

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Fermentációs ipari szénforrások asszimilációjának vizsgálata fonalas tömlősgomba (*Pezizomycotina*) fajokban



KARAFFA LEVENTE

**Debreceni Egyetem
Természettudományi és Technológiai Kar
Biomérnöki Tanszék**

2016

TARTALOMJEGYZÉK

BEVEZETÉS	3
CÉLKITŰZÉSEK	4
EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK.....	5
Az <i>Aspergillus nidulans</i> laktóz és D-galaktóz anyagcseréjének vizsgálata	5
Ipari biotechnológiai jelentőségű <i>Pezizomycotina</i> fajok laktóz és D-galaktóz anyagcseréje	12
A specifikus növekedési ráta és a szénváz asszimiláció sebességének összefüggései	14
A szénváz asszimiláció sebességének hatása fonalas gombák anyagcseréjére	16
Stacioner szénváz asszimiláció: a cianid-rezisztens alternatív légzés szabályozása <i>Acremonium chrysogenum</i> -ban.....	20
HIVATKOZÁSOK	21
AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA.....	22
A DOLGOZAT TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ TOVÁBBI KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA AZ EGYETEMI DOKTORI (PHD) FOKOZAT MEGSZERZÉSE (1997) ÓTA.....	25
TUDOMÁNYOS MÉRŐSZÁMOK	27

BEVEZETÉS

Egy aerob mikrobiális sejt szárazanyag tartalmának 45-55 %-át a szénváz teszi ki. Ennek megfelelően egy tipikus fermentációs táptalaj mennyiségének is legalább a felét – de sokszor ennél is többet – a szénforrások alkotják, minőségi értelemben pedig széntartalmú szerves vegyületek százairól állapították meg, hogy jelenlétük a tápközegben előnyös vagy hátrányos lehet ipari biotechnológiai folyamatokra. A szénforrás a sejtek növekedéséhez és az ipari fermentációs folyamat céltermékének bioszintéziséhez egyaránt szükséges. A kettős funkció egyféle szénforrás révén is megvalósulhat (pl. szerves savak előállítása), de ugyanaz a szénforrás a növekedésre illetve a bioszintézisre részben eltérő, vagy kifejezetten ellentétes hatású is lehet (pl. antibiotikumok gyártása). A szénforrások metabolitok képződésére gyakorolt hatása is változatos: specifikus indukciót fejthetnek ki egy génre, epigenetikus szabályozóként működhetnek, de akár a teljes genomra ható (globális) anyagcsere-regulátorokat is módosíthatják. Mindezek miatt egy ipari fermentációs technológia megtervezése és irányítása a táptalajban lévő szénforrás(ok) asszimilációs mechanizmusainak ismerete nélkül nem képzelhető el.

Az értekezésemben tárgyalt eukarióta mikroorganizmusok a jelenleg érvényes rendszertani felosztás szerint „Gombaország” (Kingdom: *Fungi*, Sub-Kingdom: *Dikarya*) tömlősgombák (*Ascomycota*) törzsének *Pezizomycotina* altörzsébe tartoznak. Az *Aspergillus nidulans*, az *Aspergillus terreus*, az *Aspergillus niger*, valamint a *Penicillium chrysogenum* az *Eurotiomycetes* osztály *Eurotiales* rend *Trichocomaceae* családjába tartozó nemzetségek (genera) fajai – vagyis közeli rokonok – míg a *Trichoderma reesei* és az *Acremonium chrysogenum* az előző négytől rendszertanilag távolabb, de egymáshoz közelebb eső, a *Sordariomycetes* (szinoním: *Pyrenomycetes*) osztály *Hypocreales* rend *Hypocreaceae* családjába tartozó két nemzetség (genus) tagjai.

Miért pont ezekben a fonalgomba fajokban vizsgáltuk a szénváz lebontásának mechanizmusait? Az okok nem filogenetikai, hanem gyakorlati jellegűek. Az *A. nidulans* a *Pezizomycotina*-k egyik ismert modellje: a metabolizmusáról, genetikájáról meglévő ismeretanyag, az alkalmazható molekuláris biológiai módszerek száma kimagasló. Az *A. nidulans*-on túlmenően pedig olyan fonalas *Pezizomycotina* fajokat vizsgáltunk, melyeknél a szénváz hasznosításának illetve a szénváz általi indukciós és repressziós folyamatoknak konkrét biotechnológiai vonatkozásai vannak.

A szénváz asszimiláció az élettan minden egyéb területével kapcsolatban áll; teljes vertikumának akár csak érintőleges vizsgálatára sajnos nem törekedhettünk. Értekezésemet mégis abban a reményben készítettem el, hogy hozzájárulok a fungális szénforrás hasznosulás mechanizmusainak megértéséhez, és a gyakorlati alkalmazások lehetőségeinek kiaknázásához.

CÉLKITŰZÉSEK

- A fungális laktóz anyagcsere (transzport és hidrolízis) és a D-galaktóz asszimiláció tanulmányozása, a molekuláris szabályozó mechanizmusok feltárása *Aspergillus nidulans* modell-szervezeten.
- Gyakorlati jelentőségű *Pezizomycotina* fajok (*Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei*) laktóz és D-galaktóz anyagcseréjének vizsgálata, összehasonlítása.
- A specifikus növekedési ráta és a szénváz asszimiláció sebességének összefüggései: kemosztát-típusú folytonos fermentációs rendszerek létrehozása és optimalizálása fonalas gombák élettani vizsgálatainak során.
- A szénváz asszimiláció sebességének hatása fonalas gombák anyagcseréjére a *Trichoderma reesei* celluláz, az *Acremonium chrysogenum* cephalosporin-C és az *Aspergillus terreus* itakonsav termelésének példáján.
- A stacioner fázisú szénváz asszimiláció egyik peremfeltételének számító cianid-rezisztens alternatív légzés szabályozásának vizsgálata *Acremonium chrysogenum*-ban.

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

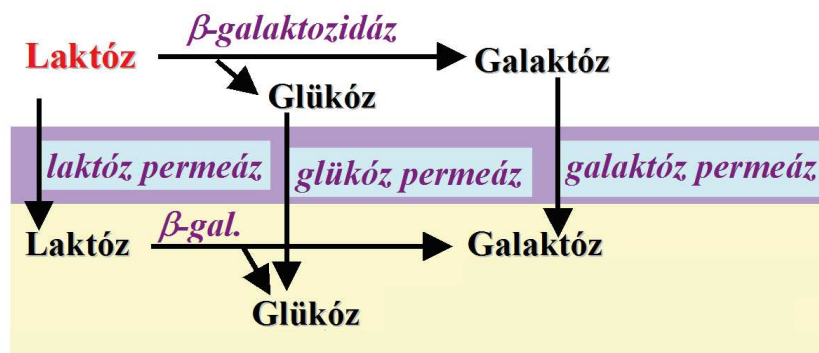
A természetben csak elvétve fordulnak elő azonnal hasznosítható mono- vagy diszacharidok, így a mikroorganizmusok, köztük a tipikusan növénypatogén illetve szaprofita gombák számára a szénforrás asszimiláció első lépése a polimer jellegű szacharidok extracelluláris degradációja kisebb, transzportálható egységekre. A fermentációs ipari technológiák ezt az idő- és energia igényes lépést a szénforrás előkezelésével (savas vagy enzimes hidrolízis) váltják ki, azonnal felvehető szénvázat biztosítva a sejteknek. Kutatásaink során ezt a megközelítést adaptáltuk. Három olyan cukor – laktóz, D-glükóz, D-galaktóz – közvetlen asszimilációját tanulmányoztuk, melyek – ha nem is az általunk alkalmazott analitikai tisztaságban –, de előkezelt ipari szénforrásként gyakorlati jelentőséggel is bírnak.

A tézispontok ismertetése előtt általánosságban elmondható: a szénváz asszimiláció több szinten szabályozott folyamat a gombákban; az egyes cukrok anyagcseréje befolyásolja egymást; az időegység alatt több energiát szolgáltató, gyorsan hasznosuló szénforrás előnyt élvez a lassabban hasznosuló, kevesebb energiát biztosítóval szemben; a szénváz asszimiláció elválaszthatatlan a hatóanyag (termék) bioszintézisétől. Másfelől, ugyanazon szacharid lebontására hasonló metabolikus stratégiák alakultak ki és konzerválódtak olyan, egymástól evolúciósan távol álló gombafajokban is, mint az *A. niger* és a *T. reesei*.

A fenti célkitűzések mentén elvégzett kutatásaink legfontosabb eredményei a következők:

Az *Aspergillus nidulans* laktóz és D-galaktóz anyagcseréjének vizsgálata

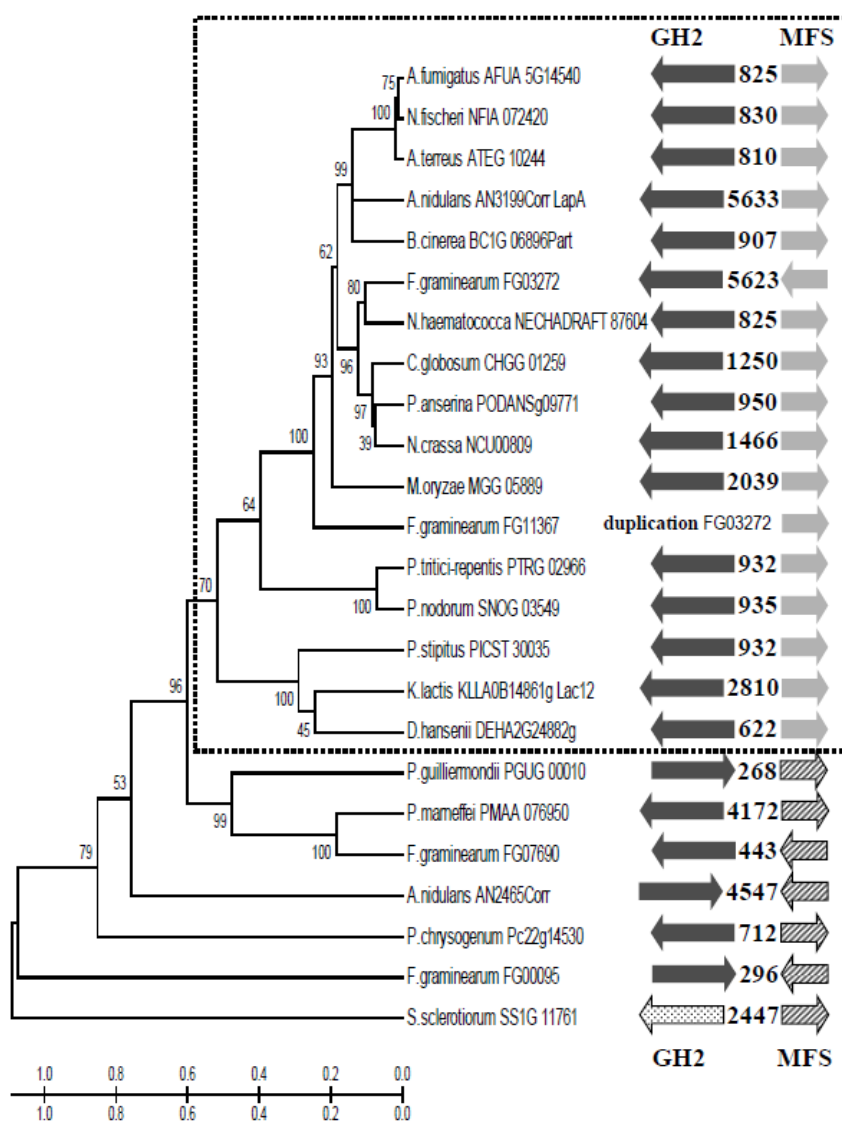
A gombák laktóz anyagcseréje extra- illetve intracelluláris lehet. Az első esetben a diszacharid a sejten kívül hidrolizál monomerjeire az extracelluláris β -galaktozidáz (bGal) enzimaktivitás hatására, és ezt követi a D-glükóz és D-galaktóz felvétele. A második esetben maga a diszacharid jut be a sejtbe egy laktóz transzporter (permeáz) enzim révén, a hidrolízis ilyenkor intracellulárisan történik ([1]; **1. ábra**). Az összes, funkcionálisan jellemzett intracelluláris (semleges pH-optimumú) bGal a Glikozil Hidroláz 2 (GH2) enzimcsaládba tartozik [2].



