

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

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



KARAFFA LEVENTE

Debreceni Egyetem

Természettudományi és Technológiai Kar

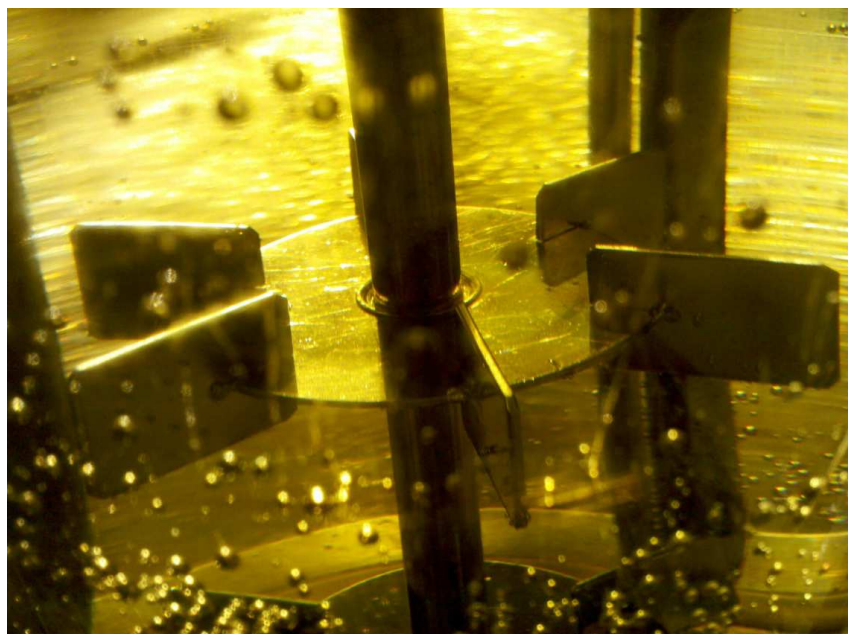
Biomérnöki Tanszék

2016

TARTALOMJEGYZÉK

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	4
AZ ÉRTEKEZÉSBEN HASZNÁLT RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
ELŐSZÓ	6
1. BEVEZETÉS	7
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	8
2.1. A LAKTÓZ ÉS GALAKTÓZ BIOLÓGIÁJA ÉS BIOTECHNOLÓGIÁJA	8
2.1.1. A laktóz (tejcukor) humán élettani vonatkozásai	8
2.1.2. A laktóz gazdasági-technológiai jelentősége.....	10
2.1.3. A mikrobiális laktóz anyagcsere szabályozása	14
2.1.4. A D-galaktóz előfordulása a természetben	18
2.1.5. A D-galaktóz anyagcsere Leloir útvonala	19
2.1.6. A D-galaktóz anyagcsere alternatív útvonalai.....	21
2.1.7. A D-galaktóz patobiokémiája.....	22
2.2. A KARBON KATABOLIT REPRESSZIÓ	23
2.3. A CIANID-REZISZTENS ALTERNATÍV LÉGZÉS	26
3. CÉLKITŰZÉSEK	28
4. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK.....	29
4.1. A SZÉNFORRÁS FELVÉTELÉNEK VIZSGÁLATA FONALAS GOMBÁKBAN	29
4.1.1. A laktóz felvétel és hidrolízis vizsgálata <i>Aspergillus nidulans</i> -ban.....	29
4.1.1.1. Laktóz permeáz/ β -galaktozidáz génklaszter azonosítása.....	29
4.1.1.2. A <i>lacpB</i> gén azonosítása és jellemzése.....	47
4.1.2. A D-galaktóz lebontás oxido-reduktív útvonala <i>Aspergillus nidulans</i> -ban	54
4.1.3. Az oxido-reduktív útvonal szerepe <i>Trichoderma reesei</i> -ben	67
4.1.4. A D-galaktóz felvétel és lebontás vizsgálata <i>Aspergillus niger</i> -ben.....	69
4.1.4.1. Új módszer a galaktokináz enzimaktivitás meghatározása	69
4.1.4.2. Élettani vizsgálatok.....	70
4.1.5. Laktóz és D-galaktóz anyagcsere <i>Penicillium chrysogenum</i> -ban.....	74
4.2. A SZÉNFORRÁS ÉS A SPECIFIKUS NÖVEKEDÉSI RÁTA ÖSSZEFÜGGÉSEI.....	86
4.2.1. A metabolikus aktivitás és a növekedési ráta kapcsolatának modellezése.....	86
4.2.2. A karbon katabolit represszió növekedési ráta-függése	89
4.2.3. A β -galaktozidáz expresszió növekedési ráta-függése <i>Trichoderma reesei</i> -ben	92
4.2.4. <i>Trichoderma reesei</i> cellulázok keletkezésének növekedési ráta-függése	94
4.3. A SZÉNFORRÁS SZEREPE METABOLITOK TÚLTERMELÉSÉBEN	98

4.3.1. Cellulázok indukciója <i>Trichoderma reesei</i> -ben	98
4.3.2. Cephalosporin C túltermelés <i>Acremonium chrysogenum</i> -ban	106
4.3.2.1. A sejtsűrűség hatása a cephalosporin C termelésére	113
4.4. TERMINÁLIS OXIDÁCIÓ: A SZÉNFORRÁS ASSZIMILÁCIÓ UTOLSÓ ÁLLOMÁSA	121
4.4.1. Az <i>Acremonium chrysogenum</i> alternatív légzésének szabályozása	121
5. ÖSSZEFOGLALÁS - ÚJ EREDMÉNYEK (TÉZISEK).....	130
6. IRODALMI HIVATKOZÁSOK	138
7. FÜGGELÉK	150
7.1. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	150
7.1.1. A dolgozatban szereplő gombatörzsek felsorolása és jellemzése	150
7.1.2. A kemosztát teória összefoglalása és technikai megvalósítása.....	152
7.1.3. Intracelluláris galakto-glycom izolálása <i>Trichoderma reesei</i> -ből	154
7.2. MELLÉKLETEK (KIEGÉSZÍTŐ ÁBRÁK ÉS TÁBLÁZATOK).....	155
8. AZ ÉRTEKEZÉSBEN SZEREPLŐ SAJÁT KÖZLEMÉNYEK	160
9. A DOLGOZAT TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ TOVÁBBI KÖZLEMÉNYEK AZ EGYETEMI DOKTORI (PHD) FOKOZAT MEGSZERZÉSE (1997) ÓTA.....	163
10. TUDOMÁNYOS MÉRŐSZÁMOK.....	165



Fermentor keverőlapátja (Fekete Zoltán felvétele)

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Nagyon szerencsésnek érzem magam, amiért az elmúlt huszonöt évben számos nagyszerű szakemberrel dolgozhattam együtt. Köszönetet mondok minden egyes kollégámnak, akiknek hozzájárulása nélkül nem, vagy csak nagyon lassan haladhattam volna előre tudományos munkámmal. Külön kiemelem **Fekete Erzsébet** docenst, akivel egyetemi hallgató kora óta együtt dolgozunk, s szinte minden szakmai eredményt együtt értünk el, illetve feleségemet, **Sándor Erzsébet Mónika** docenst, akivel együtt kezdtük mikrobiológus pályafutásunkat, és akit szakmai téren is társamnak tekinthetek. Köszönettel tartozom első mestereimnek: **Kozma József** tudományos főmunkatársnak (Richter Gedeon Vegyészeti Gyár NyRt.), és a debreceni biotechnológus iskolát megalapító **Szentirmai Attila** professzornak, amiért érdeklődésemet a fermentációs ipari jelentőségű fonalas gombák anyagcseréjének tanulmányozása felé terelték, valamint **Christian P. Kubicek** professzornak (Bécsi Műszaki Egyetem), amiért bevezetett a molekuláris biotechnológiába, és akinek tanácsaira, támogatására a mai napig számíthatok. Köszönöm a Debreceni Egyetem Biomérnöki Tanszék oktatóinak (**Németh Zoltán, Molnár Ákos**), munkatársainak (**Michel Flipphi, Papp Benedek, Fekete Zoltán**), doktoranduszainak (**Jónás Ágota, Orosz Anita, Ág Norbert, Kulcsár László, Mojtaba Assadollahi, Rafael Díaz**), szakdolgozó illetve diákkörös hallgatóinak, továbbá a hazai fermentációs ipar (TEVA, Richter, Chinoin, Xellia, Agroferm, Codexis, Zolend) kiváló szakembereinek a közös munkát, a sokirányú támogatást és az együtt eltöltött időt. Szeretném megemlíteni külföldi szakmai partnereimet (**Bernhard Seiboth, Verena Seidl, Lukas Hartl** – Technische Universität Wien, Ausztria; **Yair Aharonowitz, Gerald Cohen, Ilya Borovok** – Tel Aviv University, Izrael; **Colin R. Thomas, Gopal C. Paul** – The University of Birmingham, Anglia; **Ronald P. de Vries** – CBS, Utrecht, Hollandia; **Herbert Märkl, Martin Krahe** – Technische Universität Hamburg-Harburg, Németország; **Nancy P. Keller** – University of Wisconsin-Madison, WI, U.S.A.; **Claudio Scazzocchio** – Imperial College London, Anglia; **Gerhard H. Braus** – Georg-August-Universität Göttingen, Németország; **Axel A. Brakhage** – Hans-Knöll Institut, Jena, Németország; **Peter J. Punt** – TNO, Zeist, Hollandia), akiktől rengeteget tanultam és sok segítséget kaptam. Köszönöm **Fábián István** vegyészprofesszor, korábbi centrumelnök és rektor támogatását a debreceni biomérnöki műhely kialakításában. Köszönet illeti a kutatások anyagi háttérét biztosító hazai, külföldi és nemzetközi szervezeteket, alapítványokat, cégeket. És tűnjön esetleg közhelyesnek, de ettől még igaz: végtelenül hálás vagyok a családomnak türelmükért és támogatásukért.

AZ ÉRTEKEZÉSBEN HASZNÁLT RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AMM	<i>Aspergillus</i> <u>M</u> inimal <u>M</u> edium (standard <i>A. nidulans</i> táptalaj)
AMP/ADP/ATP	adenozin mono/di/trifoszfát
AOX:	alternatív oxidáz (enzim)
BLAST:	Basic Local Alignment Search Tool
bGal:	β-galaktozidáz (enzim illetve aktivitás)
bp:	bázispár
cAMP:	ciklikus adenozin-monofoszfát
CCR:	karbon katabolit represszió (<u>C</u> arbon <u>C</u> atabolite <u>R</u> epression)
CPC:	cephalosporin C (antibiotikum)
CTD:	C-terminális domén
Da:	Dalton
DO:	<u>D</u> issolved <u>O</u> xygen Tension (oldott oxigénszint)
EST:	<u>E</u> xpressed <u>S</u> equences <u>T</u> ag
gal-1-P:	D-galaktóz-1-foszfát
gal-1-P-UT	D-galaktóz-1-foszfát uridilil transzferáz
glü-1-P:	D-glükóz-1-foszfát
glü-6-P:	D-glükóz-6-foszfát
h:	óra (<u>h</u> our)
IA:	itakonsav (<u>i</u> taconic <u>a</u> cid)
K _a :	egyesített tömegátviteli koefficiens (1/idő)
M:	millió (10 ⁶)
MM:	minimál táptalaj (<u>M</u> inimal <u>M</u> edium)
MFS:	Major Facilitator Superfamily
NMR:	Nuclear Magnetic Resonance (mágneses rezonancia-spektroszkópia)
NTD:	N-terminális domén
ONPG:	<i>ortho</i> -nitrofenil-β-D-galaktopiranozid
ORF:	<u>O</u> pen <u>R</u> eadin <u>G</u> <u>F</u> rame (nyitott leolvasási keret)
PEP:	foszfo- <i>enol</i> -piroszölősav
PTS:	foszfo-transzferáz rendszer
SPF:	Sugar Porter Family
t:	tonna (10 ⁶ g)
UMP/UDP/UTP	uridin mono/di/trifoszfát
WT:	vad típusú törzs (<u>w</u> ild- <u>t</u> ype strain)
X-gal:	5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktopiranozid
Y _{p/s} :	Termékre vonatkoztatott hozamkonstans (Yield)
Y _{x/s} :	Biomasszára vonatkoztatott hozamkonstans (Yield)

ELŐSZÓ

Eddigi szakmai pályafutásom túlnyomó részében „fonalas gombák” élettanával, ezen belül szénanyagcseréjük működési mechanizmusaival, genetikai és fiziológiai szabályozásával, gyakorlati jelentőségével foglalkoztam. A szénforrás egyrészt a sejtek növekedését támogatja, másrészt az ipari fermentációs folyamat céltermékének bioszintéziséhez is szükséges. A két funkció egyféle szénforrás révén is megvalósulhat (pl. szerves savak előállítás), de ugyanaz a szénforrás a növekedésre illetve a termelésre részben eltérő vagy kifejezetten ellentétes hatású is lehet (pl. antibiotikumok képződése). A szénforrások metabolitok bioszintézisére gyakorolt hatása is változatos lehet: specifikus indukciót fejthetnek ki egy génre vagy egy bioszintetikus útvonalra, epigenetikus szabályozóként működhetnek, de a teljes genomra kiterjedő hatású (globális) anyagcsere-regulátorokat is módosíthatják. Mindezek miatt egy ipari fermentációs technológia megtervezése és irányítása nem képzelhető el a táptalajban lévő szénforrás(ok) asszimilációs mechanizmusainak ismerete nélkül.

Egy aerob mikrobiális sejt szárazanyag tartalmának 45-55 %-át a szénváz teszi ki. Ennek megfelelően egy tipikus mikrobiális táptalaj mennyiségének is legalább a felét, de gyakran még többet a szénforrások alkotják; az anyagi minőség szempontjából pedig széntartalmú szerves vegyületek százairól állapították meg, hogy jelenlétük a tápközegben előnyösen vagy hátrányosan befolyásolhat adott ipari biotechnológiai folyamatokat. A szénváz metabolizmus szerteágazó, és lényegében minden egyéb területtel kapcsolatban lévő aspektusa a mikrobiális élettannak, így teljes vertikumának akár csak érintőleges vizsgálatára nem törekedhettem. Ráadásul – ahogy az a természettudományban gyakorta előfordul – az eredmények számos új, egyelőre megválaszolatlan kérdést is felvetettek. Értekezésemet mégis abban a reményben készítettem el, hogy hozzájárulok a fungális szénforrás hasznosulás élettanáinak alaposabb megértéséhez, és a gyakorlati alkalmazások kiaknázásához.

1. BEVEZETÉS

A doktori értekezésemben részletesen tárgyalt eukarióta mikroorganizmusok a ma 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* illetve 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, egymáshoz viszont közelebb eső, a *Sordariomycetes* (szinoním: *Pyrenomycetes*, magyarul „mag-gombák”) osztály *Hypocreales* rend *Hypocreaceae* családjába tartozó két nemzetség (genus) tagjai.

Miért pont ezekben a gombafajokban vizsgáltuk a szénváz lebontás mechanizmusait? A válasznak nem filogenetikai, hanem gyakorlati okai vannak. Az *A. nidulans* a fonalas *Pezizomycotina* fajok egyik hagyományos modellje: a metabolizmusáról illetve genetikájáról rendelkezésre álló ismeretanyag, az alkalmazható molekuláris biológiai módszerek száma kimagasló. Az *A. nidulans*-on túl pedig – munkacsoportunk aktuális kutatási programjainak részeként – olyan *Pezizomycotina* fajokat vizsgáltunk, amelyeknél a szénváz hasznosításnak illetve a szénváz általi indukciós és repressziós folyamatoknak konkrét ipari biotechnológiai vonatkozásai vannak. A penicillin gyártás során a *P. chrysogenum* fermentációs szénforrása évtizedekig a laktóz (pontosabban a tejsavó) volt, míg a *T. reesei* celluláz és hemicelluláz enzimeket jelenleg is laktózon termelik. Az *A. chrysogenum* cephalosporin-C antibiotikum bioszintézise során a szénváz lebontás utolsó szakasza, a terminális oxidáció kritikus jelentőségű, az *A. niger* esetében pedig a D-galaktóz hasznosítás hiányának van gyakorlati jelentősége, mivel gyengíti a faj növényi biomassza lebontó képességét. Az *A. terreus* itakonsav fermentációja során a szénforrás minősége és mennyisége egyaránt kritikus.

Értekezésemben először a laktóz illetve egyik monomerje, a D-galaktóz felvételével (transzportjával) kapcsolatos vizsgálatainkat elemzem. Utána a D-galaktóz citoplazmatikus lebontásának munkacsoportunk által felfedezett tulajdonságait mutatom be, majd rátérek a szénforrás és a gombatenyésztet specifikus növekedési rátája közti kapcsolatok jellemzésére. A szénforrás indukciós illetve repressziós folyamatokban betöltött szerepét a cellulázok és a cephalosporin-C, koncentrációjának jelentőségét az itakonsav példáján szemléltetem. Végül a szénforrás asszimiláció utolsó állomásának, a terminális oxidációnak a működését mutatom be, külön is kiemelve a cianid-rezisztens alternatív légzés szabályozásának az intracelluláris szabadgyökök képződésén keresztül megvalósuló mechanizmusait.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A fejezetben az értekezésem szempontjából legjelentősebb fermentációs szénforrást, a laktózt, továbbá a szénforrás lebontást szabályozó élettani-molekuláris mechanizmusokat mutatom be, röviden kitérve a történeti illetve a nem-mikrobiális aspektusokra is.

2.1. A LAKTÓZ ÉS GALAKTÓZ BIOLÓGIÁJA ÉS BIOTECHNOLÓGIÁJA

2.1.1. A laktóz (tejcukor) humán élettani vonatkozásai

Noha a tejtermékeket évezredek óta előállító és fogyasztó emberiség vélhetően régebb óta ismerte, a laktóz első írásos említése a Bolognai Egyetem tudós orvosa, Fabrizio Bartoletti (1576 – 1630) 1628-ban írt, de csak halála után megjelent könyvében olvasható (BARTOLETTI 1633). „... ez a tejsavó édes része. Óvatosan melegítsük a tejsavót egy vízfürdőn, amíg só hozzáadását követően egy fehéres anyag ki nem ülepszik az edény alján. Ez a különös anyag a tejsavó esszenciája, amiben az összes életerő egyesül. Oldjuk fel újra a savóban, majd csapjuk ki, és ezt addig ismételjük, amíg már csak az édes ízt érezzük...”. Néhány évtizeddel később a velencei gyógyszerész, Lodovico Testi (1640 – 1707) az ízületi gyulladások ellen ajánlotta a tejcukrot (*saccharum lactis*), amit a lipcsei Michael Ettmüllernek (1644 – 1686) a tejsavó párologtatását követő kristályosítással sikerült izolálnia. A gyógyászaton kívüli tudományos életbe a laktóz a svéd kémikus, Carl Wilhelm Scheele (1742 – 1786) publikációi révén került be (SCHEELE 1780a, b). Heinrich Vogel (1778-1867) 1812-ben állapította meg, hogy a laktóz hidrolízise glükózt eredményez (VOGEL 1812a, b). A laktóz másik hidrolízis-termékét, a Marcellin Berthelot (1824–1907) által galaktóznak¹ elnevezett cukrot Louis Pasteur (1822 – 1895) kristályosította és jellemezte (PASTEUR 1856). A laktóz diszacharid két monomerjének konfigurációját Emil Fischer (1852 – 1919) határozta meg (FISCHER és MORRELL 1894).

Jelenlegi ismereteink szerint a laktóz (β -D-galaktopiranozil-(1 $\rightarrow$ 4)-D-glükopiranoz) természetes körülmények között kizárólag a méhlepényes emlősök tejében fordul elő, ahol viszont karakteres jellemzőnek számít². A korábbi szakirodalom beszámolt egyes növények (*Forsythia* sps., *Achras zapota*, *Zizyphus jujuba*) laktóz tartalmáról is, de a korszerű analitikai módszerek sorra megcáfolták ezeket a megfigyeléseket (TOBA és mtsai 1991).

A laktóz az emlőmirigyek sejtszövetében keletkezik; fajtól függően a tej energiatartalmának 30-50, tömegének 2-8 százalékát teszi ki. Átlagos mennyisége az emberi tejben 70 g/l (VESA és mtsai 2000). A szintéziséhez szükséges D-galaktóz (a D-glükóz C-4 epimerje) a D-glükóz

¹ Laktóz és galaktóz egyaránt tejcukrot jelent, az előbbi a tej latin ('lac'), utóbbi görög ('gáaktos') neve alapján.

² Kivételt a medvefókák és a tengeri oroszlánok családjának (*Otariidae*) fajtái képeznek, melyek az α -laktalbumint kódoló gén mutációja miatt elvesztették a laktóz előállítás képességét.

epimerizációjával keletkezik (hexoneogenezis), illetve a vérplazmából szívódik fel. A kétféle eredet aránya kb. 1 : 2, amit az élettani körülmények jelentősen befolyásolhatnak.

A releváns hormonok koncentráció változását (progeszteron csökkenés, prolaktin emelkedés) követően a durva felszínű endoplazmatikus retikulum felszínén α -laktalbumin fehérje képződik, ami a Golgi-apparátusba transzportálódik. A szintén a Golgi-ban lévő β -1,4-galaktoziltranszferáz-1 enzim UDP-galaktózt köt meg, aminek következtében konformáció változáson esik át, és képes lesz kapcsolódni az α -laktalbuminnal. A két fehérje kötődése után a β -1,4-galaktoziltranszferáz-1 szubsztrátum specificitása megváltozik: N-acetil glükózamin helyett D-glükózt köt (RAMAKRISHNAN és mtsai 2001). A D-glükóz reakcióba lép az UDP-aktiválta galaktózzal, létrehozva a laktózt³. A felhalmozódó laktóz ozmotikusan aktív, vizet vonz a Golgi-apparátusba, melynek komplex tartalma (kazeinek, α -laktalbumin, ionok, stb.) vezikulákba csomagolva jut el a szekretórikus sejtek csúcsához (SHENNAN és PEAKER 2000). Ozmotikus aktivitása miatt a laktóz a keletkező tej mennyiségének szabályozója. Mivel a laktóz szintézis igénye időszakos – akkor viszont jelentős –, a laktóz szintetáz alegységeit kódoló gének két transzkripciós indítóhellyel rendelkeznek; az első gyenge, konstitutív expressziót tesz lehetővé, míg a másodikhoz tartozó promóter indukálható és erős, az innen átíródó mRNS translációja is hatékonyabb (SHAPER és mtsai 1998). A laktóz bioszintézis szűk keresztmetszete a D-glükóz transzportja a véráramból az emlőmirigyek sejteibe (ZHAO 2014). Hiányos táplálkozás mellett a laktáció lerövidül, szélsőséges esetben el is maradhat.

Miért van szükség a tejben egy máshol elő nem forduló cukorfajtára? Ozmotikusan a laktóz kevésbé aktív, mint más mono- vagy diszacharidok, így az ozmotikus aktivitás/energia tartalom aránya itt a legkedvezőbb (MUSTAPHA és mtsai 1997). Vízoldékonysága alacsonyabb, mint a többi mono- és diszacharidé, ami tejbeli koncentrációjának szabályozását könnyíti meg (VENEMA 2012). Hidrolízisét követően felszabaduló glükóztartalma azonnali energiabevitelt jelent az újszülöttnak, míg a D-galaktóz az idegrendszer fejlődéséhez nélkülözhetetlen (ADAM és mtsai 2004). Létfontosságú az újszülöttek immunitásában is. Az Antimikrobiális Fehérjék (Antimicrobial Peptides, AMPs) esszenciálisak a gasztro-intesztinális fertőzések leküzdésében és a bélrendszer mikrobiontájának kialakulásában. Emlősökben az egyik legfontosabb AMP család a katehelicidinek, melyek egyetlen ismert humán homológja az LL-37 jelű fehérje. A fehérjét kódoló gén laktóz illetve equimoláris mennyiségű D-glükóz és D-galaktóz elegyének jelenlétében nagyon erősen indukálódik, vagyis a tejcukor hozzájárul az újszülöttek gyomor- és bélrendszerének védelméhez is (CEDERLUND és mtsai 2013).

³ Az α -laktalbumin és a β -1,4-galaktoziltranszferáz-1 enzimeket a laktóz szintetáz komplex „A” és „B” alegységének is nevezik.

A laktóz a köznapi életben legtöbbször a laktóz intolerancia (hipolaktázia) kapcsán kerül szóba, ami a laktóz hidrolízis képességének hiányát jelenti, és nem keverendő össze a tejérzékenységgel, melyet a köznyelvben tévesen laktózérzékenységnek is neveznek. Jellemző oka a laktózt hidrolizáló β -galaktozidáz (laktáz) enzimet kódoló gén életkorral csökkenő, majd megszűnő expressziója. Ennek következményeként a sok laktózt tartalmazó táplálék fogyasztása után a tejcukor a belekben marad, az ottani baktériumflórát táplálva. Az anaerob laktózlebontás gázképződéssel jár (bélpuffadás, hasgörcs), az ozmotikusan aktív laktóz pedig vizet köt meg, megnövelve a vastagbél víztartalmát (hasmenés). A szindrómák a felnőtt lakosság kb. negyedénél – jelentős földrajzi eltérésekkel – nem jelentkeznek. Az un. laktóz perzisztencia a konvergens evolúció ismert példája, kialakulását döntően a populáció életmódja, és a tejfogyasztás ebből következő mértéke határozza meg (GAUBA 2015).

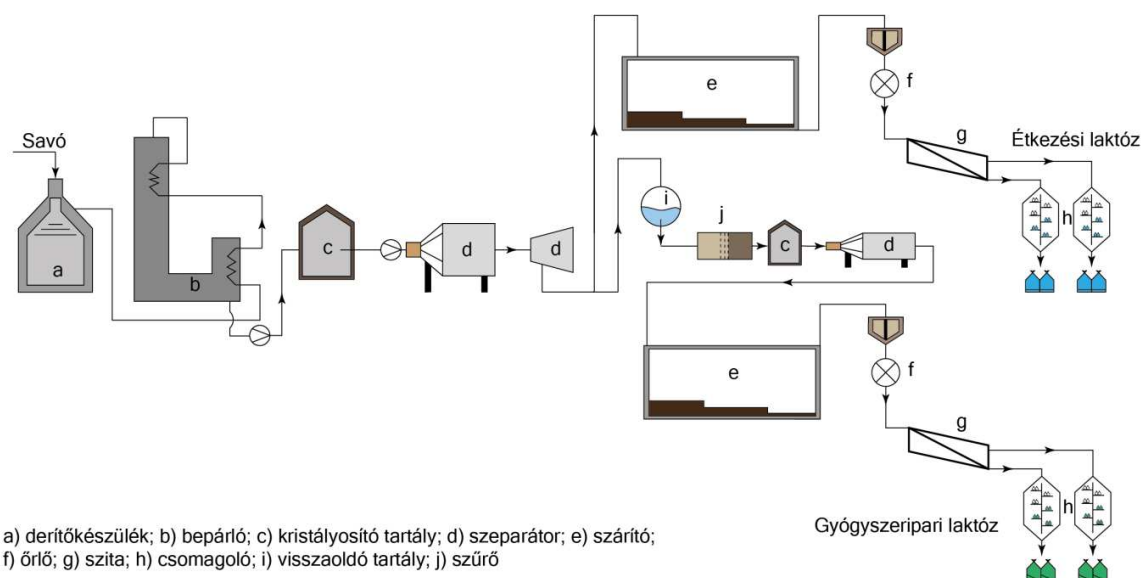
A hipolaktázia további oka lehet a laktáz enzim környezeti okok (bélfertőzés, erős gyógyszeres kezelés, gyulladás stb.) miatti aktivitás-csökkenése illetve a veleszületett laktáz-hiány, ami egy ritka, recesszíven öröklődő genetikai rendellenesség. Bármelyik ok is álljon a laktóz intolerancia mögött, a táplálék helyes megválasztásával, illetve laktáz készítmények fogyasztásával a tünetek jelentősen enyhíthetők. A laktáz készítmények jellemzően fungális eredetű β -galaktozidáz (bGal) enzimeket tartalmaznak. A bGal preparátumok aktivitásának tulajdonságai, emiatt pedig gyakorlati alkalmazhatóságuk is jelentősen eltérőek lehetnek, ami magyarázza a bGal-ok iránti gazdasági érdeklődést is (RUBIO-TEXEIRA 2006).

2.1.2. A laktóz gazdasági-technológiai jelentősége

A laktóz természetes állapotában a tejsavóban oldva található. A tejsavó a tej vizes fázisa, mely a tejfehérjék – elsősorban a kazeinek – savas vagy rennines (kimozinós) kicsapását és elválasztását követően marad vissza. Az első típust „savanyú” (savas), a másodikat „édes” (semleges kémhatású) savónak nevezzük; az igazi különbség az ásványi anyag és a maradék fehérje tartalmában van. A savas közeg több só (iont) képes oldatban tartani, míg az édes savóban a kazeinek rennines kezelést követő maradványa, az un. glikomakropeptid kerül be, az összes savófehérje 20 %-át téve ki (GÄNZLE és mtsai 2008).

A tejfehérjék (a túró) és a tejsavó szétválasztása a sajtgyártás egyik alapvető lépése. A világon 2011-ben kb. 20 M t sajt készült. Egy kg sajt gyártásához kb. 10 kg tej szükséges, ebből a kazein fehérjék kicsapását követően 8,5 – 9 kg tejsavó marad vissza (azaz globálisan évente mintegy 180 M t), melynek 3,5 – 4,9 vegyesszázaléka, szárazanyag tartalmának pedig kétharmada laktóz (GÄNZLE és mtsai 2008). A kezeletlenül a környezetbe kerülő tejsavó a

talajban és a vizekben is káros folyamatokat indíthat el (MARWAHA és KENNEDY 1988), emiatt a jogszabályok hulladékkezelési eljárásokat írnak rá elő. A tejsavó tehát extra költségeket okozó melléktermék, másrészt bőséges, megújuló szén- és energiaforrás. Ennek megfelelően már évtizedek óta folynak kutatások magasabb értékű termékekké („value-added products”) alakítására (valorizáció), s ezek eredményeként ma már a keletkező tejsavónak csak a fele jut a (biológiai) szennyvíztisztítóba, a másik felét tovább hasznosítják. Ez történhet eredeti állapotában, koncentrált formában, de szárított és porrá őrölt tejsavóként illetve laktózként is (MARWAHA és KENNEDY 1988; **1. ábra**). A fehérjék kivonását, a tejsavó koncentrációját és ultraszűrését követően a különböző tisztaságú laktóz készítményekből a világon évente mintegy 1,5 M t készül (ROELFSEMA és mtsai 2010). Gyakorlati felhasználásuk sokrétű: az élelmiszeripar aroma-stabilizátorként és mesterséges tejkészítmények alkotóelemeiként alkalmazza. Mivel az élesztők – kevés kivétellel⁴ – nem tudják metabolizálni a laktózt, sörök édesítésére is használják. A gyógyszeriparban a tablettázás során töltőanyagként szolgál (NB: a heroint hasonló fizikai megjelenése miatt gyakran laktózzal „hígítják”!).



1. ábra: A laktóz tejsavóból történő kivonásának technológiai lépései.

A laktóz két anomer formában – α - és β -laktóz – létezik, különbség a glükopiranoz C-1-hez kötődő -H és -OH csoportok relatív pozíciójában van. Tejtermékekben kétféle (α -hidrát, β -anhidrát) kristályként illetve amorf elegyként („üveglaktóz”) van jelen. A laktóz oldatokban spontán kristályképződés következhet be, amit a kémhatás és az oldatban lévő fehérjék és ionok minősége/mennyisége befolyásol (BHARGAVA és JELEN 1996). A laktóz kristályok megjelenése a tejtermékekben (pl. fagylaltok) jól ismert minőségi probléma.

⁴ A klasszikus kivétel a *Kluyveromyces lactis*, melynek laktóz metabolizmusa a tudományterület egyik paradigmája (részletesen lásd később).

A tejsavó a fermentációs biotechnológiai ipar számára hagyományos jelentőséggel bír. A „penicillin story” az alkalmazott mikrobiológia ismert története, így csak röviden utalnék az amerikai Andrew J. Moyer (1899 – 1959) és Robert D. Coghill (1901 – 1997) munkásságára, akik kutatócsoportja⁵ a II. világháború alatt brit tudósokkal (Howard Florey, Norman Heatley) közösen kidolgozta a penicillin fermentáció üzemi technológiáját. Alapvető felfedezésük a laktóz „lassan hasznosuló szén- és energiaforrás”-ként való definiálása, és a lassú szénforrás-hasznosulás antibiotikum képződésre gyakorolt kedvező hatásának megfigyelése. Munkájuk eredményeként a nagyüzemi, kétfázisú (trofofázis, idiofázis) penicillin fermentáció termelői szakaszának szénforrása az 1970-es évekig a laktóz (tejsavó) lett; ezután a törzsfeljesztés és a fermentációs folyamatszabályozás gyors fejlődése lehetővé tette a laktóz szénforrás kiváltását ismételten adagolt, kis mennyiségű szacharózzal illetve glükóz-hidrolizátummal („repeated fed-batch”). A penicillin gyártástechnológiája a II. világháború alatt hadititok volt, a háborút követően amerikai szabadalmak formájában került leírásra (COGHILL és MOYER 1947; MOYER 1948, 1949). Talán ennek is köszönhető, hogy a szakirodalomban csak elvétve esik szó a laktóz anyagcsere és a penicillin kapcsolatáról (BHUYAN és JOHNSON 1957; BRAKHAGE 1998).

A tejsavót számos további mikrobiális fermentációs technológiában alkalmazzák. Az alkoholgyártásnál nehézséget jelent, hogy a *Saccharomyces cerevisiae* élesztőfaj nem képes laktózt hasznosítani. A probléma megoldására három stratégia létezik: (a) a laktóz hidrolízise bGal-al, majd a hidrolízis végtermékeinek alkoholos erjesztése *S. cerevisiae*-vel; (b) olyan élesztőtörzsek kialakítása, melyek képesek – legalább párhuzamos szubsztrátumként – laktóz hasznosításra; (c) olyan rekombináns *S. cerevisiae* törzs létrehozása, mely képes kifejezni más fajok bGal/laktóz permeáz enzimeket kódoló génjeit. Mivel D-glükóz és D-galaktóz elegyén a *S. cerevisiae* az alkohol kihozatalt csökkentő, kétfázisú növekedést mutat, továbbá a bGal alkalmazása jelentős költségnövelő, az első stratégia gazdaságilag nem életképes (MOULIN és mtsai 1980). A második esetén a *Kluyveromyces fragilis* élesztő tűnik a legalkalmasabbnak (CASTILLO és DE SANCHEZ 1978), mivel a tejsavó > 95 %-át hasznosítja. A rekombináns *S. cerevisiae* törzseken alapuló gyártástechnológiák a csökkent genetikai stabilitás és a változó hozamok problémájával küzdenek (PANESAR és KENNEDY 2012).

A tejsav laktóz alapú fermentációs előállításánál során a tejsavó ásványi anyag és vitamin tartalma is hasznosul, mivel a termelő *Lactobacillus/Lactococcus* törzsek jellemzően multi-auxotrófok. A táptalaj a tejsavón túl sok egyéb komplex komponenst (élesztőkivonat, melasz kukoricafehérje) is tartalmaz, tovább növelve a kihozatalt. A betáplált laktóz 97 %-a tejsavvá

⁵ United States Department of Agriculture, Northern Regional Research Laboratory [NRRL], Peoria, Illinois

alakítható, a végtermék koncentrációja eléri a 40 g/l-t (AESCHLIMANN és VON STOCKAR 1990).

A laktóz fermentációs ipari felhasználásának további területe az ún. single-cell fehérje (SCP) előállítás, mely lényegében élesztő biomassza létrehozását jelenti takarmányozási vagy – ritkábban – élelmiszeripari célokra. A fermentációs táptalaj tartalmazhat (a) laktózt, (b) D-glükózt és D-galaktózt, melyet egy megelőző lépés során enzimes vagy savas hidrolízissel állítanak elő laktózból, és (c) tejsavat és D-galaktózt, melyet tejsav baktériumok állítanak elő laktózból, ugyancsak a fő fermentáció előtt (BOZE és mtsai 1992). Az élesztő jellemzően a *K. fragilis* valamely törzse, de néha 2-3 különböző törzs kevert tenyészetét alkalmazzák.

Laktózon gyártott fermentációs termékek lehetnek az exo-poliszacharidok is, melyeket sokféle iparág hasznosít, mivel viszkozitás-növelés révén megváltoztatják az oldatok reológiai tulajdonságait. A tejsavbaktériumok mellett *Xanthomonas* fajokkal is ígéretes próbálkozások történtek. Egy *X. campestris* baktériumtörzs tejsavón, mint kizárólagos szénforráson 25 g/l xantán gumit állított elő (SILVA és mtsai 2009).

A laktóz ipari továbbhasznosítási lehetőségeit növeli a monoszacharidokká történő előzetes hidrolízis. A hidrolízis savval vagy enzimmal történhet, de a környezetvédelmi okok miatt az utóbbi a gyakoribb. A klasszikus bGal-hidrolízis édes szirupot eredményez, amit az élelmiszeripar (cukrászat, üdítőital gyártók) hasznosít. A technológia Achilles-sarka a bGal tisztítás költsége, amit teljes sejtes eljárással próbálnak meg kiváltani, azaz intakt mikrobiális sejteket használnak enzimforrásként. A laktóz alacsony permeabilitását különböző ágensekkel (etanol, digitonin, cetil-trimetil-ammónium bromid) lehet fokozni. Merevágas bioreaktorban ('packed bed bioreactor'), alkohollal permeabilizált élesztősejteket használva a tejsavó laktóz tartalmának 99,5 %-át sikerült elhidrolizálni (BECERRA és mtsai 2001). Szintén életképes megoldás a bGal enzim immobilizálása; számos enzimforrást, hordozót és rögzítési technikát írtak már le (DECLEIRE és mtsai 1985a, b; BÓDALO és mtsai 1991a, b; DWEVEDI és KAYASTHA 2009).

A biológiai szennyvíztisztítás sokszor kapcsolódik biogáz (metán) előállításához, így nem meglepő a tejsavó anaerob lebontásának fokozódó vizsgálata. Szakaszos és folytonos, egy- illetve kétfázisú fermentációs rendszereket egyaránt leírtak (MENDEZ és mtsai 1989; YAN és mtsai 1989). A legsikeresebb technológia naponta 10 fermentor-térfogatnyi biogázt termel tejsavóból; metán tartalma meghaladja a 70 %-ot (SADDOUD és mtsai 2007). A tejsavó alapú hidrogéngáz előállításról szintén számos publikáció olvasható (YANG és mtsai 2007; DAVILA-VAZQUEZ és mtsai 2008).

A tejsavó (laktóz) ipari biotechnológiai felhasználásának talán leggyorsabban fejlődő területe az enzimtermelés. Az első, laktózon előállított enzim a bGal volt, az alkalmazott

mikroorganizmusok pedig különféle *Kluyveromyces* élesztőfajok (*K. fragilis*, *K. marxianus*, *K. lactis* – PANESAR és mtsai 2006; KUMARI és mtsai 2011), illetve az *Aspergillus carbonarius* (EL-GINDY 2003). Később proteáz (ASHOUR és mtsai 1996), amiláz (BAJPAI és mtsai 1992), és mangán-peroxidáz (FEIJOO és mtsai 1999) termelésre is használtak laktóz szénforrás alapú táptalajokat, de rekombináns penicillin aciláz termelésről is jelent már meg közlemény (DE LEÓN-RODRÍGUEZ és mtsai 2006).

A fungális celluláz illetve hemicelluláz enzimek fermentációs úton történő előállítása leggyakrabban szintén laktóz szénforráson történik, melyhez a *Trichoderma reesei* (teleomorf: *Hypocrea jecorina*) fonalas gombát használják. A legjobban termelő *T. reesei* törzsek 100 g/l-t meghaladó végkoncentrációban képesek extracelluláris fehérjét kiválasztani; ennek kb. 90 %-át cellulázok és hemicellulázok teszik ki (DURAND és mtsai 1988). A legjobban indukáló, részlegesen vízoldékony, kolloidális állapotú cellulóz hidrolizátumok azonban megnehezítik a keletkezett fehérjék tisztítását, mivel enzim és szubsztrátuma között erős kötődés alakul ki. Emiatt jelenleg a laktóz az egyetlen olyan szénforrás, mely a gyakorlatban is alkalmazható cellulázok, hemicellulázok és – egyelőre kísérleti üzemi léptékben – rekombináns fehérjék termeltetésére (PENTTILÄ és mtsai 2004; SINGH és mtsai 2015). A *T. reesei* cellulázainak promóterei (pl. a cellobiohidroláz-I illetve cellobiohidroláz-II expresszióját szabályozó *cbh1* és *cbh2*) ugyanis felhasználhatók heterológ fehérjék transzkripciójának szabályozására is.

2.1.3. A mikrobiális laktóz anyagcsere szabályozása

A bakteriális laktóz anyagcsere működésének és szabályozásának felderítése a molekuláris biológia egyik mérföldköve. Francois Jacob (1920 – 2013) és Jacques Monod (1910 – 1976) fiziológiai Nobel-díjat (1965) eredményező közleménye több mint fél évszázados (JACOB és MONOD 1961), de génregulációs modelljük, a *lac*- (laktóz-) operon máig elfogadott (LEWIS 2011). Kutatásuk alapkérdése: hogyan kapcsolódik ki/be egy enzim szintézise?

A vizsgálatokhoz az *Escherichia coli* bGal enzimét használták. Megállapították, az enzim természetes induktora a laktóz transzglükozilációja során keletkező laktóz-analóg, az allolaktóz (β -D-galaktopiranozil (1 $\rightarrow$ 6)-D-glükóz). Leírták az *E. coli* törzsek bGal szintézise közötti eltéréseket (teljes hiány, indukálható, konstitutív termelődés), és azt, hogy a bakteriális konjugáció (LEDERBERG és TATUM 1946) révén az enzimszintézis befolyásolható. Kimutatták, hogy a bGal szintézis induktorai a represszió alól mentesítenek („enzim repressziós modell”). Legismertebb eredményük azonban az operon elmélet: a genomi DNS több struktúrgénből felépülő funkcionális egységét (génklaszter) egyazon szabályozó régió működteti. Az átíródó mRNS ezért tartalmazza az adott élettani feladathoz, esetünkben a laktóz hasznosításához

szükséges összes enzim kódját (policisztronos mRNS).

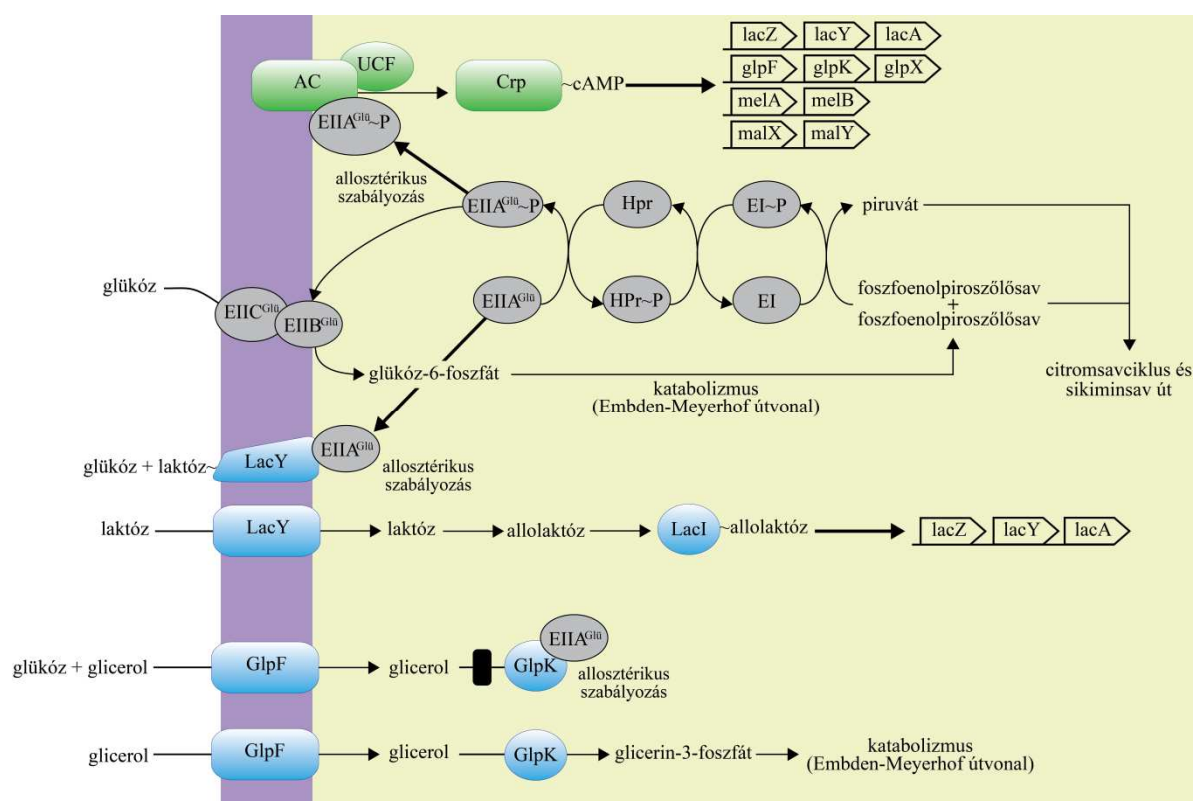
A szabályzó régió a promóter és operátor szakaszokból épül fel; az előbbihez az RNS polimeráz, utóbbihoz a transzkripció faktorok kötődnek. Az *E. coli lac*-operon struktúrgénjei a *lacZ* (bGal), a *lacA* (galaktozid-acetil-transzferáz⁶) és a *lacY* (β -galaktozid permeáz). A releváns transzkripció faktor a konstitutív represszor *lacI*. DNS-hez kötődését a CAP fehérje (Catabolite Activator Protein) teszi lehetővé, mely felnyitja a kettős hélixet. Ezt megelőzően a CAP – két cAMP molekula kötődésének eredményeként – konformáció változáson esik át, és a DNS iránt megnövekedett affinitású aktivált formába kerül.

A fentiek alapján az *E. coli* laktóz operon működése a következő: a citoszolikus cAMP koncentráció D-glükóz hiány esetén megemelkedik (éhség-szignál), kialakul a cAMP-CAP, mely a DNS egymást követő nagyobbik mélyedéseibe ('major groove') horgonyzódik, és a kettős hélixet egy specifikus, a promóter régió előtti 16 bázispárnyi (bp) szakaszon szétnyitja. Az RNS-polimeráz az így hozzáférhetővé vált operon promóteréhez kötődik. A transzkripciót azonban gátolja a *lacI* gén terméke, mely nagy affinitással kötődik a promóter után található operátor szakaszhoz. A minimális mennyiségben mégis keletkező bGal azonban képes a laktózt annak megjelenésekor allolaktózzá alakítani. Az allolaktóz kötődése miatt a represszor konformációja megváltozik, nem tud az operátor régióhoz kötődni, s így elhárul az akadály az RNS polimeráz útjából. Az átíródó struktúrgén-termékek működésbe lépnek, a folyamat felgyorsul, és a laktóz elfogyásáig illetve gyorsan metabolizálódó szénforrás (pl. D-glükóz) megjelenéséig tart. Előbbi esetben a represszor operátor régióhoz történő újbóli kötődése, utóbbiban a DNS-t szétnyitó cAMP-aktivált CAP hiánya miatt áll le a transzkripció. Azt is kimutatták, hogy az induktor kizárás is felelős lehet a *lac*-operon kikapcsolásáért D-glükóz jelenlétében. Baktériumokban a glükóz a PEP-függő foszfortranszferáz rendszer (PTS) révén transzportálódik; a PEP foszfátcsoportja több fehérje közbeiktatásával végül a D-glükózra kerül. Ezen fehérjék egy része többféle cukrot is képes foszforilezni, mások (pl. az E-II-A_{glc}) D-glükóz-specifikusak (2. ábra). Mivel glükóztranszport esetén a foszforilációs igény nagy, a defoszforilált E-II-A_{glc} koncentrációja megnő és a laktóz permeáz fehérjével szembeni affinitása miatt hozzá kötődik, vagyis laktóz permeáz-E-II-A_{glc} fehérjekomplexek alakulnak ki. A D-glükóz transzportja tehát a laktóz permeáz inaktiválásával, ezen keresztül pedig a *lac*-operon induktorának a kizárásával jár.

