltuk.

5.4.12. *E. coli* sejtek transzformációja

A baktériumok transzformációját a Sambrook és mtsi. (1989) által ismertetett módon hajtottuk végre. 200 µl fagyasztva tárolt kompetens sejtet jégen felolvasztottunk, majd 5-10 µl ligátumot és 100 µl TCM puffert (10 mM Tris (pH 7,5); 10 mM CaCl₂; 10 mM MgCl₂) adtunk hozzá. Összekeverés után 25 percig jégen inkubáltuk, ezt követően 3,5 perces 37 °C-os hőshockot alkalmaztunk, majd a mintákat 10 percig szobahőmérsékleten állni hagytuk. A mintákból különböző mennyiségeket szélesztettünk 100 µg/ml ampicillint tartalmazó LB táptalajra 40 µl IPTG (izopropil-β-D-tiogalaktopiranozid, 20 mg/ml, Fermentas) és 40 µl X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktopiranozid, 20 mg/ml, Fermentas) jelenlétében (pJET1.2/blunt vektor esetén nem volt szükség színszelekcióra). A transzformáns sejteket 37 °C-on 16-20 óráig

tenyésztettük, az inszert DNS-t tartalmazó vektorokat hordozó baktériumokat szín alapján szelektáltuk (fehér telepek).

5.4.13. Plazmid DNS tisztítása

A plazmid DNS tisztításához a Viogene Mini-MTM Plasmid DNA Extraction System (Viogene) kitet használtuk. A transzformáns baktérium telepekből tisztított plazmidokba beépült inszerteket restriktációs emésztésekkel ellenőriztük, melyeket a standard módszerek szerint végeztünk (Sambrook és mtsi. 1989) mindig az adott körülményekhez optimalizálva.

5.4.14. A $\Delta 9$ deszaturáz szekvenciák elemzése

A $\Delta 9$ deszaturáz fragmentumokat tartalmazó plazmidok szekvenálását az LGC Genomics (Berlin) végezte a plazmidokra tervezett primerek (Frw2 és Rev1) segítségével. A kapott szekvenciákat egyesével összehasonlítottuk adatbanki (NCBI GenBank) szekvenciákkal a BLAST alkalmazás segítségével. Az összehasonlítás alapján igazoltan $\Delta 9$ deszaturáz ellentétes irányból meghatározott szekvenciáiból kontig-ot készítettünk a Staden programcsomag PreGap és Gap4 programjainak felhasználásával (Staden és mtsi., 2000), majd a kontigokból CLUSTAL-W (Thompson és mtsi., 2002) algoritmus alapján a BioEdit (Hall, 1999) program segítségével illesztéseket készítettünk. Az illesztésekbe az adatbankban található *Mo. alpina* $\Delta 9$ deszaturáz, illetve egyéb gomba deszaturáz szekvenciákat is bevontunk.

6. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

6.1. Filogenetikai vizsgálatok

Az általunk meghatározott nrSSU szekvenciákat bevontuk egy kombinált nrLSU, ITS, *tef* és *rpb1* adatokat tartalmazó adatsorba, melyeket szintén munkacsoportunk határozott meg. Erre azért volt szükség, hogy ne csupán egy gén adatain alapuló ún. génfát, hanem a valós viszonyokat jobban tükröző, több gén együttes összehasonlításán alapuló törzsfát kapjunk. Ezen túlmenően az nrSSU szekvenciák nagyfokú hasonlósága is indokoltta az adatok kiegészítését a jóval variábilisabb ITS régió, illetve az nrLSU, a *tef* és az *rpb1* adatokkal. A kiegyensúlyozott taxonmintavételt szem előtt tartva a nagyszámú izolátummal reprezentált fajok közül néhányat kihagytunk a filogenetikai elemzésből, azonban a szénforrás-hasznosítási mintázataikban esetlegesen rejlő különbségek tisztázása céljából bevontuk őket a szénasszimilációs vizsgálatokba. A 107 izolátum (4 *Dissophora*, 1 *Gamsiella*, 1 *Lobosporangium*, 2 *Umbelopsis*, 2 *Micromucor*, 96 *Mortierella* és a külcsoportként választott *Rhizopus oryzae*) szekvenciái alapján számolt törzsfát a 2. mellékletben ábrázoltuk.

A törzsfán jól elkülönülnek az **Umbelopsis** és **Mortierella kládok**. Az **Umbelopsis klád** magába foglalja az *Umbelopsis isabellina* (NRRL 1757), *U. autotrophica* (CBS 310.93) és a *Micromucor* nemzetség képviselőit: *Mi. ramannianus* var. *ramannianus* (SZMC 12036), *Mi. ramannianus* var. *ramannianus* (NRRL 1296), *Mo. ramanniana* var. *angulispora* (CBS 222.29), valamint a *Mo. longicollis*-t (CBS 209.32), ami a külcsoportként definiált Mucorales rendbe tartozó *R. oryzae*-vel alkot testvércsoportot.

A nagy **Mortierella klád** további 12 alkládra osztható: *strangulata*, *globulifera*, *stylospora*, *angusta*, *lignicola*, *selenospora*, *polycephala*, *alpina*, *parvispora*, *wolfii*, *verticillata*, *humilis* és *gamsii*. A **strangulata klád** magas támogatottsági érték mellett magába foglalja a *Mo. strangulata* (CBS 455.67) és a *Mo. rostafinskii* (CBS 522.70) fajokat. A *Gamsiella* és *Dissophora* nemzetségek vizsgálatunkba bevont képviselői a korábbi, szintén a munkacsoportunk által készített három gén (nrSSU, nrLSU, ITS) szekvenciáin alapuló törzsfán még egy nagyobb, alacsony támogatottsági értékű (0,74) **globulifera kládot** alkottak. Az öt gén szekvenciáin alapuló törzsfán azonban a klád magas támogatottsági érték mellett három kisebb kládra: *globulifera*, *stylospora* és *angusta* bontható. A *Mo. globulifera* izolátumai (CBS 858.70, CBS 417.64, FSU 826) alkotják a **globulifera kládot**. A **stylospora kládba** tartoznak a *Mo. stylospora* (CBS 211.32) és testvércsoportként a *Gamsiella multivaricata* (CBS 227.78), ami maximális támogatottsági érték mellett a *Mo. mutabilis* (CBS 308.52) testvércsoportja. Az **angusta kládot** a *Mo. angusta* (CBS 293.61) és az előbbiekhöz hasonlóan magas támogatottsági

értékkel testvércsoportja, a *Dissophora* alkotja. A **lignicola klád** magába foglalja a *Mo. gemmifera* (CBS 134.45, CBS 842.70), *Mo. kuhlmanii* (CBS 157.71), *Mo. chlamydospora* (CBS 120.34, CBS 529.75) és *Mo. beljakovae* (CBS 123.72, CBS 267.71) fajokat. A kládon belüli támogatottsági értékek magasak, mindazonáltal a klád alacsony támogatottsági értékkel ábrázolódik a törzsfán. Szintén ebbe a kládba tartozik még a *Lobosporangium transversale* (NRRL 3116) is, amelynek a helyzete a korábban, három gén adatai alapján készített törzsfán még nem volt egyértelmű, azonban az öt gén adatai alapján készített törzsfán magas támogatottsági értékekkel rendelkezik. A *Mo. parazychnae* (CBS 868.71) testvércsoportként ábrázolódik a törzsfán, azonban a támogatottsági értéke alacsony. Pontos helyzete további törzsek bevonásával tisztázódhat. A **selenospora kládba** tartozik a *Mo. selenospora* izolátumok (CBS 811.68, CBS 452.88) mellett magas támogatottsági értékkel a többi *Mo. wolfii* izolátumtól mind megjelenésében, mind fiziológiai sajátosságaiban eltérő *Mo. wolfii* CBS 614.70 izolátum. A *Mo. polycephala* (CBS 456.66, FSU 696, FSU 866) – mely a *Mortierella* nemzetség típusfaja – egy önálló kládot alkot (**polycephala klád**), s számos mikromorfológiailag hasonló tulajdonságokkal bíró fajt ölel fel, mint például a *Mo. polygonia* (CBS 685.71, CBS 248.81) és a *Mo. indohii* (CBS 720.71, CBS 665.70, FSU 830, FSU 831) fajok. Közös tulajdonságuk, a tenyésztési körülményektől függően, a nagyszámban előforduló stylospórák megléte. Az **alpina klád** képviselői a – névadó faj mellett – a *Mo. amoeboides* (CBS 889.72) és a *Mo. antarctica* (CBS 609.70). Közös élettani sajátosságuk az alacsony hőmérsékleten való növekedés. A **parvispora klád** két alkládra oszlik, az egyik a névadó, maximális támogatottsági értékekkel bíró *Mo. parvispora* (CBS 311.52, FSU 834, FSU 835) izolátumokat tartalmazó csoport, míg a másik csoport számos további fajt tartalmaz: *Mo. turficola* (CBS 432.76, CBS 433.76), *Mo. pulchella* (CBS 312.52), *Mo. cystojenkinii* (CBS 456.71, CBS 660.82) és *Mo. elongatula* (CBS 488.70). A korábbi, három gén adatai alapján készített törzsfán a **selenospora klád** testvércsoportjaként szereplő **wolfii klád** ezen a törzsfán különálló kládot alkot a faj négy termofil izolátumával (CBS 209.69, CBS 612.70, CBS 611.70, CBS 651.93), valamint a szintén ebbe a kládba tartozó *Mo. capitata*-val (CBS 648.68). Ez az izolátum ugyan élettani igényei alapján eltér az előbbiektől, megfelelő táptalajon (MEA) azonban a *Mo. wolfii* izolátumokhoz hasonló rozettaszerű telepmorfológiát mutat. A maximális támogatottsági értékkel bíró **verticillata-humilis klád** számos további fajt foglal magába, úgymint a *Mo. horticola* (CBS 305.52, CBS 869.68), a *Mo. minutissima* var. *dubia* (CBS 307.52, FSU 832), a *Mo. zonata* (CBS 863.68), a *Mo. sossauensis* (CBS 898.68), a *Mo. epicladia* (CBS 355.76) és a *Mo. clonocystis* (CBS 357.76). Az ághosszak, illetve a támogatottsági értékek alapján feltételezhető, hogy a *Mo. verticillata* (CBS 346.66, CBS 374.95), illetve a *Mo. humilis* (CBS 443.68, CBS 745.68, CBS

222.35) fajok valójában egy fajba tartoznak. A törzsfa legtöbb fajt magába foglaló, maximális támogatottsági értékkel bíró csoportja a **gamsii klád**. A kládon belüli elágazások is többnyire 1,00 körüli poszterior valószínűségi értékkel rendelkeznek. Az ide tartozó fajok a *Mo. cogitans* (CBS 879.97), a *Mo. armillariicola* (CBS 914.73), a *Mo. hyalina* (CBS 115655, CBS 306.52), a *Mo. elongatula* (FSU 822, FSU 823), a *Mo. rishiksha* (CBS 652.68), a *Mo. schmuckeri* (CBS 295.59, CBS 156.78), a *Mo. camargensis* (CBS 221.58), a *Mo. acrotona* (CBS 386.71), a *Mo. zychae* (CBS 316.52, CBS 102879), a *Mo. nantahalensis* (CBS 610.70), a *Mo. biramosa* (CBS 370.95) és a *Mo. sarnyensis* (CBS 122.72).

A filogenetikai törzsfa alapján a *Mortierella* nemzetség parafiletikus és magába foglalja a *Dissophora*, *Gamsiella* és *Lobosporangium* génuszokat. Az *Umbelopsis* klád tartalmazza a szinonimként megjelölt *Micromucor* nemzetséget, amit a szénasszimilációs vizsgálatok is alátámasztottak. Az *Umbelopsis* klád a Mucorales rendbe tartozik, ennek megfelelően, a korábban a Mortierellales rendbe sorolt *Micromucor* izolátumok szintén a Mucorales rend tagjai. Elnevezésük ennek megfelelően a közelmúltban módosult, így a *Mi. ramannianus* var. *ramannianus* hivatalos neve *Umbelopsis ramanniana*, míg a *Mo. ramanniana* var. *angulispora* hivatalos neve *Umbelopsis vinacea* lett. A *Mo. longicollis* a Mucorales renddel együtt ábrázolódik vélhetően egy azonosítási hiba eredményeként. A nemzetségen belüli viszonyok minél pontosabb tisztázása érdekében további fajok, illetve izolátumok, valamint egyéb markergének bevonása és elemzése szükséges.

6.2. Szénforrás-hasznosítás vizsgálata

6.2.1. Szénasszimilációs spektrumok felvétele és kiértékelése

Munkánk következő részét képezte az a kísérletsorozat, amelyben meghatároztuk 118 *Mortierella* és rokon izolátum szénasszimilációs profilját 66 szénforrás bevonásával. A kísérletekben azt vizsgáltuk, hogy az egyes törzsek milyen mértékben képesek, illetve képesek-e egyáltalán hasznosítani az adott anyagokat egyedüli szénforrásként. Az egyes szénforrásokon tapasztalt növekedéseket a szénforrásmentes (negatív kontroll) és a glükóz tartalmú táptalajhoz (pozitív kontroll) viszonyítva vizsgáltuk. A szénforrásmentes táptalajon tapasztalt pókhálószerű növekedést – amit a táptalajban lévő agar hasznosítása eredményezett – vettük nullának (0), a glükózon tapasztalt növekedést pedig hármassal erősítettük (+++). Mínusz (-) jelzést akkor adtunk, amikor egyáltalán nem indult meg a növekedés az adott táptalajon a spórák csírázásának gátlása miatt. Az eredményeinket a 3. táblázatban összefoglalva ábrázoltuk.

3. táblázat: A szénforrások csoportosítása az izolátumok hasznosítási képessége alapján.

Minden izolátum által hasznosított szénforrások	D-glükóz, D-mannóz
Az izolátumok többsége által hasznosított szénforrások	D-fruktóz, L-glutamin, inozin, L-tirozin
Egyik izolátum által sem hasznosított szénforrások	xilit, L-alanin, cisz-akonitsav, vanillin, orotsav, galluszsav, L-metionin, protokatechusav, α -metil-D-xilozid
Csak néhány izolátum által hasznosított szénforrások	D-szacharóz, D-lixóz, D-xilóz, L-arabinóz, mio-inozit, cellobióz, raffinóz, szorbit, glükonsav, L-szorbóz, L-ramnóz, laktóz, xilán, dextrán, inulin, L-almasav, fumársav, etanol, eritrit, galaktit, L-glicin, L-leucin, L-valin, L-izoleucin, L-fenilalanin, L-triptofán, L-szerin, L-treonin, L-cisztein, L-hisztidin, L-citrullin, l-metilmannozid, keto-izovaleriánsav, gentizinsav, piroszölősav, aszkorbinsav, melibióz, mannit
Különböző mértékben hasznosított szénforrások	D-galaktóz, maltóz, keményítő, L-prolin, L-aszparagin, L-glutaminsav, ornitin, glicerol-1-monohidrát, borostyánkősav, glicerol, L-lizin, L-arginin, glicerol-l-monoacetát

Megállapításaink a következők: a vizsgált izolátumok mindegyikénél növekedést tapasztaltunk a D-glükózon és a D-mannózon, és további négy szénforráson a legtöbb törzs képes volt növekedni. A D-fruktózt három izolátum nem tudta hasznosítani egyedüli szénforrásként, az izolátumok között azonban nincs közvetlen filogenetikai kapcsolat, mivel a *Mo. rostafinskii* CBS 522.70 a strangulata klád, a *Mo. beljakovae* CBS 123.72 a lignicola klád, míg a *Mo. capitata* CBS 648.68 a wolfii klád tagja. Megfigyeltük azt is, hogy az L-triptofánt csak a *Mo. elongata* FSU 822, míg az l-metilmannozidot csak a *L. transversale* CBS 357.67 izolátum tudta hasznosítani. A vanillin minden vizsgált izolátum csírázását gátolta, rajta kívül további 9 szénforrásnál nem tapasztaltunk növekedést. E szénforrások a törzsek egy részét gátolták, míg más törzsek kicsíráztak ugyan, de további növekedést nem tapasztaltunk. 13 szénforrás esetében különböző mértékű növekedést figyeltünk meg, ami alkalmas lehet az izolátumok közötti rokonsági viszonyok tanulmányozására. A többi 38 szubsztrátot csak néhány törzs tudta hasznosítani.