1. ábra. Gombák laktóz anyagcseréjének vázlata. Lila sáv: sejtmembrán, sárga terület: citoszol.

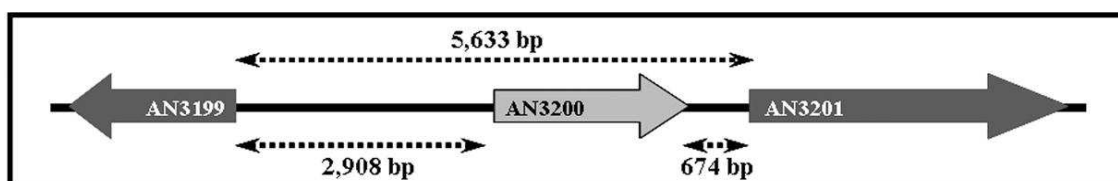
Az *A. nidulans* kizárólag intracelluláris laktóz anyagcserével rendelkezik [3]. Mindkét enzimaktivitás indukálható; laktózon és D-galaktózon magas értékeket érnek el [4]. Indukció során a laktóz felvétel és a bGal aktivitás kinetikája párhuzamos mintázatú. Mindebből azt a munkahipotézist állítottuk fel, hogy a laktóz intracelluláris lebontása során a permeáz és hidroláz funkciók kifejeződését szabályozó molekuláris mechanizmusok legalábbis részben közösek. A hipotézis teszteléséhez azonosítottuk, majd jellemeztük az *A. nidulans* élettanilag releváns (funkcionális) laktóz permeáz és bGal génjét/génjeit.

1) A VI. kromoszómán azonosítottunk egy génpárt. Tagjai egy intracelluláris bGal-t (*bgaD*) és egy laktóz permeázt (*lacpA*) kódolnak. A *bgaD/lacpA* génklaszter ortológjait *in silico* további 15, filogenetikailag diverz *Ascomycetes*-ben azonosítottuk, ami evolúciós konzerváltságra utal. A *bgaD/lacpA* génklaszter tagjai divergensen íródnak át, hasonlóan a vizsgált *Ascomycetes* fajok túlnyomó többségéhez (2. ábra).



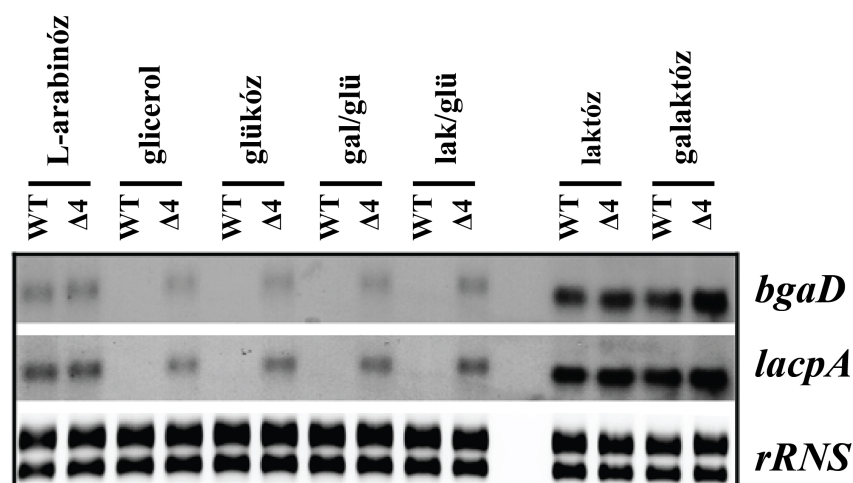
2. ábra. Gombák intracelluláris Glikozil Hidroláz 2 (GH2) β -galaktozidáz génjeivel párban található Major Facilitator Superfamily (MFS) cukortranszporterek evolúciós kapcsolatai.

A divergens génpárok közti távolság – éppen az *A. nidulans* kivételével – 810 és 2034 bp közé esik (2. ábra). *A. nidulans*-ban a távolság 5,6 kb, amit egy konstitutívan kifejeződő, GH2 hidroláz gén tölt ki (3. ábra).



3. ábra. A *bgaD/lacpA* génklaszter elhelyezkedése az *A. nidulans* VI. kromoszómáján (1.52/1.53 kontigok). AN3199 – *lacpA*, AN3201 – *bgaD*).

2) Bebizonyítottuk: az *A. nidulans* *bgaD/lacpA* génpár tagjainak kifejeződése – a vizsgált körülmények között – hasonló mintázatokat követ. A *bgaD* és a *lacpA* – az expressziók erősségének sorrendjében – párhuzamosan indukálódott D-galaktózon, laktózon, majd L-arabinózon. D-glükózon, D-xilózon, galaktitolon és glicerolon nem következett be indukció. CreA-hiányos karbon katabolit derepresszált törzsekben, kis mennyiségben *bgaD* és *lacpA* transzkriptum képződött D-glükózon illetve glicerinen is, vagyis a génpár tagjai CreA-függő, konstitutív alap-expresszióval rendelkeznek (4. ábra).



4. ábra. A *bgaD* (intracelluláris bGal) és a *lacpA* (laktóz permeáz) gének kifejeződésének szénforrás függése *A. nidulans* vad típusú (WT) és karbon katabolit derepresszált ($\Delta 4$) mutáns törzsekben.

A CreA a (D-galaktóz és a laktóz általi) indukcióval is kölcsönhat: laktóz/D-galaktóz illetve D-glükóz együttes jelenlétében, vad típusú törzsekben a *bgaD/lacpA* génpárról nem íródik át transzkriptum, karbon katabolit derepresszált törzsben viszont gyenge kifejezések és alacsony bGal enzimaktivitás detektálható. A laktóz/D-galaktóz indukció hatása a *bgaD/lacpA* génparra CreA-hiányos törzsben erőteljesebb volt, amit enzimaktivitási adatokkal is alátámasztottunk. Végezetül, a D-glükóz vad típusban leállítja a laktózfelvételt, míg a CreA-hiányos mutáns törzsekben a gátlás

elmarad. A D-glükóz hatása az *A. nidulans* laktóz anyagcseréjére tehát legalább három szinten jelentkezik, melyek mindegyike CreA-függő folyamat: (a) a konstitutív *bgaD/lacpA* transzkripció gátlása; (b) a génpár indukálhatóságának részleges gátlása; (c) az indukált szintek gátlása illetve lecsökkentése.

3) A vad típusú *A. nidulans bgaD* kifejeződése és az intracelluláris bGal aktivitás képződése a **2) tézispontban** megadott szénforrásokon – a D-xilóz kivételével – jól korrelál. D-xilózon *bgaD* expressziót nem, bGal aktivitást viszont tudtunk mérni, jelezve, a *bgaD* géntermék nem az egyetlen bGal aktivitású enzim *A. nidulans*-ban. Ezt támasztotta alá az is, hogy laktóz-minimál táptalajon a *bgaD*-hiányos illetve *bgaD*-túltermelő mutáns törzsek a vad típushoz hasonlóan nőttek. Noha a *bgaD* géntermék az egyetlen enzim *A. nidulans*-ban, mely a laktóz-analóg mesterséges szubsztrátum X-gal-t¹ hidrolizálni képes, a laktóz asszimiláció szempontjából mégis nélkülözhetőnek bizonyult. Az eredmények az X-gal alapú kísérleti rendszerek korlátait is jelzi.

4) Bebizonyítottuk, hogy a klasszikus *A. nidulans lacA1* laktóz anyagcsere mutáció [5] nem a *lacpA* génhez kötődik. A *lacpA* – génkiütés révén végrehajtott – funkcionális elemzése azonban rávilágított, hogy a *lacpA* géntermék is egy funkcionális laktóz permeáz, mivel a hiánymutáns növekedése jelentősen visszaesett a vad típusú és a retranszformáns kontrollhoz képest. A fenotípus nem abszolút: a *lacpA* hiánymutáns képes laktóz felvételére és belőle új biomassza létrehozására. A többi vizsgált szénforráson (glicerol, L-arabinóz, D-galaktóz, D-glükóz, D-xilóz) a hiánymutáns és a referencia törzsek szénforrás-felvételi illetve biomassza-produkciós időprofiljai megegyezők voltak, vagyis a *lacpA* élettani szerepe specifikus a laktóz felvételére. A túltermelő (extra kópiás) *A. nidulans lacpA* törzsek laktóz-minimál táptalajon szignifikánsan gyorsabban vették fel a cukrot és szignifikánsan nagyobb biomasszát képeztek belőle. Mindez arányos volt a kópiaszámmal: a 2 db extra kópiát tartalmazó törzs gyorsabban nőtt az 1 db extra kópiát tartalmazónál. Ezzel kísérletesen demonstráltuk, hogy az *A. nidulans* laktóz lebontásakor a cukor transzportja a sebesség meghatározó lépés.

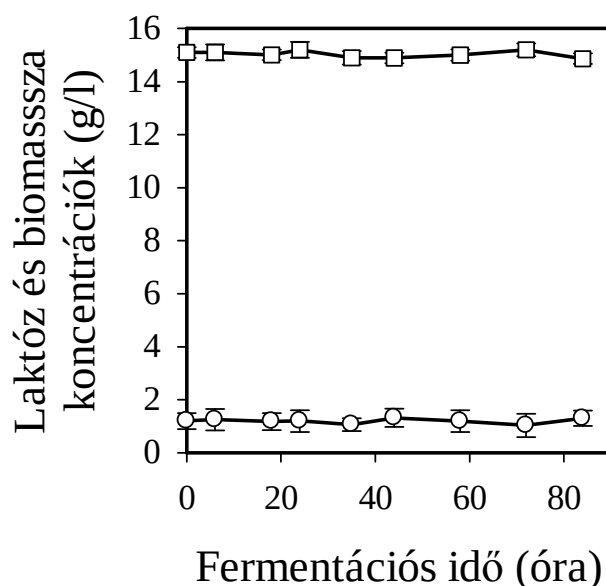
Az eredményeket ¹⁴C-el jelölt laktóz felvételi rátájának mérésével erősítettük meg. A permeázok jellemzéséhez a felvételt különböző laktóz koncentrációk mellett tanulmányoztuk. A szubsztrátum külső koncentrációjának csökkenésével a LacpA hozzájárulása fokozódott: 2 mM koncentrációnál alig 20 %, 100 μ M-nál > 65 % volt. Ez azt sugallta, hogy a még ismeretlen laktóz permeáz a tejcukor iránt a LacpA-hoz képest kisebb affinitással bír.