A *lac*-operon modell bizonyításának kulcslépése a *lacI* géntermék (= a represszor) tisztítása és funkcionális vizsgálata volt. Ki kellett zárni, hogy a molekula a fehérjeszintézis

⁶ Noha része a *lac*-operonnak, a galaktozid acetiltranszferáz a laktóz hasznosításához nem szükséges; nem-metabolizálható D-galaktóz analógok detoxifikációjában játszik szerepet.

során fejt ki hatását. Sikertült olyan fehérje-frakciót izolálni, mely kötődött az izotóppal jelölt induktorhoz (GILBERT és MULLER-HILL 1966). Ez a frakció a vad típusú *E. coli* DNS-sel együtt mozgott, operátor szekvenciában mutáns DNS-sel viszont nem. Nem hidrolizálható, mesterséges induktor⁷ hatására azonban elmaradt a jelölt fehérjefrakció és a vad típusú DNS kötődése (GILBERT és MULLER-HILL 1967). A *lac*-represszor 360 aminosavból felépülő, tetramer szerkezetű fehérje (GEISLER és WEBER 1977). Mindegyik monomer képes DNS-hez kötődni. Az operátor szakasz 27 bp-ből áll, ebből a centrális 17 bp szükséges a specifikus kötődéshez (BOURGEOIS és RIGGS 1970; BAHL és mtsai 1977).



2. ábra: Az *E. coli* foszfo-transzferáz rendszerének (PTS) áttekintése. A lila sáv a sejtmembránt, a sárga terület a citosolt jelzi.

A represszor molekula DNS-kötő helyeinek analízise a fehérjék NMR-rel történő szerkezetvizsgálatának ismert példája (CHUPRINA és mtsai 1993; FRIEDMAN és mtsai 1995). Az intakt represszor teljes szerkezetét – önmagában illetve operátor régióval és effektorokkal komplexben – röntgendiffrakciós eljárással határozták meg (LEWIS és mtsai 1996). Ez alapján a fehérje négy elkülönülő funkcionális egységre tagolódik: fejrész (az N-terminális domén, NTD), sarokrész, cukorkötő hely és a központi rész (a C-terminális domén, CTD). A CTD két

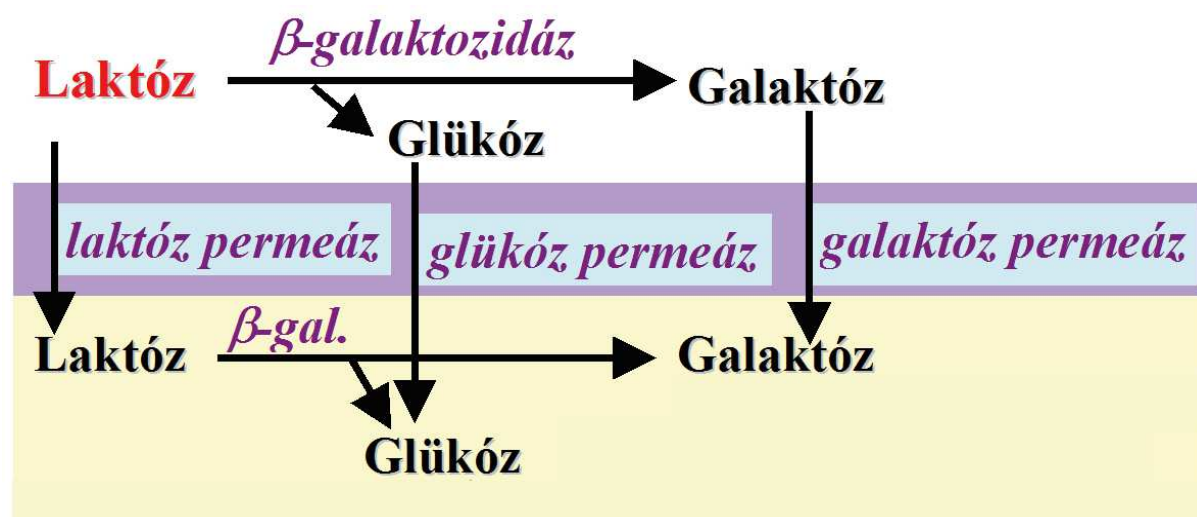
⁷ izopropil-β-D-tiogalaktopiranozid (IPTG)

részre tagolható: az egyik felelős a dimerizációért, a másik a metabolitok jelenlétének az NTD felé történő kommunikációjáért. A *lac*-operon modell további fejlesztése két új operátor hely (O_2 és O_3) leírása volt (OEHLER és mtsai 1990), melyek funkciója redundáns, fenotípusuk csak kettős mutánsokban ($\Delta O_2/O_3$) jelentős. Szerepük a represszor működésének finomhangolása.

A *lac*-operon kutatásának számos, önmagán túlmutató eredménye lett (LEWIS 2013). A represszor aktivitásának metabolitok általi szabályozása az allosztérikus reguláció ún. Monod-Wyman-Changeux (MWC-) modelljét eredményezte (MONOD és mtsai 1963), a represszor és az operátor régió kötődésének vizsgálata a fehérje – DNS kölcsönhatások mechanizmusainak molekuláris alapjait rakta le (GILBERT és MAXAM 1973; SEEMAN és mtsai 1976). A represszor NTD bi-helikális felépítése, az ún. 'helix-turn-helix' (HTH) motívum sok egyéb DNS-kötő fehérjére is jellemző (SAUER és mtsai 1982). A *lac*-operon szabályzó elemeivel befolyásolható az egér tirozináz gén transzkripciója, vagyis a bakteriális mechanizmus egy emlőszállatban is működőképes (CRONIN és mtsai 2001).

A gombák laktóz hasznosítása kapcsán az első fellelhető dolgozat a *Neurospora crassa* laktózt nem hasznosító illetve vad típusú törzseinek bGal enzim-preparátumait hasonlítja össze. Mivel különbséget nem találtak, a mutációt a laktóz transzportjának tulajdonították (LANDMAN és BONNER 1952), vagyis feltételezték a két funkcionális komponens (permeáz, hidroláz) meglétét. Az *Ophiostoma multiannulatum*-ban a laktóz szintén bGal aktivitás megjelenését indukálta (HOFSTEN 1956). A kutatási terület modell-szervezete azonban az eredetileg tejből izolált *K. lactis* élesztő. A sajtgyártás során a tejsavó kezdeti savanyodását ez az organizmus okozza, a tejsavbaktériumok csak később dominálnak. Más szempontból is kiváló modell-faj: tetrád képzése indukálható, haploid és diploid állapotban is fenntartható, párosodási típusai ismertek, vagyis alkalmas a klasszikus genetikai vizsgálatokra (keresztezés, tetrád analízis), de a rendelkezésre álló molekuláris biológiai eszközök (genomszekvencia, transzformációs-szelekciós rendszerek, mutánsok, vektorok) száma és minősége is jelentős (SALMERON és JOHNSTON 1986; WRAY és mtsai 1987; DUJON és mtsai 2004; KOOISTRA és mtsai 2004; RUBIO-TEXEIRA 2006; RODICIO és HEINISCH 2013).

A laktóz lebontás első lépése gombákban kétféle: extracelluláris és intracelluláris lehet (3. ábra). Az első esetben a diszacharid sejten kívül hidrolizál monomerjeire az extracelluláris bGal aktivitásának hatására, és ezt követi a D-glükóz és D-galaktóz felvétele. A második esetben maga a diszacharid kerül be a sejtbe egy laktóz transzporter révén, és a sejtben belül történik a hidrolízis.



3. ábra: gombák laktóz anyagcseréjének vázlata. A lila sáv a sejtmembránt, a sárga terület a citoszolt jelzi.

A *K. lactis* intracelluláris laktóz anyagcserével rendelkezik: a transzportért a *LAC12* gén által kódolt permeáz a felelős, mely a D-galaktózt is képes importálni, noha vele szemben csak alacsony affinitással bír (RIGAMONTE és mtsai 2011). A külső D-galaktózt elsősorban a *Hgt1* által kódolt nagy affinitású D-glükóz permeáz transzportálja (BARUFFINI és mtsai 2006; BILLARD és mtsai 1996). Sejten belül a laktózt a *LAC4* géntermék bGal hidrolizálja. Említést érdemel, hogy nevéhez méltóan a *K. lactis* a Kluyver-effektust mutató élesztők közé tartozik: a cukrokat – a D-glükózt is ideértve – kizárólag aerob körülmények között tudja hasznosítani (FUKUHARA 2003), vagyis ebből a szempontból eltér az *S. cerevisiae*-től. Intracellulárisan a D-glükóz nagyrészt a pentóz-foszfát úton hasznosul, szemben pékélesztővel, ahol a szénváz fluxus $\sim 90\%$ -a a glikolitikus útvonalra kerül (TARRIO és mtsai 2006). A D-galaktózból származó szénváz hasznosulásának biokémiáját a következő fejezetekben tekintem át.

2.1.4. A D-galaktóz előfordulása a természetben

A D-galaktózt eredetileg a laktóz egyik összetevőjeként írták le, de a természetben más fontos előfordulási módjai is léteznek. Mennyiségi szempontból a növényi sejtfa hemicellulóz mátrixának egyik építő elemeként betöltött szerepe a legjelentősebb. A hemicellulóz általános funkciója a cellulóz mikrofibrillumok közötti keresztkötések kialakítása. A hemicellulózok kémiaiag három típusba sorolhatók: xilán, mannán és xiloglükán. A D-galaktóz az egyetlen komponens, mely mindhárom típusban előfordul, sőt a növényi sejtfa laktóznak a cellulóz illetve hemicellulóz melletti harmadik poliszacharid típusából, a pektinből is kimutatható (PAULY és KEEGSTRA 2010). A D-galaktóz növényekben előforduló polimerjét galaktánnak nevezzük; jellemzően α -(1 $\rightarrow$ 6), de néha α -(1 $\rightarrow$ 3) kötést tartalmaz.

A 2-9 monomerből felépülő galakto-oligoszacharidok közvetlenül nem hasznosuló, de a felszívódást és az emésztést a bél baktériumflórájának stimulálása révén elősegítő, ún. prebiotikumként a közelmúltban komoly piaci pozíciókra tettek szert. A D-galaktóz többféle hetero-oligoszacharid alkotóelemeként is előfordul, pl. a zöldségekben található sztachiózban (D-fruktofuranozil- α -D-galaktopiranozil-(1 $\rightarrow$ 6)-D-galaktopiranozil-(1 $\rightarrow$ 6)-D-glükopiranozid, a raffinózban (D-galaktozil-szacharóz) és a verbaszkóz pentaszacharidban („raffinóz-család”). A raffinózek α -galaktóz kötéseit az α -galaktozidáz enzimek hidrolizálják.

Fentiekén túl a D-galaktóz előfordul a gombák sejtfalában, valamint a magasabbrendű eukarióták glikolipidjeiben és glikoproteinjeiben is, melyek révén vitális élettani funkciókban játszik szerepet.

2.1.5. A D-galaktóz anyagcsere Leloir útvonala

A D-galaktóz hasznosulásának biokémiáját a múlt század közepén az argentin Luis Federico Leloir (1906 – 1987) laboratóriuma tárta fel; munkásságát 1970-ben kémiai Nobel-díjjal ismerték el. A lebontó folyamat első lépése a D-galaktóz foszforilezése galaktóz-1-foszfáttá a **galaktokináz** (galaktóz : ATP foszfortranszferáz) enzim által (TRUCCO és mtsai 1948). A gal-1-P egy enzim és egy kofaktor jelenlétében D-glükóz-1-foszfáttá alakul (CAPUTTO és mtsai 1949). Az enzim neve **D-galaktóz-1-foszfát uridilil transzferáz (gal-1-P-UT)**, a kofaktor a D-glükózzal kapcsolódó uridin-difoszfát (UDP-glükóz; CARDINI és mtsai 1950; CAPUTTO és mtsai 1950). A reakció során az enzim egy, az UDP-glükózzal kapcsolódó uridin-monofoszfát (UMP) csoportot transzferál a gal-1-P-ra, UDP-galaktózt és glü-1-P-ot hozva ezzel létre. A folyamat úgy is felfogható, hogy a D-galaktóz két lépésben (előbb egy foszfát- majd egy UMP-csoport ráépülésével) aktiválódik, és így kellően instabillá válik a négyes szénatomon bekövetkező enzimes epimerizációhoz. Az UDP-galaktóz – UDP-glükóz átalakulást (az epimerizációt) az **UDP-galaktóz-4-epimeráz**⁸ katalizálja; az így létrejött UDP-glükóz készen áll egy újabb gal-1-P aktiválására (LELOIR 1951). A három enzimet összefoglalóan Leloir-útvonalnak nevezzük (**4. ábra**). Mai tudásunk szerint ez az egyetlen olyan biokémiai útvonal, ahol három önállóan kódolt és képződő enzimnek az az egyedüli funkciója, hogy együttesen megváltoztassák egy szénatom konfigurációját (FREY 1996). Jelentőségét mutatja, hogy pro- és eukariótákban is általánosan elterjedt; mindkét csoportban ez a leggyakoribb D-galaktóz hasznosítási útvonal (HOLDEN és mtsai 2003). Az *E. coli* gal-operon négy enzimet (Leloir-út

⁸ Az enzimet eredetileg 'Waldenáz'-nak nevezték el, mivel a reakció mechanizmusa mögött – tévesen – a Walden-féle inverziót sejtették.

csoport intramolekuláris, reverzibilis transzfere a D-glükóz 1' és 6' szénatomjai között.

A Leloir-útvonalnak a felépítő anyagcserében is fontos szerepe van; külső D-galaktóz forrás hiányában így keletkeznek az exo-poliszacharidokban, lipo-poliszacharidokban, sejtfal-komponensekben, glikoproteinekben található galaktozil egységek. Leloir fontos eredménye az első cukor-nukleotid, az UDP-glükóz azonosítása és funkciójának (kofaktor a gal-1-P-UT reakcióban) tisztázása volt. Felismerte a komplex szénhidrátok felépítésében betöltött szerepét is: az **UDP-glükóz pirofoszforiláz** (a harmadik „kiegészítő” enzim) által katalizált glü-1-P + UTP reakcióból egy pirofoszfát egység és UDP-glükóz keletkezik (LELOIR 1964; **4. ábra**). Az UDP-glükóz a glikogén szintetáz szubsztrátumaként a glikogén szintézis előanyaga. A Leloir-útvonal lépéseit az UDP-glükóz pirofoszforiláz reakcióval összekapcsolva [1] látható, hogy a D-galaktóz energetikai szempontból ugyanolyan hatékony forrása a glikogén szintézis glikozil építőelemeinek, mint a D-glükóz.

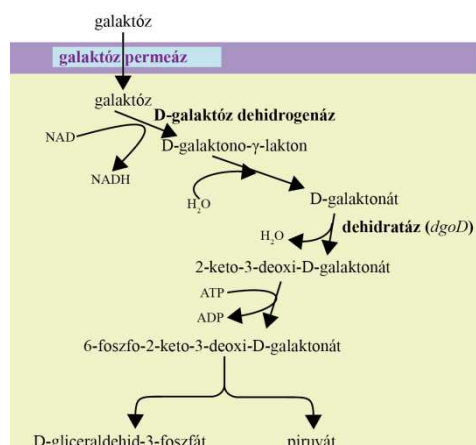


Az UDP-glükóz pirofoszforiláz gal-1-P-ből + UTP kondenzációjával UDP-galaktózt is előállít (LAI és ELSAS 2000; **4. ábra**), ami UDP-galakto-furanózzá alakulva (mutarotáció) a sejtfal felépítésében vesz részt. Az anabolikus funkciók az okai annak, hogy a Leloir-útvonal enzimeit kódoló gének konstitutívak, vagy alap-expressziós rátával rendelkeznek (EL-GANINY és mtsai 2008; 2010). Végezetül, a Leloir-útvonal a köztes anyagcserében is részt vehet, pl. uborkában (*Cucumis sativus*) a galaktóz tartalmú tartalék szénforrás, a sztachióz lebontásában és szacharózzá alakításában játszik szerepet (GROSS és PHARR 1982).

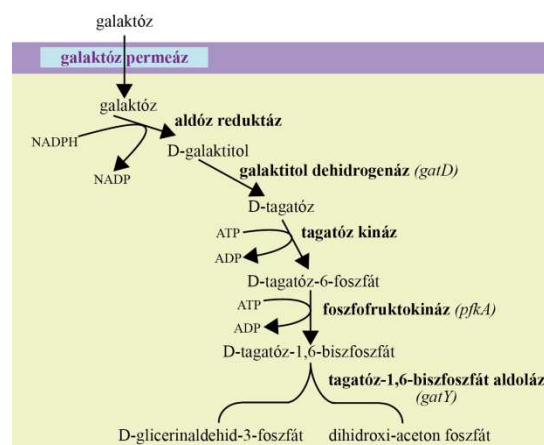
2.1.6. A D-galaktóz anyagcsere alternatív útvonalai

Noha a Leloir-útvonal általánosan elterjedt az élővilágban, alternatív megoldások is léteznek a D-galaktóz hasznosítására. A felfedezőiről elnevezett De Ley-Doudoroff-útvonal (DE LEY és DOUDOROFF 1957) az Entner-Doudoroff útvonal (ENTNER és DOUDOROFF 1952) D-galaktóz-specifikus változata (**5. ábra**). A *Pseudomonas saccharophila* foszforilezés helyett oxidálja a D-galaktózt, ami D-galaktono-lakton, galaktonsav és 2-keto-3-deoxi-6-foszfo-galaktonáton át glicerinaldehid-3-foszfáttá és piruváttá alakul (SHUSTER és DOUDOROFF 1967). Az útvonalat kizárólag prokariótákban (nagyreszt Gram-negatív baktériumokban) azonosították; *E. coli*-ban a három enzimet kódoló gének a *dgo*-operon részeit képezik (BURLAND és mtsai 1993).

Ugyancsak kizárólag prokariótákban (*E. coli*, *Rhodobacter sphaeroides*) találták meg



5. ábra: A D-galaktóz hasznosítás De Ley-Doudoroff-útvonalának áttekintése. A lila sáv a sejtmembránt, a sárga terület a citoszolt jelzi.



6. ábra: A D-galaktóz hasznosítás tagatóz-1,6-biszfoszfát-útvonalának áttekintése. A lila sáv a sejtmembránt, a sárga terület a citoszolt jelzi.

azt az útvonalat, mely első lépésben galaktitollá (dulcitol, a D-galaktóz poliolja) redukálja a D-galaktózt, majd D-tagatózt hoz létre (**6. ábra**). A tagatóz 1,6-biszfoszfátot egy specifikus aldoláz hidrolizálja D-glicerinaldehid-3-foszfát + dihidroxi-aceton foszfáttá (SCHNEIDER és mtsai 1995; NOBELMANN és LENGELER 1996).

Eukariótákban a mi kutatásaink szolgáltatottak először közvetlen bizonyítékot alternatív D-galaktóz lebontási útvonal létezésére. Az *A. niger* sejtmentes kivonatában ugyan kimutatták a De Ley-Doudoroff útvonal köztéseit (ELSHAFEI és ABDEL-FATAH 2001), de az enzimeket és az őket kódoló géneket nem azonosították, noha több *A. niger* törzs genomszekvenciája ismert (ANDERSEN és mtsai 2011), és a genom funkcionális annotációját is elvégezték (PEL és mtsai 2007). ROBERTS (1970) korábban leírta, hogy az *A. nidulans* galaktokináz mutáns lúgos (pH > 7,5) tápközegben hasznosítja a D-galaktózt, de a biokémiai hátteret nem vizsgálta.

2.1.7. A D-galaktóz patobiokémiája

A galaktozémia, vagyis a D-galaktóz lebontás képességének hiánya egy ritka (európai eredetű emberek esetében átlagosan 60000 születésnél egyszer előforduló), de súlyos betegség, mely azonnali kezelés nélkül az újszülött halálához is vezethet. A rendkívül diverz tünetegyüttes – sárgasággal együttjáró máj-megnagyobbodás, vese-elégtelenség, mentális és testi fejlődési zavarok, katarakta (szürkehályog, azaz a szemlencse fényáteresztő képességének csökkenése; SHIELS és HEJTMANCIK 2013), beszédzavar, hiperammonémia (a vér ammónia szintjének megemelkedése), petefészkek működési zavarok – már 100 évvel ezelőtt ismert volt (GOPPERT 1917). A tejmentes diéta terápiás hatását MASON és TURNER (1935) írta le, de a betegség molekuláris hátterét csak a D-galaktóz anyagcseréjének feltárását követően határozta meg a Herman Kalckar (1908–1991) vezette laboratórium (ISSELBACHER és mtsai 1956).

A betegség alapesetben (klasszikus galaktozémia) a gal-1-P-UT enzimaktivitás teljes vagy részleges (Duarte-galaktozémia) hiányából fakad, amit a gén pontmutációi okoznak (BERRY 2014). A betegség öröklődésmenete autoszomális recesszív, vagyis kialakulásához mindkét szülőnek hordozónak kell lennie („G/G genotípus”). A Duarte-galaktozémia esetén a beteg az egyik szülőtől működésképtelen („G”), a másiktól szintén mutáns, de részlegesen működőképes gént („D”) örököl, így a gal-1-P-UT aktivitás a normális 25-30 %-át is elérheti.

A galaktozémia diagnózisa a születés után, vagy a terhesség alatt történik¹⁰. A terápia a laktóz és D-galaktóz tartalmú élelmiszerek teljes, élethosszig tartó kizárása. Mivel a Leloir-út a felépítő anyagcserének is része, a betegeknek a D-galaktózt igénylő anyagcsere folyamatok különböző mértékben csökkent aktivitásúak lehetnek. Ez az állapot is sokféle, de tipikusan intellektuális problémákkal összefüggő klinikai kórképeket eredményezhet, összefüggésben azzal, hogy a D-galaktóz fontos az idegrendszer fejlődéséhez (LAI és mtsai 2014).

A klasszikus galaktozémiához hasonló tüneteket okoz a galaktokináz illetve az UDP-galaktóz-4-epimeráz aktivitásának elvesztése is. Leggyakoribb a galaktokináz gén mutációja miatt bekövetkező szürkehályog. A mutáció egyik típusa (A198V), az ún. Osaka-variáns a galaktokináz enzim instabilitását eredményezi; a hibás allél gyakorisága Japánban meghaladja a 4 %-ot!

2.2. A KARBON KATABOLIT REPRESSZIÓ

D-glükóz, és néhány más, gyorsan hasznosuló szénforrás jelenlétében a lassabban hasznosuló szénforrások lebontásához szükséges enzimeket kódoló gének gátolt (represszált) állapotban vannak. A jelenséget karbon katabolit represszió (carbon catabolite repression, CCR) nevezzük. Noha a CCR az egyik legáltalánosabb globális genetikai szabályozó mechanizmus az élővilágban, a részleteket tekintve jelentősek az eltérések nemcsak a pro- és eukarióták között, de nemzetség (*genus*) szinten is. A bakteriális CCR legismertebb példája a *lac*-operon és a vele funkcionális kapcsolatban lévő foszfo-transzferáz (PTS-) rendszer (lásd 2. ábra).

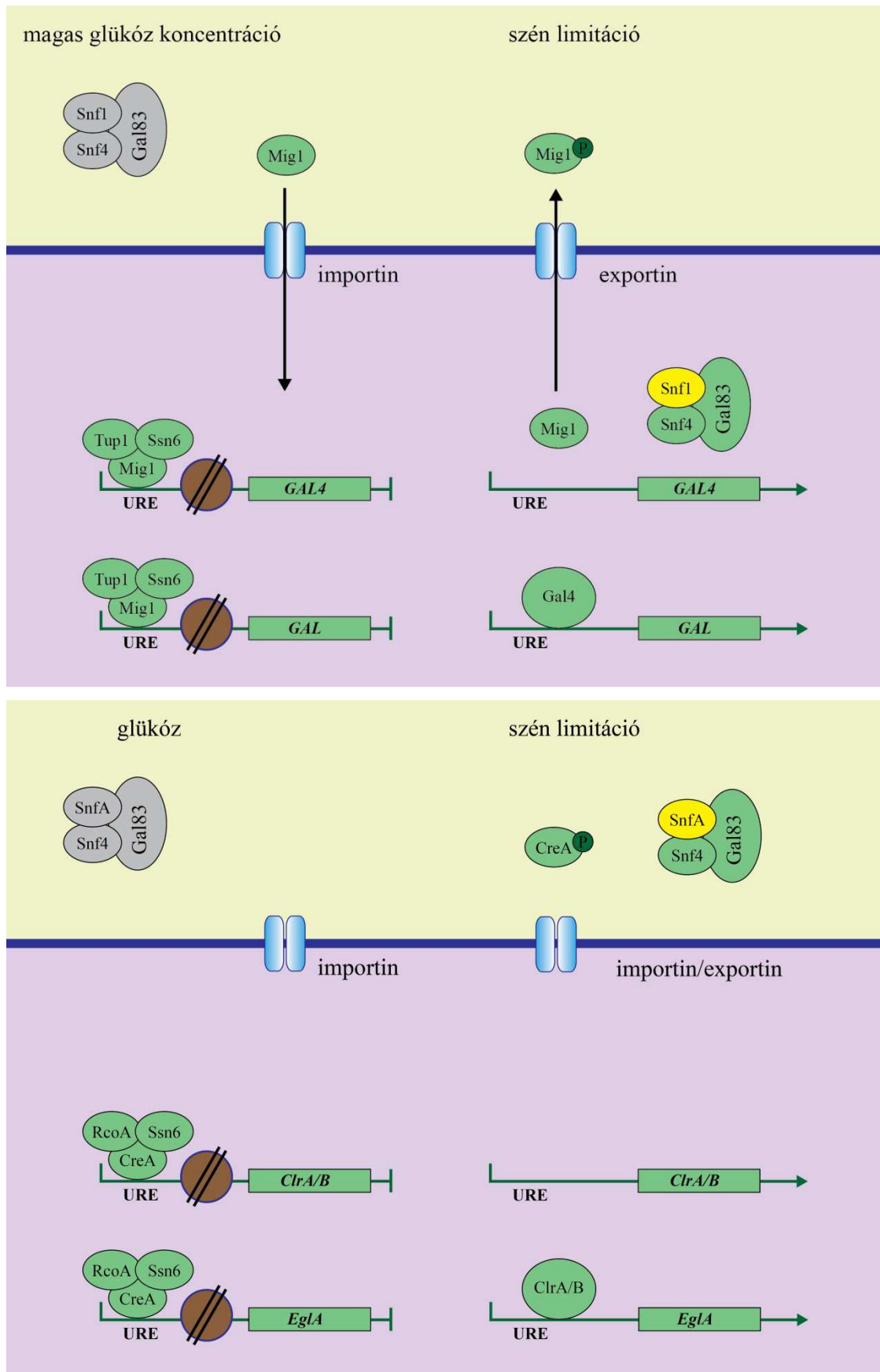
Élesztőkben és fonalas gombákban a CCR-t egy DNS-kötő, Cys₂-His₂ típusú cink-ujj represszor fehérje közvetíti, melyet *S. cerevisiae*-ben Mig1p-nek, *A. nidulans*-ban CreA-nak, *T. reesei*-ben Cre1-nek neveznek (ZAMAN és mtsai 2008; SHROFF és mtsai 1997; STRAUSS és mtsai 1995). Az *A. nidulans* és a *S. cerevisiae* kettős cink-ujj doménje 70 %-ban megegyezik. A represszor a szabályozandó gének promótoreiben lévő GC-boxokhoz kötődik. Ezeket *S. cerevisiae*-ben két AT-gazdag régió fogja közre, míg *A. nidulans*-ban illetve *T. reesei*-ben a

¹⁰ A galaktozémia a fenilketonúria után a második olyan öröklött anyagcsere-rendellenesség volt, amit az újszülöttek kötelező szűrésével ('newborn screening') rutinszerűen ki lehetett mutatni.

represszor-kötő konszenzus szekvencia (5'-SYGGRG-3') két, egymáshoz közeli kópiában van jelen (CUBERO és SCAZZOCCHIO 1994; DOWZER és KELLY 1991; TAKASHIMA és mtsai 1996). A *cre1/creA* gén teljes kiütése extrém fenotípusokat eredményez, a részleges deléción pedig jellemzően az extracelluláris enzimek képződésének fokozódásával jár, amit az ipari törzsfejlesztésben ki is használnak (pl. *T. reesei* RUT C-30 celluláz termelő törzs). Egyes CCR alá eső gének specifikus represszorokkal is rendelkeznek; néhány *T. reesei* cellulolitikus gén kifejeződését D-glükóz jelenlétében az *ace1* géntermék gátolja (ARO és mtsai 2003).

A represszor fehérje szabályozásának élesztőben (*S. cerevisiae*) és fonalas gombákban (*A. nidulans*, *T. reesei*, *N. crassa*) is fontos eleme a sejten belüli lokalizáció. Ha derepresszált sejtekhez D-glükózt adunk, a represszor percekben belül a sejtmagba transzportálódik. Itt az alternatív szénforrások lebontásához szükséges gének kifejeződésének repressziója kettős mechanizmussal történik. Egyrészt a génkifejeződéshez szükséges transzkripciós faktorok és metabolikus enzimeket kódoló gének kifejeződése gátlódik, másrészt a kromatin szerkezet is megváltozik az érintett területeken, akadályozva a transzkripciót (RIES és mtsai 2014). A kromatin szerveződést a nukleoszóma pozíciója és a hiszton fehérjék metilációja/acetilációja befolyásolja. Gátlás során az expresszióban érintett transzkripciós fehérjék nem tudnak a kromatinhoz – pontosabban a benne lévő DNS-hez – kötődni. A glükóz által represszálnak a gének a kromatin sejtmag periferiájához közelebb eső részein találhatók (MENON és mtsai 2005). A glükóz jelenlétében és hiányában bekövetkező sejtszintű változásokat *S. cerevisiae*-ben illetve *A. nidulans*-ban a **7. és 8. ábra** szemlélteti (lásd még BROWN és mtsai 2014).

A CCR egyik legfontosabb eleme a (külvilágban lévő) glükóz érzékelése. Gombákban a sejtszintű válasz percekben belül kialakul, amit elsősorban a cAMP/protein kináz A (PKA) útvonal szabályoz. *S. cerevisiae*-ben a szignál transzdukciós útvonal csúcsán lévő fehérje (a tulajdonképpeni szenzor) a G-proteinhez kapcsolt Gpr1p receptor, melynek ortológjait fonalas gombákban még nem sikerült kimutatni. A Gpr1p a Gpa2 fehérjén keresztül a Cyr1p nevű adenilát ciklázot aktiválja. A Cyr1p aktiválása alternatív útvonalon, a D-glükóz foszforilációt végző glüko- és hexokinázokon (Glk1p és Hxk1p/2p), majd a Ras1p/Ras2p fehérjéken át is elérhető. Mindkét útvonal működése teljes mértékben függ a PKA aktivitásától (WANG és mtsai 2004). Az eredmény: *S. cerevisiae*-ben D-glükóz hatására 2 perc alatt az intracelluláris cAMP szint az 5-50-szeresére növekszik, ami megnöveli a PKA aktivitását, ez pedig aktiválja a Mig1p represszort. A fenn leírt mechanizmusok egyes elemeit fonalas *Ascomycetes*-ekben is kimutatták, de a rendszer bonyolultabb, mint *S. cerevisiae*-ben, és a részletesen vizsgált fajok (*T. reesei*, *N. crassa*, *A. nidulans*) között is jelentősek az eltérések.

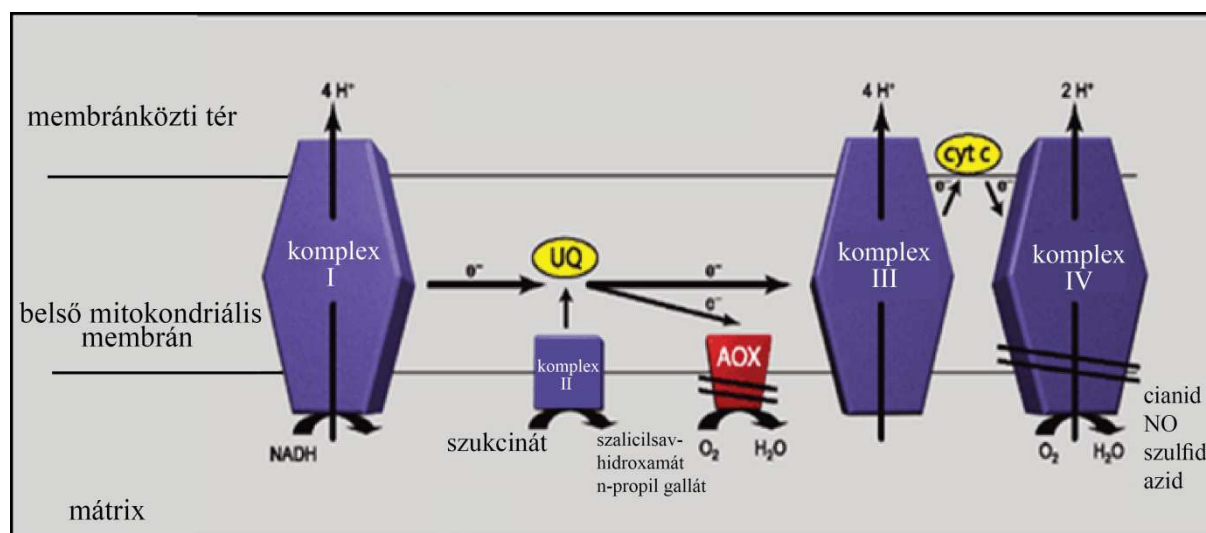


7-8. ábra: A CCR mechanizmusa *S. cerevisiae*-ben (felül) és *A. nidulans*-ban (alul). Zöld körben 'P': foszforiláció; barna kör: nukleoszóma; sárga terület: citoszol, rózsaszín terület: sejtmag; kék csík: sejtmaghártya.

2.3. A CIANID-REZISZTENS ALTERNATÍV LÉGZÉS

A mitokondriális légzés a szénforrás asszimiláció utolsó állomása, s egyben az (aerob) sejtek legfontosabb energiaképző biokémiai folyamata: a NADH-regenerációt (oxidációt) kapcsolja össze az ATP szintézisével. A négy db nagyméretű fehérjekomplex – NADH dehidrogenáz, szukcinát dehidrogenáz, citokróm bc1 komplex, citokróm c oxidáz – mellett a növényi és gomba mitokondriumok legfontosabb jellemzője egy jóval kisebb alternatív terminális oxidáz (AOX) jelenléte, melyet a citokróm c oxidáz és a citokróm bc1 komplex inhibitoraival szembeni érzéketlensége miatt, a legismertebb „hatástalan” gátlószer alapján cianid-rezisztens légzésnek is neveznek (9. ábra). Az AOX egy kinol oxidáz, aromás hidroxámsavakkal – leggyakrabban a szalicilsav-hidroxamáttal (SHAM) – ezért viszonylag szelektíven gátolható.

Az AOX a mitokondriumok belső membránjában található. A stresszhatások erősen indukálják sejtmagi struktúrgénjének kifejeződését (LEITER és mtsai 2016). Az AOX-ra kerülő elektronok az ubiquinon magasságában ágaznak le a citokróm-függő légzési útról. Az AOX protonok transzlokációja nélkül redukálja vízzé az oxigént. A belső membrán két oldala között az ATP szintéziséhez szükséges elektrokémiai gradiens így lecsökken, hiszen létrejöttében a III. és IV. komplexek már nem vesznek részt (lásd 9. ábra). Az AOX oxigén iránti affinitása jelentősen, mintegy fél nagyságrenddel kisebb a citokróm c oxidázénál (SOLOMOS 1977), így működéséhez magas oxigéntenzió (DO) szükséges (KOZMA és mtsai 1991, 1993; KOZMA és KARAFFA 1996a). A sejtek aktuális energiaigénye illetve az AOX aktivitása ezért kölcsönösen befolyásolják egymást. Fokozottan energiaigényes élettani folyamatok során – pl. spórák csírázása – az AOX működése visszaszorul.



9. ábra*: A cianid-rezisztens alternatív oxidáz (AOX) elhelyezkedése a mitokondrium belső membránjában. UQ: ubiquinon; cyt c: citokróm C. A légzési komplexek neveit lásd a szövegben.

*McDonald AE, Vanlerberghe GC, Staples JF (2009): J. Exp. Biol. 121: 2627-2634 alapján.

Az AOX kritikusan fontos szerepet játszik az aerob fermentációs technológiák azon szakaszában, ahol a túltermeltetni kívánt metabolitok bioszintéziséhez szükséges szénforrás lebontását további biomassza produkció (növekedés) nélkül kell megvalósítani. A szénforrás intenzív lebontása során keletkező, nagy mennyiségű redukált kofaktor (NADH) citokróm-függő visszaoxidálása ATP keletkezésével jár, ami – hacsak a növekedés energiaigénye nem használja fel – allosztérikusan gátolja a szénanyagcsere lebontó útvonalainak kulcsenzimeit (LAMBERS 1980). Az AOX működése tehát szétkapcsolja a szénváz lebontást és az ATP keletkezést. A jelenség ismert példája az *A. niger* citromsav fermentációja (ZEHENTGRUBER és mtsai 1980; KUBICEK és mtsai 1980; KUBICEK és KARAFFA 2010), amelynél – az AOX oxigén iránti kis affinitása, de működésének a túltermelés szempontjából esszenciális volta miatt – jóval magasabb DO szint szükséges annál, amit a tenyészet növekedési igénye önmagában indokolna. Mivel az AOX-on keresztülhaladó elektronáram szabadentalpia változása az ATP nagyenergiájú kötéseinek kialakulása helyett hőtermelésre fordítódik, a fermentáció jelentős hőképződéssel jár; elvezetése (vagyis a fermentorok hűtése) a gyártási folyamat költségeinek akkora részét teheti ki, hogy az már az üzemek telepítésének földrajzi helyét is determinálja. A citromsav mellett a legtöbb mikrobiális túltermelő rendszer (aminoglükózidok, aminosavak, β -laktámok, stb.) fermentációs technológiája is tudatosan épít az AOX kódoló gén magas DO-val indukált kifejeződésére. Technológiai léptékben azonban a magas DO szint kialakítása és fenntartása – a mechanikus keverők masszív áramfelvétele miatt¹¹ – jelentős költségnövelő tényező, így a technológia során ezt a pontot is optimalizálni kell.

Az AOX szabályozásában a szénforrás is fontos szerepet játszik. Az *Acremonium chrysogenum* cephalosporin-C (CPC) fermentációja során a glikolitikus szénforrásokon növekvő tenyészethez növényi olajat (pl. szójaolaj) adva az alternatív légzés aránya a teljes légzésen belül kétszeresére nőtt, és az antibiotikum kihozatal is megduplázódott (KARAFFA és mtsai 1999). A teljes (gátolatlan) légzés teljesítménye nem változott, vagyis a stimuláció specifikus az AOX-ra.

A növényi olajok lebontásakor aktív glioxálsav ciklus egyik kulcsenzime, az izocitrát liáz szukcinátot szabadít fel intracellulárisan. A szukcinát oxidatív metabolizmusának gátlása teljes mértékben blokkolta az alternatív légzést (KARAFFA és mtsai 1999), jelezve, az AOX számára a szukcinát – legalábbis CPC túltermelő körülmények között – meghatározó elektron donor *A. chrysogenum*-ban.

¹¹ A több száz köbméter térfogatú ipari fermentorok folyamatos keveréséhez esetenként > 500 kW teljesítményű villanymotorokat használnak.

3. 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.

4. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

4.1. A SZÉNFORRÁS FELVÉTELÉNEK VIZSGÁLATA FONALAS GOMBÁKBAN

4.1.1. A laktóz felvétel és hidrolízis vizsgálata *Aspergillus nidulans*-ban

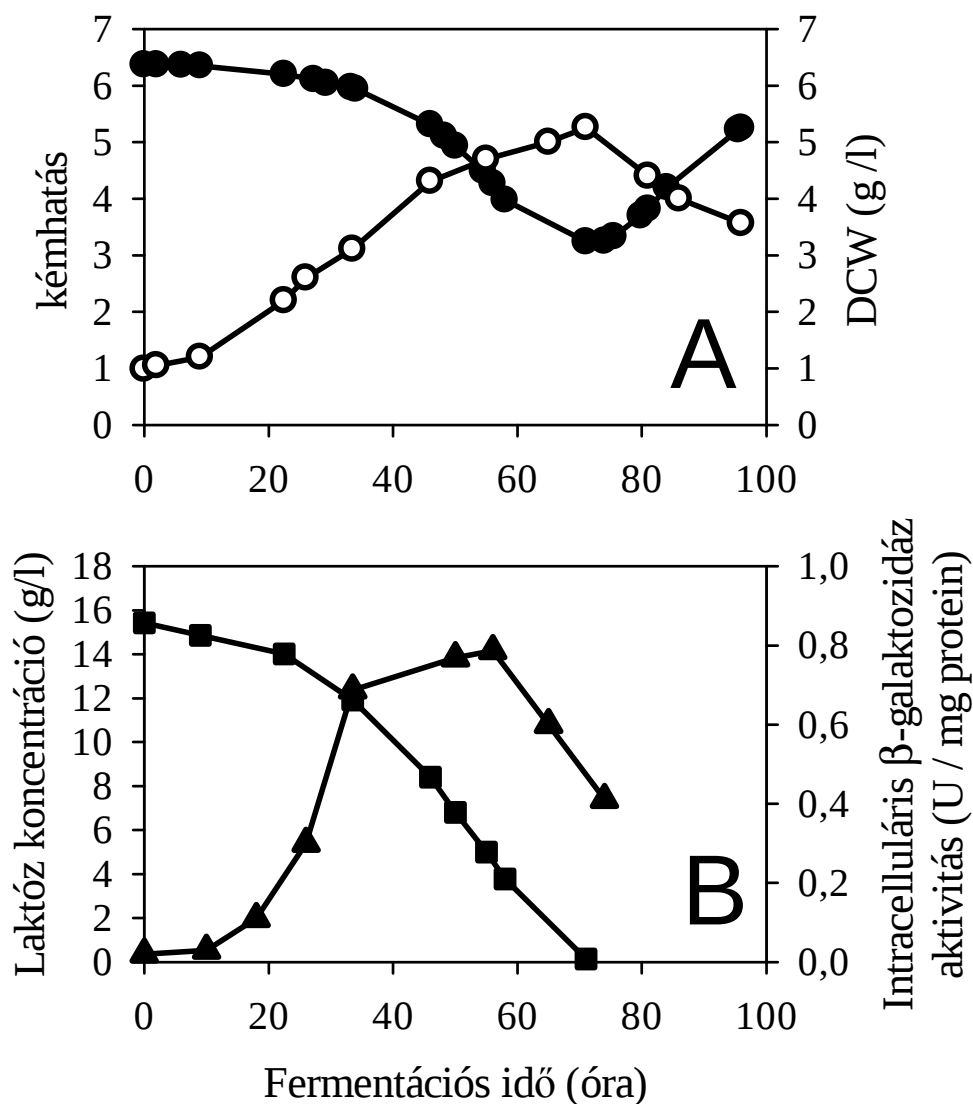
Mint az Irodalmi Áttekintésben már említettem, a gombák laktóz anyagcseréje extra- illetve intracelluláris lehet. *A. nidulans* esetében csak a micélium sejtmentes kivonatából lehet bGal aktivitást kimutatni – a fermentléből semmilyen körülmények között –, így már a gombafaj laktóz anyagcseréjéről készült első dolgozatokban (PASZEWSKI és mtsai 1970; GAJEWSKI és mtsai 1972; FANTES és ROBERTS 1973) is feltételezték az intracelluláris jelleget és az ehhez szükséges két enzim (permeáz és hidroláz) meglétét. Megállapították, hogy mindkét aktivitás indukálható; laktózon illetve D-galaktózon magas értékeket érnek el, de pl. D-glükózon nem (hidroláz) vagy csak minimális szinten (permeáz) mutathatók ki. Indukciót követően a laktóz permeáz aktivitás hamarabb jelenik meg, mint a bGal, melynek pH-optimuma semlegeshez közeli (PASZEWSKI és mtsai 1970). Mindkét megfigyelés az intracelluláris, citoszolikus laktóz hidrolízist támasztja alá, ami eltér a *N. crassa*-tól és az *A. niger*-től. Az előbbi fajban ugyanis kétféle: savas (pH 4,2) illetve semleges (pH 7,5) kémhatás optimummal bíró bGal frakciókat találtak (BATES és WOODWARD 1964; BATES és mtsai 1967), míg az *A. niger*-ben az egyetlen bGal frakció pH-optimuma 3,2 – 4 között volt (BAHL és AGRAWAL 1969).

Az *A. nidulans* laktóz indukciója során a laktóz felvétel és a bGal aktivitás kinetikája jól reprodukálható, párhuzamos mintázatot követ; az előbbi mintegy 4 h, az utóbbi 6-8 h után jelenik meg (PASZEWSKI és mtsai 1970). Ezeket az adatokat – másféle auxotróf markerekkel rendelkező, de a szénhidrát anyagcserére nézve úgyszintén vad típusú törzsszel (R21) – mi is megerősítettük. Mindebből azt a munkahipotézist állítottuk fel, hogy a laktóz intracelluláris lebontása során a permeáz illetve hidroláz funkciók kifejeződését szabályozó molekuláris mechanizmusok legalábbis részben közösek. A hipotézis teszteléséhez először azonosítanunk, majd jellemeznünk kellett az *A. nidulans* funkcionális laktóz permeáz és bGal génjét illetve génjeit.

4.1.1.1. Laktóz permeáz/ β -galaktozidáz génklaszter azonosítása.

A vad típusú (R21) *A. nidulans* nőtt laktózon: a 15 g/l kiindulási koncentráció kb. 70 óra alatt fogyott el (**10. A. ábra**). Szilárd laktóz-AMM2 táptalajon is kb. 3 nap kellett a teljes életciklus befutásáig, vagyis az új konídiospórák megjelenéséig.

Extracelluláris vagy sejtfalhoz kötött bGal aktivitást¹² a növekedés egyetlen fázisában sem tudtunk kimutatni, az intracelluláris aktivitás viszont végig jelen volt (10. B. ábra). Hasonló eredmények születtek pH-szabályzott (pH 6,5) illetve nem szabályzott körülmények között, amikor a kémhatás a növekedési fázis végére pH 3,5-ig esett vissza (10. A. ábra).



10. ábra. A. *nidulans* WT-törzs laktóz-AMM időprofiljai. A: kémhatás (●) és növekedés (biomassza, DCW) (○); B: maradék laktóz koncentráció (■) és intracelluláris β -galaktozidáz aktivitás (▲)

A kísérletes eredményeket *in silico* is igazoltuk. A *K. lactis* bGal szekvenciájával¹³ egy *N. crassa* adatbázisban¹⁴ BLAST keresést végeztünk, és a leginkább hasonló két szekvenciát kiválasztottuk. A kettős szűrőn átesett szekvenciákat BLAST-oltuk. Két magas homológiájú *A. nidulans* bGal szekvenciát találtunk, melyeket nem-fajspecifikus BLAST-tal ellenőriztünk.

¹² *ortho*-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid- [ONPG]-hidrolizáló képességként definiálva.

¹³ www.ncbi.nlm.nih.gov

¹⁴ www-genome.wi.mit.edu

Az első, 1309 bp-nyi szekvencia gyakorlatilag azonos a *K. lactis* – *N. crassa* bGal-lal, míg a másik kisebb hasonlóságot mutat ezekhez, 1554 bp hosszú, és bakteriális (*Arthrobacter sp.*, *Caldicellulosiruptor lactoaceticus*, *Thermotoga neapolitana*) bGal génekkel homológ. Mindkét szekvencia tartalmaz START és STOP kodont is, így Open Reading Frame (ORF)-nek tekinthetők. Intronok – a PCGENE program alapján – nincsenek bennük. Végezetül, a nyilvántartott fonalas gomba szignál-szekvenciák nem találhatók meg bennük. Ezzel új bizonyítékot szereztünk a régi elméletre, mely szerint az *A. nidulans* csak intracelluláris bGal-al rendelkezik. Az ORF-ek által hipotetikusan kódolt polipeptidlánc becsült mérete hasonló volt az *A. nidulans*-ból szubsztrátum affinitás kromatográfiával izolált intracelluláris bGal-hoz (120 kDa illetve 97 kDa méretű monomerekből felépülő multimer enzim; DÍAZ és mtsai 1996).

A laktóz anyagcserében defektes 'klasszikus' *A. nidulans* mutáns törzsek – melyeket random mutagenézissel hoztak létre – két csoportba oszthatók. Az egyik a felvételben sérült mutánsok, melyek D-galaktóz jelenlétében továbbra is képesek bGal aktivitás létrehozására, a másik a bGal hiánymutánsok, melyekben az ONPG-hidrolizáló aktivitást nem lehet indukálni. Nem ismerünk olyan klasszikus *A. nidulans* mutánst, mely a laktózfelvételben illetve a bGal aktivitás létrehozás képességében is defektes lenne. GAJEWSKI és mtsai (1972) számos laktóz anyagcsere mutánst izoláltak; a mutációkat okozó két lókuszt – egy eset kivételével, melyről később (JONES és mtsai 1981) kiderítették, hogy független a laktóz anyagcseréjétől – a VI. kromoszómán¹⁵ található. A laktózfelvétel elvesztéséért felelős mutáns lókuszt neve *lacA*, a bGal aktivitás hiányáért felelős lókuszt a *lacG*.¹⁶ Keresztezések során a két mutáns lókuszt közötti rekombinációs gyakoriság 12 és 19 % közé esett, ami – noha nem kimagaslóan magas érték – genetikai kapcsoltságot tételez fel közöttük.