A rokonsági viszonyokat a nagy mennyiségű adat miatt nehéz volt átlátni, ezért az egyes szénforrásokon tapasztalt növekedéseket különböző színekkel láttuk el, ahol a kék színnel az erős, míg pirossal a gyenge növekedést jelöltük. Sárgával jelöltük, ahol nem tapasztaltunk növekedést (0), míg zölddel, ahol az adott szénforrás kifejezetten gátolta a növekedést (-). Az így kapott szénasszimilációs profilokat az előző fejezetben tárgyalt filogenetikai fához illesztettük és azt vizsgáltuk, hogy ezek megfeleltethetők-e a törzsfa alapján levont következtetéseknek (2. melléklet).

A szénasszimilációs profil alapján elkülönülő csoportok részben egyezést mutattak a molekuláris filogenetikai eredményekkel. A *Mortierella* és az *Umbelopsis* klád szénasszimilációs profilja között jelentős eltéréseket figyeltünk meg, ami szintén alátámasztja a két klád elkülönülését. Az inozinon csak a *Mortierella* fajok tudtak növekedni, az *Umbelopsis* és *Micromucor* fajok nem, ugyanakkor a D-szacharózt, a D-lixózt, a D-xilózt, az L-arabinózt, a raffinózt, a szorbitot, a fumársavat és a mannitot néhány *Mortierella* faj kivételével csak az *Umbelopsis* és *Micromucor* fajok tudták hasznosítani.

Az egyes alkládokon belül nem találtunk olyan szénforrást, ami csak az adott alkládra jellemző, tehát elkülönítő bélyegként szolgálhatna. Egyes nemzetségek (pl. *Dissophora*) ugyan elkülöníthetőek voltak a szénasszimilációs profil alapján, a *Mortierella* nemzetségen belül azonban nagyfokú variabilitást tapasztaltunk. Néhány esetben azt tapasztaltuk, hogy egyes *Mortierella* izolátumok képesek voltak olyan szénforrásokon (pl. D-szacharózon, a *Mo. zonata* CBS 228.35, *Mo. armillaricola* CBS 914.73 és *Mo. schmuckeri* CBS 295.59) is növekedni, amelyen a többi *Mortierella* faj nem, csak a *Micromucor* és *Umbelopsis* fajok növekedtek. A wolfii klád tagjai – a *Mo. capitata* kivételével – a *Micromucor* és *Umbelopsis* fajokhoz hasonlóan az L-lizinen is növekedést mutattak. A *Mo. zonata* (CBS 228.35), a *Mo. camargensis* (CBS 221.58), a *Mo. acrotona* (CBS 386.71), a *Mo. verticillata* (CBS 315.52), a *Mo. beljakovae* (CBS 123.72) és a *Mo. bisporalis* (CBS 145.69) izolátumok is képesek voltak olyan szénforrásokat hasznosítani (pl. D-lixóz, D-xilóz), amelyeken csak a *Micromucor/Umbelopsis* fajok tudtak növekedni.

6.2.2. A szénasszimilációs profil fajon belüli variabilitásának vizsgálata

A filogenetikai elemzés során már említettük, hogy a taxonmintavétel kiegyensúlyozottságának érdekében az nrSSU, nrLSU, ITS, *tef* és *rpb1* szekvencia adatokat tartalmazó törzsfák készítésekor nem minden esetben vizsgáltuk a fajok összes rendelkezésünkre álló izolátumát. A szénasszimilációs vizsgálatokat azonban valamennyi izolátummal elvégeztük, hogy megvizsgáljuk a szénasszimilációs profil fajon belüli variabilitását. Az egyes szénforrások hasznosítását szintén színekkel láttuk el az áttekinthetőség miatt, amit a 3. mellékletben ábrázoltunk.

Az ábrán jól látszik, hogy a *Mo. gamsii* izolátumai a legtöbb esetben ugyanazokat a szénforrásokat hasznosították, mint a többi *Mortierella* faj, de a négy vizsgált *Mo. gamsii* izolátum szénasszimilációs profiljában megfigyeltünk eltéréseket is. Például a CBS 749.68 izolátum a másik három izolátumtól eltérően hasznosítani tudta az L-hisztidint, a melibiózt és a mannitot, de gátolta növekedését az L-glutaminsav. Hasonlóan a CBS 314.52 izolátum L-

szorbózon, L-ramnózon, laktózon, xilánon, inulinon, eritriten, galaktiton és L-glicinen is tudott növekedni, azonban L-aszparaginon nem. A CBS 253.36 és az FSU 824 az L-leucint hasznosította a másik két izolátumtól eltérően. Az FSU 824 a másik három izolátumtól eltérően hasznosította a keményítőt, az L-fenilalanint és az L-lizint. A négy *Mo. gamsii* izolátum a szénforrás-hasznosítási képességeik különbözősége ellenére is egy fajba tartozik a filogenetikai vizsgálatok alapján.

A *Mo. verticillata* öt izolátumánál L-glutaminon, L-prolinon, L-aszparaginon, L-glutaminsavon, ornitinen és glicerol-l-monohidrátion erősebb növekedést tapasztaltunk, mint a többi *Mortierella* fajnál. Ez a jellegzetességük jó elkülönítő bélyegnek bizonyulhat a többi törzshöz képest. A CBS 220.58 izolátum a többitől eltérően növekedett a D-xilózon, L-arabinózon, cellobiózon, szorbiton, L-szorbózon, L-ramnózon, laktózon és dextránon. A CBS 315.52 izolátum hasznosítani tudta az L-fenilalanint, az L-treonint és a piroszőlőssavat. A CBS 346.66 izolátumot, a többi izolátumtól eltérően, gátolta a D-xilóz és az L-cisztein. A CBS 225.35 kevesebb szénforrást tudott hasznosítani, mint a másik négy izolátum. A CBS 374.95 és a CBS 315.52 L-leucinon, míg a CBS 374.95 és CBS 346.66 izolátumok glicerol-l-monoacetáton is növekedtek.

A *Dissophora* nemzetség tagjainak növekedését a *Mortierella* fajoktól eltérően a legtöbb szénforrás gátolta, ami jó elkülönítő bélyegként szolgál. A *D. ornata* izolátumok valamivel több szénforrást tudtak hasznosítani (maltózt, keményítőt, L-aszparagint és L-glutaminsavat is), mint a *D. decumbens* izolátumok, amelyek csak D-glükózon, D-mannózon, D-fruktózon és inozinon nőttek. A szénasszimilációs profilban tapasztalt eltérések ellenére a filogenetikai vizsgálatok a két faj szoros rokonságát mutatták.

A *Mo. parvispora* négy izolátuma között a következő eltéréseket tapasztaltuk: a CBS 311.52 izolátum növekedni tudott L-almasavon, fumársavon, L-ciszteinen, citrullinon, L-argininen, L-tirozinon és glicerol-l-monoacetáton, de L-glutaminon nem. A CBS 304.52 izolátum pedig a borostyánkőssavat tudta jobban hasznosítani. Az FSU 834 izolátum növekedését gátolta a borostyánkőssav, a laktóz, a xilán és a galaktóz. Az FSU 835 izolátum a többi izolátumtól eltérően növekedett L-lizinen és L-leucinon.

A *Mo. hyalina* három izolátuma közül kettőnél tapasztaltunk eltérést: a CBS 115655 izolátum hasznosította az L-szorbózt és az L-ramnózt, míg a CBS 654.52 izolátum az L-glicint, az L-leucint és az L-fenilalanint. A CBS 306.52 izolátum szénasszimilációs profilja a CBS 654.52 izolátummal mutatott egyezést, azonban növekedését – a másik két izolátumtól eltérően – gátolta a galluszsav.

Habár az öt *Mo. wolfii* izolátum közül a CBS 614.70 a törzsfán nem a többi 4 izolátummal egy ágon helyezkedik el, a szénforrás-hasznosítási képességeik közel megegyezők voltak. A többi *Mortierella* fajtól eltérően nem nőttek a D-galaktózon, valamint az L-glutaminsavon, azonban a piroszölősavat és a keto-izovaleriánsavat hasznosítani tudták. Az utóbbin a *Mo. wolfii* izolátumokon kívül csak egy törzs, a *Mo. mutabilis* CBS 308.52 tudott nőni, de a fajok között nincs közvetlen filogenetikai kapcsolat. Ezek a szénforrások alkalmasak lehetnek a *Mo. wolfii* izolátumok többi *Mortierella* fajtól történő megkülönböztetésére.

Az *Umbelopsis* és *Micromucor* izolátumok számos olyan szénforrást képesek voltak hasznosítani, amelyeket a *Mortierella* izolátumok nem. Tanulmányunk alátámasztotta, hogy az *Umbelopsis* nemzetség a *Mortierella* nemzetségtől molekuláris és biokémiai jellegzetességeik alapján is eltér.

Eredményeink azt mutatják, hogy a szénasszimilációs vizsgálatok alkalmasak lehetnek a nagyobb csoportok (*Micromucor/Umbelopsis* nemzetség), valamint egyes fajok (pl. *Mo. verticillata*, *Dissophora* fajok) elkülönítésére. A fajon belüli variabilitás vizsgálatára szintén alkalmas ez a módszer, mivel az azonos fajba tartozó izolátumok esetében is számos eltérést tapasztaltunk.

6.3. A zsírsavtermelés és a zsírsav-bioszintézis vizsgálata

6.3.1. A zsírsavtermelés vizsgálata a *Mortierellales* rend izolátumainál

Munkánk során megvizsgáltuk a *Mortierella* és rokon izolátumok zsírsavtermelését is. A gombatörzseket 10 napig folyadéktenyészetben rázattuk 20 °C-on, majd a szárított micéliumokból ismert koncentrációjú belső standard (margarinsav) jelenlétében az 5.4.6. pontban leírt módszer szerint extraháltuk a zsírsavakat. A zsírsavak detektálásához fluoreszcens származékokat képeztünk, majd a zsírsavak elválasztását HPLC-analízissel végeztük el. Az előzetesen a mintákhoz adott, ismert koncentrációjú belső standard HPLC-analízissel mért mennyiségéből kiszámítottuk az extrakciós módszer hatékonyságát, majd ez alapján kiszámítottuk az 1 g száraz micéliumra vonatkoztatott zsírsavtartalmat, valamint meghatároztuk az egyes izolátumok zsírsavösszetételét. A kapott eredményeket a 4. és 5. mellékletben tüntettük fel. Az izolátumok zsírsavtermelését a filogenetikai adatok tükrében vizsgáltuk, ennek megfelelően kládok szerint elkülönítve mutatjuk be az egyes izolátumok zsírsavtermelését (4. melléklet) és zsírsavprofilját (5. melléklet). Az analízisbe 67 izolátumot vontunk be, de folyamatban van a többi izolátum zsírsavtermelésének vizsgálata is.

Az eredmények alapján elmondható, hogy a *Mi. ramannianus* var. *ramannianus* NRRL 1296 izolátum bizonyult a legjobb zsírsavtermelőnek össz-zsírsavak tekintetében, illetve

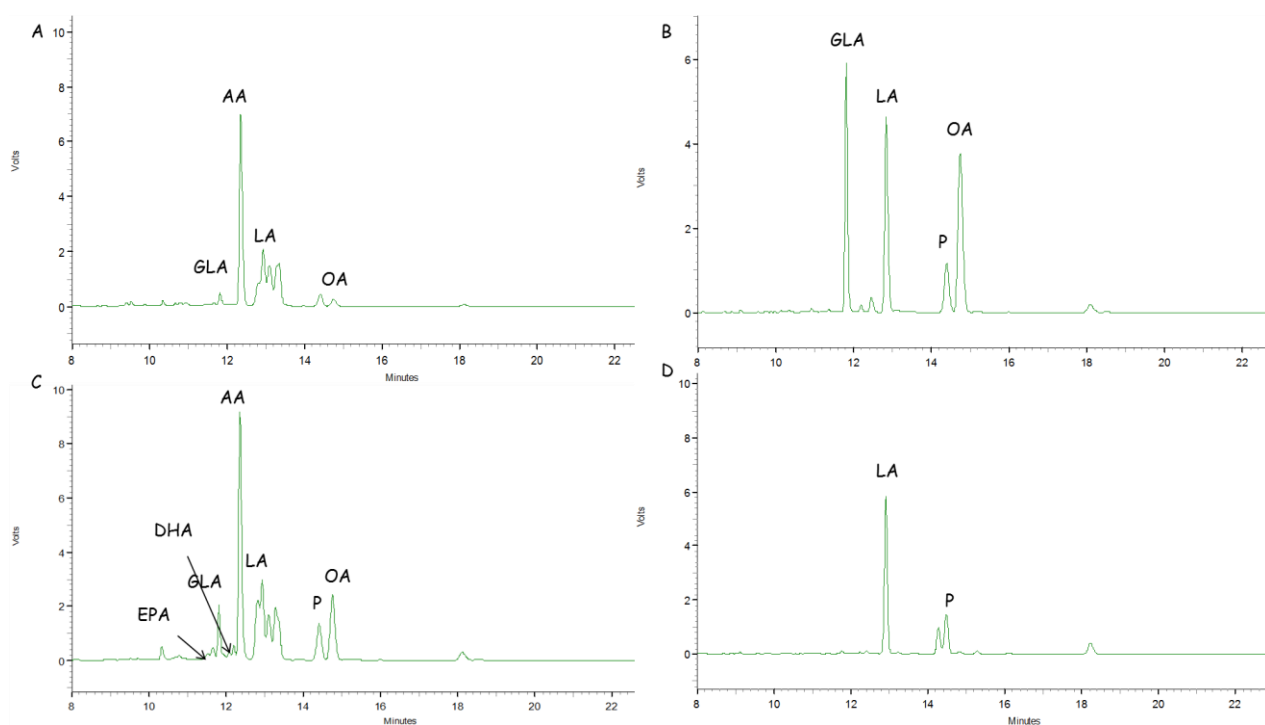
általánosságban elmondhatjuk, hogy a legjobb termelőket a *Micromucor/Umbelopsis* izolátumok (*Mi. ramannianus* var. *ramannianus* M27, *U. angularis* CBS 603.68, *Mi. ramanniana* var. *angulispora* CBS 222.29) között találtuk. A *Mo. alpina* FSU 2698 izolátum esetében a vártnak megfelelően magas zsírsavtermelést tapasztaltunk, azonban a *Mo. selenospora* CBS 452.88 szintén magas zsírsavtermelést mutatott. Számos további jó zsírsavtermelő törzset azonosítottunk a *Mortierella* nemzetség tagjai között is, például a *Mo. schmuckeri* CBS 295.59, a *Mo. gemmifera* CBS 134.45, a *Mo. echinosphaera* CBS 575.75 és a *Mo. beljakovae* CBS 123.72 izolátumokat. Jó zsírsavtermelő törzseket több filogenetikai alkládban is találtunk, tehát a telítetlen zsírsavak termelése általános tulajdonságnak tűnik a *Mortierellales* renden belül. Azt azonban megfigyeltük, hogy habár a *Mortierella* és *Micromucor/Umbelopsis* izolátumok nagy része nagy mennyiségben termelt telítetlen zsírsavakat, a többi nemzetség (*Lobosporangium*, *Dissophora*, *Gamsiella*) izolátumai általában kevés zsírsavat termeltek.

Az egyes zsírsavakat külön-külön vizsgálva a *Mo. alpina* FSU 2698, a várt eredménynek megfelelően, arachidonsav termelésben a legjobbnak bizonyult, ugyanakkor a *Mo. selenospora* CBS 452.88 izolátum hasonlóan magas arachidonsav termelést mutatott. A *Mo. amoeboides* CBS 889.72, a *Mo. gemmifera* CBS 134.45, a *Mo. verticillata* CBS 346.66 és CBS 315.52 izolátuma, a *Mo. selenospora* CBS 811.68, a *Mo. schmuckeri* CBS 295.59, a *Mo. parazycae* CBS 868.71, a *Mo. beljakovae* CBS 123.72, a *Mo. echinosphaera* CBS 575.75 és a *Mo. exigua* CBS 655.68 a tenyésztési körülmények optimalizálása mellett szintén megfelelő törzsek lehetnek arachidonsav termeltetésre.