5) A **4) tézispontban** megfogalmazottakat követve azonosítottuk az AN2814 lókuszt által jelölt, LacpA-paralóg MFS-fehérjét kódoló gént (*lacpB*). A gén deléciója szignifikánsan visszavetette a laktóz felvétel illetve a biomassza képződés mértékét a referencia törzsekhez képest, jelezve, a *lacpB* géntermék egy élettanilag releváns laktóz permeáz. Az **4) tézispont** egyik állítását – *A. nidulans*-ban a laktóz anyagcsere

¹ 5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktopiranozid

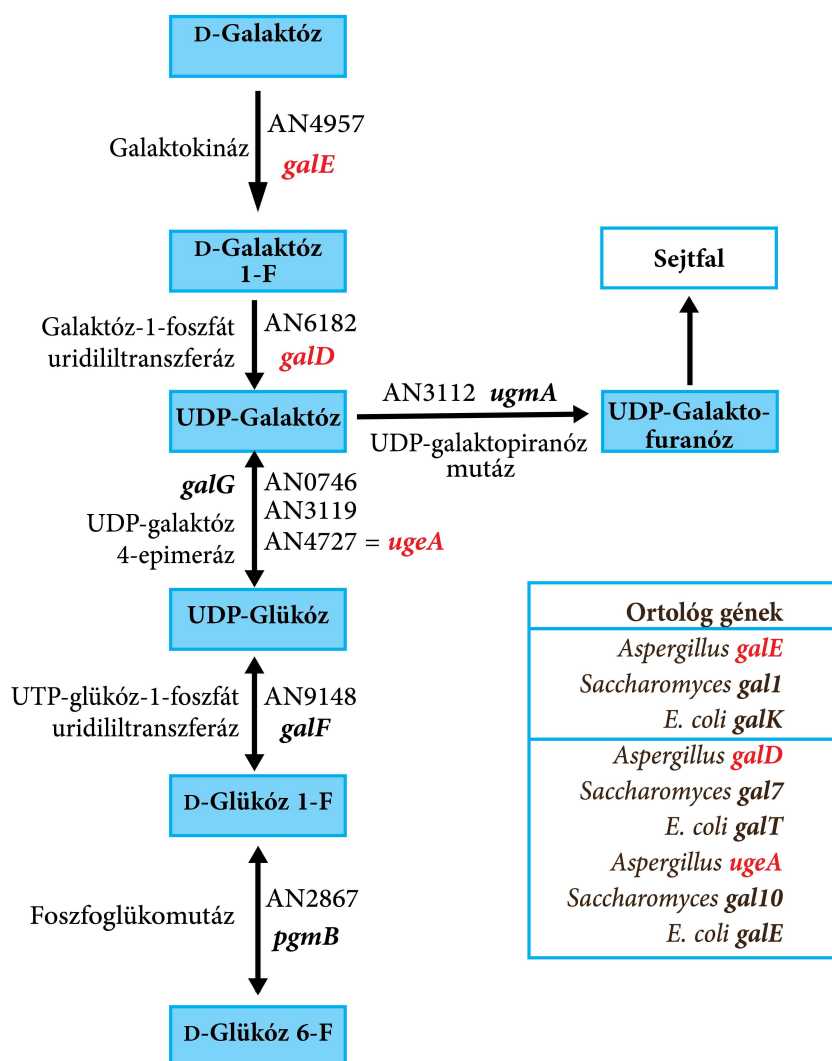
sebesség meghatározó lépése a transzport – a *lacpB* révén is bizonyítani tudtuk, kópiaszáma ugyanis arányos a laktózfelvételi és a biomassa produkciós potenciállal. Kimutattuk: az *A. nidulans lacpA/lacpB* kettős mutáns nem csírázik és nő laktózon, de más szénforráson kinövesztett, laktózra átmosott micéliuma sem képes a laktóz felvételére és belőle biomassa létrehozására. Ezzel bebizonyítottuk, hogy az *A. nidulans* laktóz felvétele kétkomponensű: a LacpA és a LacpB alkotja (5. ábra). Az *A. nidulans*-ban az MFS-cukor-transzporterek száma meghaladja a százat [6], vagyis a faj laktóz felvétele meglepően kevésbé redundáns.

6) Az *A. nidulans lacpA* és *lacpB* expressziós profiljai részben eltérőek: D-glükózon, D-xilózon és D-mannózon egyik gén sem fejeződött ki, L-arabinózon csak a *lacpA* íródott át, cellobiózon és a potens celluláz-induktor szoforózon csak a *lacpB*. A *lacp* gének expressziói egymást is befolyásolják: az egyik *lacp* expressziója a másik *lacp*-hiánymutáns törzsben D-galaktóz hatására gyorsabb és erősebb lett, cellobióz hatására a *lacpB* kifejeződésre szintén fokozódott. A laktóz indukciós hatása viszont nem tért el a vad típusétól. Ez alátámasztja azt a hipotézist, miszerint a laktóz anyagcsere génjei illetve enzimeik mintegy véletlenül képesek az evolúciósan fiatal – az emlősök megjelenéséhez kötődő – laktóz transzportjára/hidrolízisére, és eredeti funkciójuk más (növényi avagy fungális eredetű) cukor-polimerek degradációjával kapcsolatos. Megállapítottuk továbbá, hogy a *lacpB* egy funkcionális cellobióz permeázt kódol, amely része az *A. nidulans* cellulolitikus rendszerének. A cellobióz fenotípus azonban csak részleges – a *lacpB* hiánymutáns csírázik, nő és spórázik cellobiózon – vagyis a cellobióz transzportnak további, ismeretlen komponensei is vannak ebben a gombafajban.

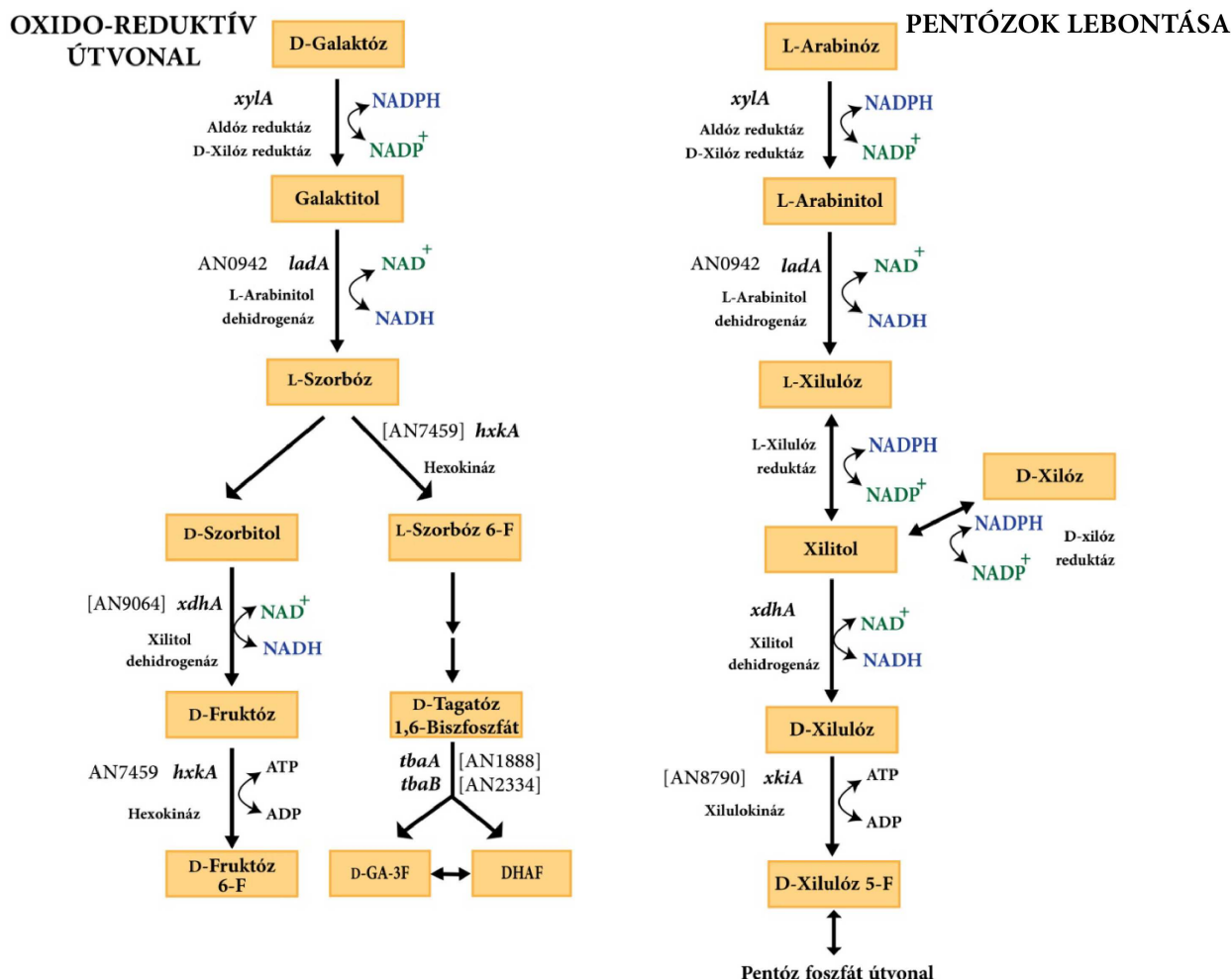


5. ábra. *A. nidulans lacpA/lacpB*-kettős mutánsok időprofiljai laktózon. (○): biomassa, (□): laktóz. A fermentációt micéliális inokulúmról indítottuk.

7) A fungális laktóz anyagcsere modell-szervezetének számító *Kluyveromyces lactis* élesztőben a D-galaktóz lebontás – pro- és eukariótákban is általánosan elterjedt, ubikviter – Leloir-útvonalában a galaktokináz nélkülözhetetlen enzim (6. ábra); hiányában a sejtek nem nőnek D-galaktózt egyedüli szénforrásként tartalmazó minimál táptalajon [7]. Ezzel ellentétben megállapítottuk, az *A. nidulans galE* (galaktokináz) mutánsok felveszik és hasznosítják a D-galaktózt, ha egyedüli nitrogénforrásként nem nitrát, hanem ammónium ionokat használunk. A jelenség vizsgálata során genetikai és biokémiai bizonyítékokat szereztünk egy alternatív, oxido-reduktívnek elnevezett D-galaktóz lebontási útvonal létrejöttére *A. nidulans*-ban, melynek során a D-galaktóz először NADPH-függően galaktitollá (dulcitol) redukálódik, majd NAD^+ -függően L-szorbózzá oxidálódik. Az új útvonal nem tartalmaz specifikus enzimeket: a galaktitol oxidáció a pentóz anyagcserében részt vevő L-arabinitol dehidrogenáz, az L-szorbóz foszforilezés a hexokináz révén történik. Az útvonal egésze a gombák hemicellulóz pentóz (D-xilóz és L-arabinóz) lebontására emlékeztet (7. ábra).



6. ábra. A D-galaktóz lebontás Leloir-útvonala. Az útvonal anabolikus funkciói miatt a legtöbb Leloir-enzim konstitutívan fejeződik ki a vegetatív fejlődési szakaszban.



7. ábra. A D-galaktóz oxido-reduktív lebontási útvonala és D-xilóz/L-arabinóz katabolizmusa *A. nidulans*-ban. D-Ga-3P: D-glicerinaldehyd-3-foszfát; DHAP: dihidroxiaceton-foszfát.