Egy membránfehérjét az aminosav szekvenciája alapján nagy bizonyossággal be lehet sorolni a nagy létszámú, diverz Major Facilitator Superfamily (MFS) tagjai közé¹⁷, szubsztrát specifitását azonban – a 12 transzmembrán doméntól független, konzervált régiók hiánya miatt – *in silico* csak elvételre lehet megállapítani (PAO és mtsai 1998). A talajlakó szaprofita *A. nidulans* genomja mintegy 400 db MFS proteint kódoló gént tartalmaz; közülük több, mint száz a cukrokat transzportáló fehérjék családjába (Sugar Porter Family, SPF; WORTMAN és mtsai 2009) tartozik. Összehasonlításképpen, a *Candida albicans* és a *K. lactis* élesztők 20-20 db, a

¹⁵ Korabeli nevén: kapcsoltsági csoport, 'linkage group'

¹⁶ Az *A. nidulans* laktóz anyagcsere géneinek terminológiája kapcsán megemlítendő, hogy FANTES és ROBERTS (1973) olyan mutánsokat izoláltak, melyek laktózon vad típusként nőttek, de β -galaktozidáz aktivitást (ONPG-hidrolízis) nem produkáltak. A mutációkat a III. kromoszómán lókuszaiba (*bgaA*, *bgaB* és *bgaC*) pozicionálták.

¹⁷ Az MFS és az ATP-kötő ABC-transzporterek együtt az ismert transzporterek mintegy felét teszik ki.

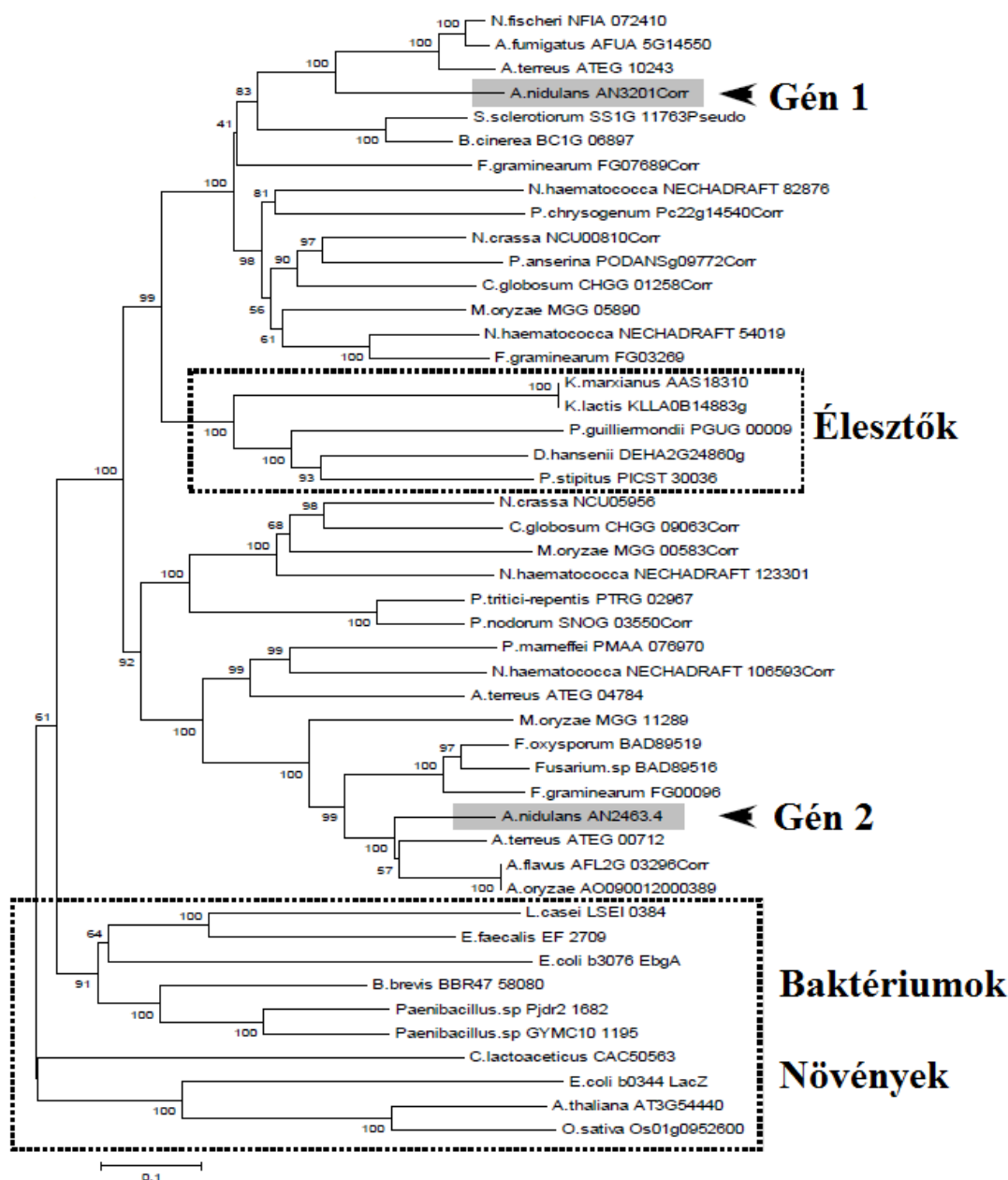
Yarrowia lipolytica 23 db cukor transzporterrel rendelkezik (PALMA és mtsai 2007). Meglévő ismereteink alapján ezért az alábbi, kétlépéses stratégiát dolgoztuk ki a laktóz permeáz azonosítására: (1) intracelluláris bGal gén(ek)e)t keresünk az *A. nidulans* VI. kromoszómáján, (2) ezen gén(ek) közvetlen közelében SPF-géneket keresünk.

Az összes, funkcionálisan jellemzett intracelluláris (semleges pH-optimummal bíró) bGal a Glikozil Hidroláz 2 (GH2) enzimcsaládba tartozik (CANTAREL és mtsai 2009), csakúgy mint a β -mannozidázok (TAKADA és mtsai 1999), a β -glükuronidázok (WENZL és mtsai 2005) és a β -exo-glükozaminidázok (IKE és mtsai 2006). A 2009-ben befejezett *A. nidulans* genom annotációs projekt során kilenc GH2 enzimet kódoló gént azonosítottak (WORTMAN és mtsai 2009). Közülük 1-1 db gén az I. és az V. kromoszómán, 4 gén a VI. kromoszómán, 3 gén pedig a VII. kromoszómán található (az *A. nidulans* 8 db kromoszómával rendelkezik). Fentiekén túl további három, potenciálisan Glikozil Hidroláz 35 (GH35) enzimet kódoló gént – melyek közül egy a VI., kettő pedig a VIII. kromoszómán található – is figyelembe vettünk az *in silico* elemzés során. A felsorolásból látható, hogy FANTES és ROBERTS (1973) *bgaA*, *bgaB* és *bgaC* lókuszai – szemben a szerzők álláspontjával – vagy nem a III. kromoszómán vannak és/vagy nem bGal-t kódolnak.

Az összesen öt db (4 GH2, 1 GH35), potenciálisan bGal-t kódoló, VI. kromoszómán lévő lókuszt közül csupán az AN3201 elég nagy ahhoz, hogy egy 120 kDa méretű polipeptid láncot kódolhasson (lásd DÍAZ és mtsai 1996). A gének által kódolt fehérjék szekvenciáinak pontosítására az Entrez adatbázisból letöltött génmodelleket manuálisan korrigáltuk, de a konklúzió nem változott: csak az AN3201 lókuszon lévő gén kódolhat 120 kDa méretű fehérjét. A gént *bgaD*-nek neveztük el (béta-galaktozidáz D), tekintettel a FANTES és ROBERTS (1973) által korábban definiált *bgaA-C* lókuszokra.

A BgaD-t mintának ('bait') használva TBLASTN¹⁸ keresést (ALTSCHUL és mtsai 1997) végeztünk, a nukleotid szekvenciák alapján filogenetikai törzsfát készítettünk (11. ábra). Mint látható, számos *Pezizomycotina* rendelkezik intracelluláris bGal génnel. Az átíródó enzimek két paralóg kládba rendeződnek; ennek hátterében egy ősi génduplikáció állhat. Néhány faj mindkét csoportban képviselteti magát. Az *A. nidulans* BgaD viszonylag közeli rokonságban áll a *K. lactis* Lac4p-vel (POCH és mtsai 1992) és távolabbiban a két *E. coli* bGal-lal (KALNINS és mtsai 1983; STOKES és mtsai 1985). A BgaD paralógja az AN2463 lókuszt terméke, mely a VII. kromoszóma GH2-enzimet kódoló génjeinek egyike.

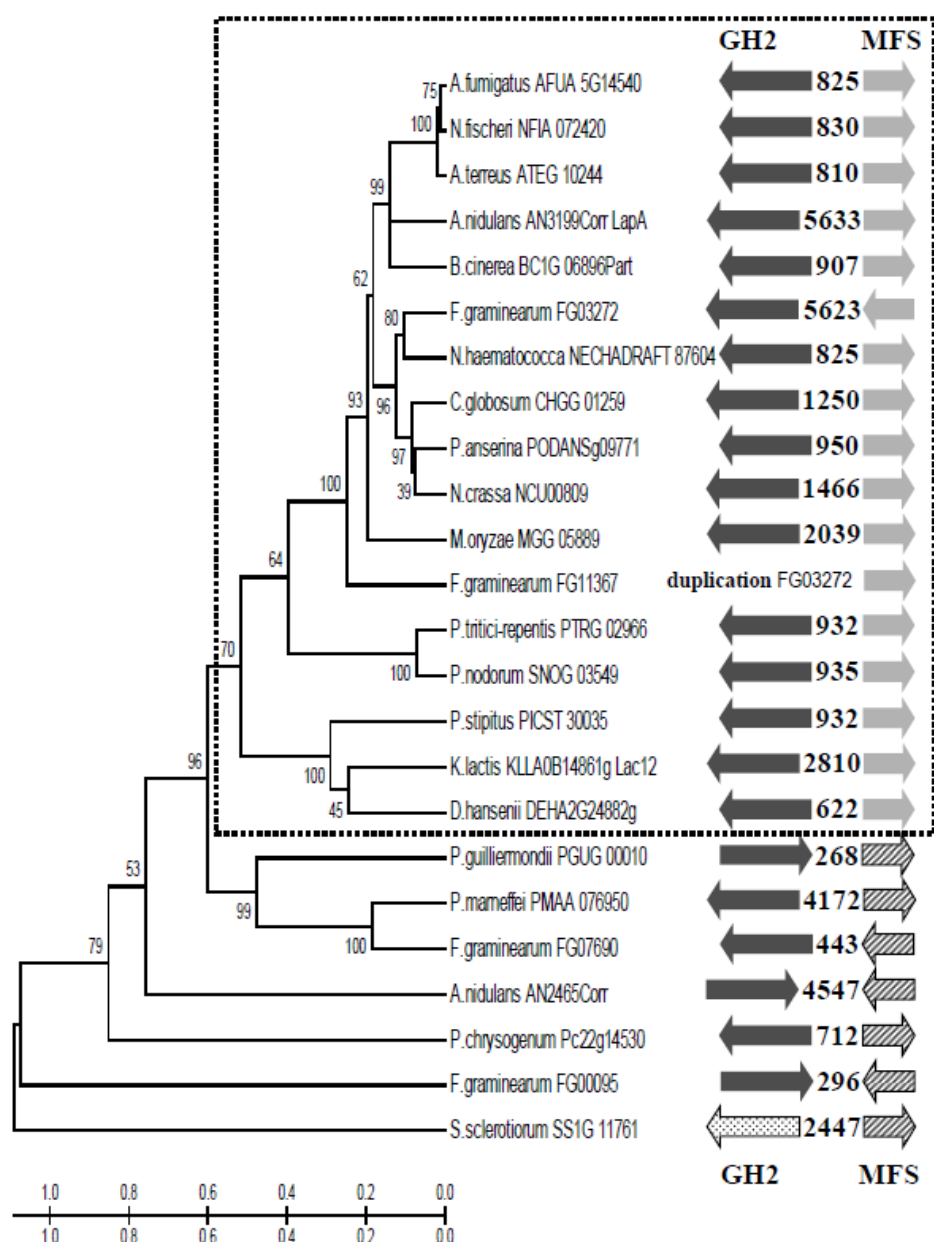
¹⁸ Átírt nukleotid (Translated Nucleotide) szekvenciák keresése fehérje szekvencia alapján.



11. ábra. Intracelluláris GH2 β -galaktozidázok filogenetikai elemzése (törzsfa)

A következő lépés az AN3201 lókuszt fizikai környezetének *in silico* feltérképezése és potenciális MFS-proteinek keresése volt. Az első MFS-cukor transzportert az AN3199 lókuszt tartalmazta; a gén 5.6 kb távolságra volt a *bgaD*-től, és azzal ellentétes irányba íródott át. A két lókuszt közti kis távolság, valamint a *lacA-lacG* lókusztok közti kapcsoltság (GAJEWSKI és mtsai 1972) okán feltételeztük, hogy az AN3201/AN3199 potenciális bGal/laktóz permeáz génklaszter. Mivel a génklaszterek jellemzően konzervatív struktúrák, a **11. ábrán** látható összes bGal gén fizikai környezetét külön-külön *in silico* megvizsgáltuk, és megkerestük a hozzájuk legközelebb eső MFS-géneket. Az összegyűjtött MFS-gének által kódolt fehérjéket

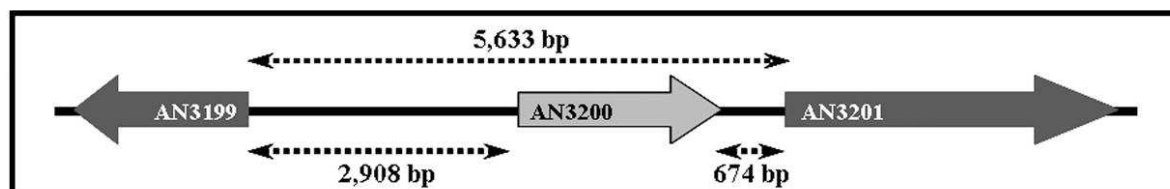
filogenetikai elemzésnek vetettük alá (12. ábra).



12. ábra. Gombák intracelluláris GH2 β -galaktozidáz génjeivel párban található MFS-cukor transzporterek evolúciós kapcsolata.

Mint látható, négy kivételével az összes olyan fonalas gomba GH2 gén, melynek a terméké a BgaD-ortológ kládban található (lásd 11. ábra) rendelkezik MFS-kísérő génnel. Ezen kísérők kivétel nélkül az *A. nidulans* AN3199 lókuszban található gén ortológjai! A 11 db (hipotetikus) transzporter fehérje legalább 61 %-ban azonos, és tíz közülük a GH2 génnel ellentétes irányba (divergensen) íródik át. A divergens génpárok közti távolság egy esetet leszámítva 810 és 2034 bp közé esik; a kivétel éppen az *A. nidulans*, ahol az 5,6 kb-nyi távolság túlnyomó részét egy harmadik gén (AN3200) tölti ki (13. ábra). Másfelől azon 14 db

GH2 hidroláz protein többségének, melyek a BgaD-paralóg kládot alkotják (**11. ábra**) – vagyis az AN2463 lókuszon lévő gén által kódolt fehérje ortológjainak – nincs MFS-partnere. Kivételt az a két gombafaj (*Pyrenophora tritici-repentis* és *Phaeophaeeria nodorum*) jelent, mely nem rendelkezik BgaD-ortológ GH2-hidroláz fehérjével.



13. ábra. A *bgaD/lacpA* génklaszter elhelyezkedése az *A. nidulans* VI. kromoszómáján (1.52/1.53 kontigok). AN3199 – *lacpA*, AN3201 – *bgaD*). Az AN3200 lókuszt által specifikált gén egy GH2-hidrolázt kódol, mely minden vizsgált szénforráson konstitutívan fejeződik ki.

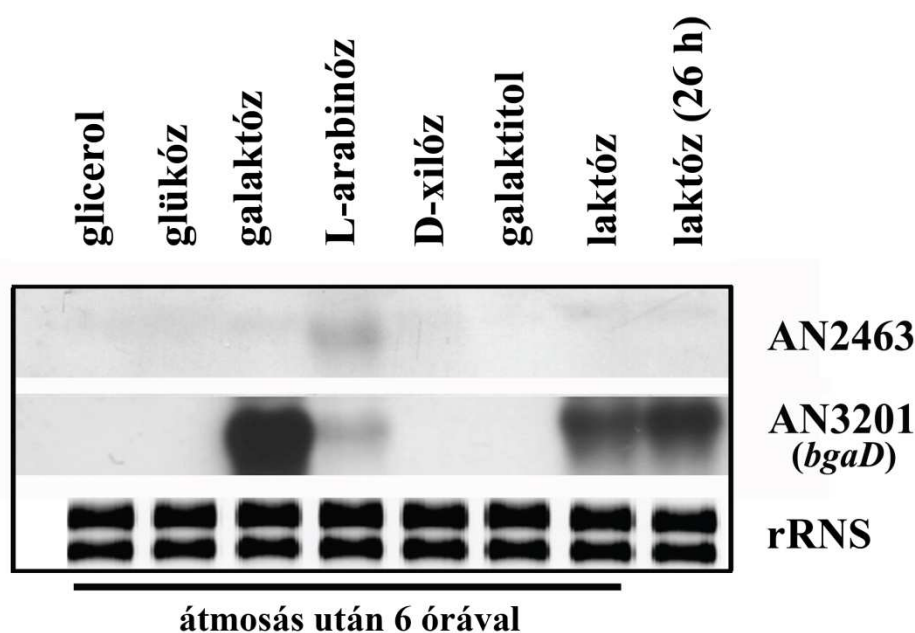
Fentiek alapján feltételeztük, hogy *A. nidulans*-ban (és legalább 15 más Ascomycetes-ben) egy konzerválódott bGal/laktóz permeáz génpár található. A *bgaD* gént kísérő, AN3199 lókuszon lévő MFS-gént *lacpA*-nak (lactose permease A) neveztük el, a génpárt pedig a továbbiakban *bgaD/lacpA*-ként említem.

Az *in silico* azonosított génpár működését Northern analízissel vizsgáltuk, továbbá *in vivo* (laktóz permeáz) és *in vitro* (bGal) enzimaktivitásokat mértünk. A kísérletekhez kétféle tenyésztési technikát alkalmaztunk: inokulum tenyészetből kiinduló süllyesztett, batch fermentációkat, ahol az induktor¹⁹ kizárólagos szénforrásként is szolgált, illetve mosott sejtes tenyészeteket, ahol az induktor alacsony (növekedéshez nem elegendő) koncentrációkban volt jelen. A laktóz lebontás glükóz represszió alatt áll (lásd Irodalmi áttekintés), vizsgálatainkat ezért a vad típus mellett két, eltérő genotípusú karbon katabolit derepresszált mutáns törzsre (*creA44*, *creA^d30*) is kiterjesztettük. A mutáns törzsek növekedési paraméterei laktózon és D-glükózon is hasonlóak voltak a vad típushoz, ami lehetővé tette összehasonlításukat.

A *bgaD* gén erősen indukálódott laktóz, de még inkább D-galaktóz jelenlétében; a transzkriptum már 6 órával a micélium indukáló körülmények közé helyezése után megjelent, és még 26 óra elteltével is hasonló szinten volt (**14. ábra**). Néhány fonalas gomba (*A. niger*, *P. canescens*) esetében leírták (NIKOLAEV és VINETSKI 1998, DE VRIES és mtsai 1999a), hogy a bGal transzkriptum képződését indukálni lehet hemicellulóz monomerekkel. Kísérleteink szerint *A. nidulans* esetében ez csak részben van így. Az indukció L-arabinózon egyértelmű,

¹⁹ A gén- illetve enzimaktivitás szintü változások megkülönböztetése céljából a transzkripció (génexpresszió) vonatkozásában az *indukció/represszió*, az enzimaktivitások kapcsán a *stimuláció/gátlás* kifejezéseket használok.

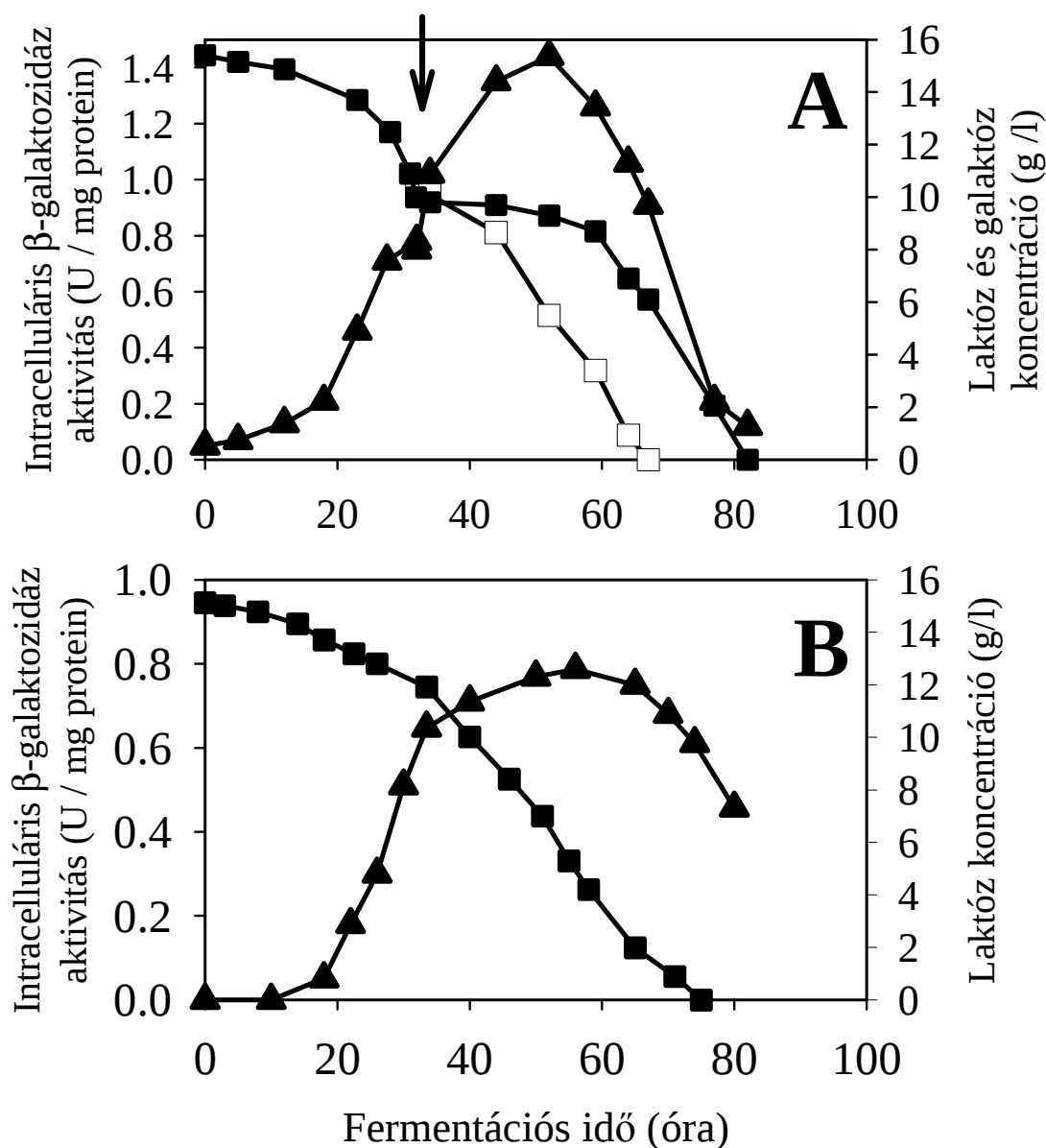
de a laktóz/galaktózhoz képest mérsékeltebb, míg a másik tipikus hemicellulóz pentózon, a D-xilózon egyáltalán nem képződött *bgaD*-transzkriptum. Hasonlóan negatív eredményt kaptunk D-glükózon, glicerolon és galaktitolon (dulcitol) is (**14. ábra**). A VII. kromoszómán található *bgaD*-paralóg gén (AN2463) csak L-arabinózra reagált (**14. ábra**), míg a VIII. kromoszómán lévő, AN0756 és AN0980 lókuszok által specifikált GH35-gének egyetlen vizsgált induktor jelenlétében sem fejeződtek ki.



14. ábra. Az *A. nidulans* WT (R21) törzs GH2- β -galaktozidáz paralóg gének indukciós spektrum elemzése. Az ábra alján az RNS minta mennyiségének és minőségének bizonyítékaként 28 S és 18 S rRNS etidium-bromiddal vizualizált képe látható (a dolgozatban szereplő összes Northern gélképhez hasonlóan).

A következőkben a micélium beltartalmának ONPG-hidrolizáló képességét – vagyis az intracelluláris bGal enzimaktivitást – hasonlítottuk össze a *bgaD* transzkripció profiljával. A vad típusú törzs D-glükózon, galaktitolon és glicerolon nem mutatott aktivitást, laktózon, D-galaktózon és L-arabinózon viszont minden növekedési fázisban jól mérhető volt, vagyis génexpresszió és enzimaktivitás eddig a pontig jól korrelált.

A laktóz alapú fermentáció időprofilján látható (**15. ábra**), hogy az enzimaktivitás kinetikája párhuzamos a laktóz felvételével és a növekedéssel, a szénforrás elfogyása után lecseng. A laktózon nőtt vad típusú micélium intracelluláris bGal aktivitását D-galaktóz ráadagolással (10 g/l) fokozni lehetett, ami az expressziós adatokhoz hasonlóan azt mutatta, hogy az enzimképződés laktózon nem maximális (**15. ábra**).



15. ábra. A: *A. nidulans* WT törzs intracelluláris β-galaktoszidáz aktivitásának laktóz-AMM időprofilja, D-galaktóz ráadagolás során (nyíllal jelezve). B: kontroll tenyészet (D-galaktóz adagolás nem történt). Szimbólumok: aktuális laktóz koncentráció (■), aktuális D-galaktóz koncentráció (□), intracelluláris β-galaktoszidáz aktivitás (▲)

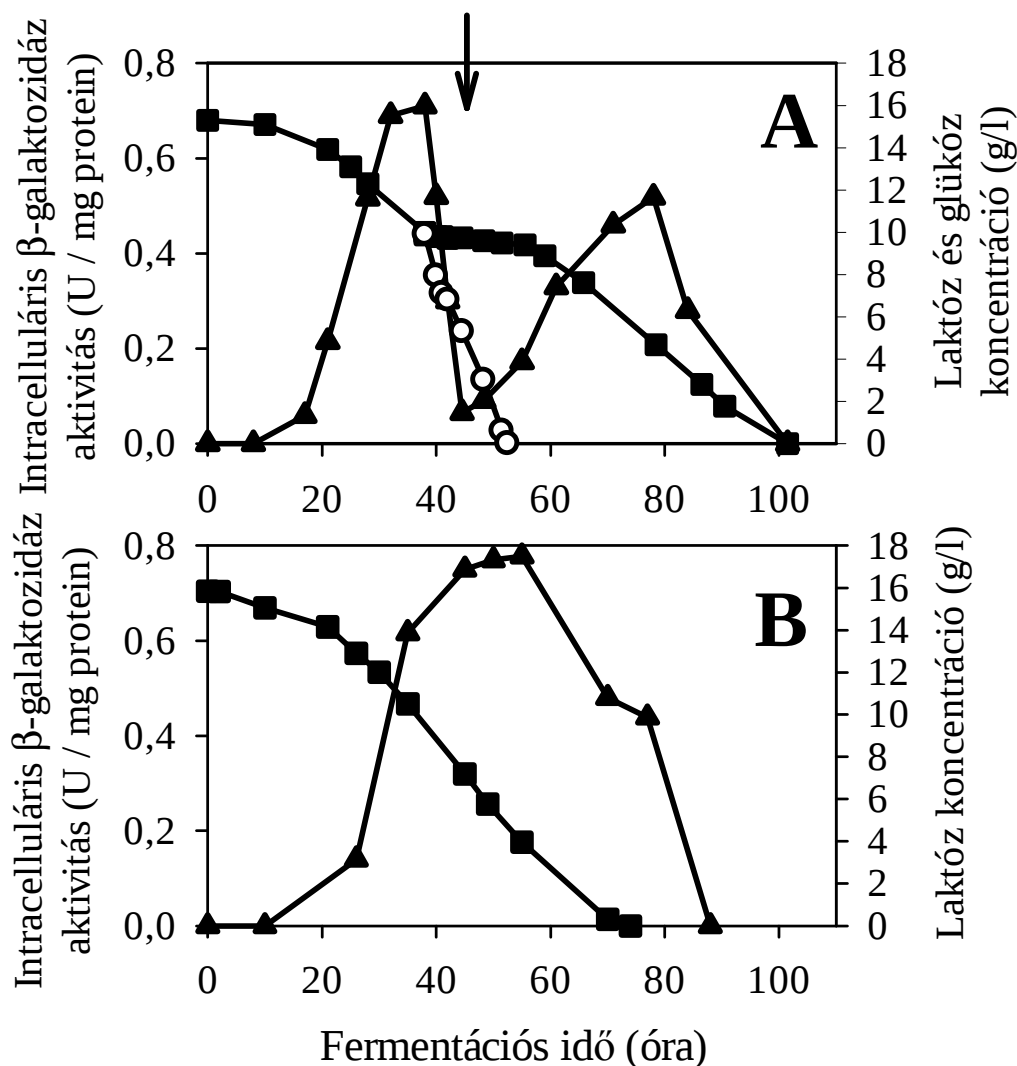
A D-galaktóz mosott sejtes rendszerben is hatékonyabban stimulálta az intracelluláris bGal aktivitást a laktóznál (**I. táblázat**), az L-arabinóz pedig még a D-galaktóznál is jobban, noha a *bgaD*-transzkriptum mennyisége a hexózon volt nagyobb. Fonalas gombákban D-arabinóz természetes körülmények között nem fordul elő, így érthető módon ez az izomer hatástalan volt. Noha *bgaD*-transzkriptum D-xilózon nem képződött, a xilózon nőtt vagy xilóz által stimulált sejtmentes kivonat – igaz, alacsony aktivitással – hidrolizálni tudta az ONPG-t.

	Vad típus		<i>creA44</i>	
	$K_{\max}$ K_m	$V_{\max}$	$K_{\max}$ K_m	$V_{\max}$
D-galaktóz	8,33	1.01	11,1	1,72
	0,55		0,69	
L-arabinóz	13,3	1.02	6,67	2,17
	0,8		0,41	
D-xilóz	6,67	0.28	6,67	0,41
	2,67		0,67	

I. táblázat. A β -galaktozidáz aktivitás stimulációja D-galaktózzal, L-arabinózzal és D-xilózzal az *A. nidulans* WT és a *CreA44* mutáns törzsekben. $V_{\max}$: maximális specifikus enzimaktivitás (U/mg protein); $K_{\max}$: a maximális aktivitáshoz szükséges inducer koncentráció (mM); K_m : a maximális aktivitás feléhez tartozó inducer koncentráció (mM).

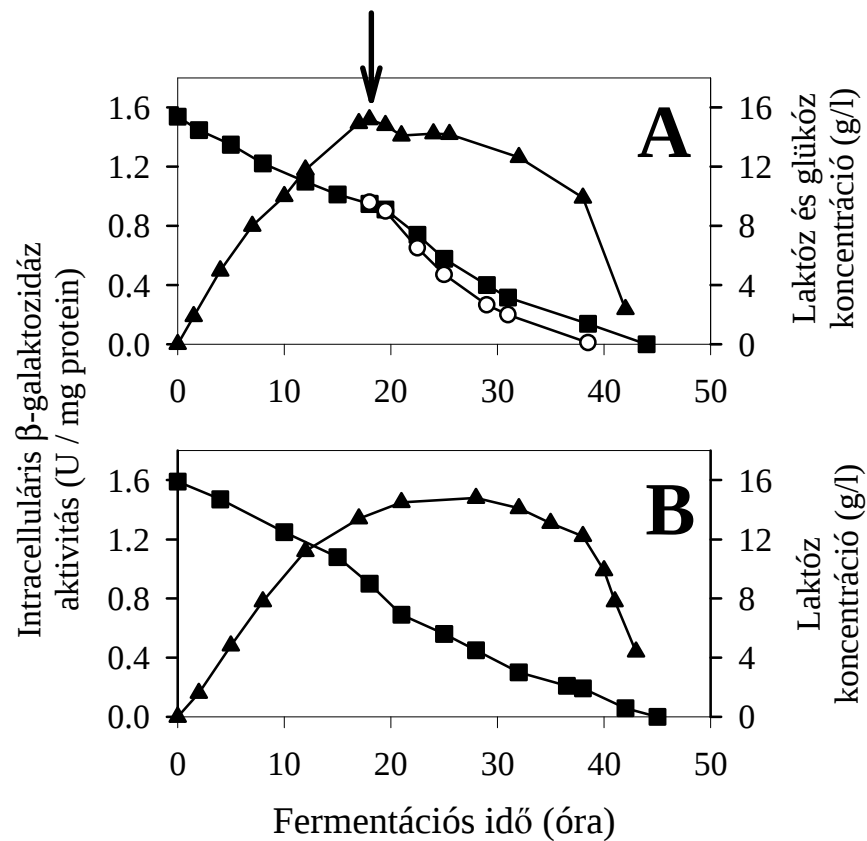
Ha a két leghatékonyabb stimulátor (D-galaktóz, L-arabinóz) egyikét szuboptimális koncentrációban alkalmaztuk, a létrejött, maximálisnál kisebb aktivitás a másik induktorral megnövelhető volt, és *vice versa* ($p < 0,1\%$). A maximális enzimaktivitás értékek azonban nem fokozhatók tovább a másik monoszachariddal ($p < 0,1\%$).

A laktóz másik monomerje, a D-glükóz a D-galaktózzal ellentétes hatást váltott ki: hozzáadását követően a laktózon nőtt tenyészetek bGal aktivitása azonnal csökkenni kezdett, és pár órán belül a detektálási határérték alá csökkent. A glükóz kb. kétharmadának elfogyása után az aktivitás újra megjelent, és az eredeti maximum közelébe emelkedett (**16. ábra**). A D-glükóz tehát gátolta a bGal aktivitás megjelenését, de egyedül ez alapján még nem lehetett eldönteni, hogy a jelenség hátterében az induktor – a laktóz – felvételének gátlása (inhibíció), vagy pedig CCR – a transzkripció gátlása – áll-e. A kétféle hatás elkülönítésére a *creA44* nullmutáns *A. nidulans* törzsszel is elvégeztük a D-glükóz ráadagolásos fermentációt. A vad típushoz alapvetően hasonló növekedési és cukor-felvételi kinetika mellett a bGal aktivitás időprofilja és értékei a kontrollhoz képest változatlanok maradtak (**17. ábra**).



16. ábra. A: *A. nidulans* WT törzs intracelluláris β-galaktoszidáz aktivitásának időprofilja laktóz-AMM táptalajon, D-glükóz ráadagolás (nyíllal jelezve) során. B: kontroll tenyészet (D-glükóz adagolás nélkül). Szimbólumok: aktuális laktóz koncentráció (■), aktuális D-glükóz koncentráció (○), intracelluláris β-galaktoszidáz aktivitás (▲)

D-galaktóz stimuláció során a *creA44* törzsben a vad típusnál szignifikánsan ($p < 0,1$ %) magasabb ($1,72 \pm 0,13$ U/mg protein) maximális enzimaktivitást mértünk, és magasabb ($1,61 \pm 0,11$ U/mg protein) értékeket kaptunk a *creA^{d30}* törzsben is (I. táblázat). Ennek oka, hogy a stimuláció a *creA* mutánsokban – szemben a vad típussal – 8 mM koncentrációnál nem ért el telítési értéket, hanem tovább nőtt 11 mM-ig. A D-xilóz illetve L-arabinóz által kiváltott bGal stimuláció is szignifikánsan ($p < 0,1$ %) magasabb aktivitásokat eredményezett a *creA*-hiányos törzsben (I. táblázat), vagyis a CreA nemcsak a D-galaktóz, hanem a hemicellulóz-pentózok általi enzimaktivitás-stimulációt is részlegesen gátolta.

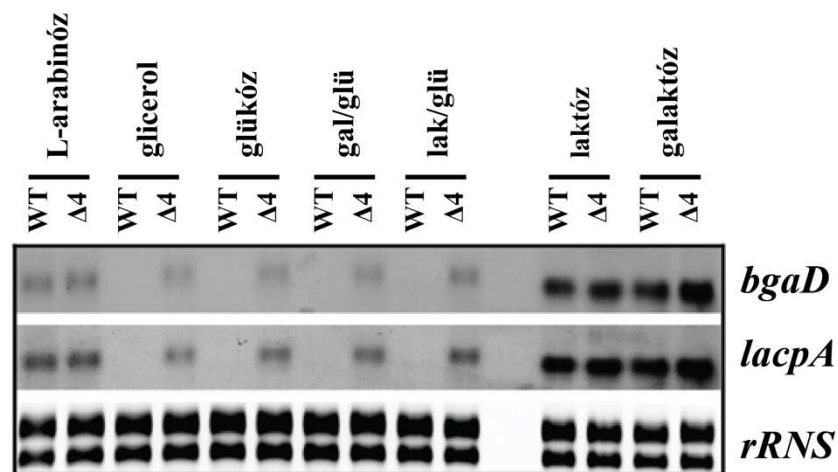


17. ábra. A: *A. nidulans creAA4* mutáns intracelluláris β-galaktoszidáz aktivitásának laktóz-AMM időprofilja, D-glükóz ráadagolás (nyíllal jelölve) során. B: kontroll tenyészet. Szimbólumok: aktuális laktóz koncentráció (■), D-glükóz koncentráció (○), intracelluláris β-galaktoszidáz aktivitás (▲)

A vad típusú törzs bGal aktivitását D-galaktózzal D-glükóz jelenlétében stimulálva a maximális érték kb. 30 %-al csökkent (**II. táblázat**), igazolva a D-galaktóz-stimuláció D-glükóz általi részleges gátlását. A *bgaD* gén viszont nem fejeződött ki, vagyis a D-glükóz represszálja a D-galaktóz (és a laktóz) indukciós hatását (**18. ábra**). Ez az ellentmondás előrevetítette: több bGal aktivitással (is) rendelkező enzim együtt alakíthatja ki az *A. nidulans* ONPG-hidrolizáló potenciálját. Hasonlóképpen magyarázható, hogy a karbon katabolit derepresszált mutánsokban a bGal aktivitás D-galaktóz általi stimulációját a D-glükóz semmilyen koncentrációban nem befolyásolta (**I-II. táblázat**), míg a *bgaD* expresszióját részlegesen represszálta (**18. ábra**). Annak eldöntésére, hogy a bGal aktivitás önmagában is CreA-függő CCR alatt áll-e, a mutáns törzsek enzimaktivitását D-glükózon és glicerinen teszteltük. Mindkét törzs a laktózon kapott érték kb. 17 %-át kitevő, jól mérhető aktivitást ($0,12 \pm 0,01$ U / mg protein) mutatott. Ezzel összhangban a derepresszált törzsek minden vizsgált szénforráson, így D-glükózon is gyenge, de egyértelmű *bgaD*-kifejeződést mutattak, míg a D-galaktóz és a laktóz a vad típushoz hasonló erős expressziót eredményezett (**18. ábra**).

	Vad típus		<i>creAΔ4</i>	
	$\frac{K_{\max}}{K_m}$	$V_{\max}$	$\frac{K_{\max}}{K_m}$	$V_{\max}$
glükóz + galaktóz	-	0,70	-	1,71
	-		-	

II. táblázat. A β -galaktozidáz aktivitás stimulációja D-galaktózzal, D-glükóz jelenlétében, *A. nidulans* WT és $\Delta 4$ mutáns törzsekben. $V_{\max}$: maximális specifikus enzimaktivitás (U/mg protein); $K_{\max}$: a maximális aktivitáshoz szükséges inducer koncentráció (mM); K_m : a maximális aktivitás feléhez tartozó inducer koncentráció (mM).



18. ábra. A *bgaD* (intracelluláris β -galaktozidáz) és a *lacpA* (laktóz permeáz) gének kifejeződésének szénforrás függése *A. nidulans* WT (R21) és karbon katabolit derepresszált ($\Delta 4$) mutáns törzsekben.

Az expressziós analízist a *lacpA* génnel is elvégeztük. Munkahipotézisünket, miszerint a laktóz permeáz/hidroláz funkciók együtt szabályozódnak, az eredmények vad típusban és karbon katabolit derepresszált törzsben is igazolták (18. ábra).

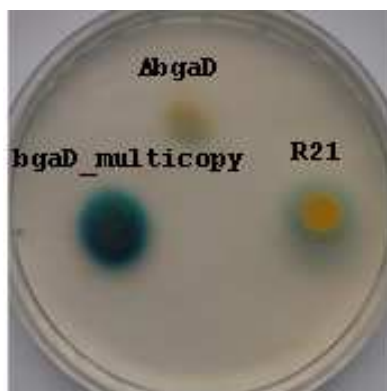
A *bgaD* és *lacpA* géneket illetve cDNS-üket is megszekvenáltuk – utóbbihoz laktózon nőtt tenyészet RNS-ét használtuk templáknént. A *bgaD* gén *in silico* translációja egy 1043 aminosav hosszúságú, 117,1 kDal tömegű peptidet eredményez, ami jól korrelál a kísérletesen meghatározott 120 kDal mérettel (FANTES és ROBERTS 1973, DÍAZ és mtsai 1996). A *lacpA*-transzláció esetében ezek a paraméterek 532 aminosav és 59.1 kDal tömeg – tipikusak egy 12-transzmembrán doménes MFS proteinre nézve.

A klasszikus laktóz anyagcsere mutánsok egyik csoportja a laktóz felvételében sérült (*lacA*-csoport), a mutáció molekuláris háttere azonban nem ismert. A *lacpA* gént és további 800 bp promóter régiót ezért egy független, *lacA1* mutációt (ROBERTS 1963) hordozó törzsben (A58) is megszekvenáltuk. A szekvenciák tökéletesen megegyeztek egymással és a vad típusú

lacpA szekvenciával is, jelezve, a *lacA1* mutáció nem a *lacpA* génhez kötődik. Emiatt a *lacpA* gént formális funkcionális elemzésnek vetettük alá. Munkahipotézisünk szerint a *lacpA* által kódolt fehérje egy élettanilag is releváns laktóz permeáz.

A génkiütésekhez *nkuA*-hiányos mutánt használtunk; a törzs nem rendelkezik a DNS mindkét láncát érintő törések javításának képességével²⁰, így a transzformációk hatékonysága jelentősen megnő. A *lacpA* illetve *bgaD* hiányát a genomban PCR segítségével bizonyítottuk.

A génklaszter hidroláz tagját *bgaD*-hiánymutáns fenotípus elemzése során vizsgáltuk. Agarral szilárdított laktóz tartalmú MM-ra X-Gal-t²¹ (5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktopiranozid) rétegeztünk, melynek hidrolízise kék színnel jelzi a bGal reakciót. A vad típusú és a retranszformáns törzsek telepei elkékültek, a *bgaD*-hiánymutáns tenyészet színtelen maradt (19. A. ábra).



19. A. ábra. *A. nidulans* törzsek növekedése szilárd laktóz-AMM táptalajon.

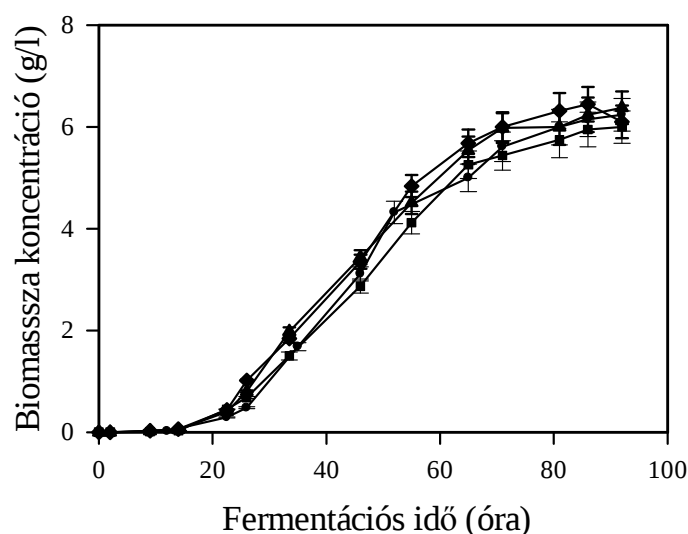
A *bgaD*-retranszformáció során is képződtek többkópiás törzsek; a *bgaD* kópiaszámát Southern hibridizációval állapítottuk meg. Noha az X-Gal alapú analízis nem kvantitatív, a kék szín mégis jól láthatóan hamarabb jelent meg és intenzívebb volt e törzsek esetében, bGal túltermelődést jelezve. Kizárólagos D-galaktóz szénforráson hasonló eredményeket kaptunk. Laktóz-minimál folyékony tenyészetben azonban a *bgaD*-hiányos és a *bgaD*-túltermelő mutánsok is ugyanúgy nőttek, mint a vad típus (19. B. ábra).

Noha a *bgaD* terméke látszólag az egyetlen enzim az *A. nidulans*-ban, amely képes a bGal-specifikus mesterséges szubsztrátot, az X-Galt hasítani, a *bgaD* a laktóz hasznosítás szempontjából nélkülözhetőnek bizonyult. Ez eltér a *K. lactis* élesztőtől, ahol a LAC4/LAC12 génklaszter – a *bgaD/lacpA* ortológjai – a laktózhasznosítás szükséges és elégséges genetikai

²⁰ Az angol szaknyelvben 'Non-homologous end joining activity'-ként ismert.

²¹ Az ONPG és az X-Gal szintelen laktóz analógok, a β -galaktozidáz szubsztrátumai. Az X-Gal hidrolízis kék színű terméke vízben nem oldódik, a színeképződés nem kvantitatív. Az ONPG hidrolízis sárga terméke vízzoldékony, a színeképződés kvantitatív. Előbbit a β -galaktozidáz gén, vagy annak promótere által vezérelt génexpresszió demonstrálására, utóbbit enzimaktivitás mérésére használják.

hátterét jelenti (SHEETZ és DICKSON 1981; RILEY és mtsai 1987; GÖDECKE és mtsai 1991; LODI és DONNINI 2005).

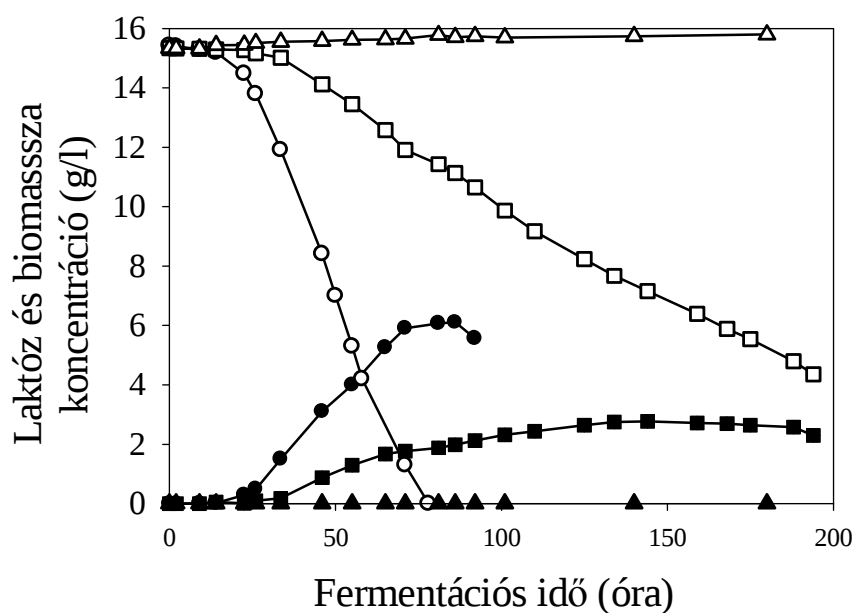


19. B. ábra. *A. nidulans* törzsek növekedése folyékony laktóz-AMM táptalajon. Szimbólumok: (●): WT; (▲): *bgaD*-hiánymutáns; (■): *bgaD*-retranszformáns (1 kópia); (◆): *bgaD*-retranszformáns (3 kópia).