A termelt zsírsavak mennyisége mellett a zsírsavak összetételét is megvizsgáltuk és jelentős különbséget tapasztaltunk a *Mortierella* és az *Umbelopsis* kládba tartozó törzsek zsírsavprofiljában. A *Mortierella* fajok fő terméke az arachidonsav volt (4A. ábra), emellett kisebb mennyiségben olajsavat, palmitinsavat, linolsavat és γ -linolénsavat termeltek. Egyedüli kivétel a *Mo. histoplasmatoides* CBS 321.78 izolátum volt (4D. ábra), amely csak linolsavat és telített palmitinsavat termelt. A *Lobosporangium*, *Dissophora* és *Gamsiella* nemzetségbe tartozó törzsek habár csak kis mennyiségben termeltek zsírsavakat, ennek döntő részét szintén az arachidonsav tette ki. Ezzel szemben a *Micromucor* és *Umbelopsis* izolátumok zsírsavprofiljának csak kis részét jelentette az arachidonsav, ehelyett közel megegyező mennyiségben termeltek linolsavat, γ -linolénsavat, olajsavat, valamint a telített palmitinsavat (4B. ábra).

Eredményeink megegyeznek Amano és munkatársai (1992) megfigyeléseivel, akik a *Mortierella* és *Micromucor* fajok zsírsavtermelésének vizsgálata során megállapították, hogy a két nemzetség bioszintézis útvonalának különbségei miatt a *Mortierella* fajok inkább a húszszénatomos, míg a *Micromucor* fajok a tizenennyolc-szénatomos telítetlen zsírsavakat termelik

jobban. Hasonló megfigyeléseket tett Certik és Shimizu (1999) is. Egyes törzsek, például a *Mo. selenospora* CBS 452.88 izolátum a *Micromucor* izolátumokhoz hasonlóan nagy mennyiségben termelt γ -linolénsavat, valamint linolsavat és olajsavat is az arachidonsav mellett, kisebb mennyiségben pedig α -linolénsavat, eikozapentaénsavat és dokozaheksaénsavat is kimutattunk (4C. ábra). A 4. ábrán az említett izolátumok HPLC kromatogramjai láthatók, amelyek négy különböző zsírsavprofil szemléltetnek.



4. ábra: A *Mortierella* és *Micromucor* törzsek által termelt zsírsavak HPLC kromatogramjai.
A: *Mo. alpina* FSU 2698, **B:** *Mi. ramannianus* var. *ramannianus* NRRL 1296
C: *Mo. selenospora* CBS 452.88, **D:** *Mo. histoplasmatoides* CBS 321.78

Összefoglalásként elmondható, hogy számos jó zsírsavtermelő törzset azonosítottunk, melyek főként arachidonsavat és γ -linolénsavat termeltek. Megállapítottuk azt is, hogy a *Mortierella* és *Umbelopsis* izolátumok zsírsavtermelésében tapasztalt különbségek alkalmasak lehetnek kemotaxonómiai markerként a törzsek elkülönítésére. A későbbi terveink között szerepel a zsírsavprofil megváltoztatása a tenyésztési körülmények változtatásával, valamint a jó zsírsavtermelőnek bizonyult izolátumok zsírsavtermelési körülményeinek optimalizálása.

6.3.2. A $\Delta 9$ deszaturáz gén azonosítása *Mortierella* izolátumokban

Adatbanki szekvenciákat felhasználva, ismert $\Delta 9$ deszaturáz gének (*Mo. alpina* CBS 608.70 és 1S-4, valamint *Aspergillus flavus* NRRL 3357, *Amylomyces rouxii* ATCC 24905 és

Ajellomyces capsulatus IGS4/5) összehasonlítása alapján degenerált primereket terveztünk a *Mortierella* izolátumok $\Delta 9$ deszaturáz génjének amplifikációjához. A tisztított genomi DNS-ből PCR technika segítségével felamplifikáltuk a kívánt génszakaszokat, melyeket klónozó vektorokba építettünk és *E. coli* TOP10F- törzsébe transzformáltunk. A transzformáns telepekből tisztított plazmidokat a klónozó vektorokra tervezett primerek segítségével megszekvenáltattuk (LGC Genomics, Berlin). Az azonosított szekvenciákat a Staden Package programjaival illesztettük. A $\Delta 9$ deszaturáz gének azonosítását 40 izolátumnál kezdtük meg, ezek közül eddig tizenöt izolátumból sikerült a $\Delta 9$ deszaturáz részleges génszekvenciákat azonosítani. A nukleotid szekvenciákból nyert aminosav szekvenciákat összevetettük az adatbankban megtalálható *Mo. alpina* izolátumok (1S-4, CBS 528.72, CBS 210.32, CBS 608.70) $\Delta 9$ génjeinek aminosav szekvenciáival. Az izolátumokból azonosított $\Delta 9$ deszaturáz génfragmentumok a *Mo. alpina* izolátumok $\Delta 9$ -1 (94-100%-os) és $\Delta 9$ -2 (94-98%-os) kópiájával nagyfokú, míg a $\Delta 9$ -3 kópiával kisebb mértékű (79-80%-os) egyezést mutattak. A *Mo. alpina* CBS 210.32, a *Mo. antarctica* CBS 609.70, a *Mo. chlamydospora* CBS 120.34, a *Mo. gamsii* CBS 749.68 és a *Mo. verticillata* CBS 346.66 izolátumok $\Delta 9$ génfragmentumai nem tartalmaztak intront. A *Mo. microzygospora* CBS 880.97 izolátumból azonosított $\Delta 9$ gén az előzőekkel ellentétben 2 intront is tartalmazott, ami általában a $\Delta 9$ -3 kópiára jellemző, azonban az összehasonlítás során ez is a $\Delta 9$ -1 (98%) és $\Delta 9$ -2- (96%) kópiával mutatott nagyobb egyezést. A többi génfragmentum a vártak megfelelően 1 intront tartalmazott. Egy izolátum kivételével (*Mo. verticillata* CBS 346.66) minden azonosított génfragmentum 185 aminosav hosszú deszaturáz részletet kódolt. Eredményeinket a 4. táblázatban összesítve ábrázoltuk.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy 15 *Mortierella* izolátumban sikeresen azonosítottuk a $\Delta 9$ deszaturáz gén egy részletét. Az azonosított szekvenciák mindegyike a $\Delta 9$ -1 kópiával mutatta a legnagyobb egyezést. A *Mortierella* izolátumok nukleotid szekvenciáiból nyert aminosav szekvenciákat összehasonlítottuk adatbanki *Mo. alpina* $\Delta 9$ deszaturáz szekvenciákkal, illetve más gombák (*Saccharomyces cerevisiae*, *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus curvatus* és *Ogataea angusta*) $\Delta 9$ szekvenciáival is. Az összehasonlítás a 6. mellékletben látható.

Eredményeink alapján elmondható, hogy a 8 konzervált hisztidin mind az adatbanki, mind az általunk azonosított deszaturázoknál megtalálható. Az általunk azonosított *Mortierella* deszaturázok nagymértékben megegyeztek egymással, illetve az adatbanki *Mo. alpina* deszaturázokkal, azonban több ponton eltért az aminosav szekvenciájuk a *Mo. alpina* 528.72 $\Delta 9$ -3 kópiájához és a többi fonális gomba deszaturázhoz képest.

4. táblázat : Azonosított $\Delta 9$ szekvenciák összehasonlítása adatbanki *Mo. alpina* deszaturáz szekvenciákkal

Izolátum	Azonosított szakasz (bp)	Aminosav	Intron (bp)	$\Delta 9$ -1 egyezés	$\Delta 9$ -2 egyezés	$\Delta 9$ -3 egyezés
<i>Mo. alpina</i> CBS 210.32	557	185	-	99 %	95-97 %	79 %
<i>Mo. amoeboides</i> CBS 889.72	708	185	151	100 %	96-97 %	80 %
<i>Mo. antarctica</i> CBS 609.70	557	185	-	98 %	94-96 %	79 %
<i>Mo. armillariicola</i> CBS 914.73	662	185	106	97 %	95-96 %	79 %
<i>Mo. chlamydospora</i> CBS 120.34	557	185	-	97 %	94 %	77-78 %
<i>Mo. elongatula</i> CBS 489.70	722	185	165	98 %	95-96 %	79 %
<i>Mo. epicladia</i> CBS 355.76	778	185	221	98 %	96-97 %	79 %
<i>Mo. gamsii</i> CBS 749.68	557	185	-	98 %	96-97 %	79 %
<i>Mo. globulifera</i> CBS 858.70	839	185	282	99 %	96-97 %	79 %
<i>Mo. horticola</i> CBS 305.52	822	185	265	99 %	96-98 %	80 %
<i>Mo. humilis</i> CBS 222.35	834	185	277	99 %	96-98 %	80 %
<i>Mo. microzygospora</i> CBS 880.97	766	185	90,119	98 %	96 %	79 %
<i>Mo. mutabilis</i> CBS 308.52	733	185	176	98 %	95-96 %	79-80 %
<i>Mo. schmuckeri</i> CBS 295.59	679	185	165	98 %	95-97 %	79 %
<i>Mo. verticillata</i> CBS 346.66	554	184	-	94 %	94 %	78-79 %

Például a 20.-30. aminosav közötti régióban a *Mo. alpina* CBS 528.72 $\Delta 3$ és a többi nem *Mortierella* izolátum esetében nagyobb eltéréseket tapasztaltunk, szintén nagyfokú variabilitást mutatott a 77.-90. aminosavig terjedő régió. A 143. és 144. aminosav a legtöbb esetben hisztidin, míg a *S. cerevisiae*, *H. capsulatum* és *O. angusta* esetében két glutaminsavat találunk ebben a pozícióban. A *S. cerevisiae*, *C. curvatus* és *H. capsulatum* esetében a 162.-180. aminosav régióban is találtunk eltéréseket, ami a többi izolátumban konzervált régiót fedett le. Általánosságban elmondható, hogy az általunk azonosított és az adatbanki szekvenciákban a hisztidin-régiók egy-egy aminosav eltéréstől eltekintve konzerváltak voltak.

További terveink között szerepel a $\Delta 9$ deszaturáz gén azonosítása további *Mortierella* és rokon izolátumok esetében is, valamint a zsírsavtermelésben résztvevő további $\Delta 5$, $\Delta 6$, $\Delta 12$ deszaturáz gének azonosítása is.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk során a 18S riboszómális kis alegységet (nrSSU) kódoló génszakasz PCR technikával történő felszaporítását végeztük el 106 *Mortierella* és rokon nemzetségek izolátumainak esetében. A kapott nrSSU szekvenciákat felhasználtuk egy kombinált, ITS, nrLSU, *tef* és *rpb1* szekvenciákat is tartalmazó filogenetikai törzsfá számolására, mellyel a *Mortierellales* renden belüli filogenetikai viszonyokat szeretnénk tisztázni. A kombinált törzsfán elkülönítettük az *Umbelopsis* és *Mortierella* kládokat, az utóbbit a rokonsági viszonyoknak megfelelően további 12 alkládra osztottuk fel. Megállapítottuk, hogy a *Mortierella* nemzetség parafiletikus és magába foglalja a *Dissophora*, *Gamsiella* és *Lobosporangium* génuszokat, míg az *Umbelopsis* klád tartalmazza a szinonimként megjelölt *Micromucor* nemzetséget.

Ezzel párhuzamosan megvizsgáltuk ugyanezen izolátumok szénasszimilációs spektrumát 66 különféle vegyületet, mint egyedüli szénforrást tesztelve. A szénasszimilációs profilokat összevetettük a filogenetikai adatokkal annak eldöntésére, hogy ezek megfeleltethetők-e a törzsfá alapján levont következtetéseknek. Eredményeink alátámasztották az *Umbelopsis/Micromucor* és *Mortierella* kládok elkülönülését, illetve egyes nemzetségek (pl. *Dissophora*) szintén elkülöníthetők voltak a szénasszimilációs profil alapján. A *Mortierella* nemzetségen belül nagyfokú variabilitást tapasztaltunk.

Munkánk másik részében megvizsgáltuk 67 *Mortierella* és rokon izolátum zsírsavtermelését és zsírsavösszetételét HPLC analízis alkalmazásával. A zsírsavtermelési eredményeket szintén összevetettük a filogenetikai analízis során kapott eredményekkel és megállapítottuk, hogy a *Micromucor/Umbelopsis* és a *Mortierella* fajok zsírsavtermelésük alapján is két különböző csoportot alkotnak. A *Mortierella* fajok főleg arachidonsavat termelnek, míg a *Micromucor/Umbelopsis* fajok fő terméke a γ -linolénsav, a linolsav, az olajsav és a palmitinsav. Számos telítetlen zsírsavtermelő törzset azonosítottunk, és megállapítottuk, hogy a legnagyobb hozammal rendelkező törzsek a *Micromucor/Umbelopsis* fajok között találhatók. Ezzel párhuzamosan megkezdjük a zsírsavtermelésben szerepet játszó $\Delta 9$ deszaturázt kódoló gén azonosítását a zsírsavtermelő izolátumokban. Adatbanki szekvenciák alapján tervezett degenerált primerek segítségével felszaporítottuk a $\Delta 9$ deszaturáz gén részleges szakaszát különböző *Mortierella* izolátumokból. A PCR során kapott termékeket vektorokba klónoztuk, majd *E. coli*-ba transzformáltuk. A baktériumokból tisztított, megfelelő inszertet tartalmazó plazmidokat megszekvenáltattuk, majd a kapott szekvenciákat összehasonlítottuk adatbanki $\Delta 9$ deszaturáz génekkel. Az azonosított szekvenciák mindegyike az adatbankban található *Mo. alpina* $\Delta 9$

deszaturáz génjének egyes kópiájával ($\Delta 9-1$) mutatta a legnagyobb egyezést. Az azonosított $\Delta 9$ deszaturáz génfragmentumok egymással is nagy hasonlóságot mutattak, habár az intronok számában és hosszában jelentős különbségeket tapasztaltunk.

Későbbi terveink között szerepel a zsírsavtermelésben résztvevő $\Delta 9$ deszaturáz gén azonosításának folytatása a rendelkezésünkre álló izolátumokból. Tervezzük még más ($\Delta 5$, $\Delta 6$ és $\Delta 12$) deszaturáz gének azonosítását is, ezen kívül a tenyésztési körülmények zsírsavprofilra gyakorolt hatásának vizsgálatát és a zsírsavtermelés körülményeinek optimalizálását a jó zsírsavtermelő fajokban.

8. IRODALOMJEGYZÉK

- Abe, T., Sakuradani, E., Asano, T., Kanamaru, H., Shimizu, S. (2006) Functional characterization of $\Delta 9$ and $\omega 9$ desaturase genes in *Mortierella alpina* 1S-4 and its derivative mutants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70: 711-719.
- Altekar, G., Dwarkadas, S., Huelsenbeck, J. P., Ronquist, F. (2004) Parallel Metropolis coupled Markov chain Monte Carlo for Bayesian phylogenetic inference. *Bioinformatics* 20: 407-415.
- Amano, N., Shinmen, Y., Akimoto, K., Kawashima, H., Amachi, T. (1992) Chemotaxonomic significance of fatty acid composition in the genus *Mortierella* (Zygomycetes, *Mortierellaceae*). *Mycotaxon* 44: 257-265.
- Amri, E., Bertrand, B., Ailhaud, G., Grimaldi, P. (1991) Regulation of adipose cell differentiation: fatty acids are inducers of the aP2 gene expression. *J. Lipid. Res.* 32: 1449-1456.
- Bajpai, P. K., Bajpai, P., Ward, O. P. (1991) Production of arachidonic acid by *Mortierella alpina* ATCC 32222. *J. Ind. Microbiol.* 31: 179-186.
- Benjamin, R. K. (1979) Zygomycetes and their spores. In: Kendrick, B. (ed.) The whole fungus the sexual-asexual synthesis. National Museum of Natural Science, National Museums of Canada and The Kananaskis Foundation. Ottawa, Canada, pp. 573-616.
- Benny, G. L., Humber, R. A., Morton, J. B. (2001) The Zygomycota: Zygomycetes. In: McLaughlin, D. J., McLaughlin, E. G., Lemke, P. A. (eds.) The Mycota, Vol. 7A, Systematics and Evolution. Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp. 113-146.
- Benny, G. L. (2005) Zygomycetes. Published on the Internet at <http://www.zygomycetes.org>.
- Cavalier-Smith, T. (1998) A revised six-kingdom system of life. *Biol. Rev.* 73: 203-266.
- Cerdá-Olmedo, E. (2001) Phycomyces and the biology of light and color. *FEMS Microbiol. Rev.* 25 (5): 503-512.
- Certik, M., Shimizu, S. (1998) Progress in polyunsaturated fatty acid production by fungi. In: Pandalai, S. G. (ed.) Recent research developments in oil chemistry, Vol.2., Transworld Research Network, Trivandrum, pp. 89-103.
- Certik, M., Sakuradani, E., Shimizu, S. (1998) Desaturase- defective fungal mutants: useful tools for the regulation and overproduction of polyunsaturated fatty acids. *Elsevier* 16 (12): 500-505.
- Certik, M., Shimizu, S. (1999) Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. *J. Biosci. Bioeng.* 87 (1): 1-14.