8) Megállapítottuk, hogy az *A. nidulans bgaD/lacpA* katabolikus gén pár D-galaktóz általi indukciójában a D-galaktóz lebontó anyagcseréje nem játszik szerepet. A kétféle (Leloir illetve oxido-reduktív) lebontási útvonal köztesének induktív képességét olyan mutánsokkal vizsgáltuk, melyek a Leloir út első (galaktokináz) illetve az oxido-reduktív út második (NAD-függő L-arabitol dehidrogenáz) lépésében defektesek. A *bgaD/lacpA* gén pár transzkriptumai mindkét mutánsban megjelentek D-galaktóz hatására, jelezve, a fenti két enzimes lépés utáni lebontó intermedierek nem játszanak szerepet az indukcióban. Mivel nem ismerünk olyan *A. nidulans* törzset, mely az oxido-reduktív út első lépését katalizáló aldóz-1-oxido-reduktázban lenne hiányos, a mutáns hiányát megkerülendő az indukálhatóságot galaktitolon teszteltük. A galaktitol nem indukálta a *bgaD/lacpA* kifejeződését. A gén pár indukciójához a D-galaktózon növekedés képessége sem szükséges, ahogy azt egy galaktokináz plusz hexokináz hiányos, D-galaktózon emiatt nem növekvő kettős mutánssal végzett kísérletek bizonyították: a micélium D-galaktózza történő átmosását követően a *bgaD* és a *lacpA* transzkriptumok jól detektálhatóan kialakultak. Megegyező eredményeket kaptunk D-

galaktóz illetve glicerol (ami egy nem indukáló, nem represszáló, semleges szénforrás) együttes használatakor, amikor kizárhattuk azt, hogy az eredmény a szénmegvonás (éhezés) következménye. A *bgaD/lacpA* génpár élettani induktora tehát D-galaktózon maga a metabolizálatlan cukor.

Ipari biotechnológiai jelentőségű *Pezizomycotina* fajok laktóz és D-galaktóz anyagcseréje

A celluláz enzim termelése miatt – az *A. nidulans*-sal ellentétben – biotechnológiai jelentőségű *T. reesei* a laktózt extracellulárisan hidrolizálja, ami a bGal-t a laktóz anyagcsere középpontjába helyezi. A funkcióhoz ez a gombafaj egy GH35 típusú bGal enzimet, a *bga1* géntermékét használja. *bga1*-hiányos *T. reesei* mutánsokban az eredeti bGal aktivitás alig 8 %-a mérhető laktózon [7], de hasonló a helyzet D-galaktózon és galaktitolon is. Mivel ipari körülmények között a celluláz / hemicelluláz enzimeket (valamint a celluláz promótereket alkalmazó heterológ enzimeket is) lassan adagolt laktóz szénforráson állítják elő, a laktóz anyagcsere vizsgálata *T. reesei*-ben gyakorlati jelentőséggel is bír.

9) A D-galaktóz lebontás oxido-reduktív útvonalának meglétét az *A. nidulans*-tól rendszertanilag távol álló *T. reesei*-ben is bizonyítottuk. Megállapítottuk, hogy az útvonalnak fontos szerepe van a laktóz anyagcserében központi szerepet betöltő, az összes aktivitás 92 %-ért felelős extracelluláris β -galaktozidáz enzimet kódoló *bga1* indukciójában, mivel élettani induktora a galaktitol.

Az *A. niger* hagyományos ipari jelentőségét a citromsavtermelés adja, amihez gyorsan hasznosuló szénforrásokat (D-glükóz tartalmú komplex táptalajok) használnak. A D-galaktóz anyagcsere iránti újkeletű érdeklődés oka az *A. niger* *Trichoderma* fajokkal összevethető extracelluláris enzimtermelése, amely révén potenciálisan alkalmas a növényi biomassza (cellulóz illetve hemicellulózok) technológiai léptékű lebontására. A D-galaktóz az egyetlen monomer, mely mindhárom fő hemicellulóz típusban megtalálható [8]. Hidrolitikus potenciálja ellenére az *A. niger* rendkívül gyengén hasznosítja a D-galaktózt, ami korlátozza alkalmazhatóságát. A jelenség élettani okát a galaktokináz gén mutációjával illetve a galaktokináz aktivitás hiányával magyarázták [9].

10) Új, ioncserés HPLC elválasztáson alapuló analitikai eljárást fejlesztettünk ki a galaktokináz enzimaktivitás meghatározására. Az 5 %-os hibán belül teljesítő módszer alapja a galaktóz + ATP $\rightarrow$ galaktóz-1-foszfát + ADP reakció során képződő D-galaktóz-1-foszfát mennyiségi meghatározása törésmutató alapján. A módszert *A. nidulans*, *A. niger* és *T. reesei* esetében teszteltük. Ennek során bebizonyítottuk, hogy a korábbi irodalmi adatokkal ellentétben [9] az *A. niger* rendelkezik galaktokináz enzimaktivitással. Szénforrás-függése hasonlít az *A. nidulans*-hoz: D-galaktózon, L-arabinózon szignifikánsan magasabb, mint D-glükózon, de minden további vizsgált szénforráson (laktóz, glicerol) megjelenik.

11) Bebizonyítottuk: az *A. niger* konidiospórák D-galaktóz negatív fenotípusa (vagyis a csírázásra való képtelenségük) a transzporttal függ össze; a konidiumok – szemben a vegetatív micéliummal – nem képesek D-galaktózt felvenni. Kimutattuk: az *A. niger* genom tartalmazza a Leloir-útvonal *A. nidulans*-ban annotált génjeinek az ortológjait (lásd 6. ábra), transzkriptum pedig mindegyikről, minden általunk vizsgált szénforráson keletkezik. A kifejeződés L-arabinózon, D-xilózon és D-galaktózon a legerősebb. A Leloir-útvonal enzimeit kódoló gének minimálisan, illetve egyáltalán nem fejeződnek ki a konidiumokban, a micéliumban ezzel szemben erőteljesek az expressziók. Megállapítottuk: a D-galaktóz lebontás Leloir-útvonalának működése *A. niger*-ben a vegetatív növekedési ciklus aktuális szakaszától függ. Mivel a konidiumok nem tudnak D-galaktózt felvenni, a Leloir-útvonal csökkent működése ennek – az inducer hiányának – lehet a következménye, vagyis vélhetően másodlagos jelenség.

A *P. chrysogenum* a fermentációs biotechnológia egyik prominens organizmusa, az elsőként felfedezett antibiotikum, a β -laktám típusú penicillin mindmáig legfontosabb termelője [10]. Noha a penicillin gyártás évtizedeken át tejsavó (vagyis gyakorlatilag laktóz) szénforráson történt, a faj laktóz asszimilációjáról keveset tudunk. Hasonló a helyzet a D-galaktóz asszimilációval is, bár *P. chrysogenum* törzseket egyre sűrűbben használnak enzim-koktélok előállítására, ami mezőgazdasági maradványokon és más, bőségesen rendelkezésre álló, lignocellulóz forrásokon megy végbe [11].

Kutatásaink célja a *P. chrysogenum* laktóz anyagcseréjében szerepet játszó strukturális gének (hidrolázok és transzporterek) azonosítása, valamint a D-galaktóz lebontás vizsgálata volt. Vizsgálatainkhoz egy vad típusú kontrollt (NRRL 1951) és egy penicillin túltermelő ipari törzset (AS-P-78) használtunk.

12) Az *A. niger* extra- és az *A. nidulans* intracelluláris laktóz anyagcseréjének annotált komponensei alapján *in silico* 5 db bGal-t (*bgaA-E*) és 2 db laktóz permeázt (*lacA-B*) azonosítottunk a *P. chrysogenum* genomban. A 3 db extracelluláris hidrolázt kódoló gén közül a *bgaB* és a *bgaC* a vizsgált körülmények között nem fejeződött ki laktózon. Az extracelluláris *bgaA* továbbá az intracelluláris *bgaD* és *bgaE* kifejeződött, expressziós jellemzőiket a laktóz koncentráció sem befolyásolta. A *bgaE* gyengén, de konstitutívan fejeződött ki. A *lacA* csak laktózon fejeződött ki, a *lacB* transzkriptum viszont egyetlen általunk vizsgált szénforráson, így laktózon sem volt detektálható. Génkiütések nélküli (közvetett) bizonyítékot szereztünk tehát, hogy a *P. chrysogenum* kettős laktóz asszimilációs mechanizmussal rendelkezik: genomja tartalmaz egy *A. niger lacA*-ortológ, feltételezetten extracelluláris bGal-t kódoló gént, egy *A. nidulans lacpB*-ortológ, feltételezetten laktóz permeázt kódoló, illetve egy *A. nidulans bgaD*-ortológ, feltételezetten intracelluláris bGal-t kódoló gént is. Egyik feltételezett bGal illetve laktóz permeáz gén sem indukálható D-galaktózzal, ami a szakirodalomban példa nélküli. A 3) **tézispontban** leírtakhoz hasonlóan a D-xilóz a *P. chrysogenum*-ban sem indukálta a feltételezett bGal géneket.

13) A szisztematikus törzsfejlesztés eredményeként drámaian megemelkedett penicillin kihozatal részben olyan mutációk következménye, melyek befolyásolják az elsődleges anyagcserét irányító általános szabályozási utakat. A gombatenyészetek kinetikai paraméterei azonban azt bizonyították, hogy az AS-P-78 törzs NRRL 1951-hez képest megnövekedett penicillin-termelő potenciálja nem jár együtt a laktóz asszimilációs ráta változásával. Ezek alapján a *P. chrysogenum* laktóz metabolizmusa nincs összefüggésben a gomba penicillin-termelő potenciáljával.

14) Az eddig vizsgált *Ascomycota* fajokban a galaktokinázt és a galaktóz-1-P-uridilil transferázt kódoló gének – függetlenül a D-galaktóz anyagcseréjétől – minden szénforráson kifejeződnek. *P. chrysogenum*-ban ezzel szemben a fenti két enzimet (feltételezhetően) kódoló gének konstitutív alapexpresszió nélküliek, de szelektíven indukálhatók D-galaktózzal és laktózzal. A jelenség a D-galaktóz anyagcsere eddig ismeretlen szabályozási mechanizmusai felé mutat.