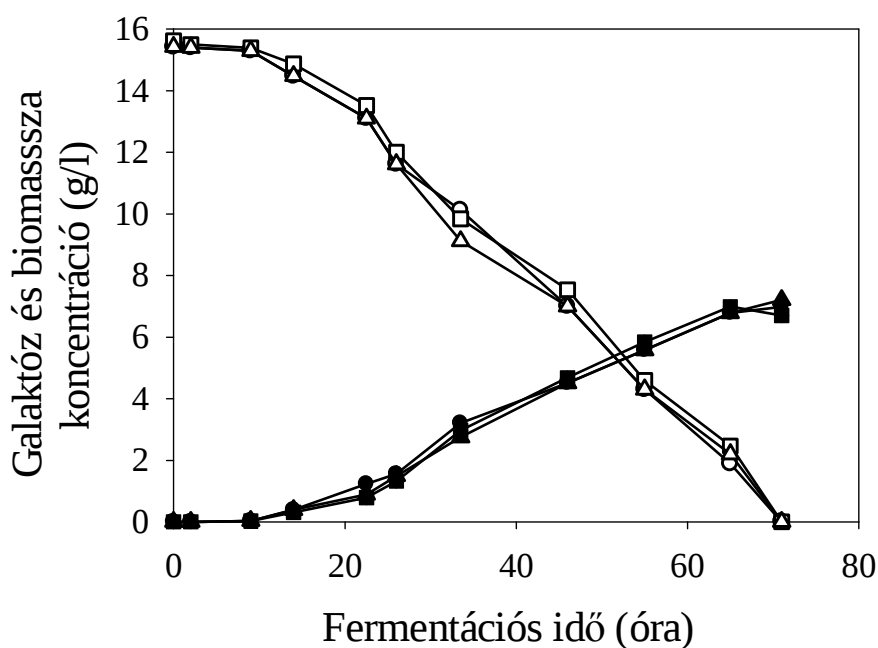
Pontos magyarázatot még nem tudunk a jelenségre adni, de két tény említést érdemel: (1) a laktóz a legfiatalabb cukor a természetben, az emlősökkel együtt, a GH2/MFS klaszter kialakulása után több száz millió évvel jelent meg. A klaszter eredeti funkciója ezért nem a laktóz lebontása, hanem a β -galaktozid és/vagy α -L-arabinopiranozid egységek felszabadítása lehetett növényi vagy fungális eredetű polimerekből a szaprofita vagy növénypatogén gombák számára. (2) nem zárható ki, hogy az *A. nidulans* egyenlőre még ismeretlen, intracelluláris bGal aktivitással bíró enzime(i) képes(ek) fenntartani a növekedést laktózon a *bgaD*-hiányos mutánsokban is.

A *lacpA* hiánymutáns fenotípus elemzése – melyet laborfermentorban, laktóz-AMM táptalajon végeztünk – kimutatta: a *lacpA* gén élettanilag releváns laktóz permeázt kódol, mivel a hiánymutáns növekedése jelentősen visszaesett a vad típusú vagy a retranszformáns kontrollhoz képest (utóbbi két törzs növekedése hasonló). A fenotípus azonban nem abszolút: a hiánymutáns képes laktóz felvételére és a cukorból új biomassza létrehozására (20. ábra).

A „klasszikus” *A. nidulans lacA1* mutáns törzs viszont abszolút laktóz fenotípussal rendelkezik, nem képes a felvételére, nem csírázik ki és nem képez rajta biomasszát. A többi vizsgált szénforráson (D-galaktóz [21. ábra], D-glükóz, D-xilóz, L-arabinóz, glicerol) a gombatörzsek szénforrás és biomassza időprofilja megegyezők voltak, vagyis a *lacpA* élettani szerepe specifikus a laktóz felvételére.



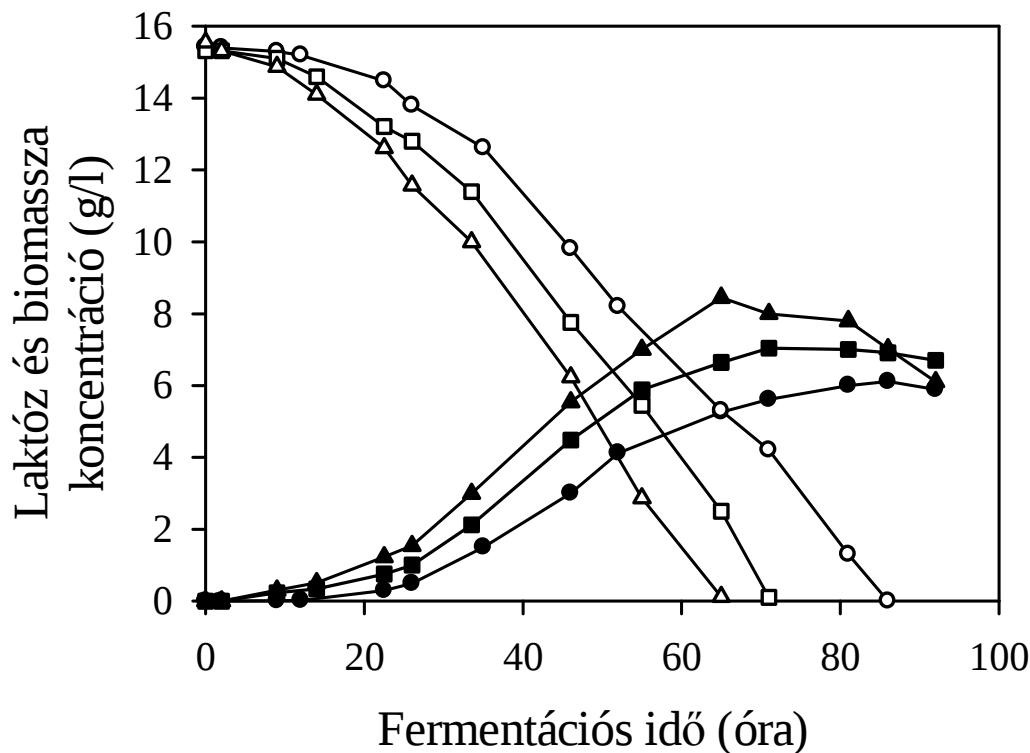
20. ábra. *A. nidulans* törzsek laktóz-AMM időprofiljai. Nyitott szimbólumok: aktuális laktóz koncentráció. Tömött szimbólumok: biomassza koncentráció. Háromszög: *lacA1* mutáns; négyzet: $\Delta lacpA$ mutáns, kör: WT (kontroll).



21. ábra. *A. nidulans* törzsek D-galaktóz-AMM időprofiljai. Nyitott szimbólumok: aktuális D-galaktóz koncentráció. Tömött szimbólumok: biomassza koncentráció. Háromszög: *lacA1* mutáns; négyzet: $\Delta lacpA$ mutáns, kör: WT (kontroll).

A *lacpA* visszatranszformálása során az egykópiás izolátumok mellett egynél nagyobb kópiaszámú törzsek is kialakultak (a kópiaszámot itt is Southern hibridizációval határoztuk meg). A többkópiás törzsek laktóz-minimál táptalajon szignifikánsan ($p < 0,1$ %) gyorsabban vették fel a cukrot és szignifikánsan ($p < 0,1$ %) nagyobb biomasszát képeztek a szénforrás

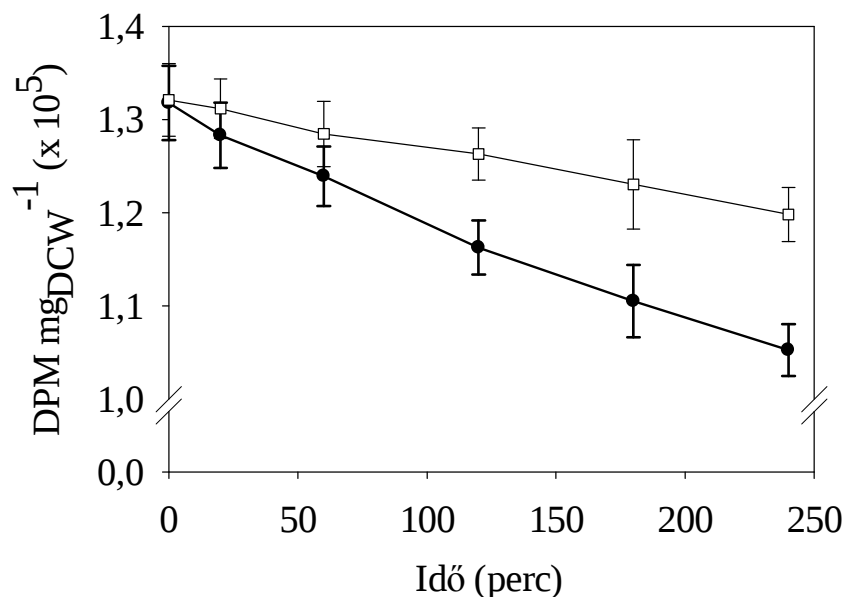
elfogyásáig. Mindez arányos volt a kópiaszámmal: a 2 db extra kópiát tartalmazó törzs gyorsabban nőtt az 1 db extra kópiát tartalmazónál. Ezzel kísérletesen bizonyítottuk, hogy az *A. nidulans* gomba laktóz lebontása során a transzport sebességmeghatározó lépés (22. ábra).



22. ábra. *A. nidulans* törzsek laktóz-AMM időprofiljai. Nyitott szimbólumok: aktuális laktóz koncentráció. Tömött szimbólumok: biomassza koncentráció. Háromszög: *lacpA* retranzsformáns (3 kópia); négyzet: *lacpA* retranzsformáns (2 kópia); kör: WT (kontroll).

A *lacpA*-hiányos mutánsok laktózfelvételét közvetlenül, ^{14}C -el jelölt laktóz révén²² vizsgáltuk tovább. A konidiospórákat laktózt kizárólagos szénforrásként tartalmazó minimál táptalajon növesztettük ki, majd jelölt laktózt is tartalmazó táptalajba mostuk át őket. A szénforrás felvétel azonnal megindult. A *lacpA*-hiányos mutáns felvételi rátája szignifikánsan kisebb volt a vad típusú illetve a retranzsformáns kontrollokénál, melyek laktózfelvételi rátái megegyeztek (23. ábra). Amikor a konidiospórákat kizárólagos szénforrásként glicerolt tartalmazó minimál táptalajon növesztettük ki, a kontroll tenyészeteknek kb. 1 h, a *lacpA*-mutánsnak mintegy 3 h adaptációs időre volt szükségük a laktózfelvétel beindulásához. Az eredményekből egyértelműen következik, hogy laktózhasznosítása során az *A. nidulans*-ban egynél több laktóz permeáz működik, ezek egyike a LacpA. Ezzel munkahipotézisünket – mely szerint a *lacpA* géntermék egy élettanilag releváns laktóz permeáz – igazolni tudtuk.

²² Specifikáció: D-glükóz -1- ^{14}C laktóz, 60 mCi/mmol (1 Ci = $3,7 \cdot 10^{10}$ Bq = 37 GBq).



23. ábra. *A. nidulans* WT (●) és *lacpA*-mutáns (□) laktózfelvetele ¹⁴C jelölt laktózt is tartalmazó AMM-on. A teljes kiindulási laktóz koncentráció 100 μ M volt.

A laktóz transzporterek differenciált jellemzéséhez a felvételt három különböző szubsztrátum koncentráció mellett tanulmányoztuk (III. táblázat). Mint látható, a laktóz koncentráció csökkenésével a LacpA hozzájárulása fokozódott: 2 mM külső koncentrációnál alig 20 %, 100 μ M-nál > 65 % volt. Ez azt sugallta, hogy a még ismeretlen laktóz permeáz a LacpA-nál kisebb affinitással bír a szubsztrátum iránt. A továbbiakban a második laktóz permeáz kódoló gén azonosítását és jellemzését ismertetjük.

Gombatörzs	Laktóz koncentráció (mM)	Specifikus felvételi ráta (μ M/min/mg DCW)
	0,1	0,21 $\pm$ 0,02
vad típus (R21)	0,5	0,29 $\pm$ 0,03
	2	0,34 $\pm$ 0,025
	0,1	0,07 $\pm$ 0,005
Δ LacpA mutáns	0,5	0,20 $\pm$ 0,015
	2	0,28 $\pm$ 0,03

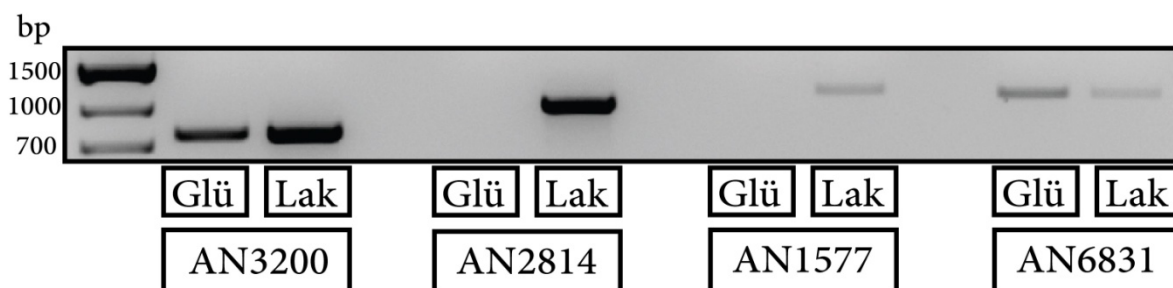
III. táblázat. Laktóz felvétel a WT és *lacpA*-hiányos *A. nidulans* törzsekben.

4.1.1.2. A *lacpB* gén azonosítása és jellemzése

Az *A. nidulans* genom száznál is több feltételezett MFS-cukor transzporter fehérjét tartalmaz (WORTMAN és mtsai 2009). A legvalószínűbb laktóz transzporter-jelölt kiválasztása céljából 31 db, publikált szekvenciával rendelkező *Aspergillus* faj MFS-proteinjeinek filogenetikai kapcsolatait elemeztük. A LacpA-ortológokat és a LacpA-hoz leginkább hasonló strukturális paralógokat kódoló géneket nyilvános nukleotid adatbázisokból²³ TBLASTN révén töltöttük le. Összesen 92 db, LacpA-hoz hasonló protein szekvenciával dolgoztunk.

A 92 db proteinből Maximum Likelihood alapú filogenetikai törzsfát építettünk (**1. melléklet**). A LacpA-hoz szerkezetileg leginkább hasonlító 7 db *Aspergillus* paralóg között 3 db *A. nidulans* MFS-protein volt (AN1577, AN6831 és AN2814 lókuszok). A három proteint potenciális laktóz permeázoknak „neveztük ki”, és kísérletes vizsgálatok tárgyává tettük őket.

A három gén kifejeződését laktóz illetve negatív kontrollként D-glükóz jelenlétében vizsgáltuk, Reverz Transzkriptáz PCR-rel (**24. ábra**). Az AN2814 lókusz által specifikált gén laktózon sokkal erősebben fejeződött ki, mint D-glükózon. Az AN1577 lókuszon lévő gén gyengébb szignált adott, míg a harmadik paralóg gén (AN6831 lókusz) inkább D-glükózon fejeződött ki, mintsem laktózon. Összefoglalóan, az *in silico* vizsgálatok illetve az expresziós előkísérletek alapján az AN2814 lókusz által jelölt LacpA-paralóg MFS-fehérjét kódoló gén tűnt a legvalószínűbb laktóz permeáz transzporternek *A. nidulans*-ban. A feltételezett laktóz permeáz gént *lacpB*-nek neveztük el.

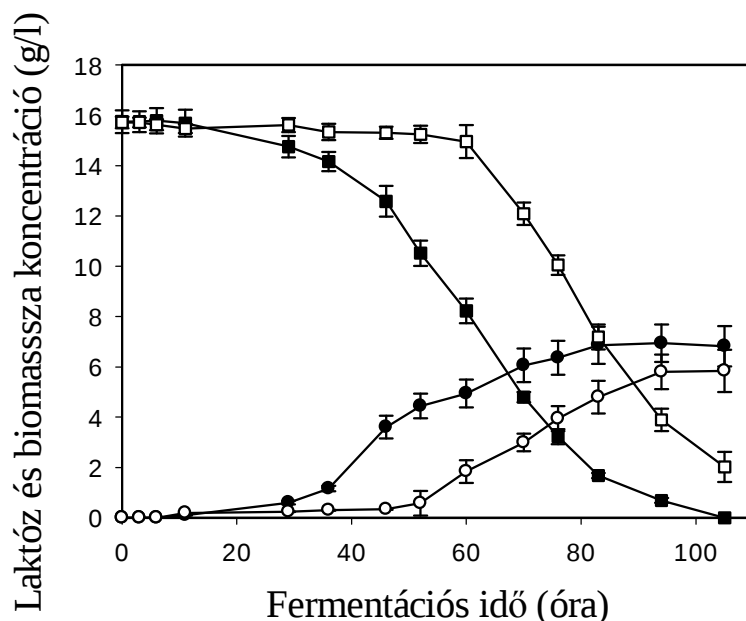


24. ábra. Feltételezett laktóz permeáz gének kifejeződése *A. nidulans*-ban. Az AN3200 lókusz a *bgaD/lacpA* génklaszter közé ékelődve található (lásd 13. ábra), a gén kifejeződése pedig minden vizsgált szénforráson, közte D-glükózon is konstitutív, így kontrollként használható.

A *lacpB* funkcionális analízise céljából a gént kiütöttük, majd visszatranszformáltuk. Az utóbbi művelet során 1, 2 és 5 *lacpB*-kópiát tartalmazó mutánsok is kialakultak (Southern-hibridizációval bizonyítva). A mutánsokat kontrollált körülmények között (állandó pH, DO, hőmérséklet), laborfermentorokban tenyésztve összehasonlító fenotípus-elemzésnek vetettük

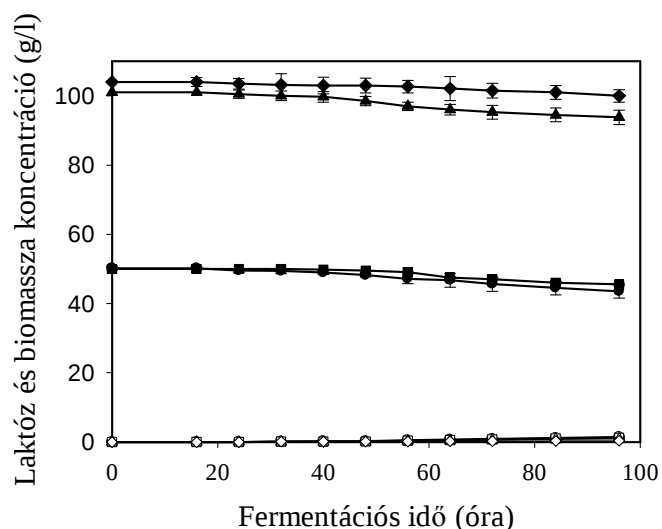
²³ National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) illetve US Department of Energy Joint Genome Institute (JGI; <http://jgi.doe.gov/>).

alá; először a *lacpB*-hiánymutáns *A. nidulans* törzs laktóz fenotípusát tanulmányoztuk (25. ábra).



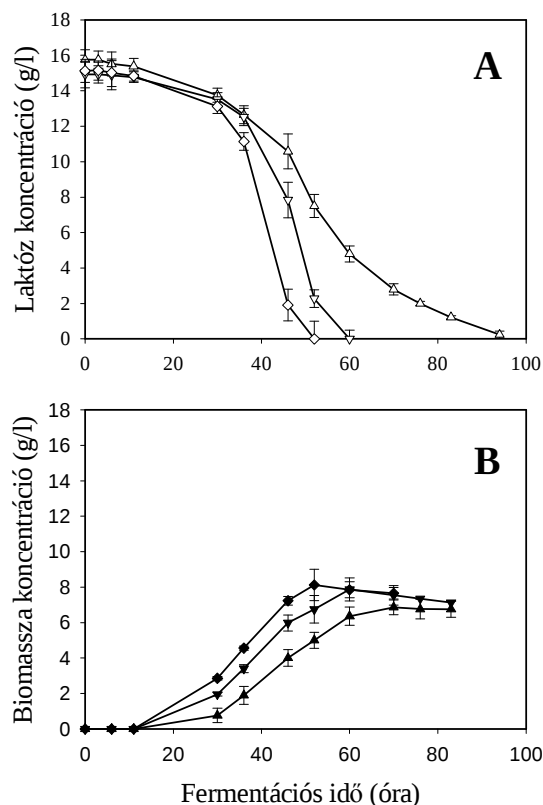
25. ábra. *A. nidulans* törzsek laktóz-AMM időprofiljai. Nyitott szimbólumok: $\Delta lacpB$ mutáns. Tömött szimbólumok: WT (kontroll). Négyzet: aktuális laktóz koncentráció. Kör: biomassa koncentráció. A tenyészeteket konidiospórákról indítottuk.

A *lacpB* hiánya a fermentáció minden mintavételi pontjára vonatkozóan szignifikánsan ($p < 0,1\%$) visszavetette a laktóz felvételt és a biomassa képződést. A fermentáció első 60 órájában a mutáns törzs konidiospórái nem csíráztak ki, míg a vad típusú (illetve 1 kópiában visszatranszformált mutánsban) a laktóz felvétel az első nap végén megindul. D-glükózon és D-galaktózon nem találtunk érdemi különbségeket a *lacpB* mutáns és a kontroll törzsek fenotípusa között. A harmadik fermentációs napon a *lacpB* tenyészet is növekedésnek indult, maximális laktóz felvételi rátája nem tért el szignifikánsan a kontrolltól ($p < 0,1\%$). A maximális biomassa koncentráció szignifikánsan ($p < 0,1\%$) elmaradt a referencia törzsektől. A késleltetett laktózfelvétel és biomassa produkció kinetikája nem függ a kiindulási laktóz koncentrációtól, mivel 1 g/l és 20 g/l ($\sim 3 - 58$ mM) értékek között jellegükben hasonlóan alakultak a fermentációk. Ennél magasabb kiindulási laktóz koncentrációknál (50 és 100 g/l, $\sim 0,15$ és $0,3$ mM) már a vad típusú törzs sem tudott növekedésnek indulni, ami azt mutatja, az *A. nidulans* gyenge tűrőképességgel rendelkezik a magas laktózkoncentrációval szemben (26. ábra). Más *Aspergillus* fajok ennél jóval magasabb cukorkoncentrációkat is elviselnek az ipari fermentációk során (pl. citromsav előállítás – KUBICEK és KARAFFA 2010), ráadásul a laktóz ozmotikusan az egyik legkevésbé aktív természetes cukor (MUSTAPHA és mtsai 1997).



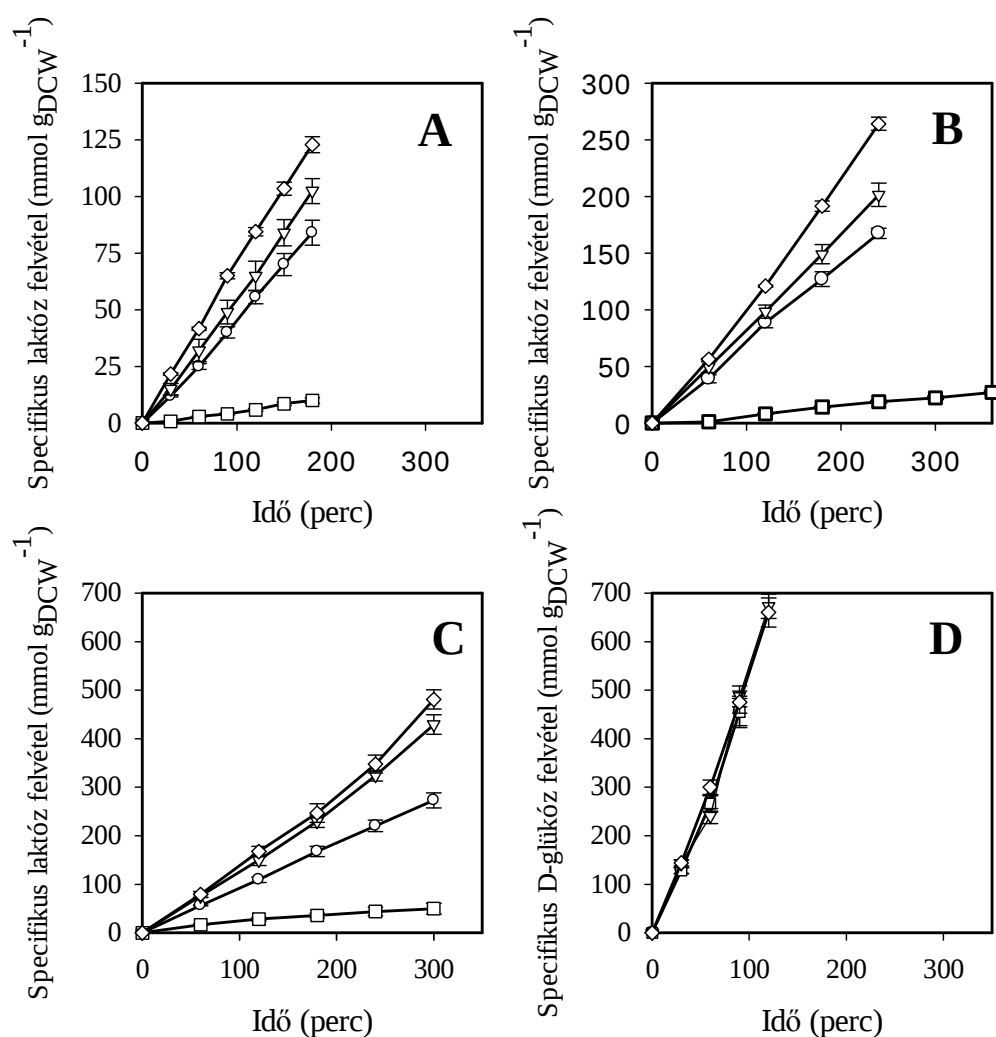
26. ábra. *A. nidulans* törzsek laktóz-AMM időprofiljai. Nyitott szimbólumok: biomassza koncentráció. Tömött szimbólumok: aktuális laktóz koncentráció. Kör és négyzet: WT (kontroll) illetve $\Delta lacpB$ mutáns 50 g/l kiindulási laktóz koncentrációnál. Háromszög és rombusz: WT (kontroll) illetve $\Delta lacpB$ mutáns 100 g/l kiindulási laktóz koncentrációnál.

A. nidulans-ban a laktózanyagcsere sebességhatározó lépése a felvétel. Ennek megfelelően a *lacpB* kópiaszáma – hasonlóan a *lacpA*-hoz – arányos a laktózfelvételi és biomassza produkciós potenciállal. Az egykópiás retranszformáns statisztikai hibán belül a vad típushoz hasonlóan viselkedett (27. ábra).



27. ábra. *A. nidulans lacpB*-retranszformánsok laktóz-AMM időprofiljai. Nyitott szimbólumok: biomassza. Tömött szimbólumok: laktóz. Négyzet: 1 kópia; kör: 2 kópia; háromszög: 5 kópia.

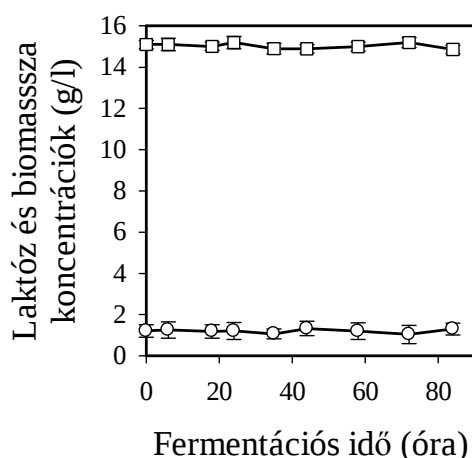
Az eredmények azt sugallják, hogy az *A. nidulans* LacpB – a LacpA-hoz hasonlóan – élettanilag is releváns laktóz transzporter. Ennek közvetlen demonstrálása céljából a mutáns törzsek glicerinen szénforráson kinövesztett micéliumát laktóz jelenlétében inkubáltuk, és rövid idő-intervallumonként megmértük a cukor aktuális koncentrációját (**28. ábra**). A vad típusú törzs specifikus laktózfelvételi rátája minden vizsgált koncentrációnál meghaladta a *lacpB*-hiánymutánsét ($p < 0,1 \%$), de alacsonyabb volt a többkópiás mutánsokétól ($p < 0,1 \%$). Az utóbbiak közül az öt *lacpB*-kópiát tartalmazó törzs gyorsabban ($p < 1 \%$) vette fel a laktózt, mint a kétkópiás. Más vizsgált szénforrásokon (D-galaktóz, D-glükóz – utóbbi **28. D. ábra**) nem volt szignifikáns különbség a mutánsok cukor felvételi rátái között, jelezve, a LacpB működése specifikus a laktózra.



28. ábra. *A. nidulans* WT törzs (○), *lacpB*-hiánymutáns (□) illetve 2 kópiás (Δ) és 5 kópiás (◇) *lacpB*-retranszformánsok specifikus laktóz felvétele. A: 0,2 mM laktóz; B: 0,5 mM laktóz; C: 2 mM laktóz; D: 2 mM D-glükóz (kontroll). Az egyes panelek 'Y' tengelyléptékei eltérőek!

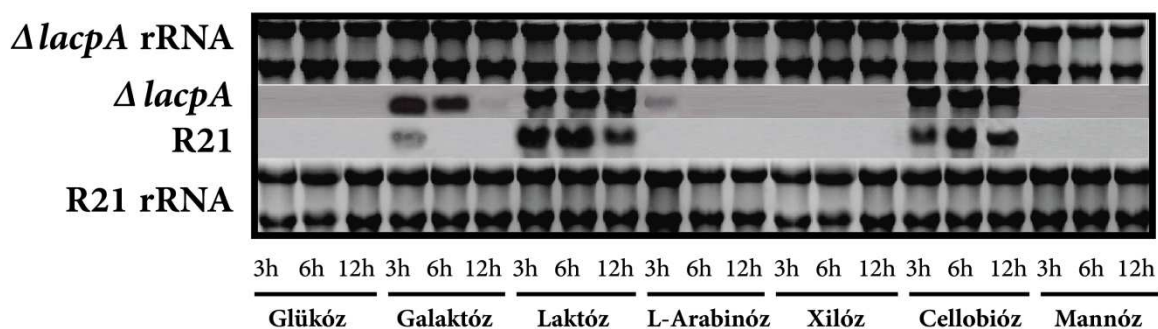
A LacpA élettanilag releváns permeáz, de a laktóz transzport csak egy részéért felelős. Annak megválaszolására, hogy a LacpB mennyiben felelős a maradék laktóz transzportjáért, a

lacpB-t *lacpA*-hiányos genetikai háttérben ütöttük ki, *lacpA/lacpB* kettős mutánst hozva így létre. A fenotípus-elemzés azt mutatta, a kettős mutáns képtelen csírázni laktózon, sőt egyéb szénforráson kinövesztett, majd laktóz-minimál táptalajra átmosott micéliuma sem képes a laktóz felvételére és belőle új biomassza létrehozására (29. ábra). Mindez azt jelenti, hogy az *A. nidulans* laktózfelvétele bizonyíthatóan két komponensű: a LacpA és a LacpB alkotja. A *K. lactis*-ben a Lac12 gén az egyetlen élettanilag releváns laktóz permeáz (RILEY és mtsai 1987), de újfent említést érdemel, hogy az MFS-cukortranszporterek száma az említett élesztőfajban húsz, míg az *A. nidulans*-ban száznál is több. Innen nézve az *A. nidulans* laktóz felvétele sem nevezhető redundánsnak. Fontos megjegyezni: állításunk csak az élettanilag releváns laktóz permeázokra vonatkozik. Nem zárhatjuk ki ugyanis, hogy léteznek olyan további permeázok, melyek rendelkeznek a laktóz sejtmembránon keresztüli transzportjának képességével, de a vizsgált (standard) körülmények között nem működnek.

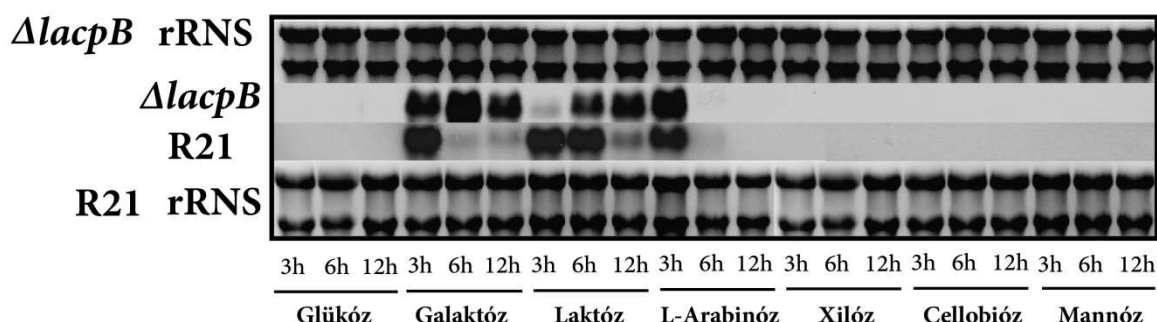


29. ábra. *A. nidulans lacpA/lacpB*-kettős mutánsok laktóz-AMM időprofiljai. (○): biomassza koncentráció. (□): laktóz koncentráció. A fermentációt micéliális inokulumról indítottuk.

A *lacpB* laktózon gyorsan (3 h) és erősen indukálódik. D-galaktózon már a korai (3 h) expresszió is mérsékeltebb, a későbbi (6 h illetve 12 h) mérési pontokon pedig nem tudtunk transzkriptumot detektálni (30. ábra). Ugyanebben a kísérletben a *lacpA* ugyanolyan erősen reagált D-galaktózra, mint laktózra, bár a későbbi mérési pontokon lecsökkent a transzkriptum mennyisége (31. ábra). További különbség a két *lacp*-gén kifejeződése között az L-arabinózra adott expressziós válasz: a *lacpA* kifejeződött rajta, a *lacpB* nem. D-glükózon, D-xilózon és D-mannózon (utóbbi a D-glükóz C-2 epimerje) egyik mintavételi ponton sem tudtunk transzkriptumot detektálni (30-31. ábrák).



30. ábra. Az *A. nidulans lacpB* gén transzkriptum analízise WT és $\Delta lacpA$ háttérben.

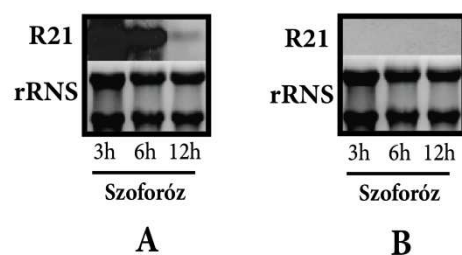


31. ábra. Az *A. nidulans lacpA* gén transzkriptum analízise WT és $\Delta lacpB$ háttérben.

A *lacpA* és *lacpB* együtt felelősek az *A. nidulans* laktóz felvételéért. A **30-31. ábrák** szerint a két gén expressziója befolyásolja egymást. Az egyik *lacp* expressziója a másik *lacp*-hiánymutáns törzsben azt mutatja, hogy a D-galaktóz indukció hatása gyorsabb és erősebb lett mindkét permeázra nézve, a cellobióz indukciója a *lacpB* kifejeződésre szintén fokozódott. A laktóz indukciós hatása viszont nem tért el a vad típusétól. Ez is azt a hipotézist támaszthatja alá, miszerint a laktóz anyagcserében részt vevő gének/enzimek mintegy véletlenül képesek a laktóz transzportjára/hidrolízisére, és eredeti funkciójuk más – növényi vagy fungális eredetű – cukor-polimerek degradációjával volt kapcsolatos. Ezzel összhangban a *lacpB* expresszió cellobióz jelenlétében gyorsnak, erősnek és tartósnak bizonyult (**30. ábra**).

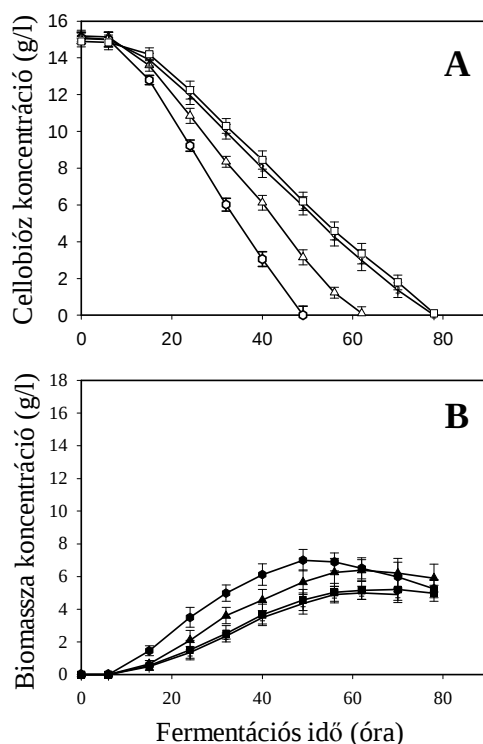
A *lacpB* (= AN2814) az *Aspergillus* adatbázisban²⁴ feltételezett cellobióz (4-O- β -D-glükopiranozil-D-glükóz) transzporterként került nyilvántartásba (CERQUEIRA és mtsai 2014), mint a *N. crassa* CDT-1 transzporter (lókus: NCU00801) ortológja. A *N. crassa* CDT-1 – élesztőben kifejeztetve – cellobiózt transzportált (GALAZKA és mtsai 2010). A cellobiózhoz hasonlóan úgyszintén *beta*-kötésű glükopiranoz dimer szoforóz (2-O- β -D-glükopiranozil-D-glükóz) szintén erős *lacpB*-induktornak bizonyult (**32. ábra**).

²⁴ <http://www.aspergillusgenome.org>



32. ábra. Az *A. nidulans* WT törzs *lacpB* (A) és *lacpA* (B) génjeinek expressziója

A szoforóz *T. reesei*-ben a cellulolitikus rendszer legerősebb induktora (STERNBERG és MANDELS 1980; SEIBOTH és mtsai 2007a). A *lacpB* transzkripciója is kapcsolatban állhat a lignocellulóz lebontással, mivel a *lacpA*, a *lacpB* és a *lacpA/lacpB* mutánsok is fenotípust mutatnak cellobiózon (33. ábra). *lacpA* hiányos háttérben a *lacpB* erősebben fejeződik ki (30. ábra), a cellobióz fogyaszt és a növekedés is szignifikánsan ($p < 0,1\%$ ill. $p < 1\%$) gyorsabb a kontrollnál. A *lacpB*-mutáció (egyedül vagy *lacpA*-mutációval együtt) hatása ezzel ellentétes: lassabb cellobióz felvétel és biomassa gyarapodás észlelhető ($p < 1\%$ mindkét vizsgálatnál). A *lacpB* géntermék tehát egy élettanilag is releváns cellobióz transzporter, az *A. nidulans* cellulolitikus rendszerének része. A cellobióz fenotípus azonban csak részleges, nem abszolút – a *lacp*-mutánsok csíráznak, növekszenek és spóráznak cellobiózon – vagyis a cellobióz transzportnak további, egyenlőre ismeretlen komponensei is vannak ebben a gombafajban.



33. ábra. *A. nidulans* WT, *lacpA*, *lacpB* és *lacpA/lacpB* mutánsok cellobióz-AMM időprofiljai. A: cellobióz koncentráció (üres szimbólumok). B: biomassa (töltött szimbólumok). kör: egykópiás *lacpB* retranszformáns; négyzet: *lacpA* mutáns; háromszög: *lacpB* mutáns; rombusz: *lacpA/lacpB* kettős mutáns.

4.1.2. A D-galaktóz lebontás oxido-reduktív útvonala *Aspergillus nidulans*-ban

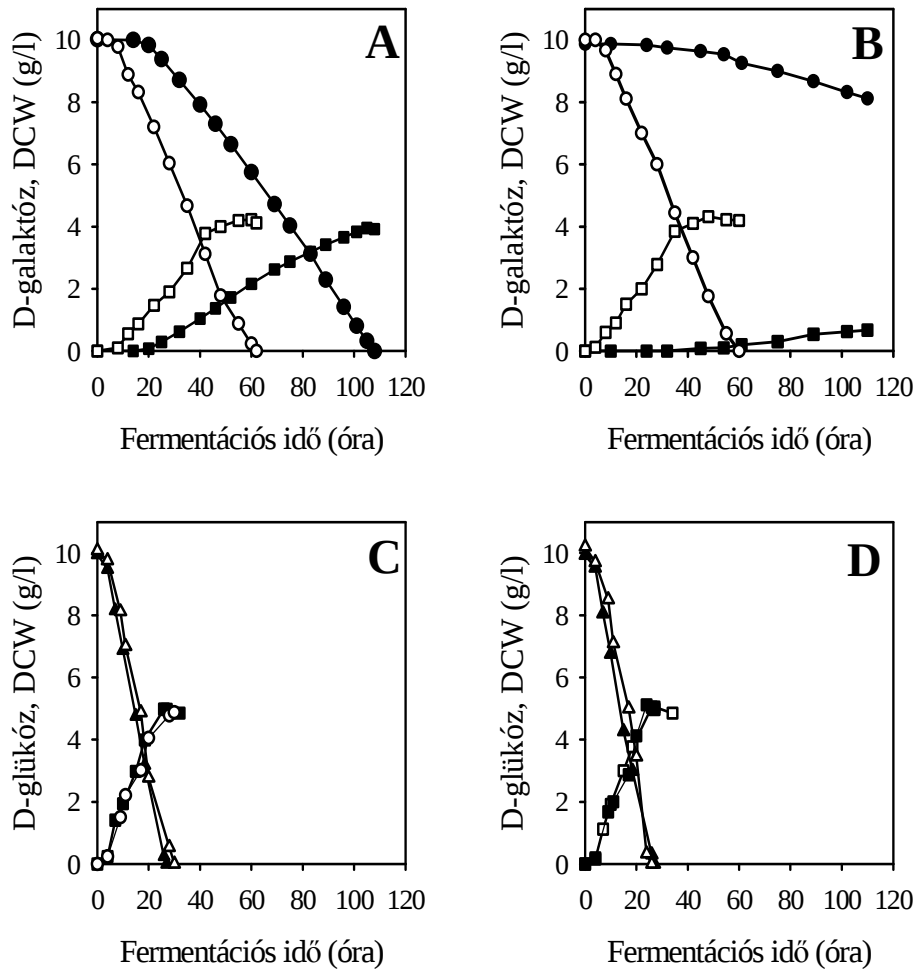
A *K. lactis* és az *A. nidulans* esetében a galaktokináz a Leloir-útvonal nélkülözhetetlen enzime (DICKSON és RILEY 1989; ROBERTS 1963; KÄFER 1977), hiányában a mutáns törzsek nem nőnek D-galaktózt kizárólagos szénforrásként tartalmazó táptalajon. A fentiekkel ellentétben megállapítottuk, az *A. nidulans gale9* (galaktokináz) mutánsok²⁵ felveszik és hasznosítják a D-galaktózt; szilárd táptalajon 3,5 – 4 nap alatt a teljes élelciklusukat befutják.

Az ellentmondás vizsgálata során kiderült: ROBERTS (1963) és KÄFER (1977) nitrátot használt kizárólagos nitrogénforrásként, mi pedig ammónium ionokat. Nitráton az *A. nidulans* galaktokináz mutáns valóban nem nőtt D-galaktózon (34. B. ábra), ammóniumon azonban az aniontól (szulfát, klorid, foszfát) függetlenül igen (34. A. ábra). ROBERTS (1963) alapján foszfáttal egészítettük ki a táptalajt, de ennek sem volt hatása a fenotípusra. A tenyészeteket pH 6,5-on tartottuk, így a kétféle nitrogénforrás által eredményezett kémhatás-különbség sem lehet oka a jelenségnek. D-Glükózon (34. C-D. ábra) és minden más vizsgált szénforráson (glicerol, acetát, D-fruktóz) a nitrogénforrás (ammónium vs. nitrát ionok) nem befolyásolta a tenyészet növekedését vagy szénforrás felvételét. A jelenség tehát a D-galaktóz anyagcserére specifikus, megjelenéséhez a *gale* lókuszt működésképtelensége illetve hiánya²⁶ szükséges. Munkahipotézisünk ez alapján: *A. nidulans*-ban a Leloir-útvonal mellett létezik egy alternatív D-galaktóz lebontási útvonal is, mely képes a szénvázat a lebontó anyagcsere fő útvonalaira terelni, s ezáltal a gomba növekedését fenntartani.

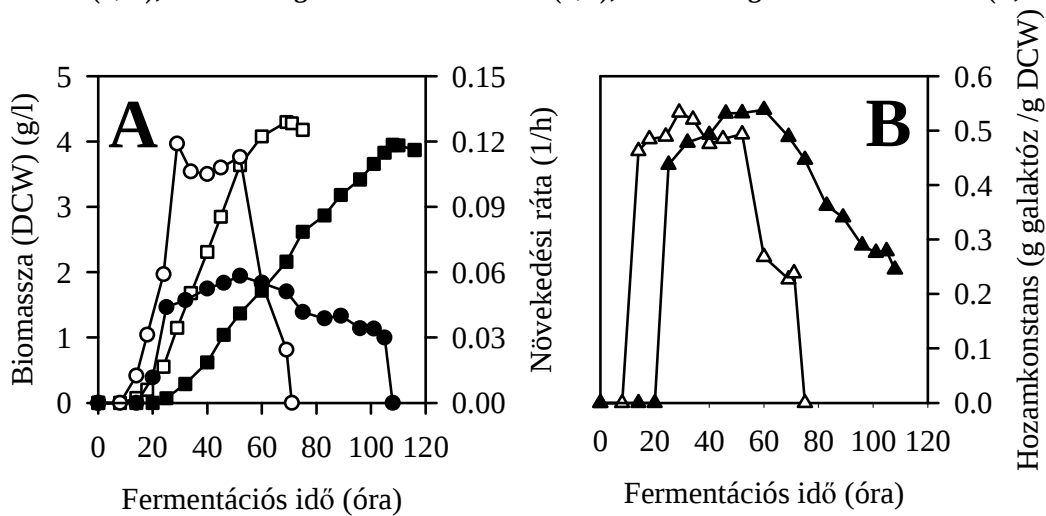
Az alternatív D-galaktóz lebontási útvonal nem képes teljesen pótolni a galaktokináz aktivitás hiányát a *gale* mutánsban; D-galaktózon a vad típusú tenyészet maximális specifikus növekedési rátája közel kétszerese a *gale* mutánsénak, és a szénforrásra vonatkozó biomassa hozamkonstansok is jelentősen eltérnek (35. A. ábra). A vad típusú törzsben a hozamkonstans időprofilja gyors felfutás után a D-galaktóz hasznosítás csaknem teljes időtartama alatt állandó, majd a stacioner fázisban gyorsan leesik (35. B. ábra). Ezzel szemben a *gale* mutáns hozamkonstans-profilja a kezdeti felfutás után folyamatosan hanyatló, a stacioner fázis elejére a maximális érték 60 %-ra esett vissza. Ez utóbbi hozamkonstans-időprofil jellegzetes példája az intracelluláris tartalék-metabolit feldúsulásnak. Más szénforrásokon (L-arabinóz, D-xilóz, D-glükóz, acetát, glicerol) a két törzs hozamkonstans-profiljai megegyeztek, kivéve laktózon, ahol kevésbé hangsúlyosan, de a D-galaktózon észlelthez hasonló tendenciákat tapasztaltunk.

²⁵ A „klasszikus” (random UV-mutagenézissel generált) *gale9* mutáció a galaktokináz gén kódoló régiójának 3' végénél egy bázispár-inszerció miatt kereteltolódást okoz (ALAM és KAMINSKYJ 2013).

²⁶ A kísérletet a *gale* mutánsok mellett általunk előállított deléciós mutánsokkal is elvégeztük. Az eredmények hasonlóak voltak.

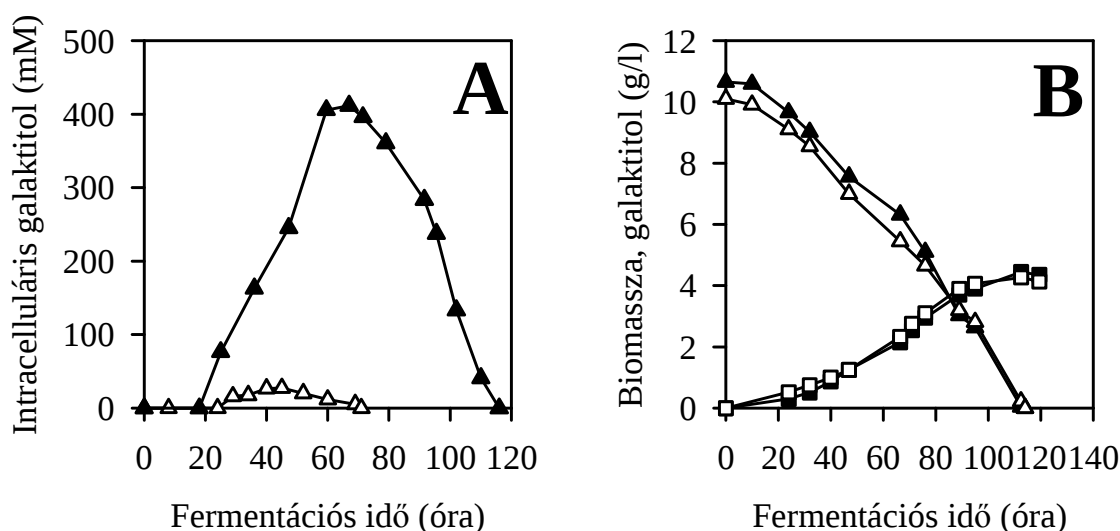


34. ábra. Az *A. nidulans* WT (üres szimbólumok) és *galE* mutáns (tömött fekete szimbólumok) szénforrás hasznosításának és biomassza képződésének időprofiljai. A: D-galaktóz és ammónium ionok. B: D-galaktóz és nitrát ionok. C: D-glükóz és ammónium ionok. D: D-glükóz és nitrát ionok. Szimbólumok: növekedés (□, ■), aktuális D-galaktóz koncentráció (○, ●), aktuális D-glükóz koncentráció (Δ, ▲)



35. ábra. *A. nidulans* WT (üres szimbólumok) és *galE* mutáns (tömött szimbólumok) D-galaktóz-AMM2 időprofiljai. A: biomassza (□, ■) és növekedési ráta (○, ●); B: hozamkonstans (Δ, ▲).