- Chayakulkeeree, M., Ghannoum, M. A., Perfect, J. R. (2006) Zygomycosis: the re-emerging fungal infection. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 25: 215-229.
- De Ruiter, G. A., van Bruggen-van der Lugt, A. W., Rombouts, F. M., Gams, W. (1993) Approaches to the classification of the *Mortierella isabellina* group: antigenic extracellular polysaccharides. *Mycol. Res.* 97: 690-696.
- Devoyod, J. J. (1988) Microbial accidents in cheese making due to *Mucor*. *Microbiologie-Aliments-Nutrition* 6: 25-29.
- Din, J. N., Newby, D. E., Flapan, A. D. (2004) Omega 3 fatty acids and cardiovascular disease-fishing for a natural treatment. *BMJ* 328: 30-35.
- Distel, R. J., Robinson, G. S., Spiegelman, B. M. (1992) Fatty acid regulation of gene expression: transcriptional and post-transcriptional mechanism. *J. Biol. Chem.* 267: 5937-5941.
- Dyal, S. D., Narine, S. S. (2005) Implication for the use of *Mortierella* fungi in the industrial production of essential fatty acids. *Food. Res. Int.* 38: 445-467.
- Gams, W. (1977) A key to the species of *Mortierella*. *Persoonia* 9: 381-391.
- Gill, I., Valivety, R. (1997) Polyunsaturated fatty acids, Part 1: Occurrence, biological activities and applications. *Trends Biotechnol.* 15: 401-409.
- Godtfredsen, S. E. (1990) Microbial lipases. In: Fogarty, W. M., Kelly, C. T. (eds.) *Microbial enzymes and biotechnology*, 2nd ed., Elsevier, London, UK, pp. 255-274.
- Guindon, S., Gascuel, O. (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* 52 (5): 696-704.
- Hall, T. A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* 41: 95-98.
- Han, B. Z., Rombouts, F. M., Nout, M. J. R. (2001) A Chinese fermented soybean food. *Int. J. Food Microbiol.* 65: 1-10.
- Hawksworth, D. L., Kirk, P. M., Sutton, B. C., Pegler, D. N. (1995) *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi*, 8th Edition, CAB International, Wallingford, UK pp. 294, 496, 536-540, 593-594.
- Hempenius, R. A., Lina, B. A. R., Haggit, R. C. (2000) Evaluation of a subchronic (13-week) oral toxicity study, preceded by an in utero exposure phase, with arachidonic acid oil derived from *Mortierella alpina* in rats. *Food. Chem. Toxicol.* 38: 127-139.
- Hempenius, R. A., van Delft, J. M. H., Prinsen, M., Lina, B. A. R. (1997) Preliminary safety assessment of an arachidonic acid-enriched oil derived from *Mortierella alpina*: summary of toxicological data. *Food. Chem. Toxicol.* 35: 573-581.

- Hesseltine, C. W., Ellis, J. J. (1973) Mucorales. In: Ainsworth, G. C., Sparow, F. K. Sussmann, A. S. (eds.) *The Fungi: An Advanced Treatise. Vol. IV B: A Taxonomic Review with Keys: Basidiomycetes and Lower Fungi.* Academic Press, London, pp. 187-217.
- Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., et al. (2007) A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol. Res.* 111: 509-547.
- Higashiyama, K., Fujikawa, S., Park, E. Y., Shimizu, S. (2002) Production of arachidonic acid by *Mortierella* fungi. *Biotechnol. Bioprocess. Eng.* 7: 252-262.
- Ho, Sz-Y., Jiang, Y., Chen, F. (2007) Polyunsaturated Fatty Acids (PUFAs) Content of the Fungus *Mortierella alpina* Isolated from Soil. *J. Agric. Food Chem.* 55: 3960-3966.
- Horrobin, D. F. (1995) Medical roles of metabolites of precursor EFA. *Inform.* 6: 428-435.
- Innis, S. M. (1991) Essential fatty acids in growth and development. *Prog. Lipid Res.* 30: 93-13.
- Jackson, F. M., Michaelson, L., Fraser, T. C., Stobart, A. K., Griffiths, G. (1998) Biosynthesis of triacylglycerol in the filamentous fungus *Mucor circinelloides*. *Microbiology* 144: 2639-2645.
- Jang, H.-D., Lin, Y.-Y., Yang, S.-S. (2005) Effect of culture media and conditions on polyunsaturated fatty acids production by *Mortierella alpina*. *Bioresource Technol.* 96: 1633-1644.
- Johnson, C. T., Lupson, G. R., Lawrence, K. E. (1990) *Mortierella wolfii* abortion in British cows. *Vet. Rec.* 127 (14): 363.
- Kwaśna, H., Ward E., Bateman G. L. (2006) Phylogenetic relationships among Zygomycetes from soil based on ITS1/2 rDNA sequences. *Mycol. Res.* 110: 501-510.
- Landschulz, K. T., Jump, D. B., MacDougald, O. A., Lane, M. D. (1994) Transcriptional control of the stearyl-CoA desaturase-1 gene by polyunsaturated fatty acids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 200: 763-768.
- Leman, J. (1997) Oleaginous microorganisms: an assessment of the potential. *Adv. Appl. Microbiol.* 43: 195-243.
- Madyastha, K. M., Srivatsan, J. (1987) Novel transformations of progesterone by a *Mucor* sp. *Can. J. Microbiol.* 33: 361-365.
- Meyer, W., Gams, W. (2003) Delimitation of *Umbelopsis* (*Mucorales*, *Umbelopsidaceae* fam. nov.) based on ITS sequence and RFLP data. *Mycol. Res.* 107: 339-350.
- Michailides, T. J., Ogawa, J. M. (1985) A comparative study of growth characteristics and pathogenicity of *Mucor piriformis* isolates causing decay of peaches and nectarines. *Phytopathology* 75: 1008.

- Murphy, D. (1991) Storage lipid bodies in plants and other organisms. *Prog. Lipid Res.* 29: 299-324.
- Ntambi, J. M. (1992) Dietary regulation of stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression in mouse liver. *J. Biol. Chem.* 267: 10925-10930.
- O'Donnel, K., Lutzoni, F. M., Ward, T. J., Benny, G. L. (2001) Evolutionary relationship among mucoralean fungi (Zygomycota): evidence for family polyphyly on a large scale. *Mycologia* 93: 286-296.
- Outtrup, H., Boyce, C. O. L. (1990) Microbial proteinases and biotechnology. In: FogaR.T.y, W. M., Kelly, C. T. (eds.) *Microbial enzymes and biotechnology*, Elsevier Applied Science Publ., London, pp. 227-254.
- Radwan, S. S. (1991) Sources of C₂₀-polyunsaturated fatty acids for biotechnical use. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35: 421-430.
- Ribes, J. A., Vanover-Sams, C. L., Baker, D. J. (2000) Zygomycetes in Human Disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 13: 236-301.
- Roshan, U., Livesay, D. R. (2006) Probalign: Multiple sequence alignment using partition function posterior probabilities. *Bioinformatics* 22: 2715-2721.
- Ruiter, G. A., van Bruggen-Van der Lugt, A. W., Rombouts, F. M., Gams, W. (1993) Approaches to the classification of the *Mortierella isabellina* group (Mucorales). Taxonomic value of extracellular polysaccharides. *Mycol. Res.* 97: 690-696.
- Sakuradani, E., Shimizu, S. (2009) Single cell oil production by *Mortierella alpina*. *J. Biotechnol.* 144: 30-36.
- Sakuradani, E., Kobayashi, M., Shimizu, S. (1999) Δ^9 -Fatty acid desaturase from arachidonic acid-producing fungus. Unique gene sequence and its heterologous expression in a fungus, *Aspergillus*. *Eur. J. Biochem.* 260: 208-216.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual* (2nd ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sessler, A. M., Ntambi, J. M. (1998) Polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression. *J. Nutr.* 128: 923-926.
- Shanklin, J., Whittle, E., Fox, B. G. (1994) Eight histidine residues are catalytically essential in a membrane-associated iron enzyme, stearoyl-CoA desaturase, and are conserved in alkane hydroxylase and xylene monooxygenase. *Biochemistry* 33: 12787-12794.
- Shinmen, Y., Kawashima, H., Shimizu, S., Yamada, H. (1992) Concentration of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid in an arachidonic acid-producing

- fungus, *Mortierella alpina* 1S-4, grown with fish oil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38: 301-304.
- Singh, A., Ward, O. P. (1997) Production of high yields of arachidonic acid in a fed-batch system by *Mortierella alpina* ATCC 32222. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48: 1-5.
- Staden, R., Beal, K. F., Bonfield, J. K. (2000) The Staden Package, 1998. *Methods Mol. Biol.* 132: 115-130.
- Streekstra, H. (1997) On the safety of *Mortierella alpina* for the production of food ingredients, such as arachidonic acid. *J. Biotechnol.* 56: 153-165.
- Suresh, Y., Das, U. N. (2003) Long-chain polyunsaturated fatty acids and chemically induced diabetes mellitus: effect of ω -6 fatty acids. *Nutrition* 19: 93-114.
- Suresh, Y., Das, U. N. (2006) Differential effect of saturated, monounsaturated, and polyunsaturated fatty acids on alloxan-induced diabetes mellitus. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 74: 199-213.
- Tanabe, Y., O'Donnel, K., Saikawa, M., Sugiyama, J. (2000) Molecular phylogeny of parasitic Zygomycota (Dimargaritales, Zoopagales) based on nuclear small subunit ribosomal sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 16: 253-262.
- Taylor, J. W., Spatafora, J., O'Donnell, K., Lutzoni, F., James, T., Hibbett, D. S., Geiser, D., Bruns, T. D., Blackwell, M. (2004) The Fungi. In: Cracraft, J., Donoghue, M. J. (eds.) *Assembling the tree of life*. New Haven, Yale University Press, pp. 171-194.
- Tebbey, P. W. és Buttke, T. M. (1993) Independent arachidonic acid-mediated gene regulatory pathways in lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 194: 862-868.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Higgins, D. G. (2002) Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Curr Protoc Bioinformatics* Chapter 2: Unit 2.3.
- Vazhappilly, R., Chen, F. (1998) Eicosapentaenoic acid and docosahexanoic acid production potential of microalgae and their heterotrophic growth. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75: 393-397.
- Vilgalys, R. Conserved primer sequences for PCR amplification and sequencing from nuclear ribosomal RNA. www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm
- Voigt, K., Cigelnik, E., O'Donnell, K. (1999) Phylogeny and PCR identification of clinically important zygomycetes based on nuclear ribosomal-DNA sequence data. *J. Clin. Microbiol.* 37: 3957-3964.
- Voigt, K., Wöstemeyer, J. (2001) Phylogeny and origin of 82 zygomycetes from all 54 genera of the Mucorales and Mortierellales based on combined analysis of actin and translation elongation factor EF-1 α genes. *Gene* 270: 113-120.

- Walsh, T. J., Groll, A., Hiemenz, J., Fleming, R., Roilides, E., Anaissie, E. (2004) Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. *Clin. Microbiol. Infect.* 10(S1): 48-66.
- Ward, O. P., Singh, A. (2005) Omega-3/6 fatty acids: alternative sources of production. *Process Biochem.* 40: 3627-3652.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J. (eds.) PCR protocols: a guide to methods and applications, Academic Press, San Diego, pp. 315-322.
- Wongwathanarat, P., Michaelson, L. V., Carter, A. T., Lazarus, C. M., Griffiths, G., Stobart, A. K., Archer, D. B., Mackenzie, D. A. (1999) Two fatty acid $\Delta 9$ desaturase genes, *ole1* and *ole2*, from *Mortierella alpina* complement the yeast *ole1* mutation. *Microbiology* 145: 2939-2946.
- Zycha, H., Siepmann, R., Linnemann, G. (1969) Mucorales. Eine Beschreibung aller Gattungen und Arten dieser Pilzgruppe mit einem Beitrag zur Gattung *Mortierella*. J. Cramer, Lehre, Germany, pp. 2-244, 283-284.

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom mindenekelőtt az SZTE TTIK Mikrobiológiai Tanszék Tanszékvezetőjének, Prof. Dr. Vágvölgyi Csabának, hogy lehetővé tette, hogy szakdolgozóként bekapcsolódhattam a Mikrobiológiai Tanszék munkájába.

Ezen kívül szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek: Dr. Nyilasi Ildikónak és Dr. Papp Tamásnak türelmükért és hasznos tanácsaikért, melyeket munkám során kaptam.

Szintén hálával tartozom Petkovits Tamásnak a filogenetikai analízisben, Dr. Szekeres Andrásnak és Bencsik Ottónak a HPLC analízis során nyújtott segítségéért, Nagy Gábornak, valamint a 309-es labor minden dolgozójának.

És végezetül, de nem utolsósorban köszönettel tartozom családomnak, szüleimnek, akik egész életem során támogattak és mellettem álltak.

10. Mellékletek

1. Melléklet: Felhasznált törzsek.

Sorszám	Fajnév	Kód	Törzsgyűjteményes kód	Szubsztrát / Eredet	Optimális növekedési hőmérséklet	Szénforrás hasznosítás	SSU szekvencia	Zsírsv termelés	Δ9 szekvencia	Megjegyzés
1	<i>Gamsiella multidivariata</i>	CBS 227.78	SZMC 11224	Korhadt fa / Oroszo.	R.T.	X	X	X		<i>Mortierella multidivariata</i> izotípusa
2	<i>Dissophora ornata</i>	CBS 348.77	SZMC 11221	Erdőtalaj / Kolumbia	R.T.	X	X	X		<i>Mortierella ornata</i> holotípusa
3	<i>Dissophora decumbens</i>	CBS 301.87	SZMC 11206	Tölgy-juhar fahulladék / USA	0°C / 2 hó 15°C	X	X	X		<i>Mortierella ornata</i>
4	<i>Dissophora decumbens</i>	CBS 592.88	SZMC 11216	Tölgy-juhar levél / USA	0°C / 2 hó 15°C	X	X	X		N.A.-
5	<i>Mortierella chlamydospora</i>	CBS 120.34	SZMC 11219	fertőzött oroszlánszáj	21°C	X	X	X	X	<i>Azygozygum chlamydosporum</i> szüntípusa
6	<i>Mortierella gemmifera</i>	CBS 134.45	SZMC 11201	Fenyőerdő talaj / UK	21°C	X	X	X		<i>Mo. gemmifera</i> típustörzs
7	<i>Mortierella longicollis</i>	CBS 209.32	SZMC 11208	Homokos talaj / Ausztrália	R.T.	X	X			<i>Mo. longicollis</i> autentikus törzse
8	<i>Mortierella alpina</i>	CBS 210.32	SZMC 11213	Homokos talaj / Ausztrália	21°C	X	X	X	X	<i>Mo. renispora</i> autentikus törzse
9	<i>Mortierella humilis</i>	CBS 222.35	SZMC 11220	Fenyőerdő talaja / Mexikó	21°C	X	X		X	<i>Mo. humilis</i> szüntípusa, MT-
10	<i>Mortierella horticola</i>	CBS 305.52	SZMC 11218	Németo.	R.T.	X	X	X	X	<i>Mo. horticola</i> szüntípusa
11	<i>Mortierella mutabilis</i>	CBS 308.52	SZMC 11202	Németo.	R.T.	X	X	X	X	<i>Mo. mutabilis</i> szüntípusa
12	<i>Mortierella parvispora</i>	CBS 311.52	SZMC 11225	Talaj / Németo.	18°C	X	X	X		<i>Mo. parvispora</i> szüntípusa
13	<i>Mortierella zychae</i>	CBS 316.52	SZMC 11212	Korhadt fa / Németo.	R.T.	X	X	X		<i>Mo. zychae</i> típustörzs
14	<i>Mortierella verticillata</i>	CBS 346.66	SZMC 11205	Tundra talaj / Alaszka, USA	R.T.	X	X	X	X	<i>Mo. marburgensis</i> , MT+
15	<i>Mortierella turficola</i>	CBS 432.76	SZMC 11207	Tőzegmoha / Hollandia	R.T.	X	X	X		<i>Mo. turficola</i> neotípus, MT-
16	<i>Mortierella epigama</i>	CBS 489.70	SZMC 11210	hulladék / Németo.	21°C	X	X	X		<i>Mo. epigama</i> típustörzs
17	<i>Mortierella sclerotiella</i>	CBS 529.68	SZMC 11214	Egér ürülék / Ukrajna	R.T.	X	X	X		<i>Mo. sclerotiella</i> típustörzs
18	<i>Mortierella antarctica</i>	CBS 609.70	SZMC 11217	Talaj, gleccser, sziklarés / Antarktis	21°C	X	X		X	<i>Mo. antarctica</i> típustörzs