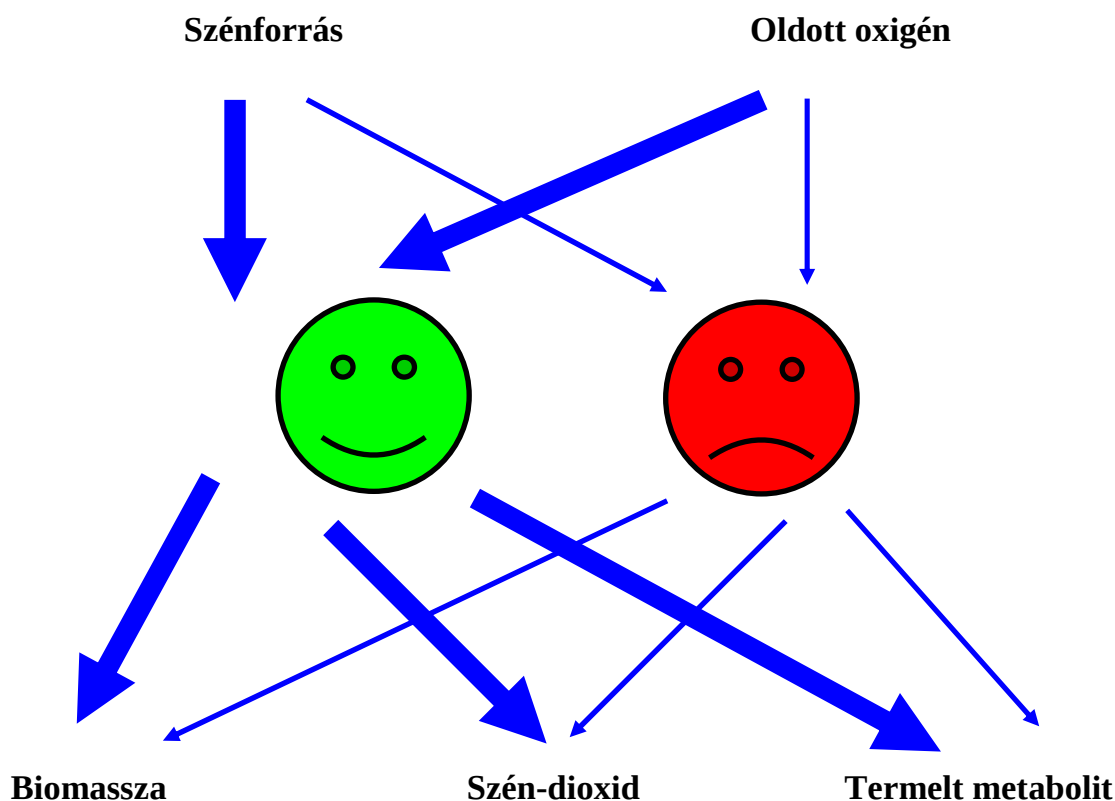
A specifikus növekedési ráta és a szénváz asszimiláció sebességének összefüggései

A specifikus növekedési ráta bármely sejt/mikróbatenyészet alapvető paramétere, mely döntő hatással van az anyagcserére. Jelentőségét korán felismerték [12], a specifikus növekedési ráta hatását is figyelembe vevő vizsgálati módszerek mégsem terjedtek el. Ennek okai főként technikaiak: a megközelítés alapját jelentő folytonos tenyészetek (kemosztát, turbidosztát, retentosztát és változataik) létrehozása és fenntartása idő- és munkaigényes, különösen a tenyésztőedény belső falán intenzív növekedésre (ún. „fali növekedés”) hajlamos fonalgombák esetében.

15) Módszert dolgoztunk ki a metabolikus aktivitás és a specifikus növekedési ráta kapcsolatának modellezésére. Az eljárás az Akridin narancs (AO) fluoreszcens festékekkel való kezeléson alapul, és fluoreszcens optikai mikroszkóppal értékelhető ki. Modellünk értelmében a metabolikus aktivitás a szénváz áramlás fluxusát jelenti a micéliumon keresztül. Ha egy sejt vagy sejtrégió metabolikus aktivitása alacsony, a (savanyú kémhatású) vakuolumok mérete jelentősen megnő, amit az AO festés – az intracelluláris kémhatás csökkenése miatt – vörösre változó színe jelez. Erőteljes szénváz-fluxus esetén csökkenő számú és méretű vakuolumok, és zöld festődés lesz a domináns (**8. ábra**). A festődés eredménye a mintavételt követő 15. percben már értékelhető, megörökíthető és (digitálisan) archiválható.

A modellt kemosztát tenyészetek vizsgálatával teszteltük. Négy különböző specifikus növekedési rátán tanulmányoztuk az AO festődést; az értékek megfeleltek a szakaszos (batch) fermentációk gyorsulási, gyors növekedési, lassulási illetve stacioner fázisainak. Az alacsonyabb hígítási ráta lecsökkent szénváz fluxussal jár együtt, aminek alacsonyabb specifikus növekedési ráta a következménye. Az *A. chrysogenum* micélium AO festődése valóban jelentősen eltért a különböző vizsgált hígítási rátákon. A legmagasabb hígítási rátánál észleltük a legnagyobb arányú zöld fluoreszcenciát, a legkisebb növekedési rátánál zöld szín már nem látszott, azaz teljes mértékben a vörös

került túlsúlyba. A köztes növekedési/hígítási ráta értékeknél az AO festődés átmeneti jellegű. Ezzel bizonyítottnak tekintettük, hogy az AO festés szoftveres képelemzéssel történő kiértékelése gyors, megbízható, számszerűsíthető és reprodukálható becslését adja a gombatenyészet *in situ* metabolikus aktivitásának.



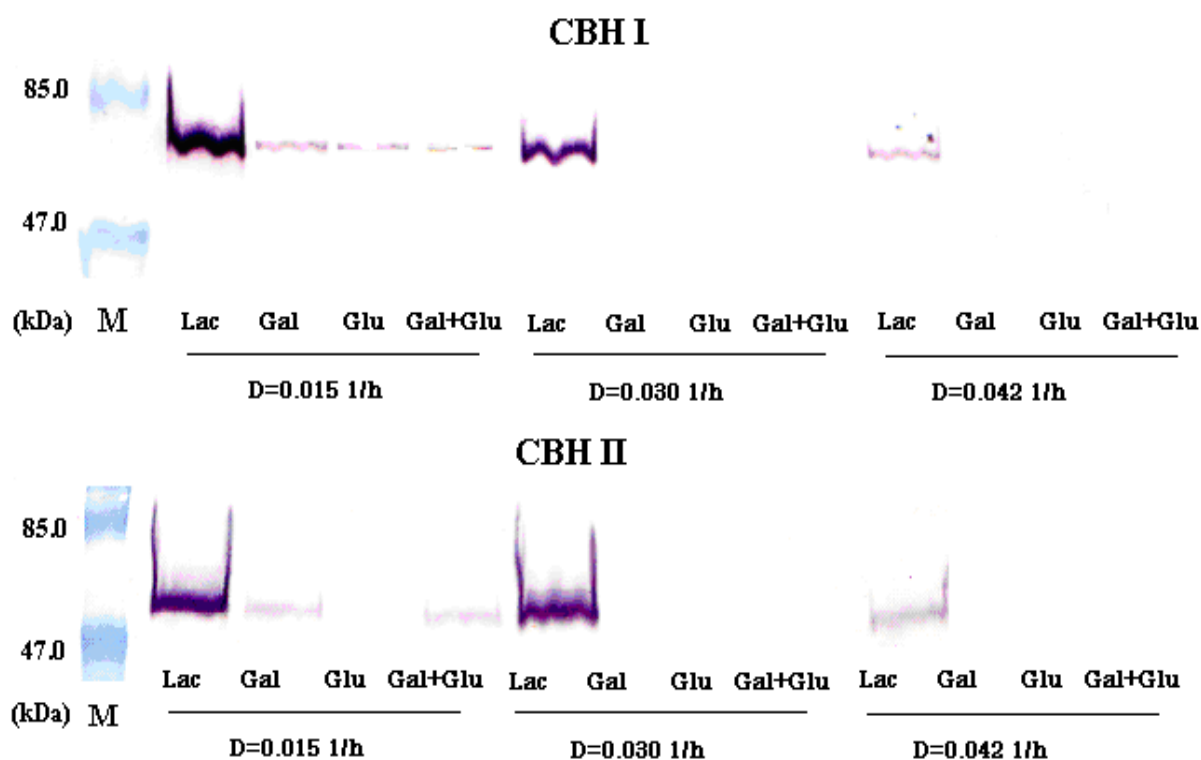
8. ábra. A fungális metabolikus aktivitás Akridin narancs festésen alapuló becslésének modellje.

16) Tudományos bizonyítékot szolgáltatunk a fermentációs biotechnológia egyik régi megfigyelésére, miszerint a karbon katabolit represszió kikerülhető illetve felfüggeszthető, ha alacsony specifikus növekedési rátán tartjuk a tenyészeteket – vagyis arra, hogy a specifikus növekedési ráta meghatározója (determinánsa) a karbon katabolit repressziónak. Állításunkat az *A. nidulans* és a *T. reesei* bizonyítottan CreA illetve CRE1-függő karbon katabolit represszió alatt álló génjeinek vizsgálatával támasztottuk alá. Eredményeink rávilágítottak továbbá a kemosztát-típusú folytonos tenyészetek jelentőségére a specifikus növekedési rátával kölcsönható szabályozási mechanizmusok vizsgálata során. Eredményeink úgy is értelmezhetők, hogy a CreA-függő karbon katabolit szabályzás vonatkozásában a „represszáló szénforrás” fogalom felülvizsgálatra szorul: a szénforrás(ok) által kialakított metabolikus fluxus (vagyis az anyagcsere sebessége) szabályozza elsődlegesen a karbon katabolit repressziót, nem pedig a szubsztrátum(ok) anyagi (kémiai) minősége.

A szénváz asszimiláció sebességének hatása fonalas gombák anyagcseréjére

A *T. reesei* cellulázokat ipari léptékben jellemzően laktóz tartalmú szénforráson állítják elő. A hidolízis lassúsága miatt feltételezték, hogy a lassan felszabaduló D-galaktóz, vagy annak egy lebontási intermediere a cellulázok induktora.

17) Szénforrás-limitált kemosztát tenyészetek alkalmazásával bebizonyítottuk, hogy a fenti hipotézis csak részben igaz. A cellulázokat modellező cellobiohidroláz (*cbh2*) gén magas hígítási rátán valóban nem fejeződött ki, alacsony hígítási rátán viszont tapasztaltunk enyhe kifejeződést. Ugyanezen – ipari körülményeket modellező – alacsony hígítási rátán azonban a laktóz négyszer jobb induktornak bizonyult a D-galaktóznál, a génkifejeződés és a keletkezett celluláz enzimek alapján egyaránt (9. ábra). Noha a D-glükóz és [ekvimoláris D-galaktóz + D-glükóz] limitált kemosztát tenyészetek, továbbá karbon katabolit represszió-függő (*cbh2*) illetve független (*cbh1*) celluláz gének kifejeződésének összehasonlításával bebizonyítottuk, hogy a *cbh2* kifejeződés D-galaktózon specifikus indukció következménye, nyilvánvalóvá vált: a laktóz illetve a D-galaktóz által kiváltott celluláz indukciók mértékében mutatkozó hatalmas különbség magában a laktózban, és nem a két monomerjében keresendő.

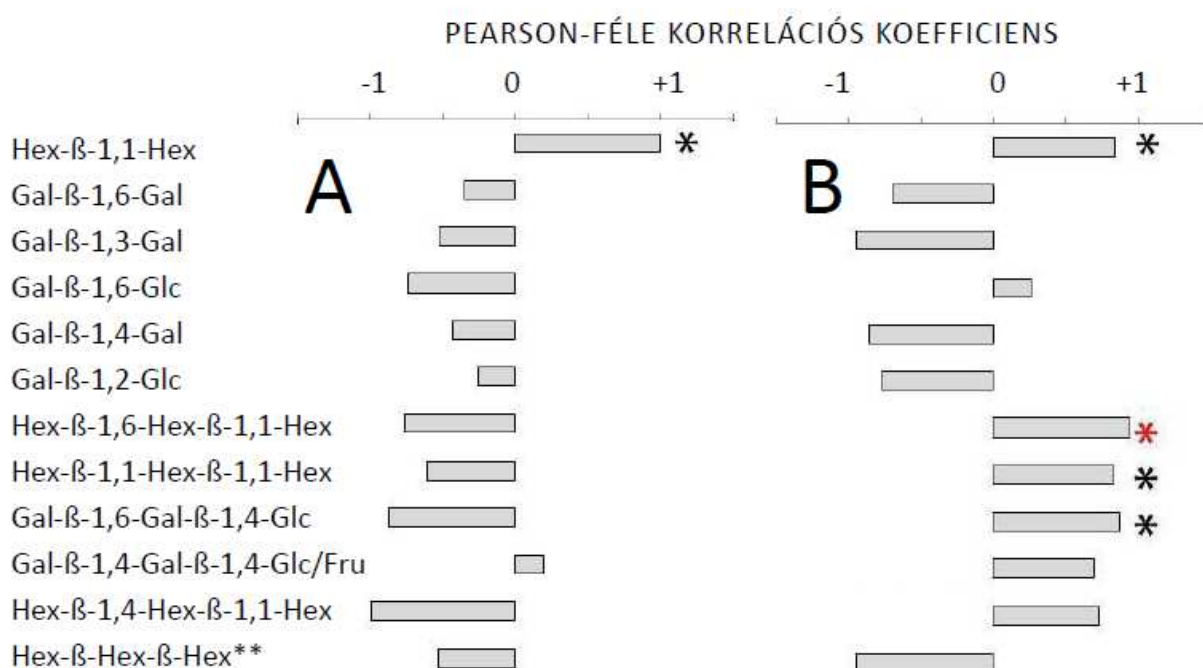


9. ábra. CBH I és CBH II fehérjék képződésének vizsgálata Western-blot analízissel *T. reesei* kemosztát-típusú folytonos tenyészeiben, a hígítási (= specifikus növekedési) ráta függvényében. Lac: laktóz, Gal: D-galaktóz, Glu: D-glükóz, D: hígítási ráta.