A biomassza metabolomikai elemzésének eredményeként az *A. nidulans galE* mutáns biomasszájában (vagyis intracellulárisan) magas (>400 mM) koncentrációban galaktitolt találtunk. A felhalmozódás átmeneti volt, a galaktitol a fermentáció végén hasznosult (36. A. ábra). Jóval kisebb koncentrációban a vad típusú micélium is felhalmozta a galaktitolt, vagyis a galaktitol képzésért és továbbalakításért felelős enzimek nem *galE*-mutáns specifikusak. Laktózon növekvő vad és *galE* mutáns törzsek micéliumában szintén találtunk galaktitolt, ennek mennyisége kb. 75 %-a volt a D-galaktózon mértnek. A D-galaktóz és laktóz kiindulási koncentrációjának (2–40 g/l között) nem volt hatása a képződött galaktitol mennyiségére. Más szénforrásokon (L-arabinóz, D-xilóz, acetát, D-fruktóz, D-glükóz, glicerol) nem tapasztaltunk intracelluláris galaktitol felhalmozódást egyik törzsben sem.



36. ábra. Időprofilok *A. nidulans* WT (üres szimbólumok) és *galE* mutáns (tömött szimbólumok) törzsekben A: Intracelluláris galaktitol (Δ, ▲) felhalmozódás D-galaktózon. B: Növekedés (□, ■) illetve szénforrás hasznosulás galaktitolon (Δ, ▲).

Az *A. nidulans* a növekedés minden fázisában képes galaktitol hasznosításra, lebontása nem igényli a galaktokináz enzimet (36. B. ábra). A feltételezett „galaktitol dehidrogenáz” aktivitás vizsgálatához előnövesztett, galaktitolra átmosott vad típusú illetve *galE* mutáns tenyészetek sejtmentes, dializált kivonatát használtuk *in vitro* enzimforrásként (IV. táblázat). Mindkét törzs rendelkezik galaktitol dehidrogenáz aktivitással, amely csak NAD⁺-kofaktorrall működik, NADP⁺-vel nem.

Az L-arabinitol dehidrogenáz hiányos *A. nidulans araA1* (= G094; CLUTTERBUCK 1981) mutáns nem nő galaktitolon (DE VRIES és mtsai 1994). Megállapítottuk, a mutáns nem rendelkezik galaktitol dehidrogenáz aktivitással (IV. táblázat). Egyedüli nitrogénforrásként ammónium ionokat használva azonban az *araA1* mutáns jól nőtt L-arabitolon (galaktitolon

nem!), és *in vitro* L-arabinitol dehidrogenáz aktivitást mutatott. Nitrogénforrásként nitrátot, szénforrásként L-arabitol tartalmazó táptalajon azonban – összhangban az irodalmi adatokkal – nem volt sem L-arabinitol dehidrogenáz enzimaktivitás, sem növekedés. Az *araA1* mutáns fenotípusa L-arabitolon hasonlít a *galE* mutánséhoz D-galaktózon – mindkettő nitráton mutatja a definiált mutáns fenotípust, ammónium ionokon a jelleg eltűnik.

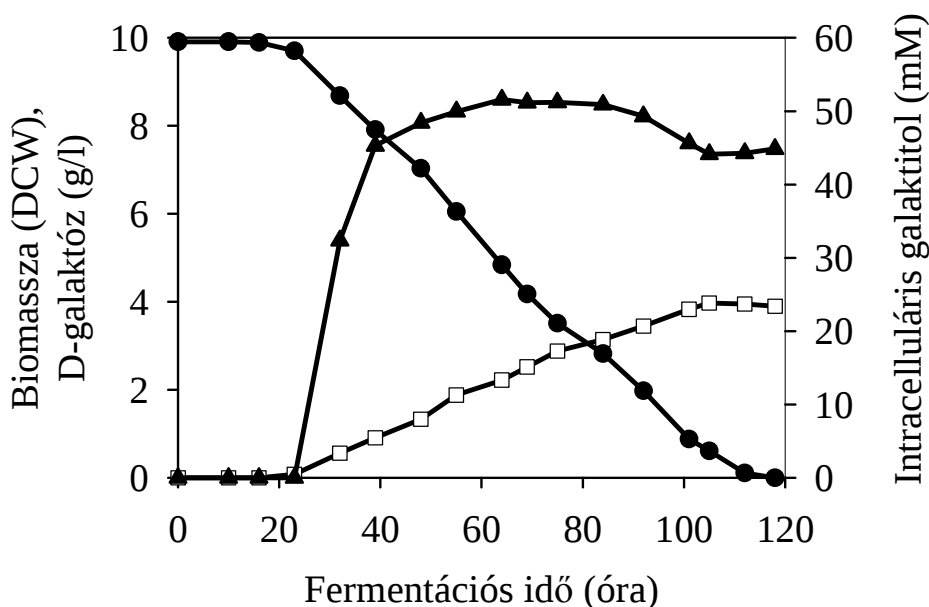
Poliol dehidrogenáz aktivitás (U/mg protein)

Törzs	Kofaktor	Szubsztrátum	
		L-arabitol	Galaktitol
Vad típus	NAD ⁺	0,41 ± 0,03	0,081 ± 0,005
	NADP ⁺	< 0,004	< 0,004
<i>araA1</i>	NAD ⁺	0,094 ± 0,02	< 0,004
	NADP ⁺	< 0,004	< 0,004
<i>galE</i>	NAD ⁺	0,356 ± 0,02	0,066 ± 0,004
	NADP ⁺	< 0,004	< 0,004

IV. táblázat. Poliál dehidrogenáz aktivitások *A. nidulans*-ban, galaktitol és L-arabitol szubsztrátumokon, NAD⁺ illetve NADP⁺ kofaktorok használata mellett

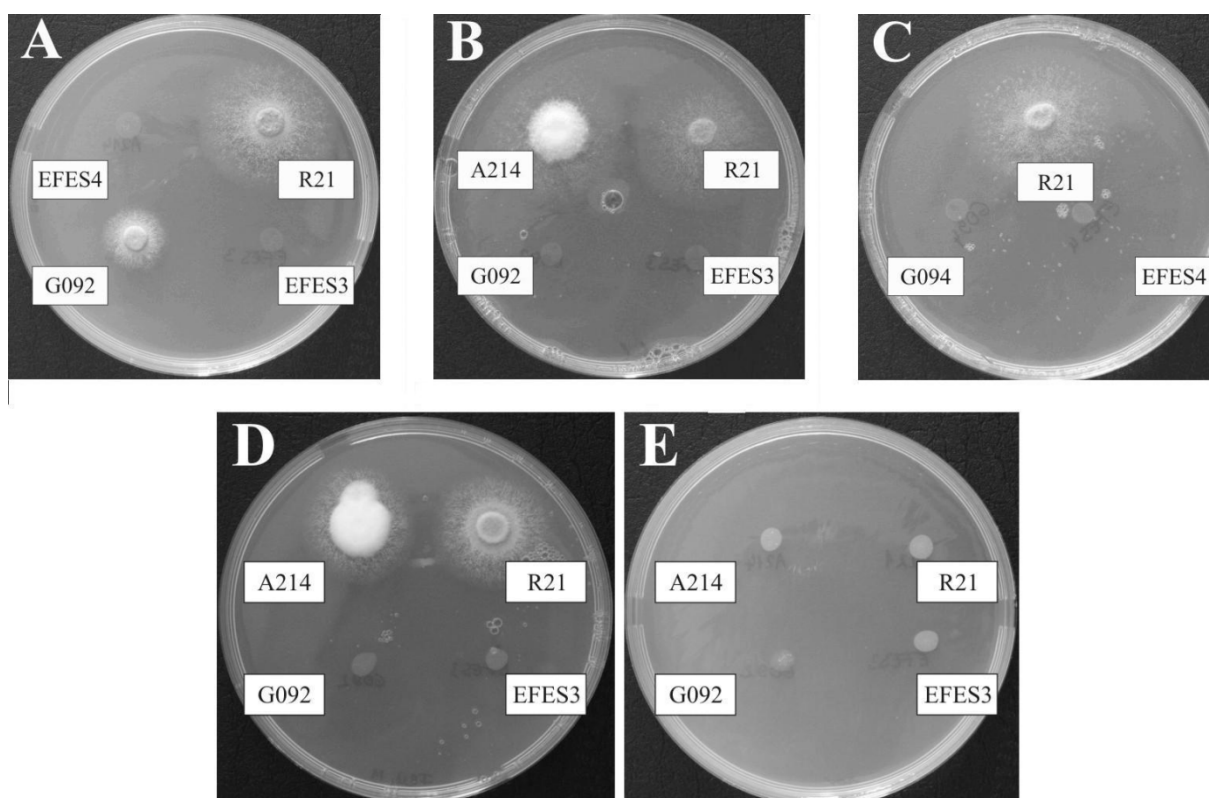
In vivo felelős-e az L-arabinitol dehidrogenáz aktivitás a galaktitol továbbalakításáért? A válaszhoz a D-galaktózon nőtt *araA1* mutáns biomasszáját és fermentlevét metabolomikai vizsgálatnak vetettük alá (37. ábra). Az intracelluláris galaktitol itt is megjelent a növekedés korai szakaszában, és a stacioner fázis végére érte el a maximum értékét (~50 mM), amely alacsonyabb, mint a *galE* mutánsban (~410 mM), de magasabb a vad típusnál (~30 mM). A legfontosabb azonban: az *araA1* mutáns nem képes hasznosítani az intracelluláris galaktitolt; felhalmozódása végleges, nem átmeneti. A galaktóz elfogyása után a sejtek szétesnek, emiatt a galaktitol extracellulárisan is megjelenik, de ekkor sem hasznosul. Az *A. nidulans* galaktitol hasznosítása során tehát az L-arabinitol dehidrogenáz enzimaktivitás megkerülhetetlen. A

galaktitol az alternatív D-galaktóz lebontási útvonal obligát intermediere is egyben, mint azt egy L-arabinitol dehidrogenáz / galaktokináz kettős mutáns (*araA1/galE* = EFES4) révén be is bizonyítottuk. Ha ugyanis a Leloir-úttól független D-galaktóz lebontás csak galaktitolon át mehet végbe, akkor galaktokináz hiányos háttérben az *AraA1* mutáns nem tud D-galaktózon nőni. Valóban ez volt a helyzet (38. A. ábra).



37. ábra. *A. nidulans* *AraA1* mutáns D-galaktóz-AMM időprofilja. Szimbólumok: biomassa (□), aktuális D-galaktóz (●), intracelluláris galaktitol (▲)

Az L-arabinitol dehidrogenáz reakció végterméke L-arabitol, L-xilulóz, galaktitol reakciójának terméke azonban *A. nidulans*-ban ismeretlen volt. Emiatt a galaktitolon nőtt vad típusú, *galE* és *AraA1* törzsek dializált sejtmentes kivonatát enzimmorrásként használva az *in vitro* reakció termékeit HPLC és NMR segítségével elemeztük. Mindkét analitikai módszer a reakcióidővel lineárisan növekvő koncentrációjú szorbózt mutatott ki a vad típus és a *galE* mutáns esetében; más hexózt nem találtunk a reakcióelegyben. Polarimetriás elemzés révén a szorbózt L-szorbózként azonosítottuk. Az *araA1* mutáns esetében reakció végterméket nem találtunk. Fordított irányba (redukció) játszódta a reakciót, a vad típus és a *galE* mutáns dializált sejtmentes kivonatát enzimmorrásként használva, NADH (de nem NADPH!) jelenlétében az L-szorbózt galaktitolá tudtuk alakítani. Ugyanez a reakció az L-arabinitol dehidrogenáz mutáns dializált sejtmentes kivonatával nem ment végbe. Mindez bizonyította, az L-arabinitol dehidrogenáz aktivitás eredményeként a galaktitol szubsztrátum L-szorbózzá alakul. Galaktitolon növesztett vad típusú és *galE* mutáns törzsekben az L-szorbóz fel is halmozódik a micéliumban (20-60 μ M). Akárcsak az *in vitro* reakció esetében, más hexózt kimutatható mennyiségben *in vivo* sem találtunk.

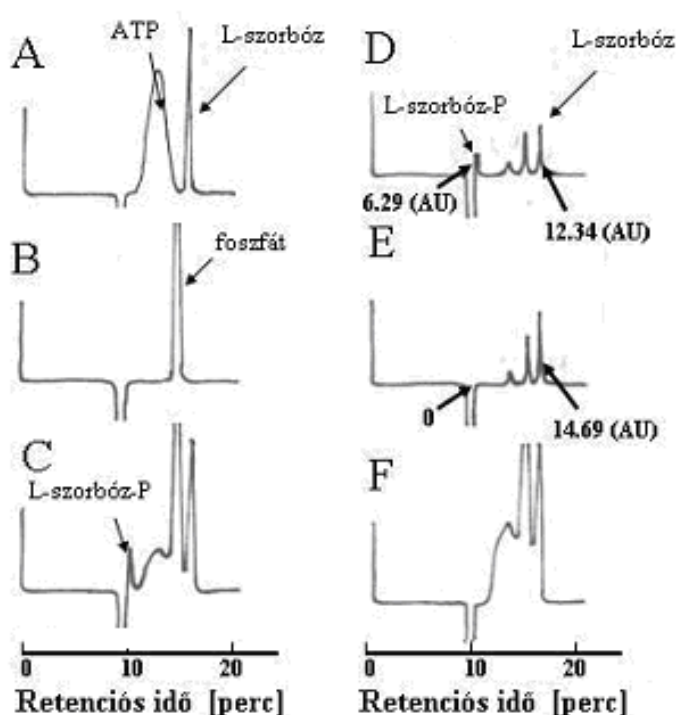


38. ábra. *A. nidulans* WT és mutáns törzsek növekedése a kutatásaink során használt fontosabb szénforrásokon. A: D-galaktóz. B és C: galaktitol. D: L-szorbóz + ammónium ionok. E: L-szorbóz + nitrát ionok. Az A-D jelű Petri-csészékben nitrogénforrásként ammónium ionokat használtunk

Az intracelluláris L-szorbóz D-szorbitollá redukálódik, majd ez D-fruktózzá alakul, ami a hexokináz általi foszforilezés után kerül a glikolitikus útvonalra (ELORZA és ARST 1971). A hexokináz L-szorbózon keresztüli részvételét az alternatív D-galaktóz lebontásban egy *A. nidulans* hexokináz mutáns (*frA1* = G092) révén bizonyítottuk. A törzs nem nőtt L-szorbózon (38. D. ábra) és galaktitolon (38. B. ábra) sem. Az *frA1* mutánsból keresztezéssel előállított galaktokináz/hexokináz kettős mutáns (*galE/frA1* = EFES3) pedig galaktitolon (38. B. ábra), L-szorbózon (38. D. ábra) és D-galaktózon (38. A. ábra) sem nőtt. Minden egyéb vizsgált szénforráson (D-glükóz, glicerol, acetát) a mutáns törzsek vad típusként viselkedtek. A kettős mutáns segítségével tehát a hexokináznak a részvételen túl a nélkülözhetetlenségét is bebizonyítottuk az alternatív D-galaktóz lebontási út vonatkozásában.

A hexokináz közvetlenül a D-fruktózt foszforilezi, az L-szorbóz anyagcserében csak közvetett szerepe van (ELORZA és ARST 1971). Mivel azonban széles szubsztrátspecifitású enzim (PURI és mtsai 1988), megvizsgáltuk, képes-e az L-szorbózt közvetlenül foszforilezni. Ehhez D-fruktózon növesztett vad típusú, továbbá *araA1*, *galE* és *frA1* mutánsok dializált, sejtmentes kivonatát enzimforrásként használtuk az L-szorbóz *in vitro* foszforilezéséhez. Az enzimreakciót a galaktokináz aktivitás mérésére általunk kifejlesztett, HPLC-alapú módszer

változatával követtük nyomon²⁷. A vad típusú, *araA1* és *galE* törzsek ATP-függő módon foszforilezték az L-szorbózt. A reakció termékét ³¹P NMR-segítségével L-szorbóz-foszfátként azonosítottuk. A foszforilált termék alkalikus foszfatáz enzimmel való kezelését követően az L-szorbóz-foszfát eltűnt, viszont sztöchiometrikus mennyiségben megnőtt az elegyben található L-szorbóz mennyisége (39. D-E. ábra). Az *frA1* hiánymutáns törzs sejtmentes kivonatát azonban nem tudtuk az L-szorbóz foszforilezéséhez enzimforrásként használni, mivel még elnyújtott inkubációs idő alatt sem keletkezett L-szorbóz-foszfát (39. F. ábra). Bizonyítékot szereztünk tehát arra, hogy – legalábbis *in vitro* – a hexokináz képes közvetlenül foszforilezni az L-szorbózt.



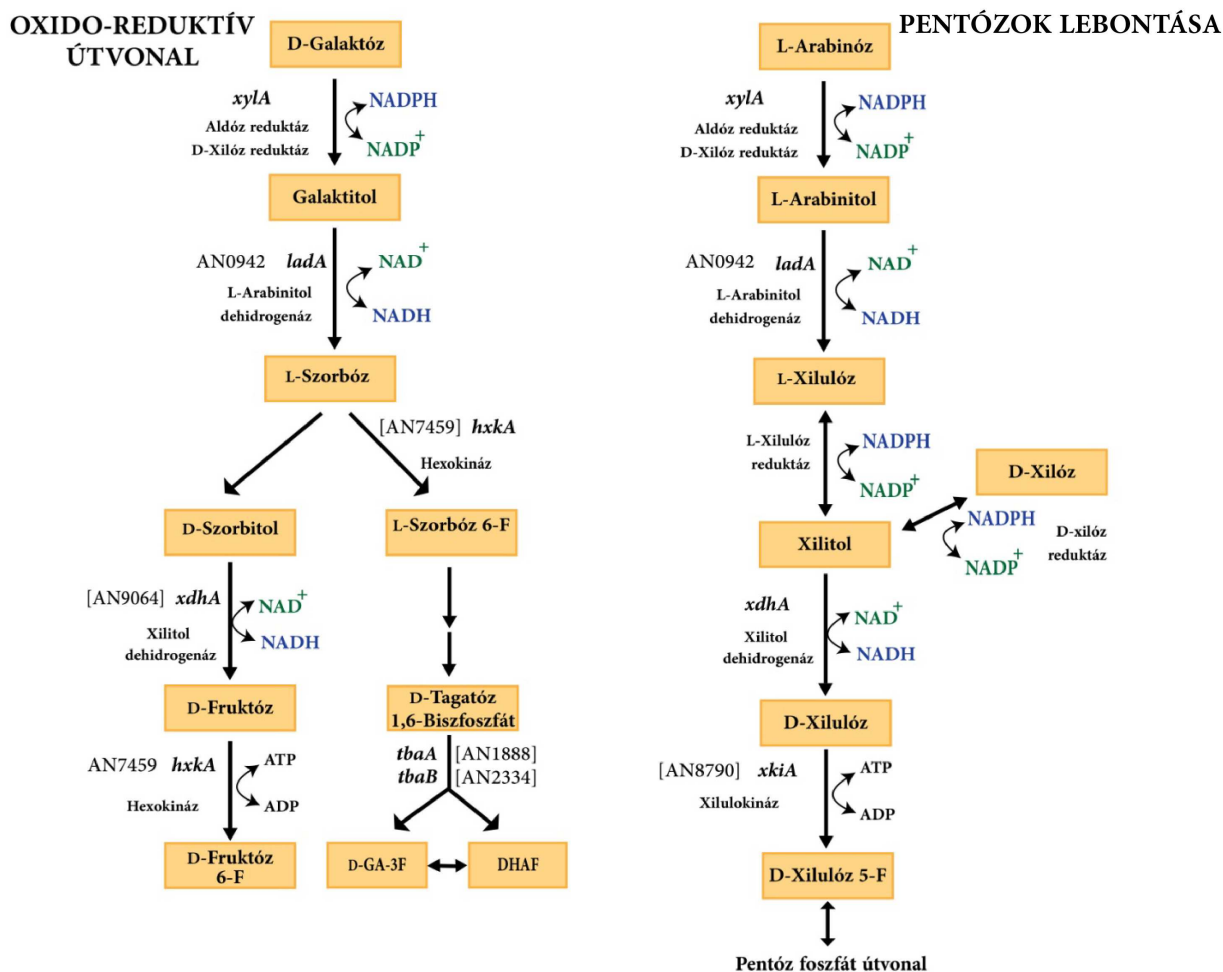
39. ábra. Az L-szorbóz foszforilezésének HPLC-kromatogramjai *A. nidulans*-ban. A: ATP és L-szorbóz. B: sejtmentes kivonat. C: A hexokináz reakció L-szorbóz szubsztrátummal, az *A. nidulans galE* mutáns dializált, sejtmentes kivonatát használva. D: Az L-szorbóz-6-foszfát tartalmú elegy alkalikus foszfatázzal való kezelése 0 h időpillanatban. E: Az L-szorbóz-6-foszfát tartalmú elegy alkalikus foszfatázzal való kezelése, 3 h időpillanatban. F: A hexokináz reakció L-szorbóz szubsztrátummal, az *A. nidulans frA1* mutáns dializált, sejtmentes kivonatát használva 6 h után. AU: arbitrárius egység (Arbitrary Unit)

A korábbi szakirodalom szerint az *A. nidulans* az L-szorbózt ugyan képes felvenni és metabolizálni, de egyedüli szénforrásként nem tudja hasznosítani (ROBERTS 1963; ELORZA és ARST 1971; MACCABE és mtsai 2003). Mi ezzel szemben megállapítottuk, itt is a táptalaj nitrogénforrásának kémiai minősége a meghatározó: L-szorbóz és egyedüli nitrogénforrásként nitrát ionokat tartalmazó minimál táptalajon nincs növekedés (38. E ábra), L-szorbózt és

²⁷ Részletesen lásd 4.1.4.1. fejezet.

ammónium ionokat tartalmazón igen (38. D ábra). Az L-szorbóz hasznosítás a *galE* mutáns D-galaktózon és az *araA1* mutáns L-arabitolon való növekedése után a harmadik olyan eset, ahol egy szénforrás lebontásának képességét a nitrogénforrás anyagi minősége determinálja.

ELORZA és ARST (1971) egy L-szorbóz → D-szorbítol → D-fruktóz lebontási útvonalat javasolt. Mivel eredményeink szerint a hexokináz közvetlenül foszforilezi az L-szorbózt (7. ábra), nem zárható ki, hogy az L-szorbóz-6-foszfát izomerizálódik fruktóz-6-foszfáttá, sőt a két útvonal akár párhuzamosan is működhet (40. ábra).



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

Eredményeinket összefoglalva, genetikai és biokémiai bizonyítékokat szereztünk egy alternatív, oxido-reduktívnek elnevezett D-galaktóz lebontási útvonal léteéről *A. nidulans*-ban, melynek során a D-galaktóz először galaktitollá redukálódik, majd L-szorbózzá oxidálódik, s melyben az L-arabitol dehidrogenáz és a hexokináz enzimek esszenciális szerepet játszanak.

Az *A. nidulans* dializált, sejtmentes kivonata – NADPH , de nem NADH jelenlétében – katalizálta a D-galaktóz galaktitollá történő redukcióját, valamint NADP^+ (de nem NAD^+)

jelenlétében a galaktitol $\rightarrow$ D-galaktóz oxidációt. A galaktitol képződésért felelős enzimet azonban még nem azonosítottuk. Emlősökben a fenti reakciót az aldóz reduktáz katalizálja; képződését elősegíti a Leloir-útvonal csökkent működése (lásd **2.1.7. fejezet**). Mivel a gomba „aldóz reduktáz” szubsztrátuma a D-galaktóz (SINGH és SCHÜGERL 1992), ez az aktivitás lehet felelős a galaktitol felhalmozódásért. Az aldóz reduktázok redundanciája (HASPER és mtsai 2000) miatt azonban nem rendelkezünk olyan *A. nidulans* mutáns törzzsel, mellyel a funkciót bizonyítani lehetne. *T. reesei*-ben a katalitikus redundancia kisebb fokú; itt sikerült igazolni, hogy a D-galaktóz redukciót az D-xilóz reduktáz végzi (SEIBOTH és mtsai 2007b).

Az oxido-reduktív D-galaktóz lebontási útvonal L-szorbóz utáni szakasza sem ismert. A fungális L-szorbóz anyagcseréről hiányosak az ismereteink, noha az L-szorbóz fontos fermentációs biotechnológiai termék; a C-vitamin gyártás során éves szinten kb. 25.000 t mennyiségben állítják elő D-szorbitolból, *Gluconobacter* baktériumfajok felhasználásával (LICHTENTALER 1998). Az L-szorbóz potenciális celluláz inducer *T. reesei*-ben (Nogawa és mtsai 2001). Baktériumokban az L-szorbóz anyagcsere oxidációs/redukciós lépéseket foglal magába: *Klebsiella pneumoniae*-ben az L-szorbóz-1-foszfátot az L-szorbóz-1-foszfát reduktáz géntermék redukálja D-szorbitol-1-foszfáttá, *Lactobacillus casei*-ben D-szorbitol-1-foszfát dehidrogenáz gént azonosítottak (YEBRA és PEREZ-MARTINEZ 2002). Mindkét génnel BLAST-keresést végeztünk az *A. nidulans* adatbázisban, de homológ szekvenciákat nem találtunk. A fenti reakciók megléte *A. nidulans*-ban ezért nem valószínű.

Az oxido-reduktív D-galaktóz lebontási útvonal érdekessége, hogy nincsenek benne specifikus enzimek, hanem más reakcióutak elemeit használja. A galaktitol oxidáció a pentóz anyagcserében szerepet játszó L-arabinitol dehidrogenáz révén történik, az L-szorbóz (vagy a D-fruktóz) foszforilezését a hexokináz végzi. Az útvonal egésze a fungális D-xilóz/L-arabinóz lebontásra emlékeztet (CHIANG és mtsai 1958; CHIANG és KNIGHT 1959; **40. ábra**): az aldóz először a megfelelő poliollá redukálódik, majd egy poliol dehidrogenáz révén ketózzá oxidálódik, ami foszforilálódik (WITTEVEEN és mtsai 1989; DE VRIES és mtsai 1994). A ketóz-foszfátok ribulóz-5-foszfáttá izomerizálódnak, ami már a pentóz-foszfát útvonal köztese (SHI és mtsai 2000). Analóg hexóz reakciókat nem ismerünk, ezért nem tudjuk, hogy a fent leírt lépések a D-galaktóz reduktív lebontására is fennállnak-e.

Nehéz megítélni, mennyire jellemző a gombákra vagy általánosságban az (eukarióta) élőlényekre az oxido-reduktív D-galaktóz lebontás. Az útvonalat leíró közleményünk (FEKETE és mtsai 2004²⁸) megjelenése óta eltelt bő évtized során az *Aspergillus* kutatói közösség nyolc

²⁸ Az aláhúzással jelölt hivatkozások az értekezést megalapozó saját közlemények közé tartoznak.

faj (*A. nidulans*, *A. flavus*, *A. terreus*, *A. oryzae*, *A. clavatus*, *A. fumigatus*, *Neosartorya fischeri*²⁹, *A. niger*) szekvenált genomjának funkcionális annotációját végezte el³⁰ (WORTMAN és mtsai 2009). *In silico* valamennyi fajban megtaláltuk az oxido-reduktív útvonal enzimeit kódoló géneket (FLIPPPI és mtsai 2009). Kísérletesen két gombafajban – a közelrokon *A. niger*-ben (MOJZITA és mtsai 2012a, b) és az *A. nidulans*-tól rendszertanilag távolabb eső *T. reesei*-ben (SEIBOTH és mtsai 2004) – bizonyították be működését. Az útvonal részben eltér az *A. nidulans*-ban leírtaktól. A galaktitol oxidációt katalizáló „galaktitol dehidrogenáz”³¹ (EC 1.1.1.-) L-xilo-3-hexulózt hoz létre, melyet az L-xilo-3-hexulóz reduktáz D-szorbitollá alakít, amit egy dehidrogenáz oxidál D-fruktózzá.

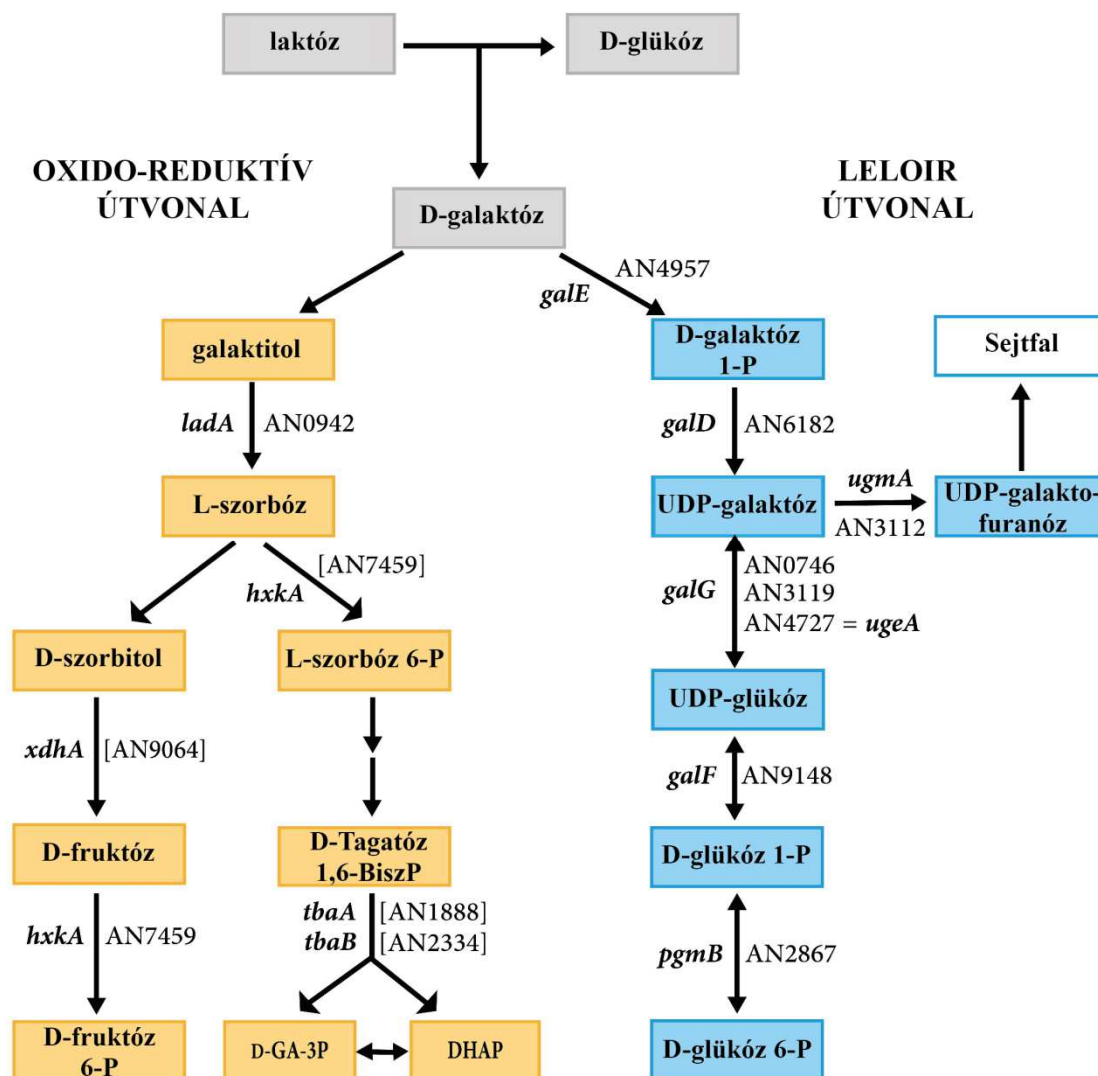
Három esetben: a *galE* mutáns D-galaktóz, az *araA1* mutáns L-arabitol és a vad típus L-szorbóz hasznosítása kapcsán észleltük, hogy nitrát, mint egyedüli nitrogénforrás esetén nincs szénforrás felvétel, ammónium ionok esetén azonban igen, ami biomassza gyarapodást is eredményez. Mindegyik szénforrás katabolizmusának része egy poliol köztes, amelynek létrejötte a megfelelő cukor szigorúan NADPH-függő redukciója révén történik. A nitrát illetve az ammónium ionok asszimilációjának élettanilag talán legfontosabb különbsége, hogy a nitrát és nitrit redukciója fokozottan NADPH igényes. Jelenleg tesztelt munkahipotézisünk szerint ezért a nitrát jelenlétében észlelt növekedés-gátlás intracelluláris NADPH-limitáció miatt történik – mivel a szén- és a nitrogénforrás asszimilációjához is NADPH szükséges, az igény meghaladja a sejt NADPH-előállító kapacitását.

Végezetül megemlíjtük, hogy a fenn említett *Aspergillus* annotációs közösségi projekt során *in silico* azonosítottuk az oxido-reduktív lebontási út egy lehetséges elágazását. Mind a 8 vizsgált *Aspergillus* faj genomja tartalmaz egy D-tagatóz-biszfoszfát aldoláz enzimet (EC 4.1.2.40) kódoló gént. Az enzim az aldolázok II. csoportjának 'B' típusába tartozik (Class II, Type B). Az *E. coli* genom tartalmaz két szerkezetileg hasonló enzimet, melyek galaktitolt és N-acetil-galaktóزامint képesek degradálni. Feltételezzük ezért, hogy a D-tagatóz-biszfoszfát aldoláz dihidroxi-aceton foszfáttá és D-glicerinaldehid-3-foszfáttá hasítja a D-tagatóz 1,6 biszfoszfátot, mely L-szorbózból keletkezik. Az L-szorbózt – mint említettük – a hexokináz *in vitro* képes L-szorbóz 6-foszfáttá alakítani. Egy újabb foszforilező lépést, majd epimerizációt követően kapunk D-tagatóz 1,6 biszfoszfátot. Az új útvonalra kísérletes bizonyítékunk még nincs, de genetikai és biokémiai vizsgálataink eredményeivel kompatibilis. Az *A. nidulans* laktóz és D-galaktóz anyagcsere útvonalait (géneket és közteseket) a **41. ábra** szemlélteti.

²⁹ Más néven *A. fischerianus*. Az *A. fumigatus*-hoz hasonló, de nem patogén faj.

³⁰ A legújabb *Aspergillus* annotációs közösségi projekt (DE VRIES és mtsai 2016) már 16 fajt elemzett.

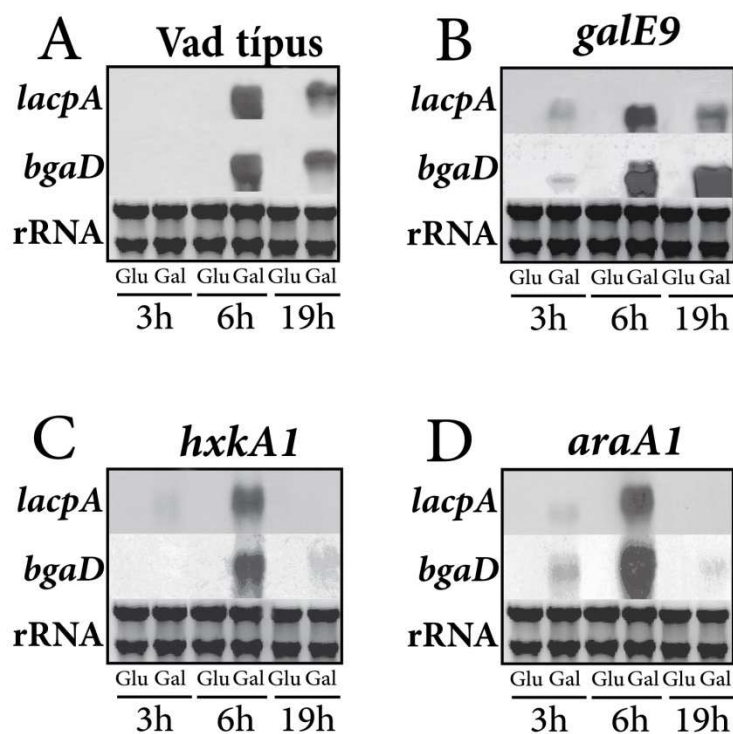
³¹ Az enzim *A. niger*-ben az *xhrA*, *T. reesei*-ben az *lxx4* gén terméke (MOJZITA és mtsai 2012a)



41. ábra. A D-galaktóz lebontás útvonalainak vázlata *A. nidulans*-ban. D-Ga-3P: D-glicerinaldehid-3-foszfát; DHAP: dihidroxiaceton-foszfát. Anabolikus funkcióik miatt a legtöbb Leloir enzim konstitutívan fejeződik ki. Az UDP-glükóz/galaktóz-4-epimeráz (*ugeA*) és az UDP-galaktopiranoz/furanóz mutáz (*ugmA*) gének szerepét a sejtfalszintézisben lásd EL-GANINY és mtsai. (2008; 2010).

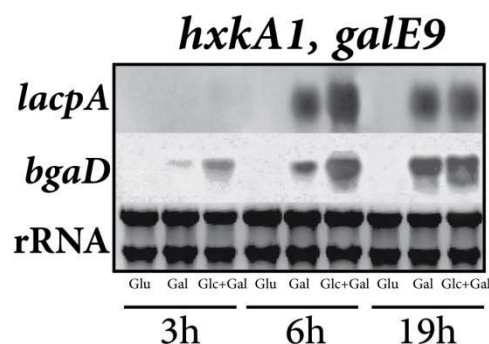
Az *A. nidulans* laktóz és D-galaktóz anyagcsere strukturális elemeinek feltérképezése után a szabályozás mechanizmusaival foglalkoztunk. Mint láttuk (18. ábra), a *bgaD/lacpA* génpár koordináltan expresszálódik; a legerősebb induktor a D-galaktóz. Mivel a szaprofita *A. nidulans* számára a lignocellulóz monomer D-galaktóz természetes szénforrás, feltételeztük, hogy a *bgaD/lacpA* D-galaktóz általi indukciójához nincsen szükség a hexóz degradációjára; a metabolizálatlan D-galaktóz (és nem egy lebontási köztese) az induktor. A továbbiakban ezt a hipotézist teszteljük. Kísérleti megközelítésünk elvi alapja: ha az indukciót mégis valamely lebontási köztes (intermedier) váltja ki, akkor a köztes kialakulását katalizáló enzimet kódoló gén mutációja az indukció elmaradásával jár együtt.

Az *A. nidulans galE* mutánsban a D-galaktóz általi indukció jellegében a vad típussal megegyező expressziós mintázatot eredményezett. Különbőség a transzkriptum képződésének időprofiljában volt: a *galE* mutánsban hamarabb következik be az expresszió, mint a kontroll törzsben (42. A, B ábra). Mivel a galaktokináz a Leloir-útvonal első enzime, kijelenthetjük, hogy lebontási köztesei nem szükségesek a *bgaD/lacpA* génpár indukciójához.



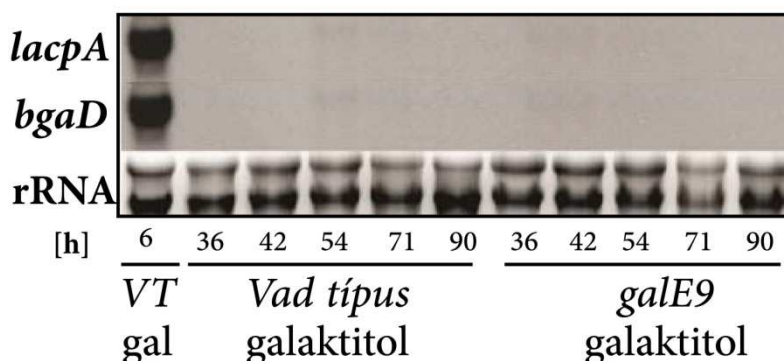
42. ábra. A *bgaD-lacpA* génklaszter indukciós spektrumának transzkripciós analízise D-glükóz (Glu) és D-galaktóz (Gal) szénforrások jelenlétében, *A. nidulans* törzsekben. A: WT (R21); B: *galE* mutáns; C: *hxkA1* mutáns; D: *AraA1* mutáns.

A *bgaD/lacpA* expressziós mintázatát a hexokináz és az L-arabinitol dehidrogenáz mutációk (*hxkA1* ill. *araA1*) sem változtatták meg (42. C, D ábra), vagyis az oxido-reduktív lebontási útvonal galaktitol utáni köztesei sem lehetnek kiváltói a D-galaktóz indukciónak. A *galE9/hxkA1* kettős mutáns (=EFES3) tesztelésével pedig kizártuk a több induktor lehetőségét is, vagyis azt, hogy az egyik útvonal blokkolásakor a másik útvonalon (esetlegesen) megnőtt szénváz fluxus váltja ki a *bgaD/lacpA* indukcióját (43. ábra). A kettős mutáns nem nő D-galaktózon, az indukció azonban – a kontrollhoz képest ugyan lassabban – de végbemegy. A D-galaktóz indukciós hatását tehát vagy közvetlenül a hexóz, vagy az oxido-reduktív útvonal első köztese, a galaktitol váltja ki. Megvizsgáltuk ezért, hogy a galaktitol indukálja-e a *bgaD/lacpA* transzkriptumok képződését, illetve az intracelluláris bGal aktivitást.



43. ábra. A *bgaD/lacpA* génklaszter indukciós spektrumának transzkripciós analízise egy galaktokináz / hexokináz kettős mutánsban D-glükóz (Glu), D-galaktóz (Gal) és D-galaktóz+glicerol szénforrásokon.

A galaktitol egyedüli szénforrásként is képes fenntartani az *A. nidulans* növekedését, bár a maximális specifikus növekedési ráta lényegesen alacsonyabb, mint D-galaktózon (lásd 36. B. ábra). Azonban *bgaD/lacpA* transzkripció vagy intracelluláris bGal enzimaktivitás a fermentáció egyetlen időpillanatában sem volt kimutatható rajta, a vad típusú kontrollban és a *galE9* mutánsban sem (44. ábra). Az eredmény egyben azt is jelzi, hogy a galaktitol nem képes *in vivo* visszaoxidálódni D-galaktózzá egyik vizsgált *A. nidulans* törzsben sem.



44. ábra. A *bgaD/lacpA* génklaszter transzkriptum képződésének időprofilja galaktitolon, sülyesztett fermentáció során, a WT törzs (R21), és a galaktokináz mutáns esetében. Kontrollként a WT törzs D-galaktózon képződött transzkriptumát láthatjuk, 6 h időpontban (mosott sejtes tenyészet).

Fonalas gombákban nem ritka, hogy a szénváz asszimilációs útvonalakat a lebontási köztesek, mint fiziológiai induktorok³² indukálják, nem maga a növekedési szubsztrátum. Jól körbejárt példa az *A. nidulans* etanol lebontásának indukciója az útvonal (az *alc* rendszer) első intermediérével, az acetaldehiddel (maga az etanol inert; FLIPPHI és mtsai 2001; 2002). Jelen esetben szintén bizonyítható volt munkahipotézisünk: D-galaktózon nem szükséges lebontási intermedierek képződése illetve jelenléte a *bgaD* és a *lacpA* gének indukciójához.

³² A kifejezéssel a lebontási közteseket kívánjuk megkülönböztetni a molekuláris induktortól, vagyis a transzkripció *de facto*, génszintű kiváltójától. Utóbbiakat kutatásaink során nem vizsgáltuk.

4.1.3. Az oxido-reduktív útvonal szerepe *Trichoderma reesei*-ben

A bGal enzimek (EC 3.2.1.23) β -D-galaktóz egységek hidrolízisét katalizálják β -D-galaktozid típusú szacharidok terminális, nem-redukáló végéről. A számottevő szerkezeti és katalitikus különbségek miatt négy glikozid hidroláz családba (GH1, GH2, GH35, GH42)³³ tartoznak.

A *T. reesei* a laktózt extracellulárisan hidrolizálja, ami a bGal-t központi helyzetűvé teszi a laktóz anyagcserén belül. A gombafaj egy GH35 típusú bGal-t tartalmaz, amit a *bga1* gén kódol. *bga1*-hiányos *T. reesei* mutánsokban az eredeti bGal aktivitásnak csak kb. 8 %-a mérhető laktózon (SEIBOTH és mtsai 2005), de hasonló a helyzet D-galaktózon és galaktitolon is. Nem tudjuk, hogy a maradék érték egy második bGal-nak, avagy más hidrolázok reziduális aktivitásának köszönhető.

A *bga1* kifejeződésének szabályozása kevésbé ismert. A transzkriptum mennyisége L-arabinózon, L-arabinitolon és laktózon a legbőségebb, de D-galaktózon, D-xilózon és ezek polioljain is kimutatható. A transzkripció *cre1*-függő CCR alatt áll, ami mind a bazális (-alap) aktivitás szintjére, mind a szénforrás általi indukcióra hat.

Mivel a D-galaktóz reduktív lebontási útvonala lényegében a hemicellulóz pentózok (L-arabinóz, D-xilóz) lebontását végző enzimeket hasznosítja, megvizsgáltuk, hogy az oxido-reduktív útvonalnak van-e szerepe a *bga1* gén indukciójában. Ehhez a Leloir illetve a reduktív útvonal első lépéseiben (galaktokináz, valamint aldóz reduktáz és L-arabinitol-dehidrogenáz) defektes *T. reesei* mutáns törzseket használtunk. Mivel a *bga1* gén szinte egyedül felelős a *T. reesei* bGal aktivitásáért, a *bga1* génexpressziót – egyfajta ön-riporter rendszerként – a bGal aktivitás megjelenésével számszerűsítettük.

Az inducer azonosításának első állomása ez esetben is annak tisztázása volt, hogy a D-galaktóz önmagában indukál, vagy valamelyik lebontási útvonal generálja az induktort. Az aldóz reduktáz hiányos $\Delta xyl1$ törzs galaktitolon a vad típussal összevethető bGal aktivitásokat mutatott (**V. táblázat**), jelezve, a galaktitol Leloir-útvonalon történő metabolizmusa (vagyis a galaktitol – D-galaktóz átalakulás) szükségtelen az indukcióhoz. Ezzel szemben D-galaktózon a $\Delta xyl1$ törzs gyakorlatilag nem mutatott bGal aktivitást, ami világosan mutatta, a D-galaktóz – galaktitol átalakulás viszont esszenciális a konverzióhoz. Fontos megjegyezni, hogy a $\Delta xyl1$ mutáns a vad típusnál gyengébben ugyan, de képes növekedni mindkét vizsgált szénforráson, vagyis az indukció elmaradása nem a növekedés hiánya miatt történt.

³³ Carbohydrate Active Enzymes Database: <http://www.cazy.org/>

<i>T. reesei</i> törzsek	Extracelluláris β -galaktozidáz aktivitás [nkat/mg _{DCW}]		
	D-galaktóz	Galaktitol	D-glükóz
QM9414 (vad típus)	68	83	< 0.1
$\Delta xyl1$	2	53	< 0.1
$\Delta gal1$	20	70	< 0.1
$\Delta lad1$	60	115	< 0.1

V. táblázat. D-galaktóz anyagcserében sérült *T. reesei* törzsek *bga1* kifejeződésének összehasonlítása a szénforrás függvényében.

A vizsgálat tükörképét jelentette, amikor a $\Delta gal1$ (galaktokináz) mutáns galaktózon és galaktitolon növesztettük (a kontrollt jelentő D-glükóz szénforráson egyik mutáns sem mutatott *bga1* kifejeződést; **V. táblázat**). Minőségi értelemben a *bga1* mindkét szénforráson kifejeződött, vagyis a galaktokináz enzim és a Leloir-útvonal köztesei nem esszenciálisak az indukcióhoz. Az erősen lecsökkent aktivitások valószínűleg annak tudhatók be, hogy ez a mutáns gyengén nőtt galaktózon és galaktitolon. Az eredményeket összevetve kijelenthetjük, a Leloir-útvonal nem esszenciális a *bga1* gén D-galaktóz általi indukciójában.