19	<i>Mortierella nantahalensis</i>	CBS 610.70	SZMC 11222	Talaj / USA	R.T.	X	X			<i>Mo. nantahalensis</i> típustörzs
20	<i>Mortierella polygonia</i>	CBS 685.71	SZMC 11203	Talaj / Hollandia	21°C	X	X	X		<i>Mo. polygonia</i> típustörzs
21	<i>Mortierella gamsii</i>	CBS 749.68	SZMC 11215	Talaj / Hollandia	21°C	X	X	X	X	<i>Mo. spinosa</i> , <i>Mo. candelabrum</i> , <i>Mo. gamsii</i> típustörzs
22	<i>Mortierella selenospora</i>	CBS 811.68	SZMC 11204	Gomba komposzt / Hollandia	R.T.	X	X	X		<i>Mo. selenospora</i> típustörzs
23	<i>Mortierella globulifera</i>	CBS 858.70	SZMC 11209	csomós ebir gyökere / Anglia	21°C	X	X	X	X	<i>Mo. globulifera</i> neotípus, MT+
24	<i>Mortierella schmuckeri</i>	CBS 295.59	SZMC 11207	<i>Opuntia</i> alatti talaj / Mexikó	R.T.	X	X	X	X	<i>Mo. schmuckeri</i> szüntípusa
25	<i>Mortierella parazychae</i>	CBS 868.71	SZMC 11223	Korhadó fenyő / Hollandia	21°C	X	X	X		<i>Mo. parazychae</i> típustörzs
26	<i>Umbelopsis isabellina</i>	NRRL 1757	SZMC 11076	Talaj / USA	R.T.	X	X	X		<i>Mortierella isabellina</i>
27	<i>Micromucor ramannianus</i> var. <i>ramannianus</i>	M27	SZMC 11078	N.A.	R.T.	X	X	X		N.A.
28	<i>Micromucor ramannianus</i> var. <i>ramannianus</i>	NRRL 1296	SZMC 12036	N.A.	R.T.	X	X	X		N.A.
29	<i>Mortierella acrotona</i>	CBS 386.71	SZMC 11231	Talaj / India	R.T.	X	X			<i>Mo. acrotona</i> típustörzs
30	<i>Mortierella amoeboides</i>	CBS 889.72	SZMC 11226	<i>Chromelosporium</i> / Németo.	21°C	X	X	X	X	<i>Mo. amoeboides</i> típustörzs
31	<i>Mortierella armillariicola</i>	CBS 914.73	SZMC 11239	<i>Armillaria mellea</i> / Hollandia	21°C	X	X	X	X	<i>Mo. armillariicola</i> típustörzs
32	<i>Mortierella beljakovae</i>	CBS 123.72	SZMC 11232	Talaj / Ukrajna	R.T.	X	X	X		<i>Mo. beljakovae</i> típustörzs
33	<i>Mortierella camargensis</i>	CBS 221.58	SZMC 11227	Homokos talaj / Franciao.	R.T.	X	X	X		<i>Mo. camargensis</i> típustörzs
34	<i>Mortierella clonocystis</i>	CBS 357.76	SZMC 11238	Talaj / Spanyolo.	R.T.	X	X	X		<i>Mo. clonocystis</i> típustörzs
35	<i>Mortierella cogitans</i>	CBS 879.97	SZMC 11237	Rothadó fakéreg / Japán	21°C		X	X		<i>Mo. cogitans</i> típustörzs
36	<i>Mortierella cystojenkini</i>	CBS 456.71	SZMC 11229	Mezőgazdasági talaj / Hollandia	21°C	X	X	X		<i>Mo. cystojenkini</i> típustörzs
37	<i>Mortierella elongatula</i>	CBS 488.70	SZMC 11241	hulladék / Németo.	21°C	X	X	X		<i>Mo. elongatula</i> típustörzs
38	<i>Mortierella epicladia</i>	CBS 355.76	SZMC 11247	Talaj / Spanyolo.	21°C	X	X	X	X	<i>Mo. epicladia</i> típustörzs
39	<i>Mortierella microzygospora</i>	CBS 880.97	SZMC 11248	Talaj / Japán	21°C	X	X	X	X	<i>Mo. microzygospora</i> típustörzs
40	<i>Mortierella minutissima</i> var. <i>dubia</i>	CBS 307.52	SZMC 11235	Talaj / Németo.	18°C	X	X	X		<i>Mo. minutissima</i> var. <i>dubia</i> szüntípusa
41	<i>Mortierella ramanniana</i> var. <i>angulispora</i>	CBS 222.29	SZMC 11234	USSR	napfény	X	X	X		<i>Mo. ramanniana</i> var. <i>angulispora</i> neotípusa

42	<i>Mortierella rostafinskii</i>	CBS 522.70	SZMC 11249	Talaj (Pinus) / USA	18°C	X	X	X		<i>Mo. rostafinskii</i> neotípusa
43	<i>Mortierella verticillata</i>	CBS 220.58	SZMC 11233	Talaj / Franciao.	R.T.	X	X	X		<i>Haplosporangium fasciculatum</i> típustörzs, MT+
44	<i>Mortierella verticillata</i>	CBS 225.35	SZMC 11240	Németo.	R.T.	X	X	X		<i>Mo. marburgensis</i> szüntípusa, MT-
45	<i>Mortierella verticillata</i>	CBS 374.95	SZMC 11236	Erdőtalaj / Kína	R.T.	X	X	X		<i>Haplosporangium attenuatissimum</i> típustörzs
46	<i>Mortierella zonata</i>	CBS 228.35	SZMC 11228	<i>Gomphidius glutinosus</i> / Németo.	21°C	X	X	X		<i>Mo. zonata</i> típustörzs
47	<i>Mortierella verticillata</i>	CBS 315.52	SZMC 11230	Erdőtalaj / Németo.	R.T.	X	X	X		<i>Mo. marburgensis</i> szüntípusa, MT+
48	<i>Mortierella wolfii</i>	CBS 611.70	SZMC 11244	tüdőgyulladásban elpusztult tehén tüdeje / Új Zéland	40°C	X	X			HO patogén
49	<i>Mortierella wolfii</i>	CBS 209.69	SZMC 11245	Szénbánya talaja / UK	40°C	X	X			HO patogén
50	<i>Mortierella wolfii</i>	CBS 612.70	SZMC 11286	Bomló széna / Új Zéland	40°C	X	X			HO patogén
51	<i>Mortierella wolfii</i>	CBS 614.70	SZMC 11242	Bomló széna / Új Zéland	24°C	X	X			HO patogén
52	<i>Mortierella wolfii</i>	CBS 651.93	SZMC 11243	Gomba komposzt / Hollandia	40°C	X	X			HO patogén
53	<i>Mortierella pulchella</i>	CBS 312.52	SZMC 11339	<i>Picea abies</i> gyökere / Németo.	21°C	X	X	X		<i>Mo. pulchella</i> autentikus törzse
54	<i>Mortierella echinosphaera</i>	CBS 575.75	SZMC 11251	Begónia / Hollandia	21°C	X	X	X		<i>Mo. echinosphaera</i> holotípusa
55	<i>Umbelopsis angularis</i>	CBS 603.68	SZMC 11252	Talaj / Hollandia	napfény	X	X	X		<i>U. angularis</i> holotípusa
56	<i>Mortierella indohii</i>	CBS 720.71	SZMC 11253	állatürülék / USA	21°C	X	X	X		<i>Mo. indohii</i> izotípusa, MT-
57	<i>Mortierella angusta</i>	CBS 293.61	SZMC 11254	podzol talaj / UK	R.T.	X	X			<i>Mo. polycephala</i> var. <i>angusta</i> neotípusa
58	<i>Mortierella biramosa</i>	CBS 370.95	SZMC 11255	Erdőtalaj / Kína	R.T.	X	X	X		<i>Mo. wuyishanensis</i> típustörzs
59	<i>Mortierella exigua</i>	CBS 655.68	SZMC 11257	Talaj / India	R.T.	X	X	X		<i>Mo. sterilis</i> típustörzs
60	<i>Mortierella gamsii</i>	CBS 253.36	SZMC 11258	Erdőtalaj / Németo.	R.T.	X	X			<i>Mo. spinosa</i> szüntípusa
61	<i>Mortierella gamsii</i>	CBS 314.52	SZMC 11259	Erdőtalaj / Németo.	R.T.	X	X	X		<i>Mo. spinosa</i> szüntípusa
62	<i>Mortierella hyalina</i>	CBS 115655	SZMC 11261	<i>Triticum aestivum</i> gyökere / UK	R.T.	X	X	X		<i>Hydrophora hyalina</i> izotípusa
63	<i>Mortierella hyalina</i>	CBS 306.52	SZMC 11262	Komposzt / Németo.	R.T.	X	X	X		<i>Mo. hygrophyla</i> var. <i>minuta</i> szüntípusa

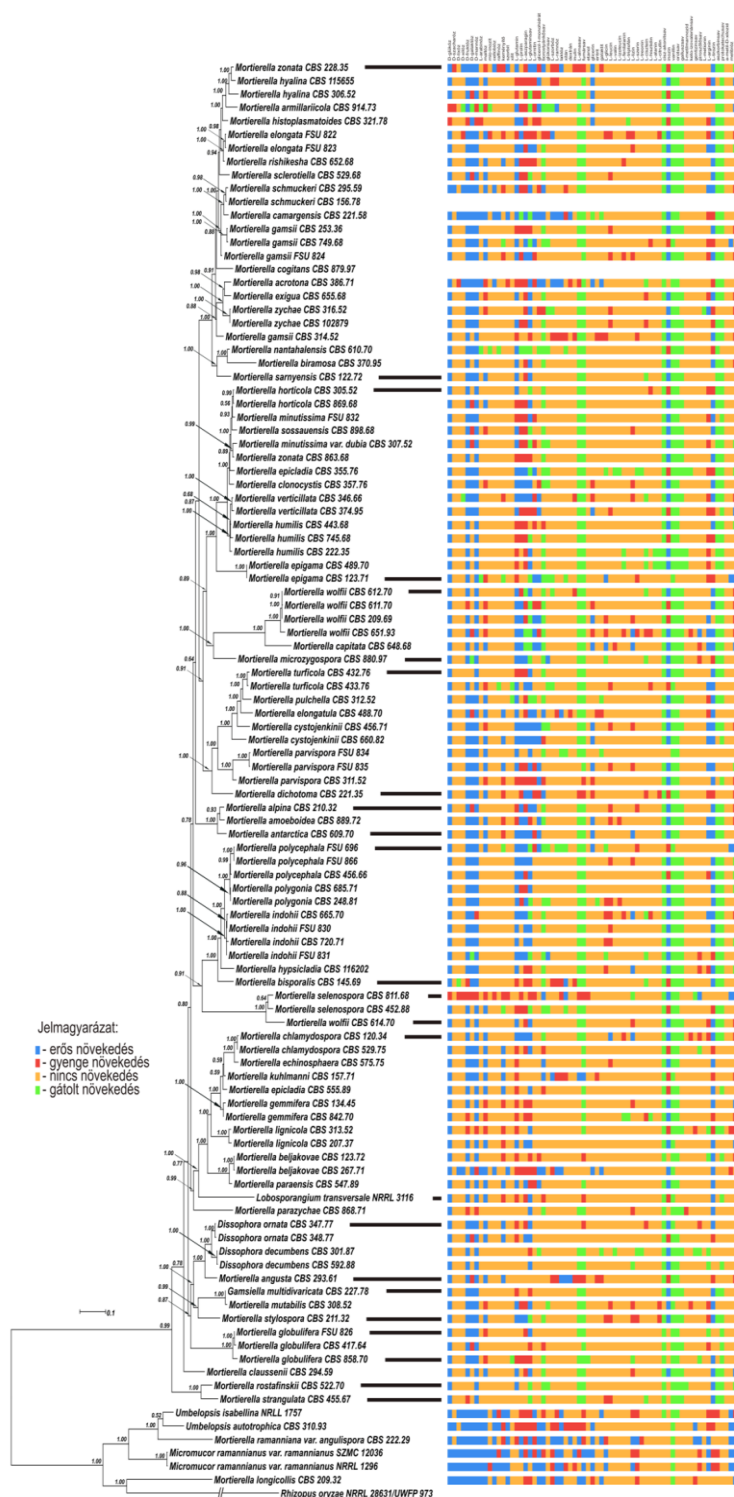
64	<i>Mortierella lignicola</i>	CBS 207.37	SZMC 11264	Korhadt fa / Kolumbia	R.T.	X	X			<i>Haplosporangium lignicola</i> típusörzs
65	<i>Mortierella lignicola</i>	CBS 313.52	SZMC 11265	<i>Pinus sylvestris</i> alatti talaj / Németo.	R.T.	X	X	X		<i>Mo. sepedonioides</i> típusörzs
66	<i>Mortierella parvispora</i>	CBS 304.52	SZMC 11266	Talaj / Németo.	18°C		X			<i>Mo. gracilis</i> szüntípusa, MT+
67	<i>Mortierella strangulata</i>	CBS 455.67	SZMC 11267	Hollandia	R.T.	X	X	X		<i>Mo. strangulata</i> neotípusa, MT-
68	<i>Mortierella clausenii</i>	CBS 294.59	SZMC 11268	<i>Castanea sativa</i> alatti talaj / Svájc	R.T.	X	X	X		<i>Mo. clausenii</i> szüntípusa
69	<i>Mortierella dichotoma</i>	CBS 221.35	SZMC 11269	Egér ürülék / Németo.	21°C	X	X	X		<i>Mo. dichotoma</i> szüntípusa
70	<i>Mortierella histoplasmatoides</i>	CBS 321.78	SZMC 11338	Trágya / USA	24°C	X	X	X		<i>Mo. histoplasmatoides</i> típusörzs
71	<i>Mortierella hypsicladia</i>	CBS 116202	SZMC 11270	denevér ürülék / Japán	R.T.	X	X	X		<i>Mo. hypsicladia</i> típusörzs
72	<i>Mortierella kuhlmanii</i>	CBS 157.71	SZMC 11271	<i>Pinus palustris</i> fátönc / USA	R.T.	X	X			<i>Mo. kuhlmanii</i> típusörzs
73	<i>Mortierella paraensis</i>	CBS 547.89	SZMC 11272	Esőerdő talaj / Brazília	18°C	X	X	X		<i>Mo. paraensis</i> típusörzs
74	<i>Mortierella rishikesha</i>	CBS 652.68	SZMC 11273	Erdőtalaj / India	R.T.	X	X			<i>Mo. rishikesha</i> típusörzs
75	<i>Mortierella saranyensis</i>	CBS 122.72	SZMC 11274	Talaj / Ukrajna	R.T.	X	X			<i>Mo. saranyensis</i> típusörzs
76	<i>Mortierella stylospora</i>	CBS 211.32	SZMC 11275	homokos talaj / Ausztrália	R.T.	X	X	X		<i>Mo. stylospora</i> típusörzs
77	<i>Umbelopsis autotrophica</i>	CBS 310.93	SZMC 11276	Talaj / UK	R.T.	X	X	X		<i>Mi. ramanniana</i> var. <i>autotrophica</i> típusörzs
78	<i>Mortierella capitata</i>	CBS 648.68	SZMC 11256	Erdőtalaj / India	R.T.	X	X	X		<i>Mo. vesiculosa</i> típusörzs
79	<i>Mortierella polycephala</i>	CBS 456.66	SZMC 11355	erdei egér ürüléke / Ukrajna	R.T.	X	X	X		N.A.
80	<i>Mortierella zychae</i>	CBS 102879	SZMC 11375	<i>Camponotus pennsylvanicus</i> / Kanada	R.T.	X	X	X		N.A.
81	<i>Mortierella gemmifera</i>	CBS 842.70	SZMC 11376	erdőtalaj / Anglia	R.T.	X	X			N.A.
82	<i>Dissophora ornata</i>	CBS 347.77	SZMC 11356	Erdőtalaj / Kolumbia	20°C	X	X			<i>Mortierella ornata</i> holotípusa
83	<i>Lobosporangium transversale</i>	CBS 357.67	SZMC 11334	talaj / Nevada, USA	24°C / napfény	X	X	X		<i>Echinopora</i> <i>transversale</i> típusörzs
84	<i>Mortierella roseonana</i>	CBS 473.74	SZMC 11350	Talaj / Ausztrália	R.T.	X				<i>Mo. roseonana</i> típusörzs
85	<i>Mortierella globulifera</i>	CBS 417.64	SZMC 11260	Németo.	R.T.	X	X	X		<i>Mo. ericetorum</i> típusörzs, MT+
86	<i>Mortierella beljakovae</i>	CBS 267.71	SZMC 20730	<i>Pinus taeda</i> magonc / USA	R.T.	X	X			N.A.