18) A szénforrásként adagolt D-galaktóz a mutarotáció miatt az α - és a β -anomerek elegye, míg a laktózból felszabaduló galaktopiranozil monomer kizárólag β -

anomerekből áll. Megállapítottuk, hogy a β -D-galaktóz – α -D-galaktóz anomerek közti átalakulást katalizáló mutarotáz aktivitás a *T. reesei* gombából hiányzik. Ezen tényt alapul véve, gain-of-function *T. reesei* mutarotáz mutánsok létrehozásával bebizonyítottuk, hogy az α -D-galaktóz kialakulása a vad típusú *T. reesei*-ben csak spontán mutarotáció révén mehet végbe, ami lecsökkenti a D-galaktóz foszforilezés intenzitását, ez pedig hatással van a gomba laktóz fenotípusára, ideértve a fokozott celluláz termelést is. Demonstráltuk, hogy a mutarotáz hatása specifikus a laktózra: a szintén celluláz induktor cellulózon nem mutatható ki. Eredményeink a mutarotációt és a mutarotáz enzimeket illetve géneket potenciális célpontként jelölik ki a *T. reesei* törzsfeljesztő programok számára.

19) A tényleges celluláz induktorról a **18) tézispont** alapján feltételezhető, hogy β -D-galaktóz monomert tartalmazó vegyület. A hipotézis bizonyítására közvetlen metabolomikai megközelítést alkalmaztunk: *T. reesei* törzsek intracelluláris galakto-oligoszacharidjainak (galakto-glycom) minőségi illetve mennyiségi elemzése során azonosítottunk egy potenciális induktort. A vegyület 2 db hexózból felépülő, β -(1-1) glikozidos kötést tartalmazó diszacharid (**10. ábra**), melynek koncentrációja széles tartományban jól korrelál a *T. reesei* ipari törzsek illetve mutánsok celluláz termelő képességével, és kizárólag laktóz szénforráson keletkezik.



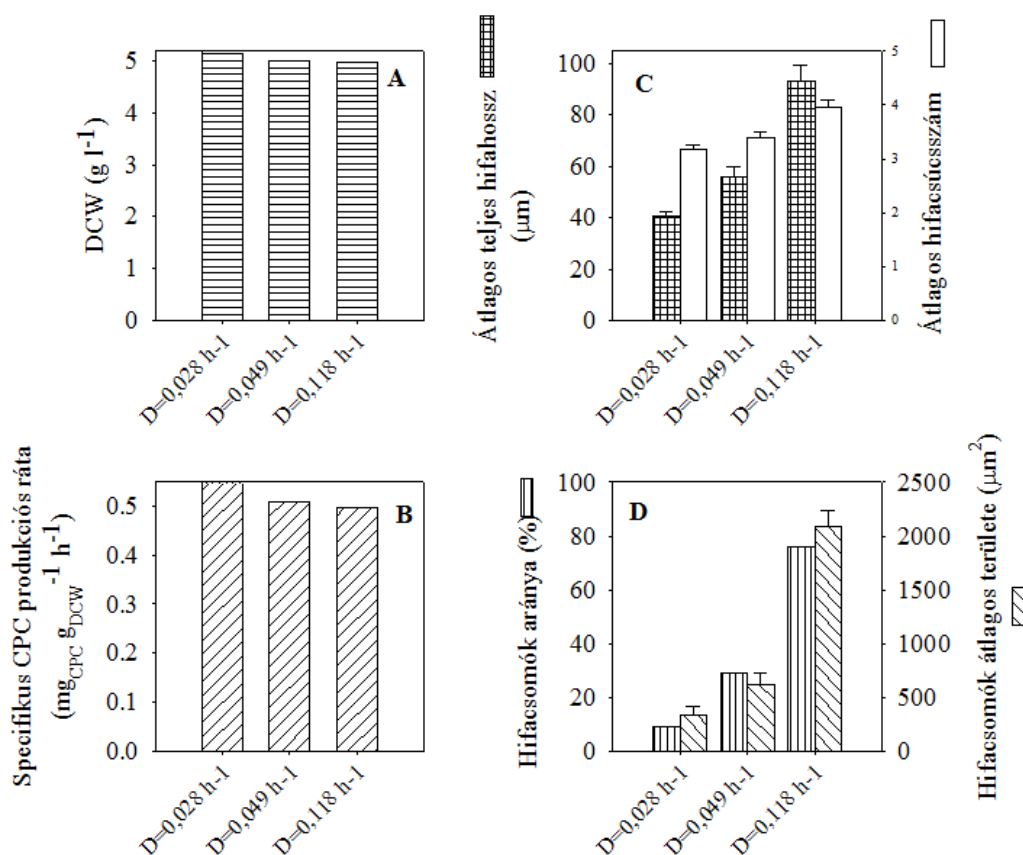
10. ábra. Korreláció a celluláz produkció és az egyes oligoszacharidok felhalmozódása (koncentrációja) között *T. reesei* túltermelő törzsekben (A) és D-galaktóz lebontásban sérült mutánsokban (B).

* Pearson-féle koeficiens (fekete csillag: $p < 0,1$; vörös csillag: $p < 0,05$).

** A glikozidos kötés típusa nem volt megállapítható.

Számos fonalgomba esetén megfigyelhető (sőt, jellemző) a vegetatív fejlődési forma kettős morfológiája: a tenyészet lekerekedett, élesztőszerű, illetve a sejt szélességéhez viszonyítva hosszú, elágazó, fonalas megjelenést mutat [13]. A két fejlődési forma a cephalosporin-C (CPC) antibiotikumot túltermelni képes *A. chrysogenum* süllyesztett tenyészeiben is megfigyelhető [14]. A sejtek élettani állapotának változ(tat)ásával arányuk szélsőségesen eltérhet: a növekedési szakaszban a sejtek teljesen fonalas, az idiofázisban kizárólag lekerekedett, fragmentált képet mutatnak. A CPC termelésének morfológiai vonatkozásai ezért klasszikus, de részleteiben máig nem ismert kérdések.

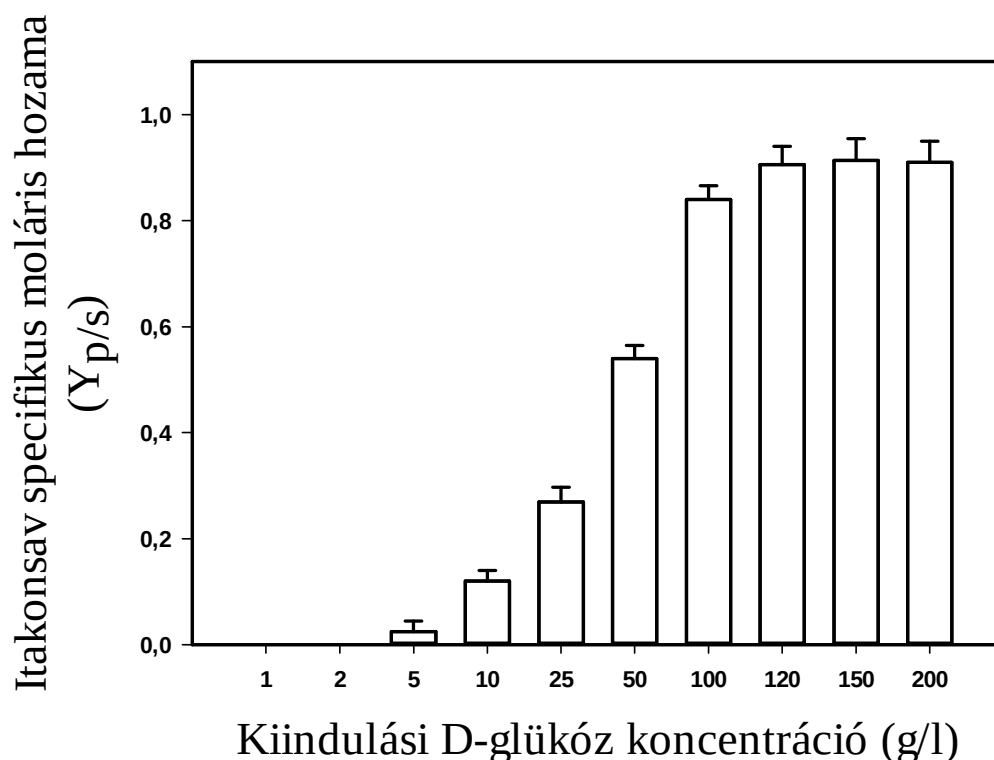
20) Ipari körülményeket szimuláló fermentációk révén megállapítottuk: noha fed-batch és batch tenyészetekben úgy tűnhet, hogy az *A. chrysogenum* morfológiája és CPC produktivitása összefüggésben áll egymással, ez csupán azért van így, mert mindkét folyamat egyidejűleg ugyanazon fiziológiai változásokra reagál a szénforrás limitált elérhetőségének függvényében. Szénforrás ráadagolásakor ez a virtuális kapcsolat megszűnik. Munkahipotézisünket szénforrás-limitált kemosztát tenyészetek vizsgálatával támasztottuk alá (**11. ábra**): a CPC produkciót minimálisan befolyásolta a specifikus növekedési ráta megváltoztatása, szemben a morfológiára kifejtett jelentős hatással. A CPC termelés illetve a növekedés tehát egymástól független folyamatok. Megállapítottuk továbbá: 0,4 – 40 g/l közötti biomassa koncentráció értékeknél az *A. chrysogenum* CPC produkciója lineárisan változik a sejtkoncentrációval és az arra vonatkozó hozamkonstans értékekkel.



11. ábra. *A. chrysogenum* D-glükóz limitált kemosztát tenyészeinek élettani paraméterei.

Az *A. terreus* által termelt itakonsav (IA) bioszintézise a citromsavéval megegyező biokémiai útvonalakon történik, de tartalmaz egy további enzimet, a *cis*-akonitát dekarboxilázt [15]. Mindkét bioszintézis a primer anyagcsere túltermelődésklasszikus példája, de az IA jóval kevésbé ismert és tanulmányozott. A hasonlóságok ellenére az IA fermentációk végső titere illetve szénforrásra számított hozama jóval alatta marad a citromsavénak, melyet közel 200 g/l végkoncentráció és 95 %-ot elérő hozamkonstans mellett gyártanak ipari fermentációs úton [16]. A citromsav fermentációs technológia kritikus része a Mn(II) ionok koncentrációjának extrém limitálása, illetve a gyorsan hasznosuló szénforrás (biokémiai szempontból D-glükóz) magas koncentrációja.