Az oxido-reduktív D-galaktóz lebontási útvonal második enzime a *lad1* géntermék L-arabinitol 4-dehidrogenáz. Annak eldöntéséhez, hogy a galaktitol, esetleg egy lebontása során keletkező későbbi intermediér felelős-e a *bga1* indukciójáért, egy $\Delta lad1$ törzset növesztettünk galaktitol illetve D-galaktóz tartalmú minimál táptalajon. A $\Delta lad1$ törzs nem nő galaktitolon, míg galaktózon csaknem olyan jól nő, mint a vad típus. Az **V. táblázat** adatai mutatják, hogy a bGal aktivitás (= *bga1* expresszió) hasonló mértékű volt D-galaktózon, mint a vad típusnál, galaktitolon pedig meg is haladta azt. Az eredmények azt mutatják, a galaktitol önmagában – a D-galaktóz redukciója során képződve – képes a *bga1* indukálására.

Összefoglalóan, a *T. reesei* laktózon növekedésének képessége nagyban függ a *bga1* által kódolt extracelluláris bGal enzim keletkezésétől. A *bga1* expresszióját a laktóz, a D-galaktóz és – kisebb mértékben – a galaktitol is képes indukálni. A galaktokináz hiányos törzs indukálható D-galaktózzal és galaktitollal, viszont az aldóz reduktáz hiányos mutáns *bga1* génje csak D-galaktózzal indukálható. A reduktív út második lépésében hiányos L-arabinitol 4-dehidrogenáz mutáns viszont mindkét szénforrás által indukálható maradt. Megállapítottuk tehát, hogy a *T. reesei* *bga1* gén élettani induktora a galaktitol.

4.1.4. A D-galaktóz felvétel és lebontás vizsgálata *Aspergillus niger*-ben

Az *A. niger* gomba biotechnológiai jelentőségét hagyományosan citromsav termelése adja. A citromsav – az etanol után – a második legnagyobb mennyiségben előállított biotechnológiai termék³⁴. A citromsavat gyorsan hasznosuló szénforrásokon, jellemzően D-glükóz tartalmú komplex táptalajon állítják elő – a túltermelés egyik előfeltétele az erőteljes glikolitikus fluxus (KUBICEK és KARAFFA 2006, 2010) –, így nem meglepő, hogy a biokémiai-fiziológiai vizsgálatok szinte kizárólag ebbe az irányba folytak.

Az *A. niger* D-galaktóz anyagcseréje iránti újkeletű érdeklődés oka a *Trichoderma* fajokkal összevethetően hatékony extracelluláris enzimtermelése. A szekretált hidrolázokat a növényi biomassza hemicellulóz polimereinek lebontásához használja az eredendően szaprofita gomba. Mint említettük (2.1.4. fejezet), hemicellulóznak a növényi sejt falban a cellulózzal szorosan egybeépült nem-cellulóz jellegű poliszacharidokat nevezzük. A D-galaktóz az egyetlen monomer, mely mindhárom fő hemicellulóz típusban megtalálható. Hidrolitikus potenciálja ellenére azonban az *A. niger* nem, vagy csak gyengén hasznosítja a D-galaktózt, ami korlátozza alkalmazhatóságát. Ennek élettani okáról kutatásunk kezdetéig egy közlemény jelent meg (ELSHAFEI és ABDEL-FATAH 2001), melyben a jelenséget – mivel az *A. niger* sejtmentes kivonatát enzimforrásként használva a D-galaktózt *in vitro* nem lehetett foszforilezni – a galaktokináz gén mutációjával magyarázták. Munkánk első részében ezért a galaktokináz gén és a galaktokináz aktivitás meglétét illetve hiányát próbáltuk meg tisztázni. Kontrollként az intakt Leloir-útvonallal rendelkező *A. nidulans* WT törzs, negatív kontrollként az *A. nidulans* galaktokináz negatív mutáns (*galE*) szolgált.

4.1.4.1. Új módszer a galaktokináz enzimaktivitás meghatározása

A D-galaktózt foszforilező galaktokináz aktivitás mérésére korábban csak izotópos (ROBERTS 1970) illetve meglehetősen bonyolult enzimes (VERHEES és mtsai 2002) módszerek léteztek. Kutatásaink során kidolgoztunk egy HPLC-s meghatározáson alapuló, 5 %-os hibán belül ismételtető módszert. Elvi alapja a

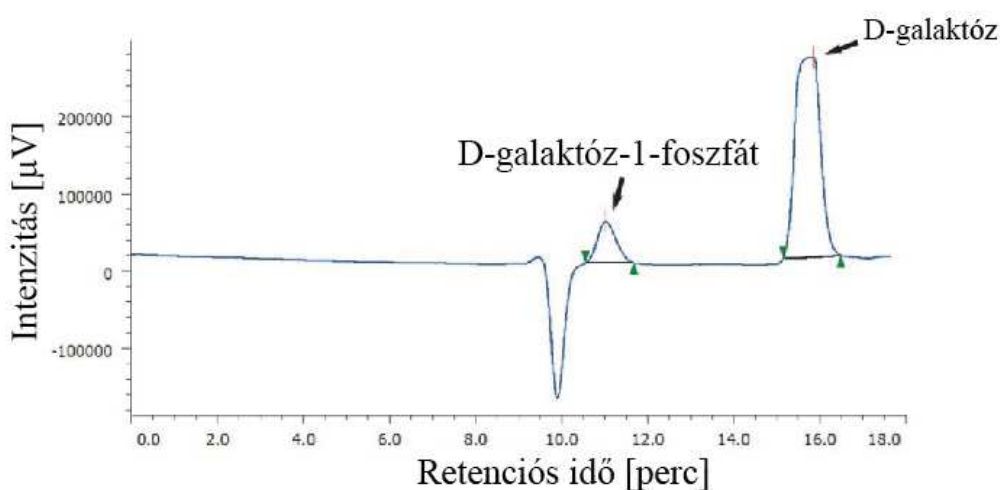


reakció végtermékeként keletkező D-galaktóz-1-foszfát mennyiségi meghatározása, melyet törésmutató (Refraktív Index, RI) alapján detektáltunk. Az elválasztást hidrogénfázisú

³⁴ Jelenleg ~ 2 M t/év, ami 2.6 milliárd US\$ piacot jelent (<http://www.marketwatch.com>)

ioncserélő oszloppal (Bio-Rad Aminex HPX-H⁺) végeztük, T = 55 °C kolonnahőmérséklet és 0,5 ml/perc áramlási sebesség mellett. Eluensként 10 mM H₂SO₄-et használtunk (45. ábra).

A reakcióelegy 10 mM ATP-t, 20 mM D-galaktózt, 10 mM MgSO₄-et és 0,7 ml sejtmentes kivonatot tartalmaz, ez utóbbit 0,1 M-os, pH = 7,6-os foszfát pufferben vettük fel. Az *in vitro* reakció T = 37°C-on játszódik le. Indításként a D-galaktózt az elegyhez adtuk, 30 percen át enyhe rázatás mellett inkubáltuk, majd jégre raktuk a kémcsöveket, leállítva ezzel a reakciót. A fehérjét 30 % (v/v) metanollal csaptuk ki. A D-gal-1-P mennyisége lineárisan nőtt az eltelt reakcióidővel 5 és 110 perc között. Az egységnyi galaktokináz aktivitás (1 U) 1 μmól képződött D-gal-1-P képződésének felel meg 1 perc alatt, 30 illetve 37°C-on.



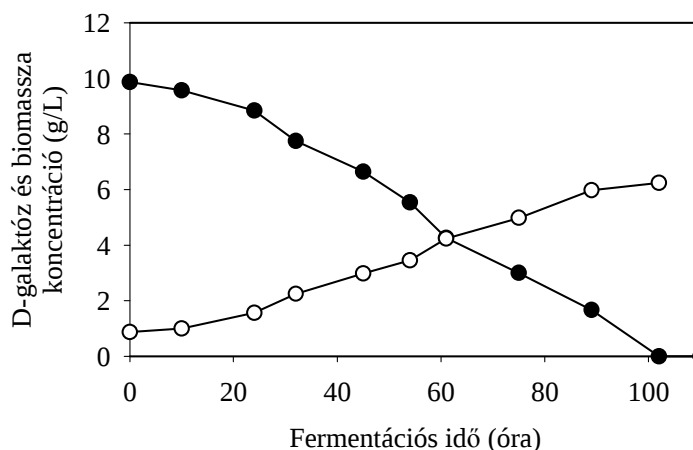
45. ábra: Tipikus HPLC-kromatogram, melyen az *in vitro* galaktokináz aktivitás meghatározásához vezető enzimreakció két legfontosabb komponense, a D-galaktóz-1-foszfát és a D-galaktóz látható.

A módszer nem csak a galaktokináz, hanem más olyan enzimreakciók esetében is használható, ahol cukor molekulára ATP-ről származó foszfátcsoport kerül. Példa erre az L-szorbóz hexokináz általi foszforilezhetőségének bizonyítása (lásd 59. oldal).

4.1.4.2. Élettani vizsgálatok

Első lépésként igazoltuk az *A. niger* D-galaktóz negatív fenotípusát egy WT törzs (N-402) felhasználásával. D-galaktózt kizárólagos szénforrásként tartalmazó táptalajon az *A. niger* konídiospórák nem tudták felvenni a D-galaktózt, így biomassza sem képződött. A fenotípus – a vizsgált szénforrások közül – kizárólag D-galaktózra vonatkozott. D-glükóz, L-arabinóz, glicerín, D-xilóz, galaktitol, D-fruktóz és szacharóz szénforrásokon nem volt számottevő különbség az *A. nidulans* WT törzs növekedéséhez képest. Laktózon valamivel gyengébben nőtt a tenyészet az *A. nidulans*-hoz képest, de teljes életciklusát befutotta, ezért a fenotípust laktózon pozitívnak nyilvánítottuk.

A glicerines táptalajon előnővesztett vegetatív micélium viszont, ha nem is gyorsan, de transzportálta a D-galaktózt és biomasszázt képzett rajta (**46. ábra**). Glicerín helyett D-glükózt, peptont, szacharózt, L-arabinózt vagy D-xilózt használva hasonló eredményeket kaptunk. Az *A. niger* tehát genetikailag alkalmas a D-galaktóz hasznosítására, a negatív fenotípusnak egy adott növekedési szakaszhoz köthető élettani okai vannak.



46. ábra. *A. niger* WT növekedése (○) és szubsztrátum-hasznosítása (●) AMM-D-galaktóz táptalajon. A tenyészet előnővesztett micéliumról indult

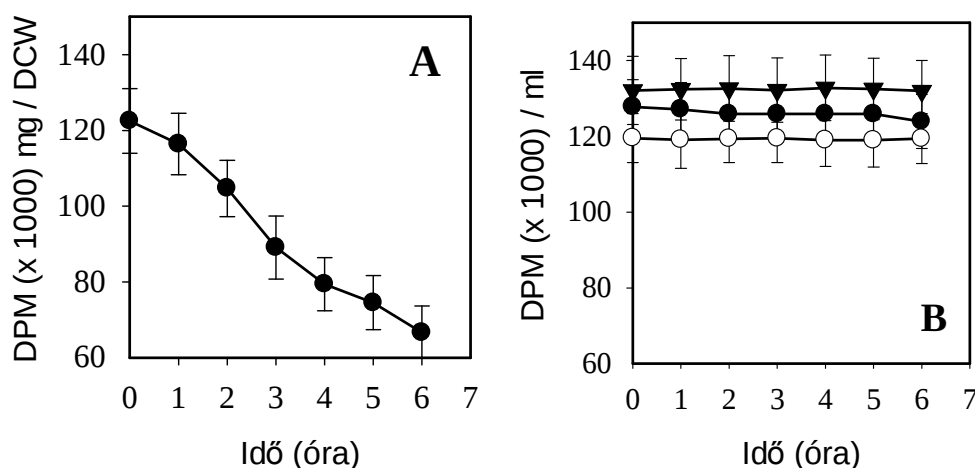
A galaktokináz aktivitás kizárólag intracelluláris, így a feltárt micélium sejtmentes felülszóját használtuk enzimforrásként (**VI. táblázat**). Az enzimaktivitás minden vizsgált szénforráson megjelent. Profilja hasonlított az *A. nidulans*-hoz: D-galaktózon és L-arabinózon szignifikánsan ($p < 0.1\%$) magasabb, mint D-glükózon. Noha az értékek jellemzően kisebbek, kijelenthető, hogy az *A. niger* rendelkezik galaktokináz aktivitással. Az analitikai módszer megbízhatóságát jelzi, hogy a negatív kontrollként használt *A. nidulans* galaktokináz mutáns törzsben nem tudtunk galaktokináz aktivitást detektálni.

Szénforrás

Gombatorzs	D-galaktóz	Laktóz	L-arabinóz	glicerol	D-glükóz
<i>A. nidulans</i> WT	$0,32 \pm 0,017$	$0,15 \pm 0,014$	$0,30 \pm 0,02$	$0,14 \pm 0,01$	$0,12 \pm 0,01$
<i>A. niger</i> WT	$0,28 \pm 0,014$	$0,19 \pm 0,012$	$0,20 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,006$	$0,08 \pm 0,005$
<i>A. nidulans galE</i>	$< 0,001$	$< 0,001$	$< 0,001$	$< 0,001$	$< 0,001$

VI. táblázat. *In vitro* galaktokináz aktivitások szénforrás függése. Mértékegység: U/mg protein.

Az eddigiek alapján feltételeztük, hogy az *A. niger* konidiospórák D-galaktóz negatív fenotípusa a cukor felvételével függ össze; a spórák – szemben a vegetatív micéliummal – nem képesek transzportálni ezt a hexózt. Hipotézisünk teszteléséhez a konidiospórákat és a vegetatív micéliumot párhuzamosan, ^{14}C -vel jelölt D-galaktóz 35 jelenlétében inkubáltuk. Az utóbbi esetben a felvételi rátát a biomasszára (DCW) specifikáltuk. Mivel a reprodukálhatóan mérhető tömeggel nem rendelkező konidiospórák esetében ez a módszer nem alkalmazható, három különböző koncentrációjú (10^6 , 10^7 , 10^8 db/ml) spóraszuszpenziót hoztunk létre abból kiindulva, hogy a specifikus felvétel arányos kell legyen a spóraszámmal. A kétféle tenyészet D-galaktóz felvételi rátája valóban alapvetően eltért egymástól (**47. ábra**): míg a vegetatív micélium képes volt transzportálni (felvenni) a D-galaktózt, a spóraszuszpenzió a kiindulási koncentrációtól függetlenül nem. Fenti hipotézisünk ezzel bizonyítást nyert.

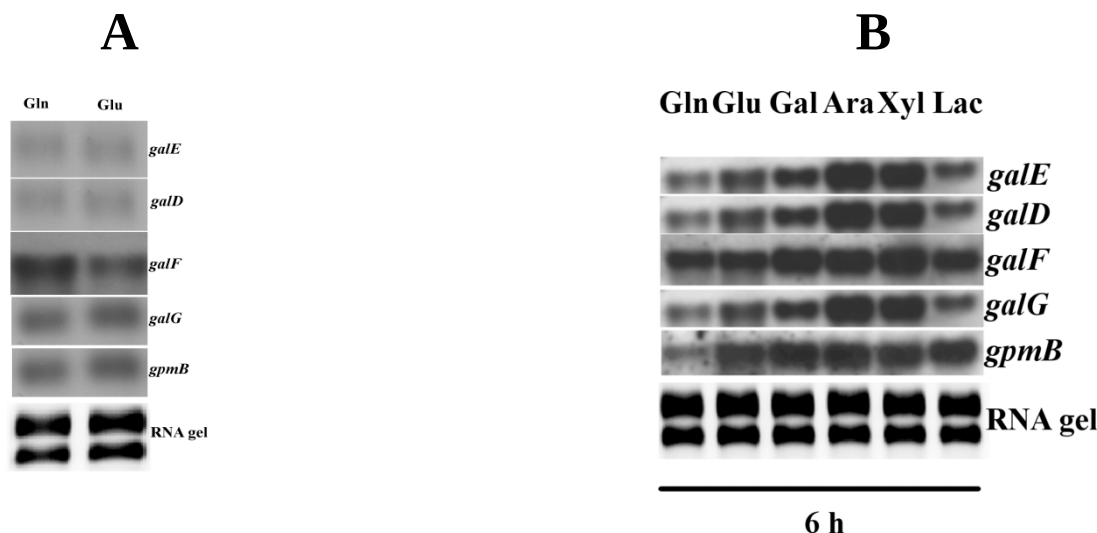


47. ábra. ^{14}C -vel jelölt D-galaktóz extracelluláris koncentrációja *A. niger* WT tenyészeiben. A: glicerinen előnövészett vegetatív micélium (1 mg/ml kiindulási koncentrációban, mely a kísérlet időtartama alatt nem változott); B: konidiospóra szuszpenzió. (●): 10^6 db spóra/ml, (○): 10^7 db/ml, (▼): 10^8 db/ml.

Mivel az *A. niger* micélium nemcsak felveszi a D-galaktózt, de biomasszáját is létrehoz rajta, megvizsgáltuk, tartalmazza-e a gomba genom a Leloir-útvonal enzimeit kódoló géneket, továbbá a gének kifejeződnek-e. *In silico* mindegyik Leloir-génnek kimutattuk az ortológját, transzkriptum pedig mindegyikről, minden vizsgált szénforráson keletkezett. A kifejeződés L-arabinózon, D-xilózon és D-galaktózon erősebb, mint a többi szénforráson (**48. A. ábra**). A legérdekesebb megfigyelés azonban az, hogy a Leloir-útvonal első két enzimét (galaktokináz, gal-1-P-UT) kódoló gének alig detektálhatóan, de a további három enzimet kódolók is csak minimálisan fejeződtek ki a konidiospórákban (**48. B. ábra**), míg a micéliumban erőteljes expressziót észleltünk mind az öt génre nézve. A D-galaktóz lebontás Leloir-útvonalának

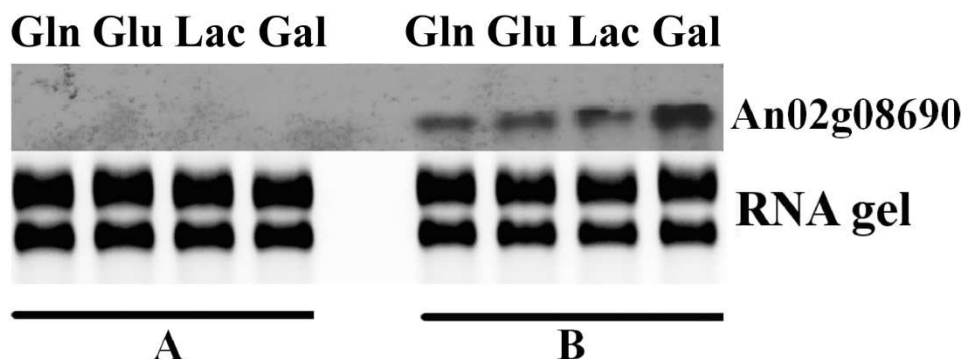
³⁵ Specifikáció: 13.63 μL (0.2 mCi/ml) D-galaktóz-1- ^{14}C ; a beütésszám 100 000–150 000 dpm/ml volt.

működése *A. niger*-ben tehát a (vegetatív) növekedési ciklus aktuális szakaszától függ. Mivel a konidiospórák nem képesek transzportálni a D-galaktózt, a Leloir-útvonal csökkent működése is ennek – az inducer hiányának – lehet a következménye, vagyis vélhetően másodlagos jelenség.



48. ábra. A D-galaktóz lebontás Leloir-útvonalát kódoló gének expressziós analízise *A. niger* WT törzsben. A: konidiospórák; B: vegetatív micélium. A génekhez annotált neveket lásd a 2.1.5. fejezetben. Gln: Glicerol; Glu: D-glükóz; Gal: D-galaktóz; Ara: L-arabinóz; Xyl: D-xilóz; Lac: laktóz

A fenti eredményekből világosan következik, hogy az *A. niger*-nek rendelkeznie kell egy működőképes D-galaktóz permeázval. Nem publikált *in silico* eredményeink szerint a genom tartalmaz egy ismeretlen hexóz transzportert, mely hasonlít ($< e-120$) a *S. cerevisiae* D-galaktóz permeázra (*gal2p*). A gén (An02g08690) konidiospórákban nem, micéliumban viszont jól kifejeződött (49. ábra). Ha ez a gén valóban az egyetlen működőképes D-galaktóz permeázt kódolja *A. niger*-ben, akkor jól beazonosítható és racionális célpontot jelenthet a D-galaktóz lebontás erősítését célzó biotechnológiai kutatások során.



49. ábra³⁶. Feltételezett D-galaktóz permeáz gén kifejeződésének vizsgálata *A. niger* WT törzsben. A: konidiospórák; B: vegetatív micélium. Gln: Glicerol; Glu: D-glükóz; Lac: laktóz Gal: D-galaktóz.

³⁶ A 49. ábrát „confidential preliminary data”-ként küldtük el vonatkozó közleményünk szerkesztőjének a cikk revíziója során. Formálisan még nem publikáltuk.

4.1.5. Laktóz és D-galaktóz anyagcsere *Penicillium chrysogenum*-ban

A *Penicillium* nemzetség tagjai széles körben elterjedt gombák; gabonafélék, olajos magvak, fűszerek, sajtok penészesedését okozhatják. A *P. chrysogenum* a talaj mikroflórájának gyakori képviselője, s egyben a fermentációs biotechnológiai ipar egyik prominens organizmusa, az elsőként felfedezett antibiotikum, a β -laktám típusú penicillin máig legfontosabb termelője (VAN DEN BERG 2011; BARREIRO és mtsai 2012; WEBER és mtsai 2012). Noha a penicillin gyártás évtizedekig tejsavó szénforráson történt, a *P. chrysogenum* laktóz asszimilációjáról meglepően keveset tudunk. Hasonló a helyzet a laktóz monomer D-galaktóz katabolizmusával kapcsolatban.

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-78³⁷) használtunk.

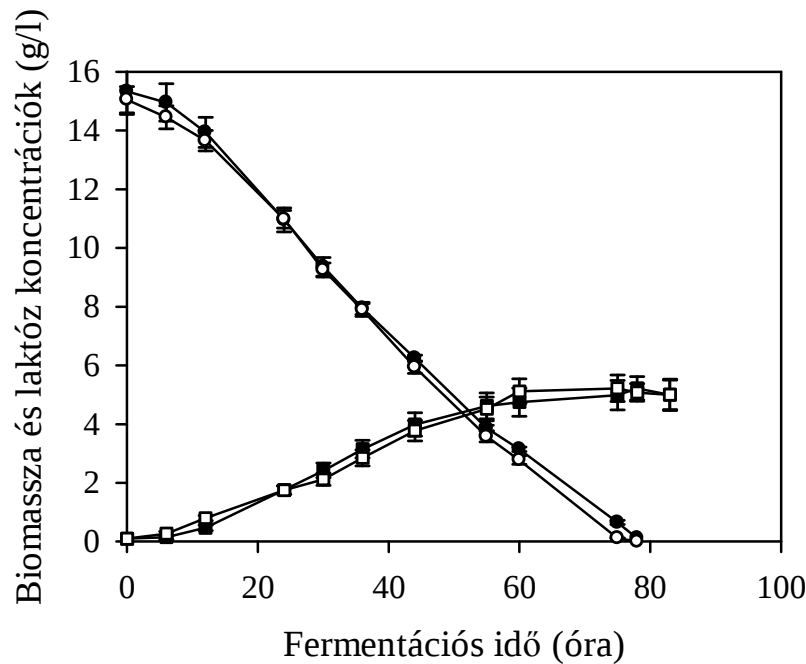
A két törzs növekedése egyedüli szénforrásként laktózt tartalmazó minimál táptalajon, szakaszos (batch) körülmények között nagyfokú hasonlóságot mutatott; 15 g/l laktózt kb. 74 h alatt asszimiláltak (50. ábra). Az elért maximális specifikus növekedési ráta $\mu = 0,045 - 0,047 \text{ h}^{-1}$ volt a gyors növekedési szakaszban³⁸. A maximális biomassza koncentrációk (5,2 g/l illetve 5,3 g/l) és az elért hozam értékek közti különbségek ($Y_{x/s} = 0,35 - 0,36$) nem voltak szignifikánsak ($p < 0.1\%$). A minimál táptalajt 0,01% (w/v) kazein peptonnal egészítettük ki³⁹; jelenléte jelentősen (~ 20 órától ~ 4 órára) lerövidítette mindkét törzsben a kezdeti lag fázist anélkül, hogy érdemben befolyásolta volna a növekedési rátát és a biomassza hozamot. A jelenség pontos magyarázatát nem ismerjük, de irodalmi előzmények alapján úgy véljük, a pepton egyes komponensei stimulálják és szinkronizálják a konídiospórák csírázását. Hasonló jelenséget írtak le az *A. nidulans* (MACCABE és mtsai 2003) és a *T. reesei* (SEIBOTH és mtsai 2005) esetében is. A batch fermentációk kinetikai adatai – melyek feltűnően hasonlóak az *A. nidulans*-éhoz – azt sugallják, hogy a *P. chrysogenum* genom⁴⁰ nemcsak tartalmazza a laktóz asszimilációjához szükséges struktúrgéneket, de ezek laktóz jelenlétében expresszálódnak is, majd aktív enzimekké íródnak át.

³⁷ A törzset Juan F. Martín professzortól (Antibióticos S.A., León, Spanyolország) kaptuk ajándékba.

³⁸ Mivel többsejtű szervezetek, az „exponenciális fázis” kifejezés fonális gombák esetében pontatlan. Helyette a „gyors növekedési szakasz” kifejezést használjuk.

³⁹ Ez a mennyiség kevesebb, mint 1 %-a a kiindulási laktóz mennyiségének, így elsődleges szénforrásként a pepton szerepe elhanyagolható volt.

⁴⁰ Az első publikált *P. chrysogenum* genom szekvencia (VAN DEN BERG és mtsai 2008) az alacsony penicillin titerű Wisconsin 54-1255 törzsből származik, mely közvetlen leszármazottja az NRRL 1951-nek. *In silico* elemzéseink során a *Penicillium* nemzetség további négy fájának (*P. paxilli* ATCC 26601; *P. decumbens*; *P. digitatum*; *P. chrysogenum sensu strictu*) nyilvános genom szekvenciáit használtuk fel.



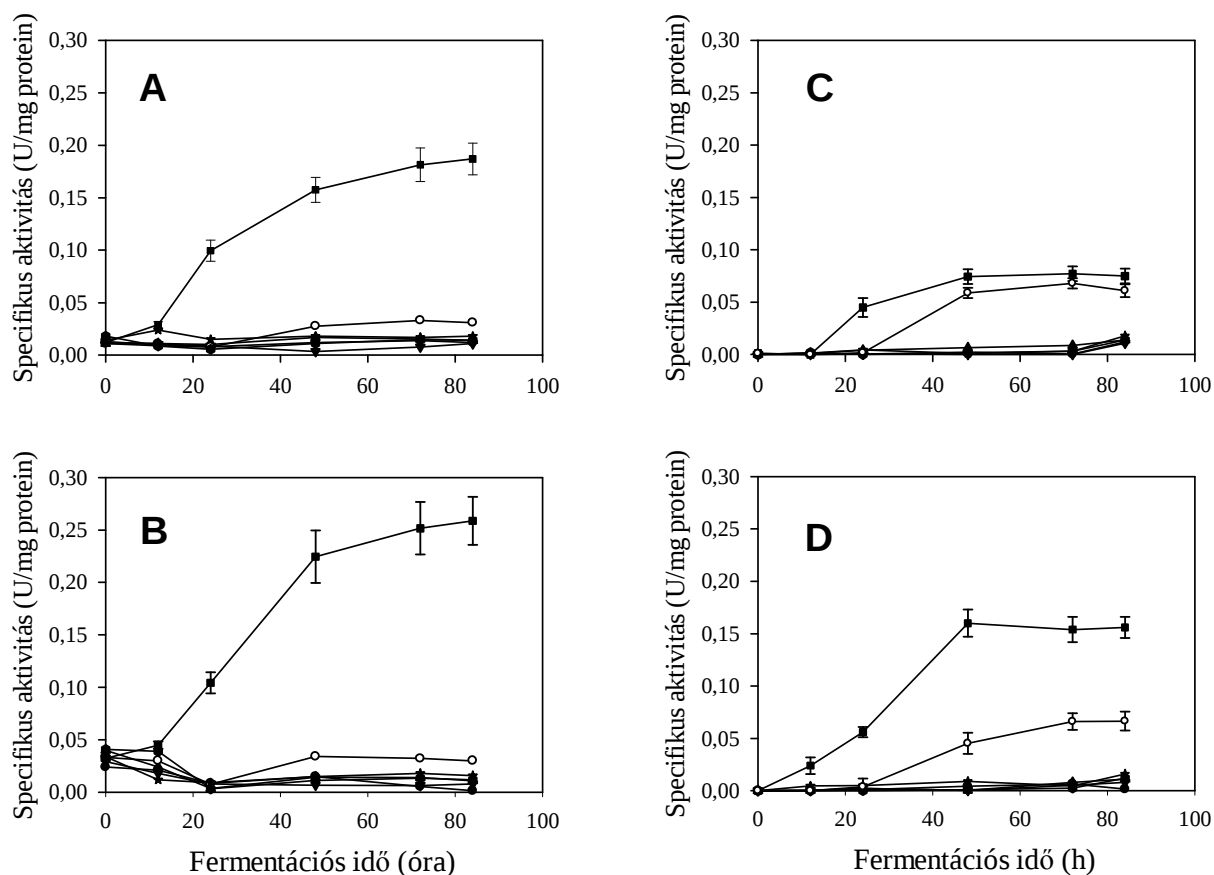
50. ábra: A *P. chrysogenum* WT törzs (üres szimbólumok) és *P. chrysogenum* AS-P-78 (sötét szimbólumok) laktóz-MM időprofiljai. Négyzet: biomassza koncentrációk; kör: maradék laktóz koncentrációk

Noha az extra- és intracelluláris bGal aktivitást hagyományosan ONPG-vel határozzák meg, *P. chrysogenum* esetében – szemben pl. az *A. nidulans*-sal – kevés irodalmi előzmény állt rendelkezésre (NAGY és mtsai 2001 a, b). Ellenőriztük ezért, hogy a bGal enzimaktivitás a mesterséges szubsztrátumon illetve laktózon korrelál-e. Bár ONPG-n valamivel magasabb értékeket kaptunk (**VII. táblázat**), a különbség nem haladta meg a laktóz hidrolízis értékeinek 15%-át ($p < 0.1\%$). Lényegében azonos adatokat kaptunk 1 mM kiindulási koncentrációnál is ($p < 0.1\%$). Az ONPG-alapú eljárást ezért alkalmasnak tekintettük a *P. chrysogenum* bGal aktivitásának tanulmányozására.

A bGal aktivitás kinetikáját laktóz-MM-on, batch fermentációk során elemeztük. A laktózfogyás időprofilja mindkét törzsben megegyezett az intra- illetve extracelluláris bGal aktivitásokéval (**50-51. ábra**). Amikor laktóz helyett D-galaktózt használtunk szénforrásként – ellentétben az *A. nidulans*-ban mért intracelluláris bGal aktivitással (lásd 15. ábra) – mindkét bGal aktivitás minimális maradt. L-arabinózon mérsékelt extracelluláris aktivitás mérhető (**51. ábra**), értéke mintegy fele a laktózon mért maximális értéknek mindkét törzsben. Más, közös monoszacharidokon – D-glükóz, D-fruktóz, glicerín – sem extra- sem intracelluláris bGal aktivitás nem volt kimutatható egyik törzsben sem. Mindkét aktivitás – az extracelluláris különösen – a fermentáció végére magasabb az AS-P-78-ban. Az extra enzimaktivitás azonban nem serkenti a növekedést vagy a laktóz fogyást, ami arra utal, hogy ennél a fajnál is a felvétel lehet a sebességhatározó lépés a laktóz katabolizmusában.

	Specifikus béta-galaktozidáz aktivitás (U/mg protein)			
	extracelluláris		intracelluláris	
	ONPG	laktóz	ONPG	laktóz
D-glükóz	< 0.004	< 0.004	< 0.004	< 0.004
D-xilóz	< 0.004	< 0.004	< 0.004	< 0.004
L-arabinóz	0.12 ± 0.01	0.10 ± 0.01	< 0.004	< 0.004
laktóz	0.156 ± 0.014	0.131 ± 0.019	0.25 ± 0.023	0.21 ± 0.022
D-galaktóz	0.006 ± 0.001	< 0.004	0.005 ± 0.001	< 0.004
D-fruktóz	< 0.004	< 0.004	< 0.004	< 0.004
glicerol	< 0.004	< 0.004	< 0.004	< 0.004

VII. táblázat: Extra- és intracelluláris ONPG ill. laktóz hidrolizáló aktivitás *P. chrysogenum* NRRL-1951-ben, különböző szénforrásokon, glicerinen kinövesztett, mosott sejtés tenyészetekben, az átmosás után 8 h-val. Statisztikailag egyező eredményeket kaptunk az AS-P-78 törzsszel is.



51. ábra: A *P. chrysogenum* NRRL 1951 (A, C) és AS-P-78 (B, D) törzsek specifikus intra (A, B)- és extra-celluláris (C, D) β -galaktozidáz aktivitásának időprofilja különböző szénforrásokon. D-glükóz (●), D-fruktóz (▲), laktóz (■), a D-galaktóz (Δ), glicerol (▼), D-xilóz (•) és L-arabinóz (○).

Az *Aspergillus* az *Eurotiales*-ek *Eurotiomycetes* rendjén belül a *Penicillium* testvér nemzetsége (HOUBRAKEN és mtsai 2011). *Aspergillus*-okban a laktóz hidrolízis extra- és intracelluláris módját is leírták. Az *A. niger* a laktózt extracellulárisan hidrolizálja a laktózzal indukálható GH35-típusú enzim (*LacA*; lókuszt An01g12150) révén (NEVALAINEN és mtsai 1981; KUMAR és mtsai 1992; PEL és mtsai 2007). A CBS 513.88 genom további négy *lacA*-paralóg gént tartalmaz a következő lókuszon: An14g05820, An01g10350, An06g00290 és An07g04420. Az öt *A. niger* GH35 fehérje filogenetikailag négy azonos eredetű kládnak felel meg. A négy paralóg gén képviselői megtalálhatók a *Pezizomycotina* különböző osztályaiban is (**2. melléklet**).

A *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1225 genom három GH35 paralóg gént tartalmaz a Pc16g12750, Pc06g00600 és Pc14g01510 annotált lókuszon. Az átirított fehérjék mindegyike tartalmaz egy szekrécióhoz szükséges szignálszekvenciát. A géneket *bgaA*, *bgaB* és *bgaC*-nek neveztük el (**3. melléklet**). A Pc16g12750 lókuszon lévő *lacA*-ortológ (= *bgaA*) megfelel a rokon *Penicillium* fajok (*P. expansum* és *P. canescens*) bGal génjeinek. Az An14g05820 (**2. melléklet**, 2. klád) teljes ortológja a *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1225 genomban nem található meg, viszont sértetlen a *P. paxilli*-ban és *P. digitatum*-ban. Feltételezhető, hogy pszeudo-génné fejlődött vissza.

Az *A. nidulans* *bgaD* (AN3201) egyetlen *P. chrysogenum*-ortológját (= *bgaD*; **3. melléklet**) is kiválasztottuk biológiai validálásra.

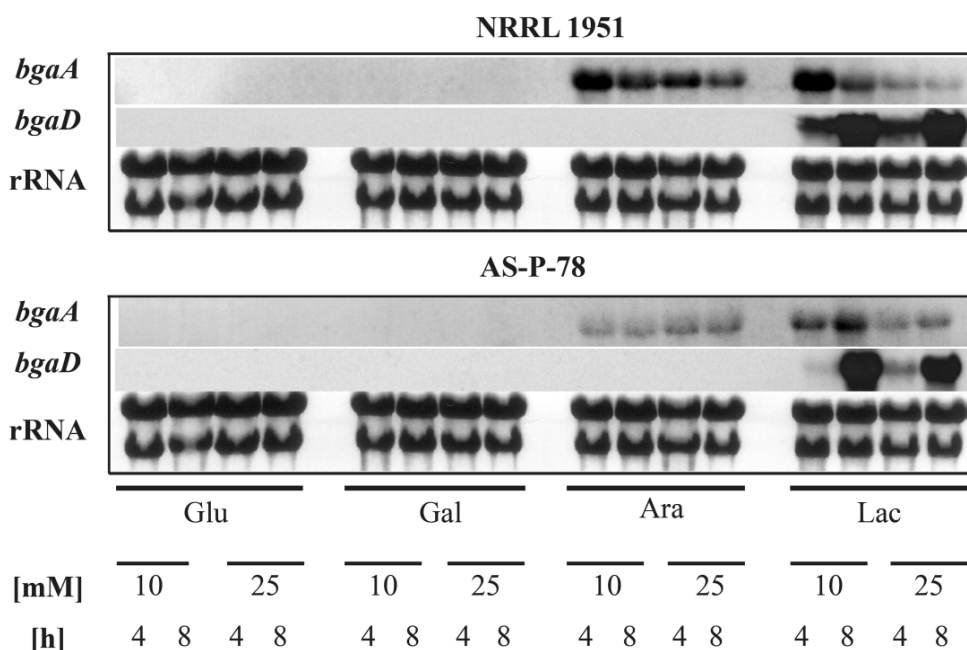
Az *A. nidulans* *bgaD/lacpA* génpár tagjai között található kisméretű gén (AN3200) feltételezhetően egy intracelluláris GH2 enzimet kódol. A *P. chrysogenum* ortológot (= *bgaE*; **3. melléklet**) szintén kiválasztottuk expressziós analízisre.

A *P. chrysogenum* genom *bgaD* közelében is található egy laktóz transzporter gén (lókuszt: Pc22g14530), mely azonban nincs közeli rokonságban az *A. nidulans* *lacpA*-val. Mi több, a vizsgált genom szekvenciák alapján a *P. chrysogenum*-ból hiányzik a *LacpA* ortológ. Ezért az *A. nidulans* korábban kiválasztott (lásd 47. oldal) három potenciális laktóz permeáz génjének (AN1577, AN6831 és AN2814) ortológjait próbáltuk megkeresni *P. chrysogenum*-ban. A genom két ilyen gént tartalmaz (Pc13g08630 = *lacA*, az *A. nidulans* *lacpB* ortológja; Pc16g06850 = *lacB*; **3. melléklet**). A két cukortranszporter gént is expressziós analízisre jelöltük ki.

Összességében tehát az *A. niger* extracelluláris és az *A. nidulans* intracelluláris laktóz anyagcseréjének komponenseit alapul véve öt hidrolázt és két permeázt találtunk *in silico* a *P. chrysogenum* genomban, melyek jó eséllyel szerepet játszanak a laktóz asszimilációjában. A továbbiakban ezen gének kifejeződését elemezzük.

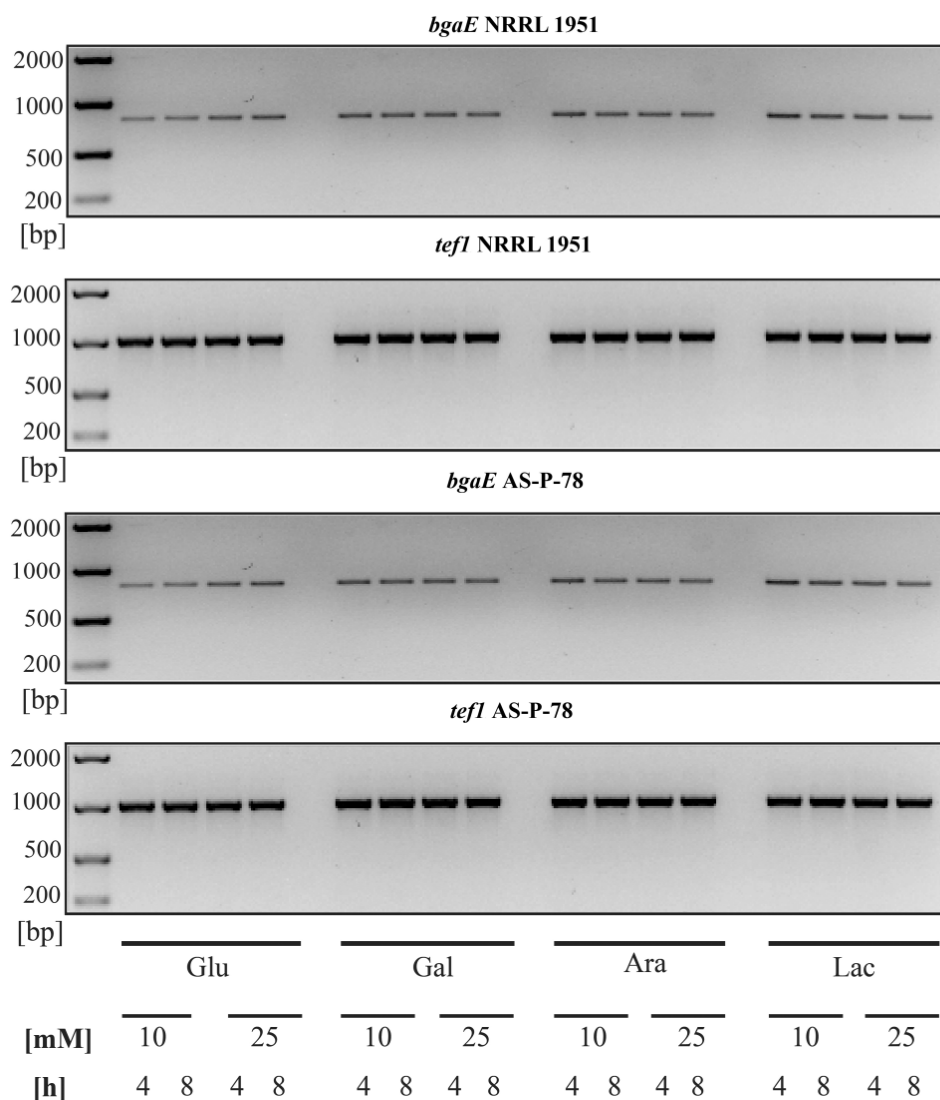
A különböző szénforrásokon kapott specifikus bGal aktivitási adatok azt mutatták, hogy D-glükózon, D-xilózon, glicerinen és D-fruktózon nem képződik enzim. Ezért a laktóz lebontásban feltehetően részt vevő gének transzkripció elemzését laktózon, D-galaktózon és az L-arabinózon végeztük, negatív kontrollként D-glükózt alkalmaztunk (52. ábra). Ebben a kísérletben is a semleges (nem indukáló, nem represszáló) szénforrás glicerinen növesztettük micéliummá a konídiumokat.

A három extracelluláris génből kettő (*bgaB* és *bgaC*) nem fejeződött ki laktózon egyik törzsben, időpontban és koncentrációnál sem. A másik három hidroláz gén (az extracelluláris *bgaA*, valamint az intracelluláris *bgaD* és *bgaE*) expressziós jellemzői azonosak voltak a két törzsben, az alkalmazott laktóz koncentráció (10 illetve 25 mM) nem befolyásolta. A hosszabb (8 h) inkubációs idő a 4 h periódushoz képest megnövelte az átíródott *bgaD* mennyiségét.



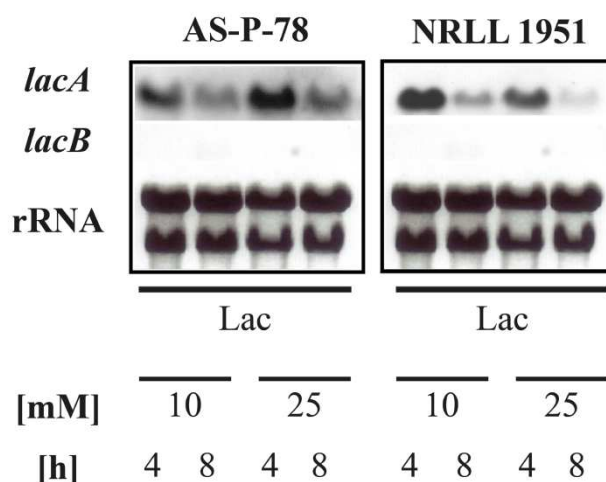
52. ábra: Két feltételezett (*bgaA*: extra-, *bgaD*: intracelluláris) béta-galaktozidáz gén transzkripció analízise D-glükózon (Glu), D-galaktózon (Gal), L-arabinózon (Ara) és laktózon (Lac), a *P. chrysogenum* NRRL 1951 és AS-P-78 törzsekben.

A harmadik hidroláz gén, a *bgaE* transzkripciójának mértéke fluoreszcens Northern analízissel a detektálási küszöbön mozgott, ezért a szemi-kvantitatív, de jóval érzékenyebb Reverz Transzkriptáz (RT-) PCR módszer alkalmazásával vizsgáltuk meg kifejeződését (53. ábra). A *bgaE* gyenge, konstitutív expressziót mutatott minden vizsgált körülmény között, *A. nidulans*-béli ortológjához (AN3200) hasonlóan. Ez azt valószínűsíti, hogy a *P. chrysogenum* *bgaE* sem játszik fontos szerepet a laktóz hidrolízisben.



53. ábra: A *bgaE* expressziós analízise a *P. chrysogenum* NRRL 1951 és AS-P-78 törzsekben. A gén egy feltételezett intracelluláris bGal-t kódol. Az alkalmazott szimbólumok azonosak a 47. ábrán lévőkkel. Az RT-PCR-analízis konstitutív kontrolljaként az eukarióta transzlációs elongációs faktor 1-alfa komponense (*tef1*) szolgált.

A két feltételezett laktóz permeáz gén közül a *lacA* kizárólag laktózon fejeződött ki mindkét *P. chrysogenum* törzsben, mindkét indukáló koncentrációt és inkubációs időt is figyelembe véve (54. ábra). A *lacA* expressziós szintje lényegesen magasabbnak tűnt a tápközeg váltás után 4 órával a 8 órás mintához képest. Ez éppen a fordítottja a *bgaD* gén expressziós időprofiljának. A *lacB* transzkripciója viszont egyetlen vizsgált szénforráson, így laktózon sem volt detektálható (54. ábra), jelezve, ez a permeáz gén nem releváns a tejcukor asszimilációjának szempontjából.



54. ábra: A két feltételezett laktóz permeáz gén (*lacA* és *lacB*) transzkripció elemzése laktózon (Lac) *P. chrysogenum* NRRL 1951 és AS-P-78 törzsekben. A többi vizsgált szénforráson nem történt transzkripció. Az RNS minőségének és mennyiségének ellenőrzése céljából a riboszómális RNS-t (28S és 18S) etídium-bromiddal tettük láthatóvá.

Sikerült tehát – noha még csak közvetett módon, génkiütések nélkül⁴¹ – bebizonyítani, hogy a *P. chrysogenum* kettős laktóz asszimilációs mechanizmussal rendelkezik: genomja tartalmaz egy feltételezett extracelluláris bGal-t, valamint egy feltételezett laktóz permeázt és egy feltételezett intracelluláris bGal-t is. A további két feltételezett extracelluláris bGal-t kódoló GH35 gén (*bgaB* és *bgaC*) nem expresszázódtak a vizsgált körülmények között, és ezért nem valószínű, hogy fiziológiailag releváns szerepük lenne a laktóz asszimilációjában. Ugyanakkor bGal izoenzimek termelése egy fajon belül nem lenne példa nélküli a gombák körében. Az *A. carbonarius* két, aminosav szekvenciájában eltérő extracelluláris bGal-t termel (O'CONNELL és mtsai 2008), míg a savtűrő *Teratosphaeria acidotherma* gomba (Ascomycota; Pezizomycotina; Dothideomycetes; Capnodiales) négy különböző intracelluláris bGal-al rendelkezik (ISOBE és mtsai 2013). A *P. chrysogenum* növekedési jellemzői (specifikus növekedési ráta, biomasszahozam) laktózon hasonló voltak az *A. nidulans*-hoz vagy *T. reesei*-hez, de a bGal transzkripció/aktivitás szénforrás általi szabályozásában érdekes különbségeket találtunk. A leginkább figyelemre méltó: sem az extra-, sem az intracelluláris bGal aktivitás, és egyik feltételezett Bgal és laktóz permeáz gén sem indukálható D-galaktózzal. A szakirodalom szerint minden eddigi vizsgált gombában (sőt baktériumokban is; HASAN és mtsai 1974), a D-galaktóz legalább olyan potens induktora a Bgal-t kódoló géneknek, mint a laktóz (SEIBOTH és mtsai 2005; DE VRIES és mtsai 1999a).