87	<i>Mortierella chlamydospora</i>	CBS 529.75	SZMC 11344	Hollandia	R.T.	X	X			N.A.
88	<i>Mortierella zonata</i>	CBS 863.68	SZMC 11374	Erdőtalaj / UK	R.T.	X	X			N.A.
89	<i>Mortierella turficola</i>	CBS 433.76	SZMC 11273	rothadó <i>Sphagnum recurvum</i> / Hollandia	R.T.	X	X			MT+
90	<i>Mortierella sossauensis</i>	CBS 898.68	SZMC 11343	Mocsár talaj / Gibraltár	R.T.	X	X			N.A.
91	<i>Mortierella polygonia</i>	CBS 248.81	SZMC 11347	<i>Solanum tuberosum</i> alatti agyagos talaj	R.T.	X	X			N.A.
92	<i>Mortierella humilis</i>	CBS 745.68	SZMC 11346	Talaj / Hollandia	R.T.	X	X			MT-
93	<i>Mortierella selenospora</i>	CBS 452.88	SZMC 11342	Talaj / Indonézia	R.T.	X	X	X		N.A.
94	<i>Mortierella hyalina</i>	CBS 654.68	SZMC 11348	Őz trágya / India	R.T.	X	X			N.A.
95	<i>Mortierella indohii</i>	CBS 665.70	SZMC 11349	Mezőgazdasági talaj / Hollandia	R.T.	X	X			MT-
96	<i>Mortierella cystojenkini</i>	CBS 660.82	SZMC 11345	Fenyőerdő, <i>Endogone lactiflua</i> / Hollandia	R.T.	X	X			N.A.
97	<i>Mortierella epigama</i>	CBS 123.71	SZMC 20731	Közösségi hulladék / Németo.	R.T.	X	X			N.A.
98	<i>Mortierella bisporalis</i>	CBS 145.69	SZMC 11354	<i>Tuber magnatum</i> / Olaszország	R.T.	X	X			N.A.
99	<i>Mortierella epicladia</i>	CBS 555.89	SZMC 11352	Esőerdő talaj / Brazília	R.T.	X	X			N.A.
100	<i>Mortierella horticola</i>	CBS 869.68	SZMC 11353	Búzamező talaja / Németo.	R.T.	X	X			N.A.
101	<i>Mortierella schmuckeri</i>	CBS 156.78	-	N.A.	R.T.		X			N.A.
102	<i>Mortierella humilis</i>	CBS 443.68	SZMC 11331	N.A.	R.T.		X			N.A.
103	<i>Mortierella alpina</i>	FSU 2698	SZMC 11317	N.A.	R.T.	X		X		N.A.
104	<i>Mortierella polycephala</i>	FSU 696	SZMC 11298	N.A.	R.T.	X	X			N.A.
105	<i>Mortierella polycephala</i>	FSU 759	SZMC 11315	Erdei egér ürülék / Ukrajna	R.T.	X				N.A.
106	<i>Mortierella polycephala</i>	FSU 866	SZMC 11295	Mocsár talaj / UK	R.T.	X	X			MT+
107	<i>Mortierella elongata</i>	FSU 822	SZMC 11308	Mezőgazdasági talaj / Hollandia	R.T.	X	X			MT-
108	<i>Mortierella elongata</i>	FSU 823	SZMC 11318	Mezőgazdasági talaj / Hollandia	R.T.	X	X			MT+
109	<i>Mortierella gamsii</i>	FSU 824	SZMC 11309	Legelő talaj / USA	R.T.	X	X			MT+
110	<i>Mortierella gamsii</i>	FSU 825	SZMC 11340	Legelő talaj / USA	R.T.	X				MT-

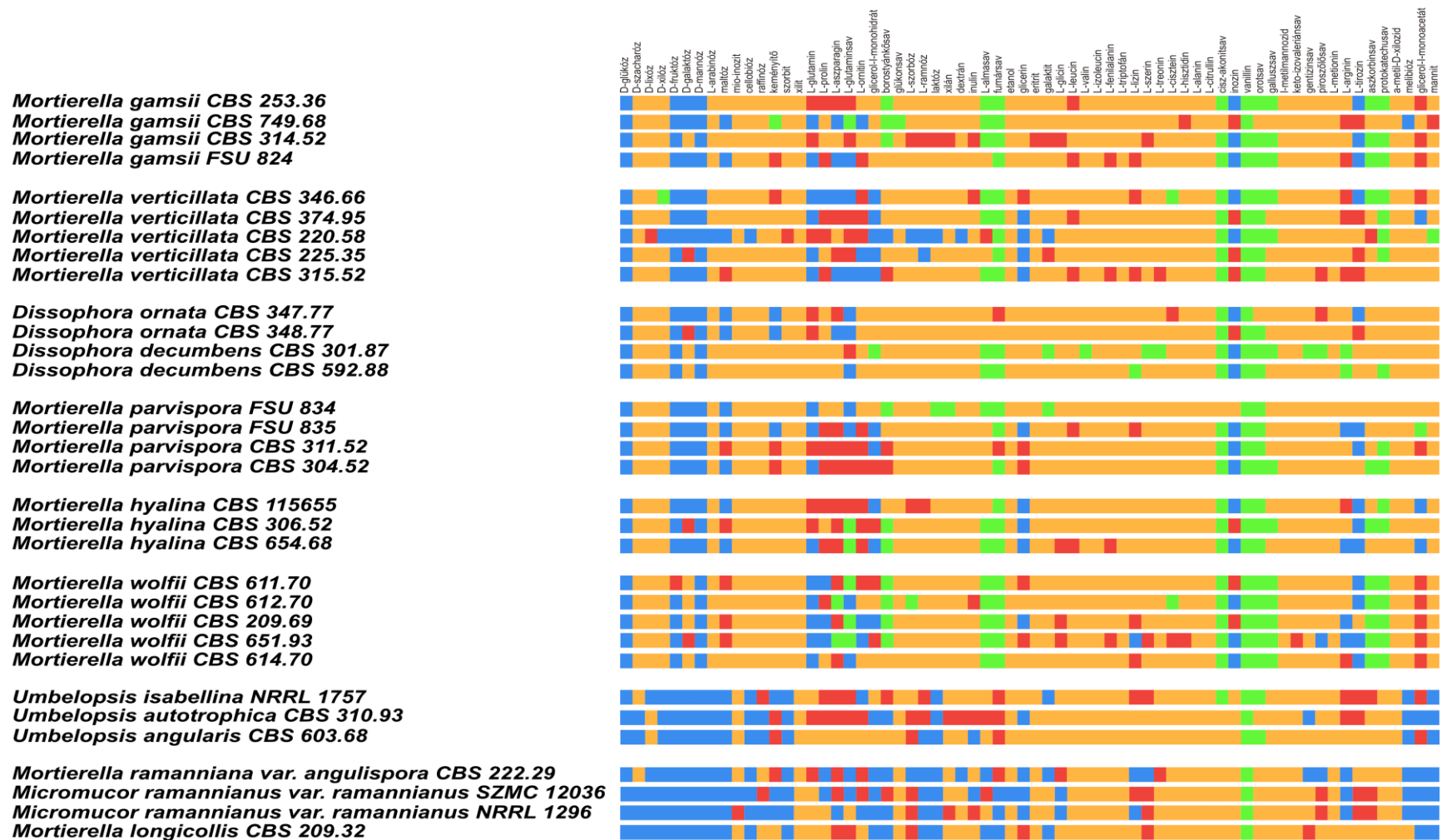
111	<i>Mortierella globulifera</i>	FSU 826	SZMC 11329	<i>Pinus sylvestris</i> rothadó fenyőtű / UK	R.T.	X	X			MT-
112	<i>Mortierella humilis</i>	FSU 828	SZMC 11331	Fakéreg / USA	R.T.	X				MT+
113	<i>Mortierella humilis</i>	FSU 829	SZMC 11302	Talaj / Hollandia	R.T.	X				MT-
114	<i>Mortierella indohii</i>	FSU 830	SZMC 11297	<i>Triticum aestivum</i> gyökere / Hollandia	R.T.	X	X			MT-
115	<i>Mortierella indohii</i>	FSU 831	SZMC 11283	állattűrűlék / USA	15°C	X	X			MT+
116	<i>Mortierella minutissima</i>	FSU 832	SZMC 11305	Erdőtalaj / USA	R.T.	X	X			MT+
117	<i>Mortierella minutissima</i>	FSU 2735	SZMC 11332	N.A.	R.T.	X				N.A.
118	<i>Mortierella parvispora</i>	FSU 834	SZMC 11304	Talaj / UK	18°C	X	X			MT+
119	<i>Mortierella parvispora</i>	FSU 835	SZMC 11313	Talaj / UK	18°C	X	X			MT-
120	<i>Mortierella parvispora</i>	FSU 2736	SZMC 11327	N.A.	R.T.	X				N.A.
121	<i>Mortierella elongata</i>	FSU 9721	SZMC 11284	N.A.	R.T.	X				N.A.
122	<i>Dissophora decumbens</i>	FSU 801	SZMC 11337	N.A.	R.T.	X				N.A.

Rövidítések: R.T. = szobahőmérséklet, N.A.= nincs adat, MT = párosodási típus, X= az adott vizsgálatba bevont izolátumok

2. Melléklet: Az ITS + nrLSU + nrSSU + *tef* + *rpb1* adatsor alapján Bayes-féle analízissel létrehozott kombinált törzsfá, illetve az izolátumok szénasszimilációs spektruma.



3. Melléklet: Néhány faj különböző izolátumainak szénasszimilációs profilja.



4. Melléklet: *Mortierella* és rokon izolátumok zsírsavtermelésének HPLC analízise. A zsírsavak mennyisége mg-ban van megadva 1 g szárazmicéliumra vonatkoztatva.

Izolátum	Zsírsavak (mg zsírsav/1g micélium)										
	EPA C20:5 ω-3	ALA C18: 3 ω-3	GLA C18: 3 ω-6	DHA C22:6 ω-3	AA C20: 4 ω-6	PO C16: 1 ω-7	LA C18: 2 ω-6	P C16:0	OA C18: 1 ω-9	S C18:0	Össz-zsírsav
<i>Mortierella zonata</i> CBS 228.35	0,21	0,20	6,67	0,02	31,88	0,00	5,62	5,77	9,07	0,00	59,43
<i>Mortierella hyalina</i> CBS 115655	0,13	0,25	3,24	0,01	26,71	0,00	3,12	11,84	7,56	0,03	52,89
<i>Mortierella hyalina</i> CBS 306.52	0,12	0,13	6,19	0,02	34,26	0,00	4,13	11,12	13,15	0,05	69,19
<i>Mortierella armillariicola</i> CBS 914.73	0,20	0,38	5,12	0,03	48,02	0,00	3,36	0,11	15,59	0,00	72,81
<i>Mortierella histoplasmatoides</i> CBS 321.78	0,00	0,95	0,00	0,03	1,14	0,00	30,90	11,83	0,43	0,00	45,28
<i>Mortierella sclerotiella</i> CBS 529.68	0,24	0,00	9,77	0,00	51,93	0,00	6,66	7,84	21,52	0,00	97,96
<i>Mortierella schmuckeri</i> CBS 295.59	0,53	0,00	14,04	0,00	148,39	0,00	26,95	34,27	44,76	0,00	268,95
<i>Mortierella camargensis</i> CBS 221.58	0,16	0,45	4,75	0,03	53,13	0,00	6,63	5,02	14,15	0,00	84,32
<i>Mortierella gamsii</i> CBS 749.68	0,19	0,38	7,96	0,02	79,59	0,00	8,51	33,72	25,25	0,00	155,63
<i>Mortierella cogitans</i> CBS 879.97	0,27	1,53	8,99	0,11	42,32	0,37	4,89	1,26	4,18	0,00	63,91
<i>Mortierella exigua</i> CBS 655.68	0,30	0,38	11,79	0,00	113,88	0,00	16,18	43,93	22,08	0,00	208,55
<i>Mortierella zychae</i> CBS 316.52	0,11	0,85	5,19	0,04	83,77	0,00	8,59	8,51	15,50	0,00	122,57
<i>Mortierella zychae</i> CBS 102879	0,09	0,38	5,66	0,02	80,79	0,00	7,27	21,42	17,30	0,00	132,93
<i>Mortierella gamsii</i> CBS 314.52	0,17	0,40	4,52	0,02	24,82	0,00	2,35	8,02	4,55	0,00	44,84
<i>Mortierella biramosa</i> CBS 370.95	0,16	0,93	7,53	0,02	88,97	0,00	10,04	6,65	6,63	0,00	120,93
<i>Mortierella horticola</i> CBS 305.52	0,13	0,86	3,26	0,03	27,58	0,00	2,34	0,00	7,64	0,00	41,84
<i>Mortierella minutissima</i> var. <i>dubia</i> CBS 307.52	0,12	0,30	3,70	0,02	16,31	0,00	1,91	3,87	5,52	0,00	31,75
<i>Mortierella epicladia</i> CBS 355.76	0,05	0,47	3,67	0,04	14,73	0,00	2,02	0,00	3,55	0,00	24,53
<i>Mortierella clonocystis</i> CBS 357.76	0,10	0,34	4,17	0,03	36,92	0,00	5,13	0,35	10,73	0,00	57,77
<i>Mortierella verticillata</i> CBS 346.66	0,28	0,76	13,00	0,05	116,08	0,00	11,63	8,68	25,81	0,00	176,28
<i>Mortierella verticillata</i> CBS 374.95	0,26	1,03	11,87	0,02	75,32	0,00	4,48	21,29	19,84	0,00	134,12
<i>Mortierella verticillata</i> CBS 220.58	0,27	1,74	9,93	0,04	55,73	0,00	4,60	6,36	13,20	0,00	91,86
<i>Mortierella verticillata</i> CBS 225.35	0,30	1,26	7,65	0,05	44,01	0,00	6,87	6,80	10,74	0,00	77,69
<i>Mortierella verticillata</i> CBS 315.52	0,50	0,57	10,32	0,03	104,66	0,00	13,26	5,49	17,16	0,00	151,99
<i>Mortierella epigama</i> CBS 489.70	0,14	0,26	4,53	0,04	10,70	0,00	1,19	1,51	4,15	0,00	22,52
<i>Mortierella capitata</i> CBS 648.68	0,03	1,66	5,09	0,10	43,60	0,34	9,64	2,06	6,53	0,00	69,05
<i>Mortierella microzygospora</i> CBS 880.97	0,03	0,18	6,71	0,01	19,41	0,00	1,47	5,93	9,10	0,00	42,83
<i>Mortierella turficola</i> CBS 432.76	0,08	0,36	6,08	0,00	83,84	0,00	5,75	17,25	18,60	0,00	131,97
<i>Mortierella pulchella</i> CBS 312.52	0,05	0,57	3,99	0,03	53,10	0,00	4,59	0,00	9,65	0,00	71,97
<i>Mortierella elongatula</i> CBS 488.70	0,09	0,67	6,77	0,03	42,70	0,00	2,58	0,20	13,41	0,00	66,46
<i>Mortierella cystojenkini</i> CBS 456.71	0,10	0,72	5,05	0,02	61,31	0,00	5,26	11,37	19,00	0,00	102,84
<i>Mortierella parvispora</i> CBS 311.52	0,08	0,68	6,07	0,03	61,63	0,00	6,48	18,87	19,02	0,00	112,86