21) Ipari körülményeket szimuláló *A. terreus* fermentációk révén bizonyítottuk, hogy IA-at is lehet a citromsavéhoz hasonló magas hozam mellett termeltetni, ha két kritikus fermentációs paramétert: a gyorsan hasznosuló szénforrás D-glükóz illetve a Mn(II) ionok koncentrációját optimált értéken tartjuk. A szénforrás esetében ez az érték magas ($> 10\%$), a Mn(II) ionoknál extrém alacsony ($< 5\ \mu\text{g/l}$), még a standard csapvíz Mn(II) koncentrációjától is elmarad. Az elért maximális IA kihozatal 95,3 g/l, ami 87 %-os specifikus moláris hozamot, vagyis hatékony cukor-sav konverziót jelent. Megállapítottuk: technológiai szempontból nincsen szükség – a közelrokon *A. niger* platformon történő – heterológ IA termeltetésre, mivel *A. terreus* törzsekkel is el lehet érni az elméleti maximumot megközelítő kihozatalt (**12. ábra**).

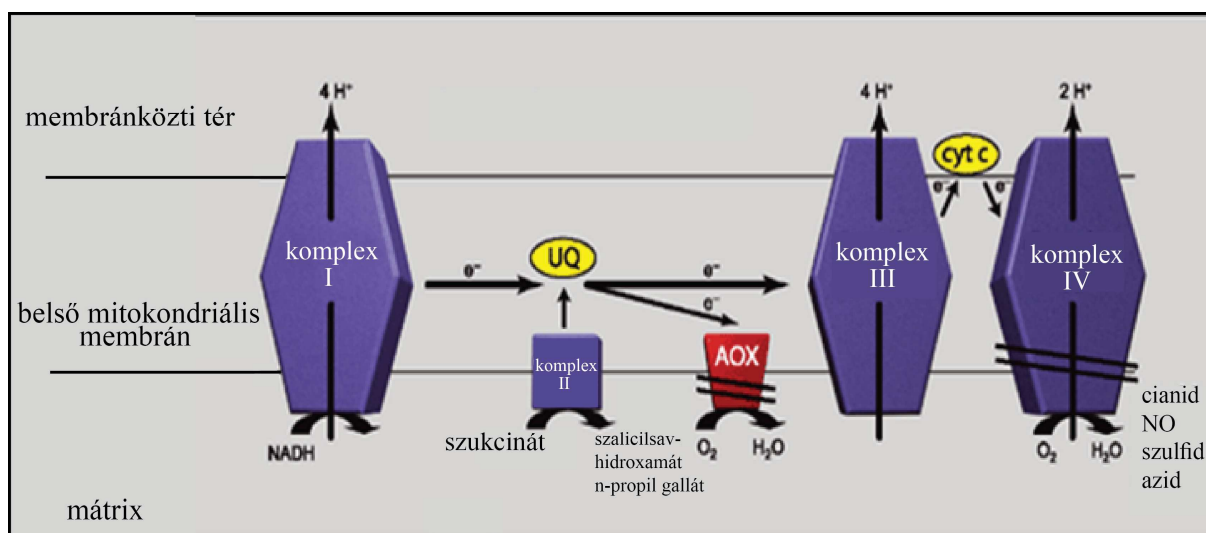


12. ábra. Az itakonsav képződés specifikus moláris hozama a kiindulási D-glükóz koncentráció függvényében, Mn(II) ion limitált *A. terreus* NRRL 1960 tenyészetekben.

Stacioner szénváz asszimiláció: a cianid-rezisztens alternatív légzés szabályozása *Acremonium chrysogenum*-ban

A szénforrás asszimiláció eredményeként keletkező ATP allosztérikusan gátolja a lebontó anyagcsere enzimeit. Metabolit túltermelés során, a stacioner fázisban ezért a szénváz lebontását és az ATP szintézisét szét kell kapcsolni; ezt az élettani feladatot a mitokondriális cianid-rezisztens alternatív légzés látja el (13. ábra).

22) Az *A. chrysogenum* cianid-rezisztens alternatív légzésének aktivitása erősen függ a fermentlé oldott oxigén szintjétől. Bebizonyítottuk, hogy a jelenség hátterében olyan élettani folyamatok állnak, melyek vagy közvetlenül intracelluláris peroxid képződéshez vezetnek, vagy a mitokondriális légzési lánc – peroxidok képződéshez vezető – telítettségét (redukciós szintjét) emelik. Az alternatív légzés fokozódása ugyanis hatékonyan csökkenti a légzési lánc redukáltságát és az oxigén szabadgyökök képződéshez vezető redukciójának lehetőségét. Ezen modell alapján tehát a cianid-rezisztens alternatív légzés eredendően védelmi funkciót tölthet be; szerepe a (fungális) metabolit túltermelés során ettől függetlenül esszenciális [16].



13. ábra*: A cianid-rezisztens alternatív oxidáz (AOX) elhelyezkedése a mitokondrium belső membránjában. UQ: ubiquinon; cyt c: citokróm C.

*McDonald AE, Vanlerberghe GC, Staples JF (2009): J. Exp. Biol. 212: 2627-2634 alapján.

HIVATKOZÁSOK

- 1) Seiboth B, Pakdaman BS, Hartl L, Kubicek CP (2007): Lactose metabolism in filamentous fungi: how to deal with an unknown substrate. *Fung. Biol. Rev.* **21**: 42-48.
- 2) Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B (2009): The Carbohydrate-Active enZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Res.* **37**: D233-238.
- 3) Fantes PA, Roberts CF (1973): β -Galactosidase activity and lactose utilization in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* **77**: 471-486.
- 4) Paszewski A, Chojnacki T, Litwińska J, Gajewski W (1970): Regulation of lactose utilization in *Aspergillus nidulans*. *Acta Biochim. Pol.* **17**: 385-391.
- 5) Roberts CF (1963): The genetic analysis of carbohydrate utilization in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* **31**: 45-58.
- 6) Wortman JR, Gilsenan JM, Joardar V, Deegan J, Clutterbuck J, Andersen MR, Archer D, Bencina M, Braus G, Coutinho P, von Döhren H, Doonan J, Driessen AJ, Durek P, Espeso E, Fekete E, Flippin M, Estrada CG, Geysens S, Goldman G, de Groot PW, Hansen K, Harris SD, Heinekamp T, Helmstaedt K, Henrissat B, Hofmann G, Homan T, Horio T, Horiuchi H, James S, Jones M, Karaffa L, Karányi Z, Kato M, Keller N, Kelly DE, Kiel JA, Kim JM, van der Klei IJ, Klis FM, Kovalchuk A, Krasevec N, Kubicek CP, Liu B, Maccabe A, Meyer V, Mirabito P, Miskei M, Mos M, Mullins J, Nelson DR, Nielsen J, Oakley BR, Osmani SA, Pakula T, Paszewski A, Paulsen I, Pilsyk S, Pócsi I, Punt PJ, Ram AF, Ren Q, Robellet X, Robson G, Seiboth B, van Solingen P, Specht T, Sun J, Taheri-Talesh N, Takeshita N, Ussery D, van Kuyk PA, Visser H, van de Vondervoort PJ, de Vries RP, Walton J, Xiang X, Xiong Y, Zeng AP, Brandt BW, Cornell MJ, van den Hondel CA, Visser J, Oliver SG, Turner G (2009): The 2008 update of the *Aspergillus nidulans* genome annotation: a community effort. *Fungal Genet. Biol.* **46**: S2-S13.
- 7) Seiboth B, Hartl L, Salovuori N, Lanthaler K, Robson GD, Vehmaanperä J, Penttilä ME, Kubicek CP (2005): Role of the *bga1*-encoded extracellular beta-galactosidase of *Hypocrea jecorina* in cellulase induction by lactose. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 851-857.
- 8) Pauly M, Keegstra K (2010): Plant cell wall polymers as precursors for biofuels. *Curr. Opin. Plant Biol.* **13**: 305-312.
- 9) Elshafei AM, Abdel-Fatah OM (2001): Evidence for a non-phosphorylated route of galactose breakdown in cell-free extracts of *Aspergillus niger*. *Enzyme Microb. Technol.* **29**: 76-83.
- 10) Weber SS, Bovenberg RA, Driessen AJ (2012): Biosynthetic concepts for the production of beta-lactam antibiotics in *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol. J.* **7**: 225-236.
- 11) Sakamoto T, Ishimaru M (2013): Peculiarities and applications of galactanolytic enzymes that act on type I and II arabinogalactans. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**: 5201-5213.
- 12) Novick A, Szilárd L (1950): Experiments with the Chemostat on spontaneous mutations of bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **36**: 708-719.
- 13) Nash CH, Huber FM (1971): Antibiotic synthesis and morphological differentiation of *Cephalosporium acremonium*. *Appl. Microbiol.* **22**: 6-10.
- 14) Stewart PR, Rogers PJ (1983): Fungal Dimorphism. In: *Fungal Differentiation* (Ed.: Smith JE) pp. 267-313. Marcel Dekker Inc., New York & Basel.
- 15) Steiger MG, Blumhoff ML, Mattanovich D, Sauer M (2013): Biochemistry of microbial itaconic acid production. *Front. Microbiol.* **4**: Art. No. 23.
- 16) Kubicek CP, Karaffa L (2010): Citric acid processes. In: *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology* (Michael C. Flickinger, ed.) 3: 1652-1658. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, N.J., USA.

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

- 1) Sándor E, Szentirmai A, Biró S, **Karaffa L** (1999): Specific cephalosporin C production of *Acremonium chrysogenum* is independent of the culture density. *Biotechnology Techniques*, 13: 443-445. Független idéző: 0 Függő idéző: 7
Összesen: 7

- 2) Sándor E, **Karaffa L**, Paul GC, Pócsi I, Thomas CR, Szentirmai A (2000): Assessment of the metabolic activity of *Acremonium chrysogenum* using Acridine Orange. *Biotechnology Letters*, 22: 693-697. Független idéző: 3 Függő idéző: 3
Összesen: 6

- 3) **Karaffa L**, Váczy K, Sándor E, Biró S, Szentirmai A, Pócsi I (2001): Cyanide-resistant alternative respiration is strictly correlated to intracellular peroxide levels in *Acremonium chrysogenum*. *Free Radical Research*, 34: 405-416. Független idéző: 11 Függő idéző: 10 Összesen: 21

- 4) Sándor E, Szentirmai A, Paul GC, Thomas CR, Pócsi I, **Karaffa L** (2001): Analysis of the relationship between growth, cephalosporin C production and fragmentation in *Acremonium chrysogenum*. *Canadian Journal of Microbiology*, 47: 801-806. Független idéző: 16 Függő idéző: 2 Összesen: 18

- 5) Seiboth B, **Karaffa L**, Sándor E, Kubicek CP (2002): The *Hypocrea jecorina gal10* (UDP-glucose 4-epimerase-encoding) gene differs from yeast homologues in sequence, genomic organization and expression. *Gene*, 295: 143-149. Független idéző: 12 Függő idéző: 8 Összesen: 20

- 6) Fekete E, **Karaffa L**, Sándor E, Seiboth B, Biró S, Szentirmai A, Kubicek CP (2002): Regulation of formation of the intracellular β -galactosidase activity of *Aspergillus nidulans*. *Archives of Microbiology*, 179: 7-14. Független idéző: 7 Függő idéző: 13 Összesen: 20

- 7) **Karaffa L**, Kubicek CP (2003): *Aspergillus niger* citric acid accumulation: do we understand this well-working black box? *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61: 189-196 (a review). Független idéző: 109 Függő idéző: 3
Összesen: 112