⁴¹ A penicillin termelő *P. chrysogenum* törzsekkel végzett kutatások az akadémiai szektorban is ipari támogatás és felügyelet mellett folynak, így a specifikus molekuláris biológiai eszközök (törzsek/klónok/plazmidok stb.) beszerzése nehézkes. Génkiütés és visszatranszformálás révén definiált funkciók hiányában a vizsgált gént/génterméket a „feltételezett” (putative) jelzővel láttuk el.

Mivel a D-galaktóz represszálo szénforrás (DE VRIES és mtsai 2001) és a gomba bGal génnek jellemzően CCR alá esnek (NAGY és mtsai 2001a; SEIBOTH és mtsai 2005; CHULKIN és mtsai 2011), feltételeztük, hogy *P. chrysogenum*-ban a D-galaktóz esetleges indukáló hatását a CCR ellensúlyozza. A hipotézis tesztelése céljából a standard 25 mM-ról és 10 mM-ról 1 mM-ra és 0,1 mM-ra csökkentettük az inducer koncentrációkat. A kísérlet háttérében az áll, hogy függetlenül a szénforrás represszív jellegétől, az ilyen alacsony koncentráció alacsony specifikus növekedési rátát, az pedig karbon derepressziót eredményez (ILYÉS és mtsai 2004). Egyik feltételezett bGal gén sem expresszáldott, azaz *P. chrysogenum*-ban ezek a gének nem reagálnak a laktóz hidrolízis elsődleges termékére.

Mint említettük, a fonalas gombák bGal génjei tipikusan indukálhatók hemicellulóz monomer pentózokkal (pl. L-arabinóz, D-xilóz; NIKOLAEV és mtsai 1998; DE VRIES és mtsai 1999a). Ezzel szemben a *P. chrysogenum* egyik feltételezett bGal génje sem reagált D-xilózzal, és ONPG hidroláz aktivitást sem tudtunk rajta mérni. Az L-arabinóz mérsékelten indukálta a *bgaA* kifejeződését; valószínűleg ez a géntermék felelős az L-arabinózon mért extracelluláris ONPG hidroláz/laktáz aktivitásért, hasonlóan a rokon *P. canescens* L-arabinózzal indukálható egyik bGal ortológjához (NIKOLAEV és mtsai 1998).

P. chrysogenum-ban csak extracelluláris bGal képződik L-arabinózon. Összhangban ezzel, az L-arabinózzal indukálható, intracelluláris GH2-hidroláz enzimet kódoló *A. nidulans* *BgaD* paralóg lókuszának (AN2364) az ortológját a *P. chrysogenum* genom nem tartalmazza.

Az ONPG-hidroláz aktivitások korrelálnak a *bgaA* és a *bgaD* expressziójával, így az enzimaktivitás profiloknál megfigyelt hatások a transzkripció szabályozást tükrözhetik. Ez alapján *P. chrysogenum* intracelluláris laktóz asszimilációs apparátusa egy indukálható bGal-ból (*bgaD*), egy indukálható permeázból (*lacA*) és egy konstitutív GH2-ből (*bgaE*) épül fel. Az extracelluláris laktóz hidrolízis struktúrája az *A. niger*-hez hasonlít (DE VRIES és mtsai 1999a).

Az *A. nidulans* két élettanilag releváns laktóz permeázával szemben (*LacpA*, *LacpB*) a *P. chrysogenum* csak egy ilyen transzporterrel (*LacA*) rendelkezik, mely a *lacpB* ortológja. A *LacA* az összes átvizsgált *Penicillium* genomban jelen van. A *LacB* – ortológja csak a *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255-ben, a *P. chrysogenum*-ban *sensu strictu* és a *P. digitatum*-ban fordul elő, hiányzik viszont a *P. paxilli*-ből és a *P. decumbrens*-ből – nem expresszáldódik a vizsgált szénforrásokon. Érdekes azonban, hogy a *P. chrysogenum* *LacB* és az *A. nidulans* AN6831 közös ortológja megtalálható a celluláz termelő *T. reesei*-ben (Trire2:3405), ráadásul ebben a gombafajban a géntermék szerepet játszik a laktóz anyagcserében (IVANOVA és mtsai

2013). A Trire2:3405 deléciónja ugyanis gátolja a *T. reesei* konídiospórák csírázását laktózon anélkül, hogy befolyásolná a növekedést D-glükózon vagy D-galaktózon.

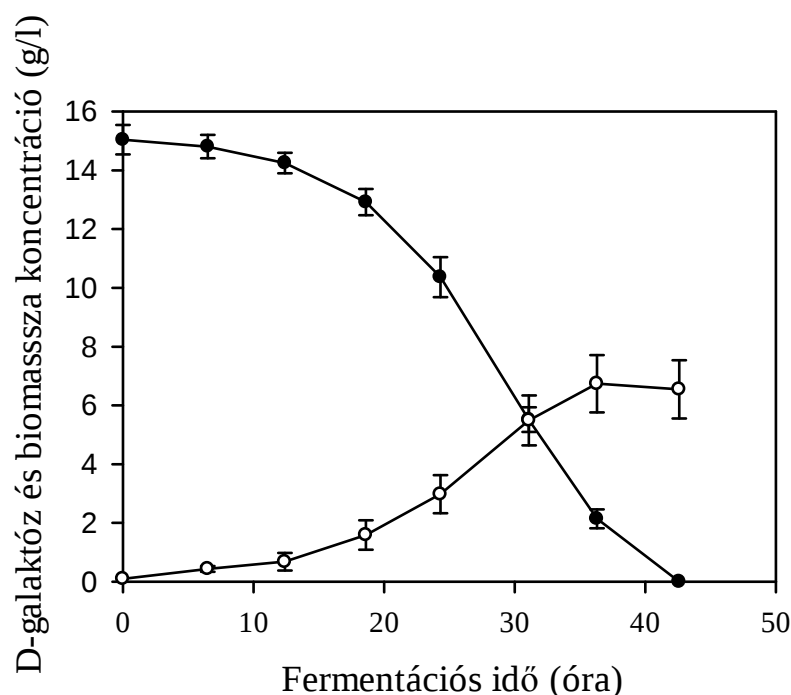
Jól dokumentált tény, hogy a megnövekedett penicillintermelés a különböző ipari törzsfeljesztő programok kezdeti leszármazottaiban – ideértve az AS-P-78-at is – egybeesik a penicillin bioszintézis génklaszter amplifikációjával (BARREDO és mtsai 1989). A penicillin bioszintézis gének overexpressziója azonban nem magyarázható kizárólag a génklaszter kópiaszámának növekedésével (HAAS és mtsai 1997). A megnövekedett kihozatal részben olyan mutációk következménye is, melyek befolyásolják az elsődleges anyagcserét irányító általános szabályozási utakat (ESPESO és PEÑALVA 1994). A növekedési paraméterek azonban azt mutatták, az NRRL 1951 törzshöz viszonyítva az AS-P-78 megnövekedett penicillin-termelő potenciálja nem jár együtt a laktóz asszimilációs ráta megváltozásával. Ezek alapján a *P. chrysogenum* laktóz metabolizmusa – legalábbis a korai generációból származó AS-P 78 törzs esetén – nincs összefüggésben a gomba penicillin-termelő potenciáljával.

A második világháború óta a *P. chrysogenum* törzseket folyamatosan alkalmazták és fejlesztették a penicillin és szerkezetileg rokon antibiotikumok ipari termelésére (OZCENGİZ és mtsai 2013). Ezen „klasszikus” alkalmazás mellett azonban egyre gyakrabban használnak *P. chrysogenum* törzseket enzim-koktélok előállítására is, melyek fermentációja mezőgazdasági maradványokon és más, bőségesen rendelkezésre álló, olcsó növényi anyagokon megy végbe (SAKAMOTO és ISHIMARU 2013).

A lignocellulóz egyik legfontosabb komponense a D-galaktóz. Lebontásának Leloir-útvonala általánosan elterjedt a prokarióta és az eukarióta sejtekben is (FREY és mtsai 1996). Korábban kilenc *Aspergillus* fajban már azonosítottuk az útvonal (feltételezett) strukturális génjeit (FLIPPPI és mtsai 2009). A *P. chrysogenum* D-galaktóz lebontásáról azonban hiányosak voltak az ismereteink.

Egyes fonalas *Ascomycetes* gombák (pl. *A. niger*, lásd 4. 1. 4. 2. fejezet) konídiospórái D-galaktózon, mint egyedüli szénforráson nem csíráznak ki, viszont micéliumuk képes új biomasszát létrehozni D-galaktózon, ha előtte más szénforráson a növekedés már elindult. Arról, hogy a *P. chrysogenum* képes-e hasznosítani a D-galaktózt, mint egyedüli szénforrást a növekedési szakasztól függően, szakaszos, batch fermentációk során győződünk meg.

A gomba kicsírázott és jól nőtt D-galaktózon. 15 g/l cukor mintegy 40 óra alatt fogyott el (55. ábra); az elért maximális specifikus növekedési ráta a gyors növekedési szakaszban $\mu_{\max.} = 0,085 \pm 0,006$ 1/h, a maximális biomassza koncentráció és a hozamkonstans értékei $X_{\max.} = 6,73 \pm 0,49$ g/l illetve $Y_{x/s} = 0,45 \pm 0,04$ voltak.



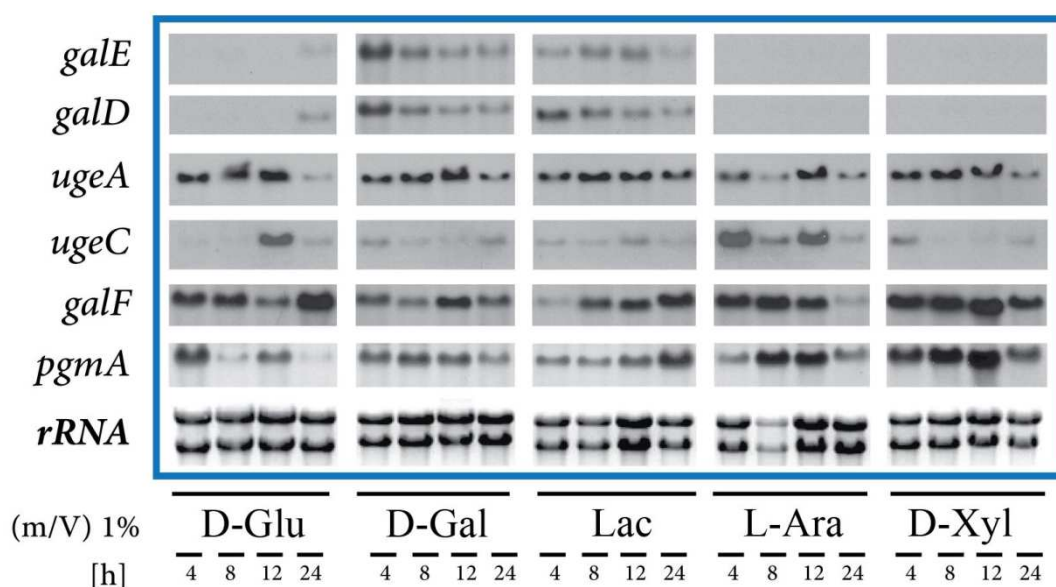
55. ábra: A *P. chrysogenum* WT törzs batch fermentációjának időprofiljai. Üres szimbólumok: biomassza; teli szimbólumok: aktuális D-galaktóz koncentráció. A fermentációk konídiospórákkal indultak.

Egy párhuzamos kísérletben a *P. chrysogenum* konídiospórákat glicerinen csíráztattuk, és az előnővesztett micéliumot D-galaktózt egyedüli szénforrásként tartalmazó friss táptalajra mostuk át. Ez a tenyészet is csaknem azonos kinetikai paramétereket mutatott, mint a spórával indított fermentációk. Összehasonlításuképpen, a vonatkozó kinetikai paraméterek D-glükózon a következők voltak: $\mu_{\max} = 0,125 \pm 0,01$ 1/h, $X_{\max} = 7,54 \pm 0,39$ g/l and $Y_{x/s} = 0,51 \pm 0,04$. Noha ezek az értékek szignifikánsan ($p < 0,1\%$) magasabbak, mint D-galaktózon, mégis azt mutatják, hogy a D-galaktózt egy gyorsan katabolizálódó ("jó") szénforrásnak lehet tekinteni a *P. chrysogenum* esetében. A korábbiakhoz hasonlóan a 0,01% (w/v) pepton jelenléte (ami $< 1\%$ -a a kiindulási D-galaktóz koncentrációnak) itt is jelentősen lerövidítette a lag fázist a konídiospórákról indított fermentációk elején.

A *P. chrysogenum* teljes vegetatív életciklusát befutja D-galaktózon, vagyis az oxidatív Leloir-útvonala vélhetően működik. A *P. chrysogenum in silico* valóban tartalmazza a Leloir-útvonal feltételezett homológjait (3. melléklet). A *galE* (feltételezett galaktokináz) és a *galD* (feltételezett gal-1-P-UT) az *A. nidulans galE9* ill. *galD5* gének orthológjai. Az *ugeA* génterméke nagyon hasonló az *S. cerevisiae* N-terminális doménjének GAL10 bifunkciós enziméhez (MAJUMDAR és mtsai 2004), így feltételezhetően 4-epimerázt kódol. Az *A. nidulans ugeB* (PAUL és mtsai 2011) és az *A. nidulans* AN0746 and AN3119 lókuszok 4-epimerázokat kódolnak (FLIPPHI és mtsai 2009); a struktúráisan hozzájuk hasonló három

(automatikusan annotált) *P. chrysogenum* lókuszt is biológiai validálásra alkalmasnak ítéltük. A feltételezett foszfoglükomutáz kódoló *pgmA* és a feltételezett UDP-glükóz pirofoszforiláz kódoló *galF* szintén az *A. nidulans* ortológjai (3. melléklet).

A *P. chrysogenum* Leloir-útvonal feltételezett génjeinek expressziós profilját D-galaktózon, laktózon, D-glükózon, továbbá L-arabinózon és a D-xilózon vizsgáltuk. Az összes vizsgált gén konstitutívan fejeződött ki D-galaktózon, függetlenül a mintavétel időpontjától (4, 8, 12 vagy 24 órával a glicerinen előnövesztett micélium átmosása után). A feltételezett 4-epimeráz gének közül az *ugeA* expressziója erősebb, mint az *ugeC*-é, míg az *ugeB*, *ugeD* és *ugeE* a vizsgált körülmények között nem fejeződött ki. Laktóz szénforráson ezzel lényegében megegyező, D-glükózon, L-arabinózon és D-xilózon azonban jelentősen eltérő expressziós profilokat figyeltünk meg (56. ábra).



56. ábra: A katabolikus Leloir-útvonal génjeinek transzkripció elemzése a *P. chrysogenum* NRRL 1951 törzsében. A gének neveinek rövidítéseit lásd az 3. mellékletben. D-Glu: D-glükóz, D-Gal: D-galaktóz, Lac: laktóz, L-Ara: L-arabinóz, D-Xyl: D-xilóz. A mennyiségi és minőségi kontrollként szolgáló riboszomális RNS-eket (28S és 18S) 2%-os natív agaróz gélen etídium-bromiddal tettük láthatóvá.

A feltételezett UDP-D-glükóz-pirofoszforiláz (*galF*) illetve foszfoglükomutáz (*pgmA*) konstitutívan fejeződtek ki a vizsgált szénforrásokon. Kifejeződésük vélhetően kapcsolatban áll a Leloir-útvonal alapvető anabolikus funkcióival, a gomba sejtfallszintézisével. Ezzel éppen ellenkezőleg, a katabolikus Leloir-útvonal első két génjének (*galE* és *galD*) transzkripciója – amelyek elméletileg nem relevánsak a gombasejtfal szintézisben – a D-galaktóztól eltérő szénforrásokon csupán egyetlen mintavételi pontban volt megfigyelhető Northern analízissel.

Ez az egy kivétel – mely szintén nagyon gyenge expressziót jelentett – a D-glükóz volt a legkésőbbi mintavételi pontban (24 h), a növekedési szubsztrátum teljes elfogyása után.

A galaktokináz aktivitások összhangban voltak a transzkripciós profilokkal: rendre alacsony aktivitás volt mérhető glükózon 24 órával a micélium transzfer után, míg a korábbi időpontban csak a vakhoz képest nem-szignifikáns ($p < 0,1\%$) háttéraktivitás volt kimutatható (VIII. táblázat).

Idő (h)	Szénforrás				
	D-glükóz	D-galaktóz	laktóz	L-arabinóz	D-xilóz
10	> 0,015	$0,350 \pm 0.04$	$0,311 \pm 0.04$	> 0,015	> 0,015
24	$0,020 \pm 0.01$	$0,321 \pm 0.03$	$0,354 \pm 0.03$	> 0,015	> 0,015

VIII. táblázat. Galaktokináz enzimaktivitás szénforrás függése mosott sejtes tenyészetekben *P. chrysogenum* WT törzsben. Mértékegység: U/mg protein.

Pentózokon nem lehetett *galE* vagy *galD* expressziót megfigyelni (51. ábra). Ezzel összhangban a pentózon növesztett micéliumokból sem lehetett statisztikailag értékelhető galaktokináz aktivitást mérni (VIII. táblázat). Megjegyzendő, a D-glükózos tenyészetrel szemben a másik négy vizsgált tenyészetből nem fogyott el a szénforrás a 24 órás mintavételi időpontra.

Más gombafajok ortológjaihoz hasonlóan a *P. chrysogenum* *ugeA*, *galF* és *pgmA* konstitutívan fejeződtek ki a szénforrás függvényében, amint az várható is olyan génektől, amelyek a sejtfal esszenciális prekursorainak – az UDP-glükóznak és az UDP-galaktóznak – a szintéziséhez szükségesek. Az eddig vizsgált *Ascomycota* fonalas gombafajokban azonban a galaktokinázt és gal-1-P-UT kódoló gének – függetlenül a D-galaktóz anyagcserétől – szintén kifejeződnek minden szénforráson, bár transzkripciójuk mértéke a katabolikus Leloir-útvonal közvetlen vagy közvetett szubsztrátumaival tovább fokozható (SEIBOTH és mtsai 2002, 2004; CHRISTENSEN és mtsai 2011). *P. chrysogenum*-ban viszont a galaktokinázt és a gal-1-P-UT-t (feltételezhetően) kódoló gének kifejeződése konstitutív alapexpresszió nélkül, szelektíven is indukálható D-galaktózzal és laktózzal. Ez eltér két másik fermentációs ipari faj, az *A. niger* és a *T. reesei* viselkedéséhez képest, és eddig nem ismert szabályozási mechanizmusok felé mutat.

4.2. A SZÉNFORRÁS ÉS A SPECIFIKUS NÖVEKEDÉSI RÁTA ÖSSZEFÜGGÉSEI

A specifikus növekedési ráta bármely sejt/mikróbatenyészet alapvető paramétere, mely döntő hatással van az anyagcserére. Noha jelentőségét korán felismerték (NOVICK és SZILÁRD 1950 a, b)⁴², a specifikus növekedési ráta hatását is figyelembe vevő vizsgálati módszerek mégsem terjedtek el általánosan a mikrobiológiai gyakorlatban. Ennek főleg technikai okai vannak: a megközelítés alapját jelentő folytonos tenyészetek (kemosztát, turbidosztát és ezek változatai) létrehozása és fenntartása idő- és munkaigényes, különösen a fali növekedésre fokozottan hajlamos fonalas gombák esetében (a kemosztát teória és a technikai részletek összefoglalását lásd **Függelék: Anyagok és Módszerek fejezet**).

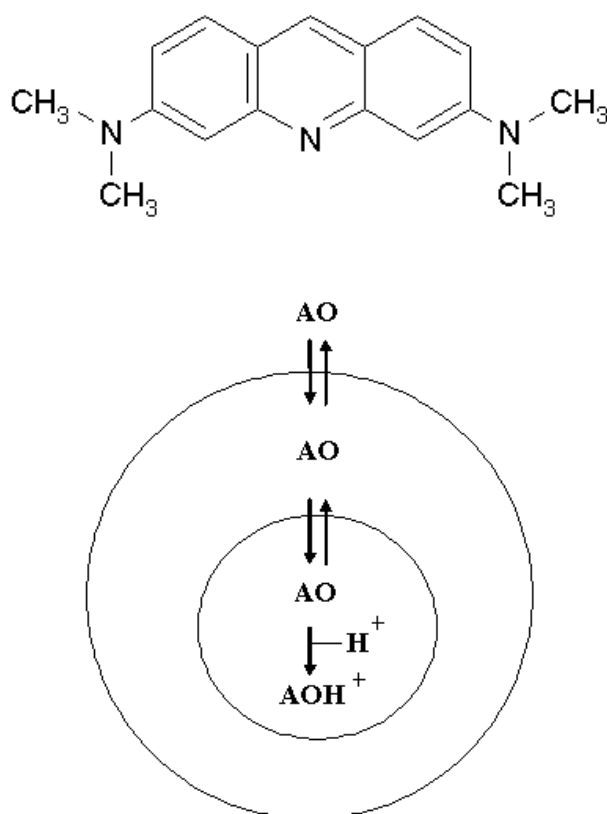
Munkacsoportunk régóta végez folytonos tenyésztésen alapuló élettani kísérleteket, így lehetőségünk nyílt a fungális anyagcsere specifikus növekedési ráta szempontjából történő vizsgálatára. Ezen tanulmányaink közül először a növekedési ráta-függő metabolikus aktivitás kvantitatív meghatározására kidolgozott eljárásunkat ismertetjük. A továbbiakban a CCR működését elemezzük – modell rendszerként az *A. nidulans* bizonyítottan CreA-függő intracelluláris bGal aktivitását használva – majd a *T. reesei* extracelluláris bGal illetve celluláz enzimeit kódoló gének kifejeződésének növekedési ráta függését vesszük górcső alá.

4.2.1. A metabolikus aktivitás és a növekedési ráta kapcsolatának modellezése

A sejtek élettani állapotának ismerete és nyomonkövetése a fermentációs folyamatszabályozás szempontjából alapvetően fontos információ. A tenyészetek szén-dioxid produkciója, oxigén fogyasztása, szubsztrátumhasznosítási rátája, biomassza és metabolit termelése együttesen (és részben külön-külön is) a sejtek metabolikus aktivitását jelzik. A metabolikus aktivitás tehát absztrakt fogalom, mi azonban – kihasználva a fluoreszcens mikroszkópi technikák fejlődését – megpróbáltunk reprodukálható módszert kidolgozni a becslésére. Hipotézisünk értelmében a metabolikus aktivitás a micéliumon átáramló szénváz fluxusát jelenti. Munkahipotéziseink teszteléséhez a CPC termelő *A. chrysogenum*-ot használtuk.

Az Akridin Narancs (Acridine Orange, AO; 3, 6 -bisz[dimetilamino] akridin) nevű, fluoreszcens tulajdonságú vegyület egy gyenge bázis, mely a sejtbe töltés nélküli formában, transzporter függetlenül jut be. A citoszolt külső koncentrációjának függvényében gyorsan feltölti (**57. ábra**). Ezt követően a savas kémhatású sejtorganellumokban lassabban, de jóval nagyobb koncentrációban halmozódik föl, mivel nitrogén atomjai kvaternerizálódnak, s az így kialakult alig permeábilis protonált forma csapdába kerül (DEAN és mtsai 1984).

⁴² A múlt század egyik legjelentősebb atomfizikusa, Szilárd Leó (1898 – 1964) 1947-ben lelkiismereti okok miatt befejezte részvételét a Manhattan Projectben, és haláláig molekuláris biológiával foglalkozott.



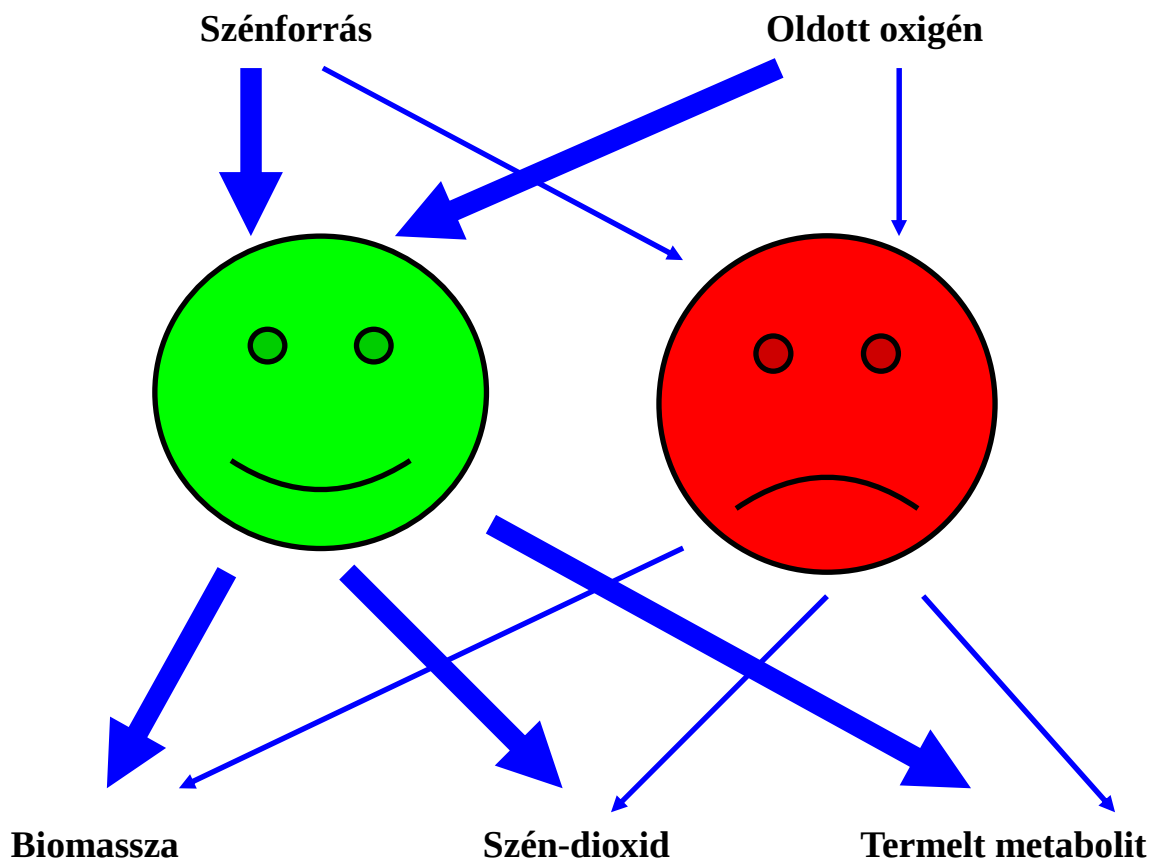
57. ábra. Az akridinnarancs szerkezeti képlete és sejten belüli transzportja

Az AO különböző formáinak eltérőek az abszorbancia és fluoreszcencia tulajdonságai. A zöld szín a monomer formából származik, míg a vörös a molekulák oligomer struktúrává alakulásának eredménye (MILLOT és mtsai 1997). Alacsony koncentrációban az AO 530 nm-es, zöld színű fluoreszcenciát ad. Ha a kompartmentekben az AO koncentráció 500 μM fölé nő, a fluoreszcencia az oligomer molekulák delokalizált elektronrendszerének torzulása miatt 660 nm-re vált (= vörös szín). Az AO felhalmozódásának mértéke, és ezáltal a fluoreszcencia színe a savas organellek belső kémhatásától függ. Minél savasabbak a kompartmentek, annál több AO halmozódik föl bennük (MILLOT és mtsai 1997).

Az öregedő gombasejtek egyik karakterisztikus jellemzője a vakuolizáció, melynek során a vakuolumok száma és térfogata is jelentősen megnő (PAUL és mtsai 1994; KARAFFA és mtsai 1997). A vakuolumok idősebb korban lesavanyodnak (ROST és mtsai 1995), ami a vakuolumok membránjához kötött H^+ -függő ATP-ázok működésének eredménye (ROTHMAN és mtsai 1989).

A modellt összefoglalva, ha egy sejt vagy sejtrégió metabolikus aktivitása alacsony, a savas kémhatású vakuolumok száma és mérete megnövekszik, amit az AO festés vörös színe jelez. Nagy szénváz-fluxus esetén csökkenő számú és méretű vakuolumok, és zöld színű

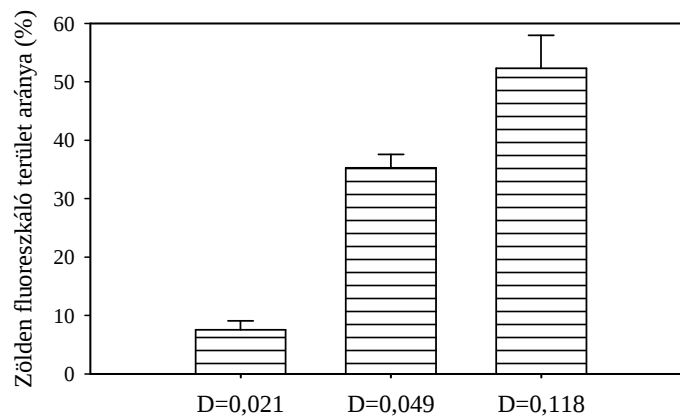
festődés lesz a jellemző. A festődés eredménye fluoreszcens mikroszkóppal tanulmányozható illetve elemezhető. Modellünket az **58. ábra** szemlélteti.



58. ábra. A fungális metabolikus aktivitás Akridinnarancs festésen alapuló becslésének modellje.

A specifikus növekedési ráta és az AO festődés közötti kapcsolatot kemosztát kultúrák vizsgálatával teszteltük. Ilyenkor az alacsonyabb hígítási ráta definíció szerint kisebb átáramló szénváz fluxust jelent, aminek következménye az alacsonyabb specifikus növekedési ráta. Négy különböző specifikus növekedési rátán tanulmányoztuk az AO festődést. Az értékek megfeleltek a szakaszos (batch) fermentációk gyorsulási, gyors növekedési, lassulási illetve stationer fázisainak.

Az *A. chrysogenum* micéliumok AO festődése jelentősen eltért a különböző hígítási rátákon. A legmagasabb hígítási rátánál észleltük a legnagyobb arányú zöld fluoreszcenciát, a legkisebb növekedési rátánál zöld szín nem látszott, itt már teljes mértékben a vörös került túlsúlyba. A köztes növekedési / hígítási ráta értékeknél az AO festődés is átmeneti jellegű (**59. ábra**). Ezzel bizonyítottunk tekintettük, hogy az AO festés számítógépes képelemzéssel történő kiértékelése gyors, megbízható, számszerűsíthető és reprodukálható becslését adja a gombatenyészet *in situ* metabolikus aktivitásának.



59. ábra. A zölden fluoreszkáló régió aránya AO festődés után *A. chrysogenum* kemosztát tenyészetekben, különböző hígítási rátákon (D (óra⁻¹)).

4.2.2. A karbon katabolit represszió növekedési ráta-függése

A fermentációs ipari gyakorlatban számos olyan termék, melynek bioszintézise CCR alatt áll (pl. penicillin) eredményesen termeltethető lassan hasznosuló szénforrásokon. Tudományos bizonyíték azonban korábban nem támasztotta alá a CCR növekedési ráta függését.

Négy olyan kemosztát tenyészetet hoztunk létre, melyekben a növekedési ráták értékei lefedték egy batch fermentáció teljes növekedési ráta tartományát. Glükóz limitáció mellett rendre $D = 0,095 \text{ h}^{-1}$, $0,068 \text{ h}^{-1}$, $0,045 \text{ h}^{-1}$ és $0,015 \text{ h}^{-1}$ hígítási (= specifikus növekedési) ráta értékeket állítottunk be. A legmagasabb érték egy batch fermentáció gyors növekedési, a legalacsonyabb a stacioner fázis előtti szakaszát modellezte. Mind a vad típusú *A. nidulans*, mind a *creAΔ4* mutáns tenyészetekben a reziduális glükóz koncentrációja 0,10 – 0,13 mM között változott, függetlenül a növekedési rátától. Noha valamennyi morfológiai eltérést tapasztaltunk a két törzs között – a legalacsonyabb növekedési rátán a vad típus spórázni kezdett, a hifacsúcsok átlagos száma lecsökkent, a mutáns pedig pelletképződést mutatott – ezek nem befolyásolták érdemben munkánkat.

Mint említettük (**4.1.1. fejezet**), a vad típusú *A. nidulans* nem képez bGal aktivitást glükózon, míg a karbon derepresszált mutáns törzs a laktózon mérhető aktivitás 17 %-át mutatja batch körülmények között. Ezzel összhangban a két legmagasabb növekedési rátájú tenyészetben a vad típus nem mutatott bGal aktivitást, míg a *creAΔ4* mutáns ugyanakkora aktivitást mutatott, mint batch körülmények között. $D = 0,045 \text{ h}^{-1}$ értéken a vad típusban megjelent egy nagyon alacsony bGal aktivitás, a mutáns törzs aktivitása változatlan maradt. A legalacsonyabb, $D = 0,015 \text{ h}^{-1}$ hígítási rátán a referencia bGal aktivitás elérte a *creAΔ4* mutáns tenyészetében mérhető, amely megegyezett a batch fermentáció D-glükózon kapott értékével. Megállapítottuk, hogy alacsony növekedési rátán a bGal aktivitás képződése D-glükózon is felszabadul a CreA gátló hatása alól.

Ahhoz, hogy az eredményeket bizonyosan a CreA-függő karbon katabolit represszió hatásának tudhassuk be, két különböző kontroll aktivitás megjelenését vizsgáltuk meg. A galaktokináz aktivitás szénforrástól függetlenül konstitutívan keletkezik (L-arabinózon és D-galaktózon enyhén indukálódik, de ennek itt nem volt jelentősége). Az izocitrát liáz aktivitás egy CreA-független inaktivációs mechanizmus révén D-glükóz hatására eltűnik (BOWYER és mtsai 1994). Mint látható (**IX. táblázat**), mindkét aktivitás szénforrás-profilja statisztikailag ($p < 0,1\%$) megegyezett a vad és a *creAΔ4* mutáns törzsekben.

Törzs	Enzimaktivitás	Szénforrás			
		D-galaktóz	laktóz	glicerol	D-glükóz
Vad típus	izocitrát liáz	0,004	0,003	0,004	0,004
	galaktokináz	0,32	0,155	0,14	0,12
<i>creAΔ4</i>	izocitrát liáz	0,004	0,004	0,004	0,004
	galaktokináz	0,29	0,185	0,178	0,14

IX. táblázat. *A. nidulans* WT és *creAΔ4* mutáns galaktokináz és izocitrát liáz aktivitásának szénforrás-profiljai. Mértékegység: U/mg protein.

A galaktokináz és az izocitrát liáz aktivitások megjelenése kemosztát tenyészetekben növekedési ráta függetlennek bizonyult, és a funkcionális *creA* gén megléte sem befolyásolta képződésüket (**X. táblázat**). A specifikus növekedési ráta tehát D-glükózon önmagában nem változtatja meg a galaktokináz és az izocitrát liáz aktivitások képződését, vagyis a bGal aktivitás értékei a CreA-függő karbon katabolit repressziós hatás megváltozásának tudhatók be (**X. táblázat**).

Eredményeink az első tudományos bizonyítékát jelentették a fermentációs ipari szakemberek régi tapasztalatának, miszerint a CCR kikerülhető, ha alacsony növekedési rátán tartjuk tenyészetünket – másszóval, a specifikus növekedési ráta determinánsa a CCR-nek. A fungális CCR még nem eléggé ismert ahhoz, hogy a megfigyelést adott molekuláris lépéshez rendeljük. Mivel azonban az extracelluláris D-glükóz koncentráció állandó volt mindegyik tenyészetben, a külső glükóz koncentráció nem játszhat okozati szerepet a CCR-ben. A D-glükóz felvétel rátája jórészt az extracelluláris koncentráció függvénye, így ugyanez igaz a transzportra is. Mindezt az is alátámasztja, hogy a transzportálható, de nem metabolizálható D-glükóz analóg, a 6-dezoxi-D-glükóz nem fejt ki CCR hatást (STRAUSS és mtsai 1999).

Törzs	Enzimaktivitás	Hígítási ráta (= specifikus növekedési ráta; h ⁻¹)			
		D = 0,095	D = 0,068	D = 0,045	D = 0,015
Vad típus	β-galaktozidáz	< 0,001	< 0,001	0,110	0,170
	izocitrát liáz	0,003	0,003	0,003	0,003
	galaktokináz	0,181	0,162	0,158	0,178
creAΔ4	β-galaktozidáz	0,191	0,189	0,184	0,194
	izocitrát liáz	0,003	0,003	0,003	0,003
	galaktokináz	0,193	0,172	0,161	0,180

X. táblázat. *A. nidulans* WT és creAΔ4 mutáns bGal, galaktokináz és izocitrát liáz aktivitásának növekedési ráta függése glükózon. Mértékegység: U/mg protein.

Hipotézisünk szerint egy glikolitikus köztes egyensúlyi koncentrációjának változása áll a jelenség hátterében. A glükóz-6-foszfát és a fruktóz-6-foszfát intracelluláris egyensúlyi koncentrációja gombákban növekedési ráta függő (WEIBEL és mtsai 1974). A glükóz-6-foszfát és a CCR kapcsolatára utal, hogy a 2-dezoxi-D-glükóz (melyet a gombasejt csak felvenni és foszforilezni tud, de tovább metabolizálni nem) képes CCR-t kialakítani. Modellünk azt is megmagyarázza, miért képesek nem-glikolitikus szénforrások is (pl. a glicerin; SZENTIRMAI 1964) repressziót kifejteni: a glükoneogenezis közteseként a glikolízistól függetlenül elérhetik azt a kritikus intracelluláris koncentrációt, mely elindítja a *creA* gén kifejeződését.

A CCR jelenségét jellemzően különböző szénforrásokon növekvő batch tenyészetek összehasonlítása révén tanulmányozzák. A módszer enkapikus hibája, hogy a derepressziót eredményező, kritikus növekedési ráta értéke szénforrás függő lehet. Ugyanez vonatkozik a tenyészkörülmények megváltoztatásának és a CCR mechanizmusának kapcsolatára – egy optimálistól eltérő érték nehezen megjósolható hatással lehet a specifikus növekedési rátára. Még az előnővesztett micéliumot friss táptalajra juttató (mosott sejtes) rendszerek esetében is gondot kell fordítani az anyagcsere fluxusok állandóságára. Noha a folytonos fermentációs rendszerek nem tartoznak a legegyszerűbb mikrobiológiai technikák közé, mégis ez a kísérleti módszer jelenti a legbiztosabb garanciát a valós és reprodukálható eredmény elérésére.

4.2.3. A β -galaktozidáz expresszió növekedési ráta-függése *Trichoderma reesei*-ben

Mivel batch tenyészetekben a bGal kifejeződését indukáló legfontosabb szénforrások (laktóz, D-galaktóz, galaktitol) eltérő növekedési rátákat eredményeznek, megvizsgáltuk, hogy a változó növekedési ráták befolyásolják-e a *T. reesei* bGal enzimét kódoló *bga1* kifejeződését. Ehhez kemosztát típusú folytonos tenyészeteket hoztunk létre, öt különböző hígítási ráta értéken. A $D = 0,075 \text{ h}^{-1}$ érték az exponenciális fázisban mérhető gyors, míg a $D = 0,015 \text{ h}^{-1}$ érték a stacioner fázisban mérhető lassú növekedést modellezi; a további három érték ezen két szélső érték közé esik. A *bga1* génkifejeződést ez esetben is az extracelluláris bGal aktivitás mérésével számszerűsítettük (lásd **4.1.3. fejezet**).

Megegyező hígítási ráta értékeken lényegesen magasabb bGal aktivitásokat kaptunk D-galaktózon, mint laktózon (**XI. táblázat**). A D-galaktóz által indukált *bga1* kifejeződés szigorúan növekedési ráta-függő: a legalacsonyabb és a legmagasabb növekedési ráta-hoz tartozó értékek között mintegy ötszörös volt a különbség a gyorsan növekvő tenyészet javára. Galaktitolon a *bga1* kifejeződése még a D-galaktózon mértet is felülmúlta. Az aktivitások a hígítási rátával párhuzamosan emelkedtek, vagyis a génkifejeződés galaktitolon is növekedési ráta-függő (**XI. táblázat**). Limitáló szénforrásként equimoláris D-galaktózt és galaktitolt alkalmazva a *bga1* kifejeződése enyhén visszaesett a galaktitolon mért értékekhez képest, de a csökkenés a mérési hibahatár körül mozgott. Ez azt sugallta, hogy a D-galaktóz és a galaktitol ugyanazt a transzkripciós aktivátort stimulálja, vagy – általánosabban megfogalmazva – ugyanazon mechanizmus szerint indukálják a *bga1* gént.

Az *A. nidulans* esetében a specifikus növekedési ráta determinánsa a CCR-nek, ezért analógia alapján azt vártuk, hogy represszáló szénforráson – amilyen a D-galaktóz – a *cre1* függő gének – mint amilyen a *bga1* – expressziós rátája fordítottan arányos lesz a specifikus növekedési rátával. Az ellentmondás feloldása céljából a *bga1* expresszió vs. növekedési ráta vizsgálatot D-glükóz limitáló szénforráson is elvégeztük. Mint látható (**XI. táblázat**), széles hígítási ráta tartományban nem volt *bga1* expresszió, kivéve a legalacsonyabb, $D = 0,015 \text{ h}^{-1}$ értéket. Ez az aktivitás a hasonló körülmények között laktózon mérhetőnek 55 %-a, a D-galaktózon mérhetőnek 30 %-a volt.

Végezetül a D-glükóz és D-galaktóz együttes limitációjának hatását vizsgáltuk meg. A legalacsonyabb hígítási rátánál a *bga1* kifejeződése jelentősen megnövekedett a D-glükóz limitált tenyészethez képest, $D = 0,030 \text{ h}^{-1}$ hígítási rátánál pedig mérsékelt génkifejeződést tapasztaltunk. A D-glükóz hatása tehát interferál a D-galaktózával a *bga1* expresszió terén, és magasabb ($D > 0,030 \text{ h}^{-1}$) hígítási ráta értékeknél egyértelműen represszál. A legalacsonyabb, derepresszáló hígítási ráta értéknél azonban a D-glükóz represszáló hatása megszűnik, a

derepresszió pedig additívan járul hozzá a D-galaktóz indukciós hatásához (XI. táblázat).

EXTRACELLULÁRIS <i>B</i> -GALAKTOZIDÁZ AKTIVITÁS [U/ML]						<i>D</i> [h ⁻¹]
Laktóz	Galaktóz	Galaktitol	Galaktóz + Galaktitol	Glükóz	Galaktóz + Glükóz	
kimosódás	10,12	kimosódás	kimosódás	0	0	0,075
kimosódás	8,88	9,01	9,14	0	0	0,050
6,74	8,45	8,78	8,12	0	0	0,042
4,07	5,98	6,45	6,02	0	0,75	0,030
1,24	2,12	instabil	instabil	0,81	2,72	0,015

XI. táblázat. *T. reesei* szénforrás-limitált kemosztát tenyészeiben mérhető extracelluláris bGal aktivitások.

Az eredmények alapján az *A. nidulans*-hoz hasonlóan a specifikus növekedési ráta *T. reesei*-ben is meghatározója a CCR-nek; egy adott érték alatt még represszálo szénforráson is derepresszió következik be. A mechanizmust még óvakodnánk általános érvényűnek nevezni, noha a két gombafaj egymástól rendszertanilag viszonylag távol áll. Ami viszont egyértelmű: amíg a D-glükóz és D-galaktóz ekvimoláris elegye represszálo (= magas) növekedési rátán a *bga1* represszióját eredményezte, derepresszálo (= alacsony) növekedési rátán a két szénforrás által külön-külön kiváltott expressziók összeadódtak (kumulatív expresszió). Ez egybeesik azon megfigyelésekkel (SEIBOTH és mtsai 2005), miszerint a *cre1* két különböző szinten fejt ki hatását a *bga1*-re: az alapaktivitásnál illetve az indukció során. A jelenség nem egyedülálló: az ún. „double-lock” (kettős lakat) mechanizmust leírták már az *A. nidulans alcA* (alkohol dehidrogenázt kódoló) génjének szabályozásánál (MATHIEU és FELENBOK 1994), az *A. niger* xilanáz bioszintézise során (DE VRIES és mtsai 1999b), de hasonló megfigyeléseket tettünk mi is az *A. nidulans* bGal aktivitásának szabályozása során (lásd 4.1.1.1. fejezet). Újfent érdemes kihangsúlyozni, hogy a kemosztát-típusú folytonos tenyészetek egyedülálló kísérleti módszert jelentenek a növekedési rátával interferáló regulációs mechanizmusok vizsgálatára.

4.2.4. *Trichoderma reesei* cellulázok keletkezésének növekedési ráta-függése

A *T. reesei* cellulázokat ipari léptékben – nem kizárólag, de jellemzően (BISCHOF és mtsai 2013) – laktóz tartalmú szénforráson állítják elő. A laktóz anyagcsere és a celluláz expresszió kapcsolatának felderítése céljából először klónoztuk és jellemeztük a Leloir útvonal mindhárom génjét (*gal7*, *gal10* és *gal1*)⁴³. A *T. reesei gal7* (amely a D-gal-1-P UT-t kódolja) egy 43,8 kDa méretű polipeptidet kódol. A szekvencia csak mérsékelten (kb. 50%) hasonló a *S. cerevisiae* és a *K. lactis* Gal7 fehérjéihez. A *gal7* mutáns pH 4,5 – 7,5 között nem tud D-galaktózon nőni, vagyis a *gal7* esszenciális a *T. reesei* D-galaktóz anyagcseréjében. Laktózon a *gal7* mutáns törzs növekedési rátája csupán lecsökkent (nagyjából a felére) a vad típushoz képest. A cellobiohidroláz Cel7A fehérje (és az ezt kódoló *cbh1* transzkriptum) képződése csak kicsivel volt alacsonyabb a mutánsban, mint a referencia törzsben, de a növekedés későbbi szakaszai során késés volt megfigyelhető a *cbh1* transzkriptum degradációjában. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a *T. reesei* celluláz képzéséhez a laktóz anyagcsere D-gal-1-P utáni lépései nem esszenciálisak (SEIBOTH és mtsai 2002).

A *T. reesei gal1* egy galaktokinázt kódol, ami a Leloir-útvonal első lépését katalizálja. Egy 1996 bp hosszúságú Open Reading Frame-et (ORF) tartalmaz, amit egyetlen nagy (415 bp hosszúságú) intron szakít meg, és egy 526 aminosavból álló, 57 kDa méretű fehérjét kódol. A *T. reesei gal1* mintegy 40 %-os hasonlóságot mutat *S. cerevisiae* és *K. lactis* homológjaihoz. Aminosav szekvenciája alapján a Gal1 fehérje a GHMP család tagja, tartalmaz egy konzervált Gly/Ser gazdag régiót – vélhetően az ATP-kötésben játszik szerepet – és az N-terminálison egy GAL-fehérjékre jellemző szakaszt is. A *gal1* delécioja nem blokkolja a növekedést D-galaktózon és laktózon, viszont meggátolja a *gal7* gén D-galaktóz általi indukcióját (de az L-arabinóz általit nem!). A celluláz gének kifejeződése azonban csaknem teljesen gátolt a *gal1* mutánsban, vagyis a galaktokináz kulcsfontosságú enzim a cellulázok laktóz általi indukciója során (SEIBOTH és mtsai 2004).

A *gal10* gén (amely az UDP-glükóz-4-epimerázt kódolja), egy 1548 bp hosszú ORF-et tartalmaz, melyet 3 intron szakít meg, és amely egy 370 aminosavból álló, pro-és eukarióta UDP-glükóz-4-epimerázokhoz hasonló fehérjét kódol. A *T. reesei* Gal10 nem rendelkezik az élesztőkre jellemző C-terminálison lévő mutarotáz aktivitással, de mégis képes funkcionálisan komplementálni a *S. cerevisiae gal10* mutánst (SEIBOTH és mtsai 2002).

A *gal1* és *gal7* alapszintű, növekedési ráta-függő expressziója minden szénforráson megtalálható, és mindkét gén enyhén indukálható D-galaktózzal és L-arabinózzal. A D-glükóz

⁴³ Személyesen a *gal10* és a *gal1* projektekben vettem részt (lásd felhasznált saját közlemények listája).

egyidejű jelenléte interferál a D-galaktóz általi indukcióval, és ilyenmódon megmagyarázza, miért csak az alapértékek észlelhetők laktózon. A fentiektől eltérően a *gal10* kifejeződése nem indukálható D-galaktózzal és L-arabinózzal, és egy a növekedési szakasz-függő alapértéket mutat minden szénforráson.