<i>Mortierella dichotoma</i> CBS 221.35	0,08	0,30	2,13	0,02	9,52	0,00	0,86	0,78	1,38	0,00	15,06
<i>Mortierella alpina</i> CBS 210.32	0,14	0,50	4,78	0,01	52,97	0,00	3,55	5,34	5,71	0,00	73,00
<i>Mortierella alpina</i> FSU 2698	0,23	3,65	9,89	0,32	290,46	0,00	76,47	0,00	7,43	0,00	388,46
<i>Mortierella amoeboides</i> CBS 889.72	0,13	0,51	9,66	0,00	109,60	0,00	10,68	11,11	10,30	0,00	151,99
<i>Mortierella polycephala</i> CBS 456.66	0,10	1,49	2,82	0,13	44,69	0,00	17,15	16,15	5,18	0,08	87,78
<i>Mortierella polygonia</i> CBS 685.71	0,13	0,60	2,48	0,03	37,44	0,00	5,13	6,64	4,80	0,00	57,26
<i>Mortierella indohii</i> CBS 720.71	0,04	0,13	1,54	0,01	8,55	0,00	1,11	2,05	3,17	0,00	16,60
<i>Mortierella hypsicladia</i> CBS 116202	0,04	0,23	0,93	0,01	7,80	0,00	0,84	2,13	1,31	0,00	13,29
<i>Mortierella selenospora</i> CBS 811.68	0,05	1,44	12,97	0,08	141,54	0,00	9,41	3,15	34,54	0,00	203,18
<i>Mortierella selenospora</i> CBS 452.88	0,71	7,99	28,37	0,51	259,41	0,00	40,79	39,40	47,71	0,00	424,89
<i>Mortierella chlamydospora</i> CBS 120.34	0,58	1,04	17,36	0,04	81,51	0,00	14,67	33,49	20,32	0,00	169,01
<i>Mortierella echinosphaera</i> CBS 575.75	0,48	0,84	25,32	0,00	122,09	0,00	21,45	44,13	34,45	0,28	249,04
<i>Mortierella gemmifera</i> CBS 134.45	0,29	0,22	17,96	0,00	141,12	0,00	21,46	30,65	31,01	0,00	242,70
<i>Mortierella lignicola</i> CBS 313.52	0,42	0,42	5,66	0,02	32,25	0,00	7,47	19,44	14,24	0,00	79,92
<i>Mortierella beljakovae</i> CBS 123.72	0,06	1,11	15,75	0,00	133,82	0,00	17,66	6,63	30,75	0,00	205,79
<i>Mortierella paraensis</i> CBS 547.89	0,03	0,60	13,62	0,01	74,77	0,00	14,05	21,75	26,19	0,04	151,06
<i>Lobosporangium transversale</i> CBS 357.67	0,01	1,01	0,97	0,11	10,41	0,00	4,42	0,00	3,04	0,00	19,97
<i>Mortierella parazycae</i> CBS 868.71	0,24	0,40	5,49	0,00	113,83	0,00	11,69	7,27	33,91	0,00	172,83
<i>Dissophora ornata</i> CBS 348.77	0,48	0,16	6,88	0,00	71,74	0,00	3,81	32,69	28,00	0,00	143,76
<i>Dissophora decumbens</i> CBS 301.87	0,09	0,18	1,61	0,00	16,54	0,00	2,21	6,17	10,36	0,00	37,16
<i>Dissophora decumbens</i> CBS 592.88	0,05	0,22	3,52	0,02	24,86	0,00	3,99	2,80	5,40	0,00	40,84
<i>Gamsiella multidivariata</i> CBS 227.78	0,13	0,38	1,81	0,02	15,12	0,00	1,95	1,88	6,27	0,00	27,56
<i>Mortierella mutabilis</i> CBS 308.52	0,08	0,20	1,37	0,00	13,43	0,00	1,65	0,76	7,63	0,00	25,12
<i>Mortierella stylospora</i> CBS 211.32	0,19	0,55	9,03	0,26	51,85	0,00	6,37	10,11	17,53	0,00	95,89
<i>Mortierella globulifera</i> CBS 417.64	0,39	0,51	21,16	0,04	81,06	0,00	15,88	30,37	47,62	0,00	197,04
<i>Mortierella globulifera</i> CBS 858.70	0,04	0,20	2,40	0,01	8,60	0,00	1,45	1,61	5,66	0,00	19,98
<i>Mortierella clausenii</i> CBS 294.59	0,15	0,43	4,99	0,02	57,68	0,00	5,38	19,27	15,36	0,00	103,27
<i>Mortierella rostafinskii</i> CBS 522.70	0,02	1,34	6,10	0,04	75,44	0,00	11,37	12,94	13,35	0,00	120,60
<i>Mortierella strangulata</i> CBS 455.67	0,01	0,72	0,65	0,04	10,01	0,00	1,04	1,73	1,71	0,00	15,89
<i>Umbelopsis angularis</i> CBS 603.68	0,19	0,65	88,65	0,39	14,45	9,33	74,75	74,45	99,34	0,00	362,20

<i>Umbelopsis isabellina</i> NRRL 1757	0,07	0,33	43,84	0,00	12,39	8,01	33,35	37,73	72,61	0,00	208,33
<i>Umbelopsis autotrophica</i> CBS 310.93	0,00	0,44	33,97	0,00	20,20	13,08	12,00	38,78	38,36	0,00	156,84
<i>Micromucor ramanniana</i> var. <i>angulispora</i> CBS 222.29	0,00	0,52	84,73	0,00	29,67	19,21	34,64	57,19	77,21	0,00	303,16
<i>Micromucor ramannianus</i> var. <i>ramannianus</i> M27	0,21	0,68	99,48	0,00	13,91	10,85	81,30	66,04	90,60	0,00	363,07
<i>Micromucor ramannianus</i> var. <i>ramannianus</i> NRRL 1296	0,39	1,16	218,89	0,00	37,16	23,96	205,74	85,66	221,36	0,00	794,31

Rövidítések: EPA - eikozapentaénsav, ALA - α -linolénsav, GLA - γ -linolénsav, DHA - dokozahexaénsav, AA - arachidonsav, PO - palmitoleinsav, LA - linolsav, P - palmitinsav, OA - olajsav, S - sztearinsav.

5. Melléklet: *Mortierella* és rokon izolátumok zsírsavprofilja (az egyes zsírsavak arányát az össz-zsírsavhoz viszonyítva ábrázoltuk).

Izolátum	zsírsavak aránya (%) az össz-zsírsavhoz képest									
	EPA C20:5 ω-3	ALA C18: 3 ω-3	GLA C18: 3 ω-6	DHA C22:6 ω-3	AA C20: 4 ω-6	PO C16: 1 ω-7	LA C18: 2 ω-6	P C16:0	OA C18: 1 ω-9	S C18:0
<i>Mortierella zonata</i> CBS 228.35	0,36	0,34	11,22	0,03	53,64	0,00	9,45	9,70	15,26	0,00
<i>Mortierella hyalina</i> CBS 115655	0,25	0,46	6,13	0,02	50,50	0,00	5,90	22,38	14,30	0,05
<i>Mortierella hyalina</i> CBS 306.52	0,17	0,18	8,95	0,03	49,53	0,00	5,97	16,08	19,01	0,07
<i>Mortierella armillariicola</i> CBS 914.73	0,27	0,52	7,04	0,05	65,95	0,00	4,61	0,15	21,41	0,00
<i>Mortierella histoplasmatoides</i> CBS 321.78	0,00	2,10	0,00	0,07	2,51	0,00	68,24	26,12	0,96	0,00
<i>Mortierella sclerotiella</i> CBS 529.68	0,25	0,00	9,98	0,00	53,01	0,00	6,80	8,00	21,96	0,00
<i>Mortierella schmuckeri</i> CBS 295.59	0,20	0,00	5,22	0,00	55,17	0,00	10,02	12,74	16,64	0,00
<i>Mortierella camargensis</i> CBS 221.58	0,19	0,54	5,63	0,03	63,01	0,00	7,86	5,95	16,78	0,00
<i>Mortierella gamsii</i> CBS 749.68	0,12	0,25	5,11	0,01	51,14	0,00	5,47	21,67	16,23	0,00
<i>Mortierella cogitans</i> CBS 879.97	0,42	2,39	14,07	0,17	66,22	0,57	7,65	1,96	6,54	0,00
<i>Mortierella exigua</i> CBS 655.68	0,14	0,18	5,65	0,00	54,61	0,00	7,76	21,07	10,59	0,00
<i>Mortierella zychnae</i> CBS 316.52	0,09	0,70	4,24	0,03	68,35	0,00	7,01	6,95	12,65	0,00
<i>Mortierella zychnae</i> CBS 102879	0,07	0,28	4,26	0,02	60,78	0,00	5,47	16,11	13,01	0,00
<i>Mortierella gamsii</i> CBS 314.52	0,37	0,90	10,07	0,04	55,34	0,00	5,24	17,89	10,15	0,00
<i>Mortierella biramosa</i> CBS 370.95	0,13	0,77	6,23	0,02	73,57	0,00	8,30	5,50	5,49	0,00
<i>Mortierella horticola</i> CBS 305.52	0,30	2,06	7,79	0,06	65,93	0,00	5,59	0,00	18,27	0,00
<i>Mortierella minutissima</i> var. <i>dubia</i> CBS 307.52	0,37	0,94	11,66	0,05	51,39	0,00	6,00	12,20	17,39	0,00
<i>Mortierella epicladia</i> CBS 355.76	0,20	1,91	14,95	0,16	60,05	0,00	8,23	0,00	14,49	0,00
<i>Mortierella clonocystis</i> CBS 357.76	0,17	0,60	7,22	0,05	63,90	0,00	8,87	0,61	18,58	0,00
<i>Mortierella verticillata</i> CBS 346.66	0,16	0,43	7,37	0,03	65,85	0,00	6,60	4,92	14,64	0,00
<i>Mortierella verticillata</i> CBS 374.95	0,19	0,76	8,85	0,02	56,16	0,00	3,34	15,88	14,79	0,00
<i>Mortierella verticillata</i> CBS 220.58	0,30	1,89	10,81	0,04	60,66	0,00	5,01	6,92	14,37	0,00
<i>Mortierella verticillata</i> CBS 225.35	0,39	1,62	9,85	0,06	56,65	0,00	8,85	8,76	13,82	0,00
<i>Mortierella verticillata</i> CBS 315.52	0,33	0,38	6,79	0,02	68,86	0,00	8,73	3,61	11,29	0,00
<i>Mortierella epigama</i> CBS 489.70	0,62	1,16	20,11	0,17	47,51	0,00	5,29	6,72	18,43	0,00
<i>Mortierella capitata</i> CBS 648.68	0,04	2,40	7,38	0,14	63,15	0,49	13,96	2,98	9,45	0,00
<i>Mortierella microzygospora</i> CBS 880.97	0,06	0,41	15,66	0,03	45,33	0,00	3,43	13,85	21,24	0,00
<i>Mortierella turficola</i> CBS 432.76	0,06	0,27	4,61	0,00	63,53	0,00	4,36	13,07	14,10	0,00
<i>Mortierella pulchella</i> CBS 312.52	0,07	0,79	5,54	0,04	73,77	0,00	6,38	0,00	13,41	0,00
<i>Mortierella elongatula</i> CBS 488.70	0,13	1,01	10,19	0,04	64,25	0,00	3,88	0,30	20,18	0,00
<i>Mortierella cystojenkinii</i> CBS 456.71	0,10	0,70	4,91	0,02	59,62	0,00	5,12	11,05	18,48	0,00
<i>Mortierella parvispora</i> CBS 311.52	0,07	0,60	5,38	0,02	54,61	0,00	5,74	16,72	16,86	0,00
<i>Mortierella dichotoma</i> CBS 221.35	0,50	1,97	14,13	0,10	63,20	0,00	5,74	5,17	9,18	0,00

<i>Mortierella alpina</i> CBS 210.32	0,19	0,68	6,54	0,02	72,56	0,00	4,86	7,32	7,82	0,00
<i>Mortierella alpina</i> FSU 2698	0,06	0,94	2,55	0,08	74,77	0,00	19,69	0,00	1,91	0,00
<i>Mortierella amoeboides</i> CBS 889.72	0,09	0,33	6,35	0,00	72,11	0,00	7,03	7,31	6,77	0,00
<i>Mortierella polycephala</i> CBS 456.66	0,11	1,70	3,21	0,15	50,91	0,00	19,54	18,39	5,90	0,09
<i>Mortierella polygonia</i> CBS 685.71	0,23	1,05	4,33	0,06	65,39	0,00	8,96	11,60	8,38	0,00
<i>Mortierella indohii</i> CBS 720.71	0,24	0,76	9,25	0,05	51,50	0,00	6,72	12,37	19,10	0,00
<i>Mortierella hypsicladia</i> CBS 116202	0,26	1,76	7,00	0,06	58,70	0,00	6,29	16,01	9,88	0,02
<i>Mortierella selenospora</i> CBS 811.68	0,02	0,71	6,38	0,04	69,66	0,00	4,63	1,55	17,00	0,00
<i>Mortierella selenospora</i> CBS 452.88	0,17	1,88	6,68	0,12	61,05	0,00	9,60	9,27	11,23	0,00
<i>Mortierella chlamydospora</i> CBS 120.34	0,34	0,62	10,27	0,02	48,23	0,00	8,68	19,81	12,02	0,00
<i>Mortierella echinosphaera</i> CBS 575.75	0,19	0,34	10,17	0,00	49,03	0,00	8,61	17,72	13,83	0,11
<i>Mortierella gemmifera</i> CBS 134.45	0,12	0,09	7,40	0,00	58,15	0,00	8,84	12,63	12,78	0,00
<i>Mortierella lignicola</i> CBS 313.52	0,52	0,53	7,08	0,03	40,35	0,00	9,35	24,33	17,81	0,00
<i>Mortierella beljakovae</i> CBS 123.72	0,03	0,54	7,65	0,00	65,03	0,00	8,58	3,22	14,94	0,00
<i>Mortierella paraensis</i> CBS 547.89	0,02	0,39	9,02	0,01	49,50	0,00	9,30	14,40	17,34	0,03
<i>Lobosporangium transversale</i> CBS 357.67	0,06	5,08	4,86	0,53	52,12	0,00	22,13	0,00	15,22	0,00
<i>Mortierella parazycae</i> CBS 868.71	0,14	0,23	3,17	0,00	65,86	0,00	6,77	4,21	19,62	0,00
<i>Dissophora ornata</i> CBS 348.77	0,34	0,11	4,78	0,00	49,90	0,00	2,65	22,74	19,47	0,00
<i>Dissophora decumbens</i> CBS 301.87	0,24	0,48	4,33	0,00	44,51	0,00	5,96	16,62	27,88	0,00
<i>Dissophora decumbens</i> CBS 592.88	0,11	0,53	8,61	0,04	60,87	0,00	9,76	6,86	13,22	0,00
<i>Gamsiella multidivariata</i> CBS 227.78	0,47	1,40	6,57	0,07	54,87	0,00	7,07	6,81	22,74	0,00
<i>Mortierella mutabilis</i> CBS 308.52	0,34	0,78	5,45	0,00	53,46	0,00	6,58	3,03	30,35	0,00
<i>Mortierella stylospora</i> CBS 211.32	0,20	0,57	9,41	0,27	54,08	0,00	6,64	10,54	18,29	0,00
<i>Mortierella globulifera</i> CBS 417.64	0,20	0,26	10,74	0,02	41,14	0,00	8,06	15,41	24,17	0,00
<i>Mortierella globulifera</i> CBS 858.70	0,22	1,01	12,01	0,06	43,06	0,00	7,25	8,05	28,34	0,00
<i>Mortierella clausenii</i> CBS 294.59	0,15	0,41	4,83	0,02	55,85	0,00	5,21	18,66	14,87	0,00
<i>Mortierella rostafinskii</i> CBS 522.70	0,02	1,11	5,06	0,03	62,56	0,00	9,43	10,73	11,07	0,00
<i>Mortierella strangulata</i> CBS 455.67	0,04	4,51	4,10	0,23	62,98	0,00	6,53	10,87	10,75	0,00
<i>Umbelopsis angularis</i> CBS 603.68	0,05	0,18	24,48	0,11	3,99	2,58	20,64	20,56	27,43	0,00
<i>Umbelopsis isabellina</i> NRRL 1757	0,03	0,16	21,04	0,00	5,95	3,84	16,01	18,11	34,85	0,00

<i>Umbelopsis autotrophica</i> CBS 310.93	0,00	0,28	21,66	0,00	12,88	8,34	7,65	24,73	24,46	0,00
<i>Micromucor ramanniana</i> var. <i>angulispora</i> CBS 222.29	0,00	0,17	27,95	0,00	9,79	6,34	11,42	18,86	25,47	0,00
<i>Micromucor ramannianus</i> var. <i>ramannianus</i> M27	0,06	0,19	27,40	0,00	3,83	2,99	22,39	18,19	24,95	0,00
<i>Micromucor ramannianus</i> var. <i>ramannianus</i> NRRL 1296	0,05	0,15	27,56	0,00	4,68	3,02	25,90	10,78	27,87	0,00

Rövidítések: EPA - eikozapentaénsav, ALA - α -linolénsav, GLA - γ -linolénsav, DHA - dokozahexaénsav, AA - arachidonsav, PO - palmitoleinsav, LA - linolsav, P - palmitinsav, OA - olajsav, S - sztearinsav.