- 8) **Karaffa L**, Sándor E, Fekete E, Kozma J, Szentirmai A, Pócsi I (2003): Stimulation of the cyanide-resistant alternative respiratory pathway by oxygen in *Acremonium chrysogenum* correlates with the size of the intracellular peroxide

pool. *Canadian Journal of Microbiology*, 49: 216-220. Független idéző: 3 Függő idéző: 0 Összesen: 3

- 9) Fekete E, **Karaffa L**, Sándor E, Bányai I, Seiboth B, Gyémánt Gy, Sepsi A, Szentirmai A, Kubicek CP (2004): The alternative D-galactose degrading pathway of *Aspergillus nidulans* proceeds via L-sorbose. *Archives of Microbiology*, 181: 35-44. Független idéző: 20 Függő idéző: 19 Összesen: 39

- 10) Ilyés H, Fekete E, **Karaffa L**, Fekete É, Sándor E, Szentirmai A, Kubicek CP (2004): CreA-mediated carbon catabolite repression of β -galactosidase formation in *Aspergillus nidulans* is growth rate dependent. *FEMS Microbiology Letters*, 235: 147-151. Független idéző: 13 Függő idéző: 11 Összesen: 24

- 11) Seiboth B, Hartl L, Pail M, Fekete E, **Karaffa L**, Kubicek CP (2004): The galactokinase of *Hypocrea jecorina* is essential for cellulase induction by lactose but dispensable for growth on D-galactose. *Molecular Microbiology*, 51: 1015-1025. Független idéző: 38 Függő idéző: 21 Összesen: 59

- 12) **Karaffa L**, Fekete E, Gamauf C, Szentirmai A, Kubicek CP, Seiboth B (2006): D-galactose induces cellulase gene expression in *Hypocrea jecorina* at low growth rates. *Microbiology-SGM*, 152: 1507-1514. Független idéző: 34 Függő idéző: 12 Összesen: 46

- 13) Fekete E, **Karaffa L**, Kubicek CP, Szentirmai A, Seiboth B (2007): Induction of extracellular β -galactosidase (*Bga1*) formation by D-galactose in *Hypocrea jecorina* is mediated by galactitol. *Microbiology-SGM*, 153: 507-512. Független idéző: 8 Függő idéző: 3 Összesen: 11

- 14) Fekete E, Seiboth B, Kubicek CP, Szentirmai A, **Karaffa L** (2008): Lack of aldose-1 epimerase in *Hypocrea jecorina* (anamorph *Trichoderma reesei*): a key to cellulase gene expression on lactose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, 105: 7141-7146. Független idéző: 19 Függő idéző: 7 Összesen: 26

- 15) Fekete E, de Vries RP, Seiboth B, vanKuyk P, Sándor E, Fekete É, Metz B, Kubicek CP, **Karaffa L** (2012): D-galactose uptake is non-functional in the conidiospores of *Aspergillus niger*. *FEMS Microbiology Letters*, 329: 198-203. Független idéző: 4 Függő idéző: 3 Összesen: 7

- 16)** Fekete E, **Karaffa L**, Seiboth B, Fekete É, Kubicek CP, Flipphi M (2012): Identification of a permease gene involved in lactose utilisation in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology*, 49: 415–425. Független idéző: 6 Függő idéző: 3 Összesen: 9
- 17)** **Karaffa L**, Coulier L, Fekete E, Overkamp KM, Druzhinina IS, Mikus M, Seiboth B, Novák L, Punt PJ, Kubicek CP (2013): The intracellular galactoglycome in *Trichoderma reesei* during growth on lactose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97: 5447-5456. Független idéző: 5 Függő idéző: 4 Összesen: 9
- 18)** Jónás Á, Fekete E, Flipphi M, Sándor E, Jäger Sz, Molnár ÁP, Szentirmai A, **Karaffa L** (2014): Extra- and intracellular lactose catabolism in *Penicillium chrysogenum*: phylogenetic and expression analysis of the putative permease and hydrolase genes. *The Journal of Antibiotics*, 67: 489–497. Független idéző: 1 Függő idéző: 2 Összesen: 3
- 19)** Orosz A, Fekete E, Flipphi M, **Karaffa L** (2014): Metabolism of D-galactose is dispensable for the induction of the beta-galactosidase- (*bgaD*) and lactose permease (*lacpA*) genes in *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiology Letters*, 359: 19–25. Független idéző: 2 Függő idéző: 0 Összesen: 2
- 20)** **Karaffa L**, Diaz R, Papp B, Fekete E, Sándor E, Kubicek CP (2015): A deficiency of manganese ions in the presence of high sugar concentrations is the critical parameter for achieving high yields of itaconic acid by *Aspergillus terreus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99: 7937 – 7944. Független idéző: 1 Függő idéző: 0 Összesen: 1
- 21)** Fekete E, Orosz A, Kulcsár L, Kavalecz N, Flipphi M, **Karaffa L** (2016): Characterization of a second physiologically relevant lactose permease gene (*lacpB*) in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology-SGM*, 162: 837-847. Független idéző: 0 Függő idéző: 0 Összesen: 0
- 22)** Jónás Á, Fekete E, Németh Z, Flipphi M, **Karaffa L** (2016): D-Galactose catabolism in *Penicillium chrysogenum*: expression analysis of the structural genes of the Leloir pathway. *Acta Biologica Hungarica*, 67: 318-332. Független idéző: 0 Függő idéző: 0 Összesen: 0

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények összesített impakt faktora: 58,220

**A DOLGOZAT TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ TOVÁBBI
KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA AZ EGYETEMI DOKTORI (PHD)
FOKOZAT MEGSZERZÉSE (1997) ÓTA**

- 1) Sándor E, Pusztahelyi T, **Karaffa L**, Karányi Zs, Pócsi I, Biró S, Szentirmai A, Pócsi I (1998): Allosamidin inhibits the fragmentation of *Acremonium chrysogenum* but does not influence the cephalosporin C production of fungus. *FEMS Microbiology Letters*, 164: 231-236. Független idéző: 24 Függő idéző: 16 Összesen: 40

- 2) **Karaffa L**, Sándor E, Kozma J, Kubicek CP, Szentirmai A (1999): The role of the alternative respiratory pathway in the stimulation of cephalosporin C formation by soybean oil in *Acremonium chrysogenum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51: 633-638. Független idéző: 19 Függő idéző: 5 Összesen: 24

- 3) **Karaffa L**, Sándor E, Fekete E, Szentirmai A (2001): The biochemistry of citric acid accumulation by *Aspergillus niger*. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 48: 429-441. Független idéző: 21 Függő idéző: 0 Összesen: 21

- 4) Sándor E, Fekete E, **Karaffa L** (2003): Regulation of the cyanide-resistant alternative respiratory pathway in the fungus *Acremonium chrysogenum*. *Food Technology and Biotechnology*, 41: 43-47. Független idéző: 3 Függő idéző: 0 Összesen: 3

- 5) Sámi L, **Karaffa L**, Emri T, Pócsi I (2003): Autolysis and ageing of *Penicillium chrysogenum* cultures under carbon starvation: respiration and glucose oxidase production. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 50: 67-76 Független idéző: 5 Függő idéző: 4 Összesen: 9

- 6) Seidl V, Seiboth B, **Karaffa L**, Kubicek CP (2004): The fungal STRE-element-binding protein Seb1 is involved but not essential for glycerol dehydrogenase (*gld1*) gene expression and glycerol accumulation in *Trichoderma atroviride* during osmotic stress. *Fungal Genetics and Biology*, 41: 1132-1140. Független idéző: 19 Függő idéző: 14 Összesen: 33

- 7) Flipphi M, Sun J, Robellet X, **Karaffa L**, Fekete E, Zeng AP, Kubicek CP (2009): Biodiversity and evolution of primary carbon metabolism in *Aspergillus nidulans* and other *Aspergillus spp.* *Fungal Genetics and Biology*, 46: S19-S44. Független idéző: 40 Függő idéző: 6 Összesen: 46

- 8) Wortman JR, Gilsenan JM, Joardar V, Deegan J, Clutterbuck J, Andersen MR, Archer D, Bencina M, Braus G, Coutinho P, Döhren HV, Doonan J, Driessen AJM, Durek P, Espeso E, Fekete E, Flippin M, Estrada CG, Geysens S, Goldman G, De Groot PWJ, Hansen K, Harris SD, Heinekamp T, Helmstaedt K, Henrissat B, Hofmann G, Homan T, Horio T, Horiuchi H, James S, Jones M, **Karaffa L**, Karányi Zs, Kato M, Keller N, Kelly DE, Kiel JAKW, Kim J-M, Van Der Klei IJ, Klis FM, Kovalchuk A, Kraševac N, Kubicek CP, Liu B, MacCabe A, Meyer V, Mirabito P, Miskei M, Mos M, Mullins J, Nelson DR, Nielsen J, Oakley BR, Osmani SA, Pakula T, Paszewski A, Paulsen I, Pilsyk S, Pócsi I, Punt PJ, Ram AFJ, Ren Q, Robellet X, Robson G, Seiboth B, Van Solingen P, Specht T, Sun J, Taheri-Talesh N, Takeshita N, Ussery D, Vankuyk PA, Visser H, Van De Vondervoort PJI, de Vries RP, Walton J, Xiang X, Xiong Y, Zeng AP, Brandt BW, Cornell M, Van Den Hondel CAMJJ, Visser J, Oliver SG, Turner G (2009): The 2008 update of the *Aspergillus nidulans* genome annotation: a community effort. *Fungal Genetics and Biology*, 46: S2-S13. Független idéző: 32 Függő idéző: 22 Összesen: 54

- 9) Portnoy T, Margeot A, Linke R, Atanasova L, Fekete E, Sándor E, Hartl L, **Karaffa L**, Druzhinina IS, Seiboth B, Le Crom S, Kubicek CP (2011): The CRE1 carbon catabolite repressor of the fungus *Trichoderma reesei*: a master regulator of carbon assimilation. *BMC Genomics*, 12: 269. Független idéző: 44 Függő idéző: 13 Összesen: 57

- 10) Fekete E, **Karaffa L**, Karimi Aghcheh R, Németh Z, Fekete É, Orosz A, Paholcsek M, Stágel A, Kubicek CP (2014): The transcriptome of *lae1* mutants of *Trichoderma reesei* cultivated at constant growth rates reveals new targets of LAE1 function. *BMC Genomics*, 15: Art. No. 447. Független idéző: 4 Függő idéző: 2 Összesen: 6

- 11) Karimi Aghcheh R, Németh Z, Atanasova L, Fekete E, Paholcsek M, Sándor E, Aquino B, Druzhinina IS, **Karaffa L**, Kubicek CP (2014): The VELVET A orthologue VEL1 of *Trichoderma reesei* regulates fungal development and is essential for cellulase gene expression. *PLoS One*, 9: e112799. Független idéző: 8 Függő idéző: 2 Összesen: 10

TUDOMÁNYOS MÉRŐSZÁMOK

Tudományos <i>in extenso</i> közlemények száma:	55
Magyar nyelven:	3
Angol nyelven:	52
 Első szerzős közlemények száma:	11
Utolsó szerzős közlemények száma:	16
Sokszerzős közlemények száma:	2
 <i>In extenso</i> közlemények összesített impakt faktora:	108,406
Ebből első/utolsó szerzős közlemény:	46,040
 Konferenciaközlemények száma:	6
Könyvfejezetek száma:	3
Egyetemi jegyzetek száma:	2
 Összes közlemény idézettsége:	1117
Független idézők száma:	773
Függő idézők száma:	344
Hirsch (h-)-index:	20