6. Melléklet: A kapott $\Delta 9$ szekvenciák aminosav sorrendjének összehasonlítása ismert $\Delta 9$ deszturázok adatbanki szekvenciájával.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Mo. alpina CBS 528.72 $\Delta 9$ -1	GLGITAGYHRLWAH	RAYNAGPAMSFVL	LALLGAGAVEGSIK	WWSRGHRAHHR	RTDTEKDPYSAHR	GGLFFSHIGWMLIKR	PGWKIGHADVDD	LNNKSKLVQWQ		
Mo. alpina CBS 528.72 $\Delta 9$ -2	GLGITAGYHRLWAH	RAYNAGPAMSFAL	LALFAGAVEGSIK	WWSRGHRAHHR	RTDTEKDPYSAHR	GGLFFSHIGWMLIKR	PGWKIGHADVDD	LNNKSKLVQWQ		
Mo. alpina CBS 528.72 $\Delta 9$ -3	GLGITAGYHRLWSH	RAYAAGPALQFIL	MASTGAMQGSIR	WWCNRAHHR	RYTDTTEKDPYGAQ	KGLIWSHILWMLV	RQDPTTVGWADV	ADLANKNLVRFQ		
Saccharomyces cerevisiae S288c	GVSTITAGYHRLWS	HRSYSAHWPLRL	FYAIFGCASVEG	SAKWWGSHRIH	HRRTDTEKDPYD	ARRGLWYSHMGW	MLLKPENPKYKA	RADITDMDT	DDWTIRFQ	
Histoplasma capsulatum	GLGITAGYHRLWAH	CSYSAATPLKYL	LAAVGGGAVEG	SIRWWARGHRAH	RYTDTTEKDPYSV	RKGLLYSHIGWM	VMKQNPKRIGR	TEITDLNED	PVVVWQ	
Cryptococcus curvatus ATCC 20509	GLGITAGYHRLWAH	RSYNASKPLQYF	LALCGAGSVQGS	IRWWSRGHRAH	RYTDTTEKDPYSA	HGFWHAMGWM	LIK-PRCKIGV	ADISDL	LSKNPVV	KWQ
Ogataea angusta	GLSITAGYHRLWAH	RAYDCRLP	VKIFFALFGAS	AVEGSIKMWG	HQHRVHHR	YTDTPRDPYDA	KRGFWYSHMG	WMLLVNPRY	RARADIS	DLDDVVRVQ
Mo. verticillata CBS 346.66	GITAGYHRLWAH	RAYTAGPAMSF	LALLGAGAVEG	SIKWSRGHRAH	HRRTDTEKDPY	SAHRGLFHS	HIGWMLV	KRPNWKI	GHADVDD	LNNKSKLVQWQ
Mo. gamsii CBS 749.68	GLGITAGYHRLWAH	RSYNAGPAMSF	VLALLGAGAVEG	SIKWSRGHRAH	HRRTDTEKDPY	SAHRGLFFS	HIGWMLIKR	PGWKIGHAD	VDDLNNK	SKLVQWQ
Mo. chlamyospora CBS 120.34	GFGITAGYHRLWAH	RAYTAGPAMSF	VLALLGAGAVEG	SIKWSRGHRAH	HRRTDTEKDPY	SAHRGLFFS	HIGWMLIKR	PGWKIGHAD	VDDLNNK	SKLVQWQ
Mo. antarctica CBS 609.70	GFGITAGYHRLWAH	RAYNAGPAMG	FVLALLGAGAVEG	SIKWSRGHRAH	HRRTDTEKDPY	SAHRGLFFS	HIGWMLIKR	PGWKIGHAD	VDDLNNK	SKLVQWQ
Mo. alpina CBS 210.32	GFGITAGYHRLWAH	RAYNAGPAMSF	VLALLGAGAVEG	SIKWSRGHRAH	HRRTDTEKDPY	SAHRGLFFS	HIGWMLIKR	PGWKIGHAD	VDDLNNK	SKLVQWQ
Mo. amoeboides CBS 889.72	GLGITAGYHRLWAH	RAYNAGPAMSF	VLALLGAGAVEG	SIKWSRGHRAH	HRRTDTEKDPY	SAHRGLFFS	HIGWMLIKR	PGWKIGHAD	VDDLNNK	SKLVQWQ
Mo. armillariicola CBS 914.73	GLGITAGYHRLWAH	RAYSAGTMSF	ILALLGAGAVEG	SIKWSRGHRAH	HRRTDTEKDPY	SAHRGLFFS	HIGWMLV	KRPNWKI	GHADVDD	LNNKSKLVQWQ
Mo. elongatula CBS 488.70	GLGITAGYHRLWAH	RAYSAGPAMSF	VLALLGAGAVEG	SIKWSRGHRAH	HRRTDTEKDPY	SAHRGLFFS	HIGWMLIKR	PGWKIGHAD	VDDLNNK	SKLVQWQ
Mo. epicladia CBS 355.76	GLGITAGYHRLWAH	RAYTAGPAMSF	VLALLGAGAVEG	SIKWSRGHRAH	HRRTDTEKDPY	SAHRGLFFS	HIGWMLV	KRPNWKI	GHADVDD	LNNKSKLVQWQ
Mo. humilis CBS 222.35	GLGITAGYHRLWAH	RAYNAGPAMSF	VLALLGAGAVEG	SIKWSRGHRAH	HRRTDTEKDPY	SAHRGLFFS	HIGWMLV	KRPNWKI	GHADVDD	LNNKSKLVQWQ
Mo. globulifera CBS 858.70	GLGITAGYHRLWAH	RAYSAGPAMSF	ALALLGAGAVEG	SIKWSRGHRAH	HRRTDTEKDPY	SAHRGLFFS	HIGWMLIKR	PGWKIGHAD	VDDLNNK	SKLVQWQ
Mo. horticola CBS 305.52	GLGITAGYHRLWAH	RAYNAGPAMSF	VLALLGAGAVEG	SIKWSRGHRAH	HRRTDTEKDPY	SAHRGLFFS	HIGWMLV	KRPNWKI	GHADVDD	LNNKSKLVQWQ
Mo. mutabilis CBS 308.52	GLGITAGYHRLWAH	RAYTAGPAMSF	VLALLGAGAVEG	SIKWSRGHRAH	HRRTDTEKDPY	SAHRGLFFS	HIGWMLV	KRPNWKI	GHADVDD	LNNKSKLVQWQ
Mo. schmuckeri CBS 295.59	GLGITAGYHRLWAH	RSYNAGPAMSF	VLALLGAGAVEG	SIKWSRGHRAH	HRRTDTEKDPY	SAHRGLFFS	HIGWMLIKR	PGWKIGHAD	VDDLNNK	SKLVQWQ
Mo. microzygospora CBS 880.97	GLGITAGYHRLWAH	RAYNAGPAMSF	VLALPAGAVEG	SIKWSRGHRAH	HRRTDTEKDPY	SAHRGLFFS	HIGWMLIKR	PGWKIGHAD	VDDLNNK	SKLVQWQ
	110	120	130	140	150	160	170	180		
Mo. alpina CBS 528.72 $\Delta 9$ -1	HKNYLPLVLIMGV	FPTVAGLWGD	WRGGYFYAAIL	RLVFVHHATF	CVNSLAHWLGD	GPDDRHS	PRDHFITAF	VTLGE	GYHNF	
Mo. alpina CBS 528.72 $\Delta 9$ -2	HKHYLILVILMGL	FPTAVAGLWGD	WRGGYFYAAIL	RLVFVHHATF	CVNSLAHWLGD	GPDDRHT	PRDHFITAF	TLGE	GYHNF	
Mo. alpina CBS 528.72 $\Delta 9$ -3	HDHFLWLAPLIS	LGLPTMVAGF	GWGDYWGFIY	GGIIRQVVFV	HHATF	CVNSLAHWLGD	MPFDDRHT	PRDHI	LTA	VTLGE
Saccharomyces cerevisiae S288c	HRHYILLMLLTA	FVIPTLTCGYF	FDNDYMGGLI	YAGFIRVFI	QQATFCIN	SLAHYIGTQPF	DDRRT	PRDNW	ITA	IVTFGE
Histoplasma capsulatum	HRNYLKVIVFMG	IVFPMVLVSG	LWGDWFGGFI	YAGILRIFV	QQATFCV	NSLAHWLGD	QPFDDRNS	SPRDH	IVT	ALVTGE
Cryptococcus curvatus ATCC 20509	HNNYVALLFFM	GLAFPTL	VAGLWGDW	GGFFAGAR	LVFVHHSTF	CVNSLAHWLGE	TPFDNKHT	PKDHFIT	ALVT	VGE
Ogataea angusta	HRHYLLLMMVMA	FFPAILTHFL	NDFWGGFI	YAGLLRAVFI	QQATFCV	NSLAHWIGE	QPFDDRRT	PRDHI	LTA	VTGE
Mo. verticillata CBS 346.66	HKNYLLLMLMGL	MGFPPTVAGL	WGDWRGGYFYA	AILRLVFVHHATF	SVNSLAHWLGD	SPFDDRHT	PRDHFIT	ALLS	GE	GYHNF
Mo. gamsii CBS 749.68	HKNYLALIFLMG	VVFPPTAVAGL	WGDWRGGYFYA	AILRLVFVHHATF	CVNSLAHWLGE	GPDDRHS	PRDHFIT	AFMT	LGE	GYHNF
Mo. chlamyospora CBS 120.34	HKNYIPLVLFMG	IIFPTL	VAGLWGDWRGGYFYA	AILRLVFVHHATF	CVNSLAHWLGD	GPDDRHT	PRDHFIT	AFVT	MGE	GYHNF
Mo. antarctica CBS 609.70	HKNYLPLVLIMG	VVFPPTL	VAGLWGDWRGGYFYA	AILRLVFVHHATF	CVNSLAHWLGD	GPDDRHS	PRDHFIT	AFVT	LGE	GYHNF
Mo. alpina CBS 210.32	HKNYLPLVLIMG	LVFPPTVAGL	WGDWRGGYFYA	AILRLVFVHHATF	CVNSLAHWLGD	GPDDRHS	PRDHFIT	AFVT	LGE	GYHNF
Mo. amoeboides CBS 889.72	HKNYLPLVLIMG	VVFPPTVAGL	WGDWRGGYFYA	AILRLVFVHHATF	CVNSLAHWLGD	GPDDRHS	PRDHFIT	AFVT	LGE	GYHNF
Mo. armillariicola CBS 914.73	HNNYTALVILM	GVFPPTAVAGL	WGDWRGGYFYA	AILRLVFVHHATF	CVNSLAHWLGE	GPDDRHS	PRDHFIT	AFVT	LGE	GYHNF
Mo. elongatula CBS 488.70	HKNYLVLVLFMG	IIFPTMVAGL	WGDWRGGYFYA	AILRLVFVHHATF	CVNSLAHWLGD	GPDDRHT	PRDHFIT	AFVT	LGE	GYHNF
Mo. epicladia CBS 355.76	HKNYLFLVLMGL	FVFPPTAVAGL	WGDWRGGYFYA	AILRLVFVHHATF	RVNSLAHWLGE	GPDDRHS	PRDHFIT	AFVT	MGE	GYHNF
Mo. humilis CBS 222.35	HKNYLFLVLMGL	FVFPPTAVAGL	WGDWRGGYFYA	AILRLVFVHHATF	CVNSLAHWLGE	GPDDRHS	PRDHFIT	AFVT	MGE	GYHNF
Mo. globulifera CBS 858.70	HKNYLPLVLFMG	IIFPTL	VAGLWGDWRGGYFYA	AILRLVFVHHATF	CVNSLAHWLGE	GPDDRHS	PRDHFIT	AFMT	LGE	GYHNF
Mo. horticola CBS 305.52	HKNYLFLVLMGL	FVFPPTAVAGL	WGDWRGGYFYA	AILRLVFVHHATF	CVNSLAHWLGE	GPDDRHS	PRDHFIT	AFVT	MGE	GYHNF
Mo. mutabilis CBS 308.52	HKNYLFLVLFMG	IIFPTL	VAGLWGDWRGGYFYA	AILRLVFVHHATF	CVNSLAHWLGD	GPDDRHS	PRDHFIT	AFVT	LGE	GYHNF
Mo. schmuckeri CBS 295.59	HKNYLALIFLMG	VVFPPTAVAGL	WGDWRGGYFYA	AILRLVFVHHATF	CVNSLAHWLGE	GPDDRHS	PRDHFIT	AFMT	LGE	GYHNF
Mo. microzygospora CBS 880.97	HKNYFPLVIFMG	IVFPTL	VAGLWGDWRGGYFYA	AILRLVFVHHATF	CVNSLAHWLGE	GPDDRHS	PRDHFIT	AFVT	LGE	GYHNF

11. NYILATKOZAT

Alulírott **Kovács Aranka Stella** Biológia MSc szakos hallgató kijelentem, hogy a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül a:

- a felhasznált gombatörzsek tenyésztését,
- a felhasznált gombatörzsek genomi DNS-ének tisztítását,
- a 18S riboszómális RNS régió (nrSSU) felszaporítását,
- az amplifikált nrSSU fragmentumok DNS gélelektroforézisét,
- az nrSSU szekvenciák elemzését,
- a $\Delta 9$ deszaturáz gén felszaporítását,
- a felszaporított $\Delta 9$ deszaturáz génfragmentumok DNS gélelektroforézisét,
- a felszaporított $\Delta 9$ deszaturáz génfragmentumok visszaizolálását,
- a visszaizolált $\Delta 9$ deszaturáz génfragmentumok vektorokba történő ligálását,
- kompetens *E. coli* sejtek készítését,
- a $\Delta 9$ deszaturáz génfragmentumokat hordozó vektorok transzformálását kompetens *E. coli* sejtekbe,
- plazmid DNS tisztítását a transzformáns baktériumokból és a plazmidok ellenőrzését restrikciós emésztésekkel,
- a $\Delta 9$ deszaturáz szekvenciák elemzését végeztem el.
- Ezen kívül részt vettem a szénforrás-hasznosítási és zsírsav-kivonási vizsgálatokban.

A szekvenálásokat az LGC Genomics (Berlin), a filogenetikai analízist Petkovits Tamás, míg a HPLC analízist Dr. Szekeres András és Bencsik Ottó végezte.

.....

aláírás

Szeged, 2012. december 10.