T. reesei-ben a laktóz anyagcsere nyitólépése a diszacharid extracelluláris bGal révén történő hidrolízise. Önmagukban a monomereken nem képződnek cellulázok. A D-galaktóz a D-glükóznál enyhébb mértékben, de represszáló szénforrás, indukálja a *cre1* gént. Celluláz indukciót azonban a karbon derepresszált *cre1*-mutánsban sem észleltünk. A galaktokináz esszenciális volta miatt feltételeztük, hogy vagy a hozzá kötődött D-galaktóz, vagy terméke, a D-gal-1-P szükséges a celluláz indukcióhoz. Az extracelluláris bGal túltermelése gyorsabban növekedést eredményezett laktózon, de celluláz enzimek nem képződtek. Hipotézisünk szerint ezért akár a D-galaktóz, akár a D-gal-1-P az induktor, hatásuk a laktózon kialakuló alacsony növekedési rátára korlátozódik, aminek oka az alacsony extracelluláris bGal aktivitás.

A hipotézis teszteléséhez a *T. reesei* QM9414 törzset szénforrás-limitált kemosztát tenyészetekben növesztettük, ahol a specifikus növekedési ráta értékét tetszőlegesen be tudtuk állítani. A *cbh2* (cellobiohidroláz 2) promoter kifejeződését egy *cbh2::goxA* (*A. niger* glükóz oxidáz) riporter törzs révén követtük nyomon – a vad típusú *T. reesei*-ből ugyanis hiányzik a saját glükóz-oxidáz aktivitás, emiatt a heterológ enzim jól alkalmazható riporter rendszerként.

A *T. reesei* kemosztátokról tett megfigyeléseink jó egyezést mutattak más gombafajok folytonos tenyészeivel (ARVAS és mtsai 2011). A D-galaktóz mellett laktózon, D-glükózon, galaktitolon és D-galaktóz + galaktitol equimoláris elegyének karbon-limitált táptalaján 4-5 tartózkodási idő kellett a steady-state állapot eléréséhez. A legalacsonyabb, $D = 0,015 \text{ h}^{-1}$ hígítási ráta értéken enyhe pellet képződést észleltünk minden szénforráson. Galaktitolon a $D = 0,015 \text{ h}^{-1}$ értéken nem lehetett stabil steady-state állapotot létrehozni, ennek oka az ezen szénforráson magasabb 'fenntartási energia' (maintenance energy) lehetett. Laktóz, D-glükóz és D-galaktóz szénforrásokon az egyensúlyi biomassza koncentráció $1,48 \pm 0,20 \text{ g/l}$ volt, 3 g/l kiindulási szénforrás koncentráció mellett – az értékek megfelelnek a szakirodalomban más gombafajok esetében leírtaknak. A reziduális szénforrás koncentráció 0,09–0,12 mM, a biomasszára kalkulált hozamkonstans 45–49 % között volt. Összefoglalóan, az eltérő hígítási (= növekedési) ráta értékek ellenére az egyes tenyészetek kinetikai paramétereiben nem volt számottevő különbség, így a rendszert a vizsgálat céljára alkalmasnak tekintettük.

D-galaktóz limitált folytonos tenyészetekben $D = 0,075 \text{ h}^{-1}$ és $D = 0,030 \text{ h}^{-1}$ között nem volt glükóz-oxidáz aktivitás, vagyis a *cbh2* gén promótere magas növekedési rátán nem fejeződött ki. Alacsony ($D = 0,015 \text{ h}^{-1}$) hígítási rátán enyhe kifejeződést tapasztaltunk (XII.

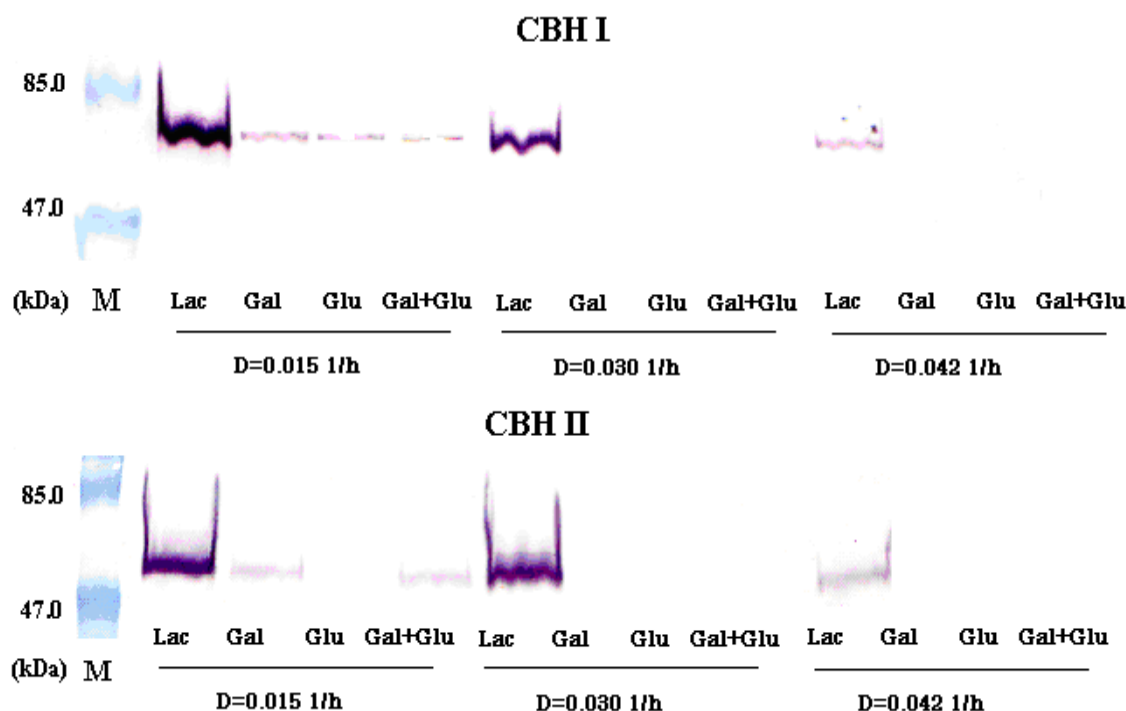
táblázat). A fenti eredményeket Western-blot analízissel is megerősítettük; a *cbh2* kódolta Cel6A illetve a *cbh1* kódolta Cel7A fehérjét nem tudtuk a tápközegből kimutatni magas és közepes, csupán az extrém alacsony $D = 0,015 \text{ h}^{-1}$ értéken (**60. ábra**).

Laktózon már $D = 0,042 \text{ h}^{-1}$ értéken jelentős *cbh1/cbh2* kifejeződést mértünk (**XII. táblázat**); az expressziós vizsgálatokat a fehérjék közvetlen detektálása is megerősítette (**60. ábra**). Magasabb növekedési rátákon a sejtek kimosódtak, vagyis a tenyészet növekedése nem tudott lépést tartani a hígítással. A hígítási ráta csökkentése fokozta a génkifejeződést és az enzimpdukciót; $D = 0,015 \text{ h}^{-1}$ értéken a laktóz mintegy négyszer jobb induktornak bizonyult a D-galaktóznál. Az eredmény egybecseng az ipari fermentációs technológiákkal: cellulázok gyártásakor a laktózt lassan adagolják a már stationer közeli állapotban lévő biomasszához, így a növekedési ráta értéke a lehető legalacsonyabb lesz.

A D-galaktózon kapott eredményeket kétféleképpen magyarázhattuk: (1) a D-galaktóz indukálta a *cbh2* promótert; (2) az alacsony növekedési ráta derepressziót váltott ki. A két alternatíva elkülönítése céljából D-glükóz limitáció mellett ismételtük meg a kísérleteket. A D-galaktózon kapott eredményekkel szemben itt $D = 0,015 \text{ h}^{-1}$ hígítási rátánál sem volt *cbh2* kifejeződés, amit megerősített a Cel6A képződés immunokémiai vizsgálata is (**60. ábra**). A Cel7A azonban megjelent e körülmények között is. Mivel a Cel7A fehérjét kódoló *cbh1* gén bizonyítottan *cre1*-függő karbon katabolit represszió alatt áll (ZEILINGER és mtsai 2003), kijelenthettük: a *cbh2* kifejeződése D-galaktózon, alacsony hígítási rátán specifikus indukciós hatás következménye.

$D [\text{h}^{-1}]$	Glükóz-oxidáz aktivitás [U/ml]					
	Laktóz	Glükóz	Galaktóz	Galaktóz + Glükóz	Galaktitol	Galaktóz + Galaktitol
0,075	kimosódás	0	0	0	kimosódás	kimosódás
0,050	kimosódás	0	0	0	0	0
0,042	1,2	0	0	0	0	0
0,030	1,68	0	0	0	0	0,51
0,015	2,71	0	0,62	0,55	-	-

XII. táblázat. *T. reesei* QM 9414 törzs kemosztát-típusú folytonos tenészeteiben mért glükóz-oxidáz aktivitás (= *cbh2* expresszió) különböző szénforrásokon, a hígítási (=specifikus növekedési) ráta (D) függvényében.



60. ábra. Cel6A (=CBH II) és Cel7A (=CBH I) 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.

Annak eldöntésére, hogy a laktóz és a D-galaktóz általi celluláz indukció mértékében még a legalacsonyabb vizsgált növekedési rátán is észlelhető különbség magának a laktóznak, avagy monomerjeinek köszönhető, D-galaktóz + D-glükóz-limitált kemosztát tenyészeteket hoztunk létre. A kettős szénforrás alkalmazása során kapott celluláz indukciós eredmények gyakorlatilag megegyeztek a D-galaktóz-limitált tenyészetekből származókkal (**XII. táblázat és 60. ábra**); magas illetve közepes hígítási rátán nem észleltünk celluláz génkifejeződést és celluláz fehérje képződést, a legalacsonyabb, $D = 0,015 \text{ h}^{-1}$ értéknél gyengén kimutathatók voltak. A laktóz illetve D-galaktóz általi celluláz indukció mértékében mutatkozó különbség tehát magában a laktózban, és nem a két monomerjében keresendő.

Játszik-e szerepet az oxido-reduktív D-galaktóz lebontási útvonal a *T. reesei* celluláz génjeinek indukciójában? A válaszhoz galaktitolon, majd D-galaktóz és galaktitol equimoláris elegyén tenyésztettük a gombát. A szénváz fluxusa az első esetben teljesen, második esetben – elvileg – félig az oxido-reduktív útvonalra terelődik. Noha galaktitolon nehéz volt folytonos tenyészeteket létrehozni, a vegyes limitáció során, $D = 0,030 \text{ h}^{-1}$ értéken a *cbh2* gén promotere kifejeződött, a Cel7A és a Cel6A fehérjék pedig megjelentek a fermentlében. Mindez az bizonyítja, hogy az oxido-reduktív útvonal pozitívan járul hozzá a *T. reesei* celluláz génjeinek indukciójához.

Összefoglalva a specifikus növekedési ráta hatását a *T. reesei* cellulázok kifejeződésére azt mondhatjuk, hogy munkahipotézisünket részlegesen ugyan bizonyítani tudtuk – alacsony ($D = 0,015 \text{ h}^{-1}$) növekedési rátán, D-galaktózon a *cbh2* / *cbh1* gének valóban kifejeződtek – de a génexpresszió és a Cel7A/Cel6A produkció mértéke erősen elmaradt a laktózon mérhetőtől. Mit „tudhat” a laktóz, amit a monomerjei külön-külön és együttesen sem? A valószínűsíthető választ a következő fejezetben olvashatjuk.

4.3. A SZÉNFORRÁS SZEREPE METABOLITOK TÚLTERMELÉSÉBEN

4.3.1. Cellulázok indukciója *Trichoderma reesei*-ben

Az előző fejezet végén lévő kérdést úgy is fel lehet tenni: mi a különbség a szénforrásként adagolt D-galaktóz és a laktózból felszabaduló galaktopiranozil monomer között? A válasz: az előbbi a mutarotáció miatt az α -és β -anomerek elegye, az utóbbi viszont csak β -anomerből áll (a laktóz kémiai neve 1,4-0- β -D-galaktopiranozil-D-glükóz). Mivel a galaktokináz csak az α -D-galaktózt képes foszforilezni, a β -anomernek előbb α -anomerré kell alakulnia. A laktóz hidrolízis lassú, ezért a felszabaduló β -galaktopiranozil monomert a sejt rögtön transzportálja (extracelluláris D-galaktózt vagy D-glükózt laktózon növekvő *T. reesei* fermentlevéből nem tudunk kimutatni). Ennek az adja a jelentőségét, hogy a *T. reesei* fermentlevének kissé savas (pH 5) kémhatása elvileg fel tudná gyorsítani a spontán mutarotációt – amely protonvezérelt folyamat –, de mivel a β -galaktopiranozil monomer csak minimális időt tartózkodik a savas kémhatású tápközegeben, erre nem kerülhet sor. A spontán mutarotáció ugyan előbb-utóbb intracellulárisan is egyensúlyi állapotot eredményez, de a citoszol közel semleges kémhatása mellett ez több órás tartó folyamat (PETTERSSON és PETTERSSON 2001).

Sok gombában a β -anomer – α -anomer átalakulást egy mutarotáz katalizálja, mely az UDP-glükóz epimeráz enzim egyik doménjeként (vagyis nem önálló enzimként) létezik. A *T. reesei* gombában azonban (és több más fonalas *Ascomycetes*-ben is) az UDP-glükóz epimeráz enzim nem tartalmazza a mutarotáz domént. Hipotézisünk szerint ezért az α -D-galaktóz kialakulása *T. reesei*-ben lassú folyamat (csak a spontán mutarotáció révén következhet be), ami lecsökkenti a D-galaktóz foszforilezés intenzitását, ennek pedig hatása lesz a laktóz fenotípusra, ideértve a celluláz termelést is. Az alábbiakban ezt a munkahipotézist teszteljük.

A *T. reesei* genetikai adatbázisában⁴⁴ három olyan lókuszt találtunk, mely feltételezett aldóz-1-epimerázokat kódol (tre43544, tre44592 és tre19341; **XIII. táblázat**). A tre43544 lókuszt kódolta fehérje hasonlít leginkább az *S. cerevisiae* kétfunkciós Gal10 protein C-

⁴⁴ <http://genome.jgi.doe.gov/Trire2/Trire2.home.html>

terminális régiójához (35 %), míg a *Gibberella zeae* hipotetikus aldóz-1-epimeráz fehérjéhez 64 %-ban homológ. A másik két feltételezett aldóz-1-epimeráz hasonlósága alacsonyabb fokú. A szekvenciák kifejeződnek (egyikük sem pszeudogén), mivel mindháromhoz találtunk EST⁴⁵-ket a FOREMAN (2003)-féle *T. reesei* RNS-mintákban.

	AEP1	AEP2	AEP3
Genom annotációs név	tre19341	tre43544	tre44592
EST sorszám	4	4	10
Aminosav-hasonlóság a <i>S. cerevisiae</i> Gal10-hez [%]	7	35	23
Aminosavak száma (db)	315	342	383
<i>Mr</i>	33988.2	37074.5	42380.0
Izoelektromos pont	4.99	5.29	6.44
A feltételezett géntermék lokalizációja	intracelluláris	intracelluláris	extracelluláris

XIII. táblázat. A három valószínűsített *T. reesei* aldóz-1-epimeráz fehérje jellemzése

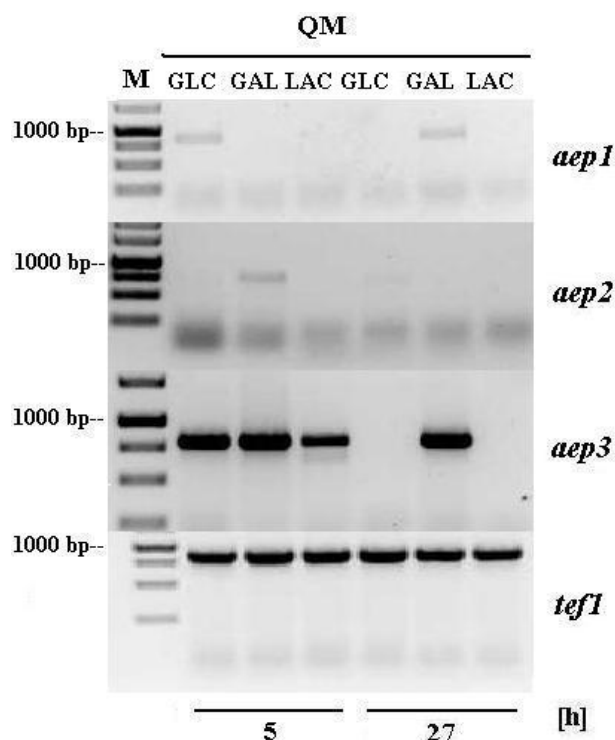
A három *T. reesei* gént *aep1*, *aep2* és *aep3*-nek (aldóz-1-epimeráz), géntermékeiket AEP1-3-nak neveztük el; az izoenzimekre vonatkozó nomenklatura szerint az 1. sorszámot az a gén kapta, melynek levezetett proteinjé a legalacsonyabb izoelektromos ponttal rendelkezik. Az AEP3 fehérjén szignálszekvencia található (SignalP valószínűség értéke 1), vagyis ez az enzim extracelluláris⁴⁶. A másik két fehérje vélhetően intracelluláris.

A gének kifejeződését laktózon, D-galaktózon és D-glükózon vizsgáltuk (**61. ábra**). Mivel a hagyományos Northern analízissel gyenge szignálokat kaptunk, RT-PCR technikát alkalmaztunk. Az *aep3* a tenyésztés korai szakaszában (5 h) mindhárom vizsgált szénforráson jól kifejeződött, de a későbbi szakaszban (27 h) már csak D-galaktózon; laktózon és D-glükózon nem. A másik két aldóz-1-epimeráz transzkriptum csak nyomnyi mennyiségben volt kimutatható D-glükózon és D-galaktózon, laktózon pedig egyáltalán nem jelentek meg. Ezzel összhangban a mutarotáz enzimaktivitást laktózon és D-galaktózon sem tudtuk kimutatni, függetlenül a lokalizációtól (felülúszó, sejtfal-törmelék, intracelluláris sejtmentes kivonat). A pozitív kontroll *S. cerevisiae* viszont jelentős intracelluláris mutarotáz aktivitást mutatott.

⁴⁵ Expressed Sequence Tag; cDNS szekvenciák rövid szubklónjai, melyeket elsősorban transzkriptumok azonosítására használnak.

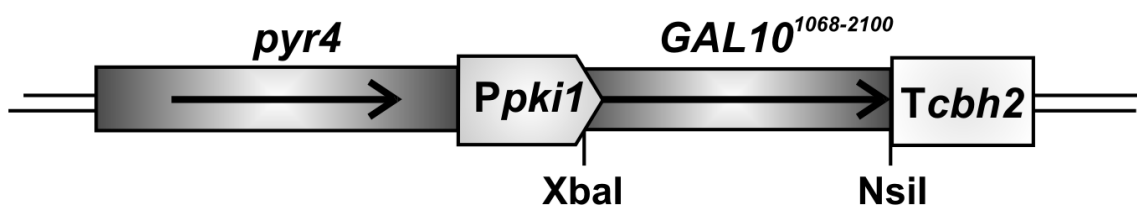
⁴⁶ A szignál szekvencia vélhetően a 23. és 24. aminosavak közötti hidrolízis eredményeként vágódik le, ennek valószínűsége 0,394.

Mindez azt bizonyítja, hogy *T. reesei*-ben nincs jelen aldóz-1-epimeráz (mutarotáz) aktivitás – önálló enzimként illetve az UDP-glükóz epimeráz részeként sem – ha a gomba laktóz vagy D-galaktóz szénforráson tenyészik.



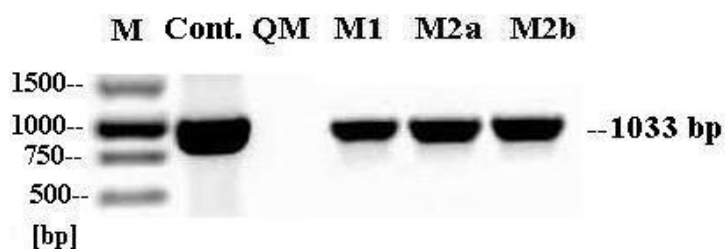
61. ábra. A *T. reesei* *aep1*, *aep2* és *aep3* gének kifejeződése a szénforrás és a tenyésztési idő függvényében.

A következőkben a mesterségesen létrehozott mutarotáz aktivitás hatását vizsgáltuk a *T. reesei* gomba laktóz fenotípusára. Ehhez egy olyan *T. reesei* mutánst konstruáltunk, melybe beletranszformáltuk és túltermeltettük a *S. cerevisiae* élesztő bifunkcionális Gal10 fehérje C-terminálisának az 1068 – 2100 bp közötti részét ($GAL10^{1068-2100}$). Promoterként a konstitutív *pki1*-et (piruvát kináz), terminátorként a *cbh2*-t (cellobiohidroláz 2) használtuk (62. ábra).



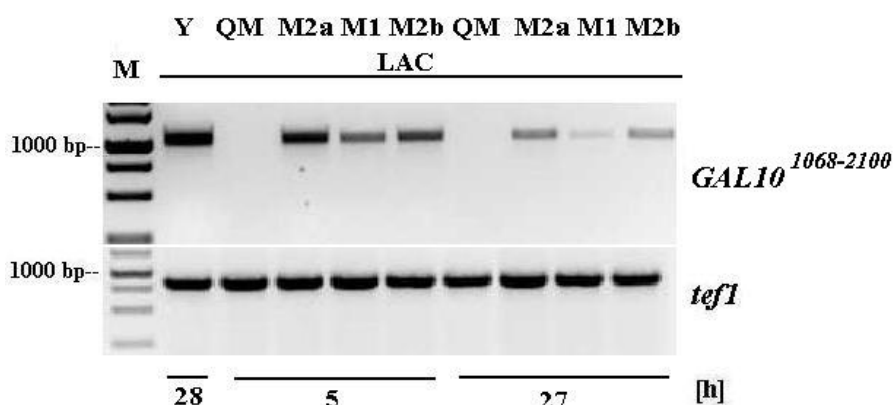
62. ábra. A $GAL10^{1068-2100}$ expressziós kazetta sematikus rajza. *cbh2* = cellobiohidroláz 2; *pki1* = piruvát kináz.

A transzformáció eredményeként kapott mutánsok közül hármat vizsgáltunk. Egyikük egy (M1), a másik kettő két kópiában tartalmazta a $GAL10^{1068-2100}$ régiót (M2a és M2b). Az integrációt PCR-rel (63. ábra), a kópiaszámot Southern analízissel ellenőriztük.



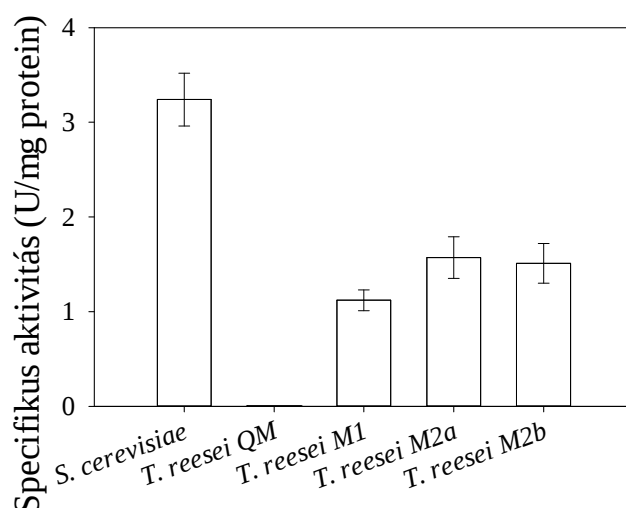
63. ábra. A *Saccharomyces cerevisiae* $GAL10^{1068-2100}$ régió jelenlétének demonstrálása *T. reesei* M1, M2a és M2b mutáns törzsekben. M = Marker, Cont = Kontrol (p $GAL10_{Kicsi}$)

A transzformált szakasz mindhárom mutánsban a kópiaszámnak megfelelő mértékben fejeződött ki (64. ábra).



64. ábra. A $GAL10^{1068-2100}$ kifejeződése a *T. reesei* mutánsokban. Y = *S. cerevisiae*, M = marker

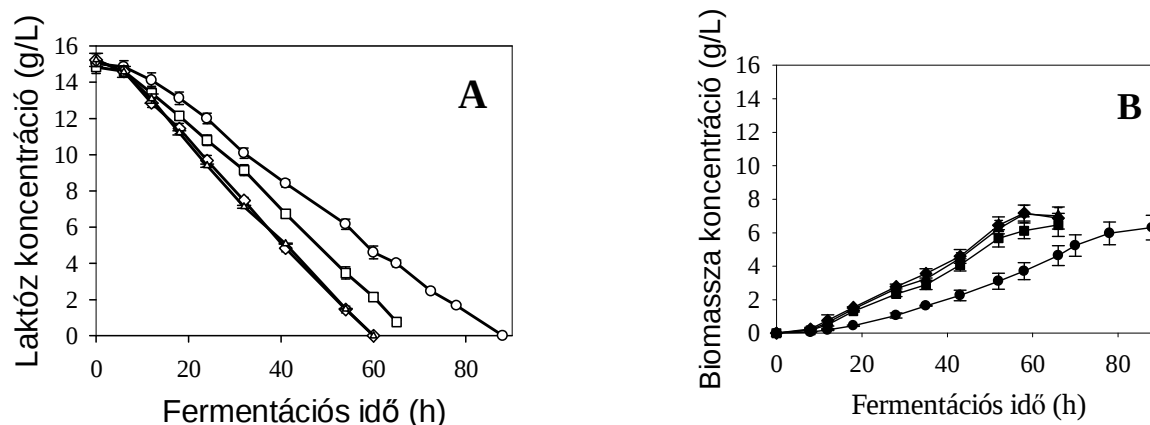
Végezetül, a kópiaszámnak megfelelően alakultak az intracelluláris mutarotáz aktivitás értékek is (65. ábra). A mintákat 12 órás mosott sejtes tenyészetekből vettük.



65. ábra. Specifikus intracelluláris mutarotáz aktivitás a *T. reesei* QM, M1, M2a és M2b törzsekben, valamint a *S. cerevisiae* élesztőben (kontroll).

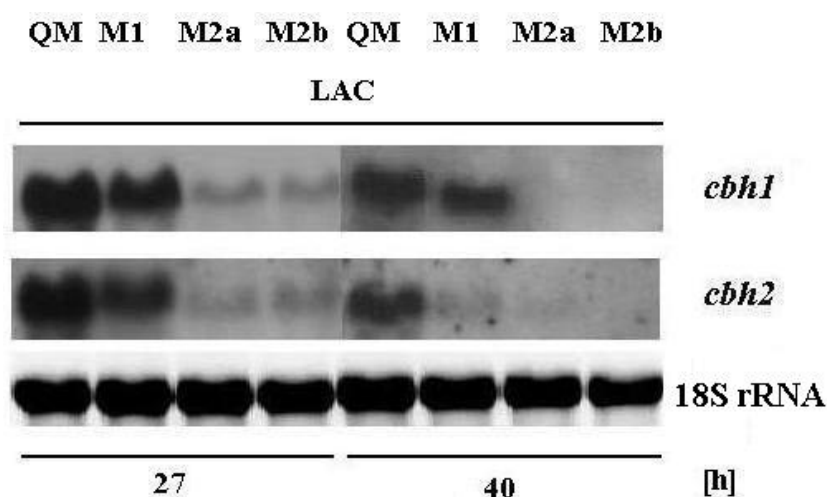
A mutánsok fenotípus analízise azt mutatta, hogy a laktóz felvétel gyorsabb lett a

mutarotáz aktivitás kialakításának eredményeként (**66. A. ábra**), és ehhez fokozott biomassza produkció is társult (**66. B. ábra**). Más vizsgált szénforrásokon (L-arabinóz, D-xilóz, D-glükóz, D-galaktóz, D-fruktóz, glicerol) a fenti paraméterekben nem találtunk szignifikáns különbségeket, vagyis a hatás specifikus a laktózra.

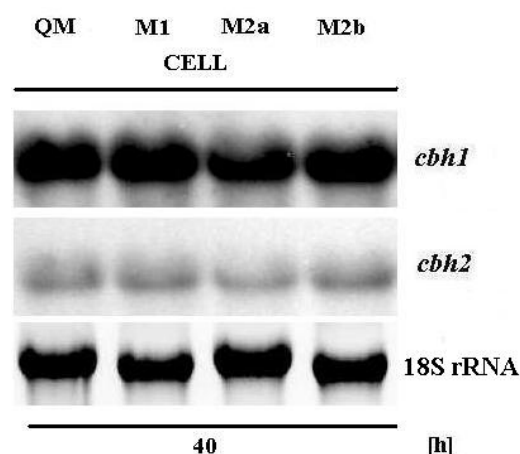


66. ábra. Laktózfelvétel (A) és biomassza produkció (B) a *T. reesei* QM 9414 (kör), valamint a *T. reesei* M1 (négyzet), M2a (háromszög) és M2b (rombusz) mutarotáz-kifejező törzseinek tenyésztésében, laktóz-MM táptalajon.

Végezetül a celluláz gének laktóz által kiváltott indukciójának mértékét vetettük össze a referencia törzzsel. A *cbh1* és *cbh2* kifejeződés is erősen és kópiaszám-függően visszaesett (**67. ábra**), a hatás pedig újból laktóz-specifikusnak bizonyult. Cellulózon – egy másik jól indukáló szénforráson – ugyanis a három *T. reesei* mutáns a referencia törzshöz hasonlóan fejezte ki a celluláz géneket (**68. ábra**).



67. ábra. A celluláz gének (*cbh1* és *cbh2*) kifejeződése laktózon (LAC). QM: referencia törzs. M1: 1 kópiás törzs; M2a és M2b: két kópiás törzsek



68. ábra. A celluláz gének (*cbh1* és *cbh2*) kifejeződése cellulózon (CELL). QM: referencia törzs. M1: 1 kópiás törzs; M2a és M2b: két kópiás törzsek

A mutarotáz aktivitás tehát interferál a celluláz gének laktóz általi indukciójával. A tényleges induktorról feltételezhető, hogy β -D-galaktóz monomert (is) tartalmazó vegyület. A továbbiakban ezt a hipotézist teszteljük. Vizsgálatunk közvetlen metabolomikai megközelítést alkalmazott: az eltérő celluláz termelőképeségű *T. reesei* (mutáns) törzsekből (XIV. táblázat) kipreparáltuk az intracelluláris cukorszármazékokat (a technikai részleteket lásd **Függelék: ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**), majd tömegspektrométerhez kapcsolt Nagy Teljesítményű Anion Cserélő Kromatográf (HPAEC-MS) révén a D-galaktóz tartalmú komponenseket minőségi és mennyiségi szempontból is meghatároztuk.

Törzs	Törzs jellemzése	Forrás/hivatkozás
QM 9414 (ATCC 26921)	szülői törzs, korai celluláz túltermelő	MONTENECOURT és EVELEIGH 1978
NG14 (ATCC 56767)	celluláz túltermelő	LE CROM és mtsai 2009
RUT C-30 (ATCC 56765)	karbon katabolit derepresszált celluláz hiper-túltermelő	LE CROM és mtsai 2009
$\Delta gal1$	galaktokináz negatív (a QM 9414 leszármazottja)	<u>SEIBOTH és mtsai 2004</u>
$\Delta xyl1$	D-xilóz (aldóz) reduktáz negatív (a QM 9414 leszármazottja)	SEIBOTH és mtsai 2007b
$\Delta gal1/\Delta xyl1$	galaktokináz / D-xilóz (aldóz) reduktáz negatív kettős mutáns (a QM 9414 leszármazottja)	SEIBOTH és mtsai 2007b

XIV. táblázat. A celluláz induktor azonosítása során használt eltérő celluláz termelőképeségű *T. reesei* törzsek jellemzése.

Elsőként az egyedüli szénforrásként laktózon növény *T. reesei* QM 9414 törzs galakto-oligoszacharidjait határoztuk meg. Az intracelluláris mintában laktózt, allo-laktózt (Gal- β -1,6-Glc) és laktulózt azonosítottunk legnagyobb mennyiségben, 7:1:1 relatív arányban⁴⁷. Szintén jelentős mennyiségben halmozódott fel két triszacharid (Gal- β -1,6-Gal- β -1,4-Glc/Fru és Gal- β -1,4-Gal- β -1,4-Glc/Fru). A Gal- β -1,6-Gal- β -1,4-Glc/Gal- β -1,6-Gal- β -1,4-Fru és a Gal- β -1,4-Gal- β -1,4-Glc/Gal- β -1,4-Gal- β -1,4-Fru oligoszacharid párokat nem tudtuk szétválasztani, így ezt a két párt 1-1 külön komponensnek tekintettük. D-glükózt, D-galaktózt és további négy oligoszacharidot (Gal- β -1,3/1,4/1,6-Gal és Gal- β -1,2-Glc) csak minimális mennyiségben találtunk. A laktóz és az allo-laktóz esetében nem zárható ki, hogy (részben) a táptalajból (is) származnak, a laktulóz (D-galaktozil-1,4- β -D-fruktozid) jelenléte azonban azt mutatja, hogy az eredmények az *in vivo* intracelluláris galakto-glycom összetételét tükrözik. A táptalaj ugyanis D-fruktózt egyáltalán nem tartalmazott.

Annak tesztelésére, hogy a cellulázok induktora ezen komponensek közül kerülhet-e ki, megvizsgáltuk a túltermelő NG14 illetve a hiper-túltermelő RUT C-30 törzsek galakto-oligoszacharid összetételét is. Munkahipotézisünk szerint az induktor galakto-oligoszacharid intracelluláris koncentrációja és a celluláz termelő képesség pozitívan korrelál, így magasabb termelőképességhez magasabb, alacsonyabb termelőképességhez alacsonyabb koncentráció tartozik. Mivel az egyes törzsek specifikus növekedési rátája eltérő, a mintavételi pontokat úgy választottuk meg, hogy azok a szénforrás felvételének ugyanazon szakaszaira essenek.

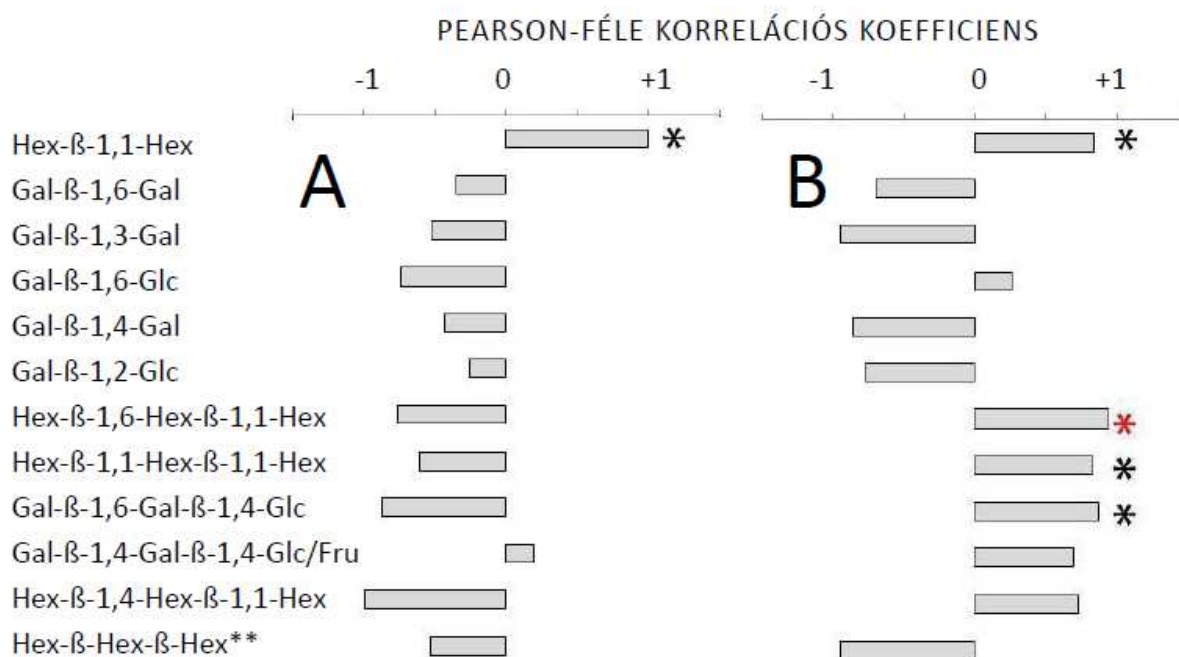
Mint említettük, celluláz termelő képesség szempontjából a vizsgált *T. reesei* törzsek tervezetten eltérőek (QM 9414 < NG14 < RUT C30). A termelőképesség vs. koncentráció összefüggést a Pearson-féle korrelációs koefficiens kiszámítása révén teszteltük (**69. A. ábra**). Egy vegyület kivételével a korreláció minden esetben negatív volt; a kivétel egy β -1,1 kötést tartalmazó, hexózokból felépülő diszacharid (Hex- β -1,1-Hex).

Amennyiben hipotézisünk helyes, úgy a termelőképesség vs. koncentráció összefüggés „lefelé” is működik, vagyis a referencia törzsnél (QM9414) gyengébben termelő mutánsokban az intracelluláris galakto-oligoszacharidok koncentrációi rendre kisebbek. A vizsgálathoz újra három törzset: a *gal1*, a *xyl1* és a *gal1/xyl1* mutánsokat használtuk fel; termelőképességük a *gal1/xyl1* < *gal1* < *xyl1* sorrendet követi (*xyl1* < QM 9414). Mivel maximális növekedési rátájuk laktózon alacsony – a kettős mutáns pedig nem is nő rajta – *gal1* és a *xyl1* esetében a relatíve legintenzívebb szénforrás felvételi szakaszban vettünk mintákat, míg a kettős mutánst

⁴⁷ rövidítések: Gal: D-galaktóz; Glc: D-glükóz; Fru: D-fruktóz; X/Y (pl. Glc/Fru): a monomer a két cukorféle valamelyike (pontosan meg nem határozható).

D-glükózon növesztettük ki, friss táptalajra mostuk át, és 10 g/l laktózt adtunk hozzá. A módszer működőképességét a *cbh1* és a *cbh2* gének kifejeződésével, illetve celluláz aktivitás megjelenésével bizonyítottuk.

Az intracelluláris galakto-oligoszacharidok elemzése során négy vegyületet találtunk, melyek pozitívan korreláltak a termelőképeséggel; kettőnek nem tudtuk meghatározni a szerkezetét, a harmadik a Gal- β -1,6-Gal- β -1,4-Glc, a negyedik viszont a túltermelő mutánsok vizsgálata során egyedüli pozitív korrelációt mutató Hex- β -1,1-Hex (69. B. ábra).



69. 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 koefficiens (fekete csillag: $p < 0,1$; vörös csillag: $p < 0,05$).

** A glikozidos kötés típusa nem volt megállapítható.

Mennyire tükrözi a valóságot a bemutatott intracelluláris oligoszacharid-spektrum? Jól ismert, hogy a mono-és oligoszacharidok a gombasejtfal poliszacharidjaihoz tapadhatnak, ahonnan csak magas sókoncentrációjú vizes oldattal/pufferral történő erőteljes mosással lehet eltávolítani őket (BUCIOR és BURGER 2004; RÖHR és mtsai 1981). Az alkalmazott extrakciós módszer során kifejezetten gyorsan kellett eljármunk, így alapos átmosásra nem volt lehetőség. Következésképpen, a nagy mennyiségű laktóz vélhetően a táptalajból a sejtfalra, majd onnan a feltárás során a citoszolba jutó szennyeződés következménye. A többi vegyület esetében azonban kizárhatjuk a műtermék lehetőségét. A laktulóz fruktóz komponense, mint említettük, csak intracellulárisan kerülhetett a molekulára. Az extracelluláris bGal aktivitás általi transz-glikoziláció hatása sem lehet jelentős, mivel ez az enzimaktivitás eltérő a különböző vizsgált

törzsekben, de a potenciálisan transzglykozilációs oligoszacharid Gal- β -1,4-Gal- β -1,4-Glc/Fru mennyisége nagyjából állandó volt. Úgy véljük ezért, hogy a kapott eredmények minőségi és mennyiségi szempontból is jól reprezentálják a *T. reesei* intracelluláris galakto-glycomját.

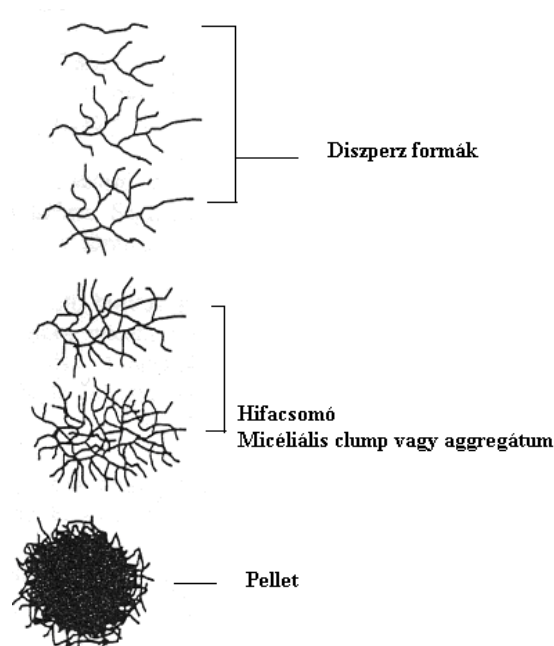
Munkánk legjelentősebb eredménye a Hex- β -1,1-Hex diszacharid azonosítása, mint potenciális celluláz induktor. Hogyan keletkezhet ez a vegyület? Nem ismerünk olyan bGal enzimet, mely β -1,1 glikozidos kötés létrehozását tudná katalizálni. Elvileg keletkezhet egy glikozil transzferáz enzim működése során is, de olyat, mely β -1,1 kötésben kapcsol össze két hexózt, szintén nem ismerünk. A szakirodalom szerint a természetben előforduló oligo- vagy poliszacharidok között egy sem tartalmaz β -1,1 glikozidos kötést. A molekula egyértelmű, és hat különböző *T. reesei* törzsben a celluláz termelőképeséggel korreláló előfordulása ebből a szempontból rejtélyes. A vegyületet létrejöttét katalizáló enzim azonosítása ezért nem csupán a *T. reesei* cellulázok indukciójának megértését segítené elő, hanem csaknem bizonyosan új típusú/működési mechanizmusú bGal-okat is feltárna, melyeknek biotechnológiai jelentősége is lehet.

4.3.2. Cephalosporin C túltermelés *Acremonium chrysogenum*-ban

Számos mikroszkópikus gombánál megfigyelhető a vegetatív fejlődési forma kettős morfológiája, ami az élesztő – micélium dimorfizmus jelenségeként ismert. Ilyenkor a gomba vagy lekerekedett, élesztőszerű, vagy bonyolult intracelluláris felépítésű, a sejt szélességéhez viszonyítva hosszú, gyakran elágazó, fonalas megjelenést mutat (STEWART és ROGERS 1983).

A két fejlődési forma az *A. chrysogenum* süllyesztett tenyészeiben is megfigyelhető (NASH és HUBER 1971). A sejtek élettani állapotának változ(tat)ásával arányuk szélsőségesen eltérhet: a CPC fermentáció növekedési szakaszában a sejtek fonalas, termelői szakaszában lekerekedett, fragmentált képet mutatnak. A CPC (és más fungális metabolit) termelésének morfológiai vonatkozásai ezért klasszikus, sokak által tanulmányozott, de részleteiben máig nem ismert kérdéseknek számítanak.

Az *A. chrysogenum* morfológiai változásait számítógépes mikroszkópi képfeldolgozás (Image Analysis) segítségével elemeztük, melynek során egy specifikusan *Actinomyces*-ek illetve fonalas gombák vizsgálatára kifejlesztett szoftvert használtuk (PAUL és THOMAS 1998). Ez a rendszer a micéliális elemeket három csoportba osztja (**70. ábra**): (a) diszperz forma, (b) hifacsomó (clump) és (c) pellet. A clump-ban a hifák egymáshoz tapadása a pelletnél kevésbé szoros, de a diszperz formák egyszerű, néhány elágazásból álló megjelenését nem mutatja, és hígítással sem lehet különálló fonalakra bontani



70. ábra. Fonalas gombák alapvető morfológiai kategóriái

A micéliális clump-ot diszperz formává a fragmentáció folyamata alakítja. Fizikai és fiziológiai hatások (pl. a fermentor keverőlapátja által kiváltott nyírőerő, a sejtfal bontását végző enzimek [pl. kitinázok; SÁNDOR és mtsai 1998] fokozott aktivitása) egyaránt szerepet játszanak benne. A clump-ról a fragmentáció során letöredező hifadarabok az „élesztőszerű” sejtek, a folyamat előrehaladtával pedig a hifacsomó diszperz formává alakul. A clump-ok arányának csökkenése a fragmentáció fokozódását jelzi. További fontos Image Analysis paraméter a clump-ok átlagos mérete, az átlagos hifahossz és az elágazások átlagos száma egy hifán belül.

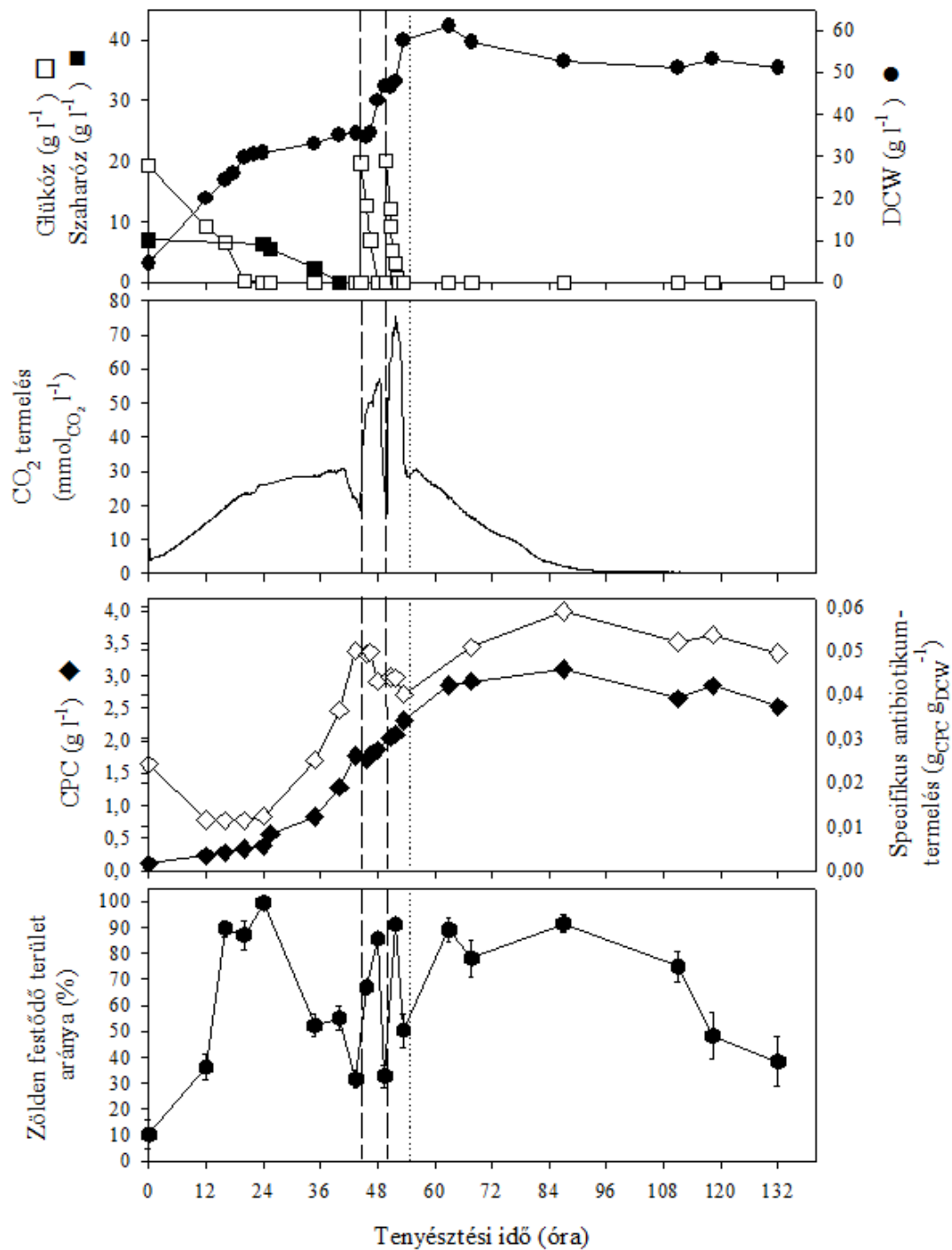
Az *A. chrysogenum* gombát alkalmazó CPC gyártás legfontosabb fermentációs technológiája a ráadagolós (fed-batch) tenyésztés, amikor a (gyors) növekedési fázis végére ért, de még nem pusztuló tenyészethez újabb adag szénforrást juttatnak. Ezt a technikát alkalmaztuk akkor is, amikor az eltérő sebességgel hasznosuló szénforrások hatását vizsgáltuk a gomba növekedésére, micéliális fragmentációjára és antibiotikum termelésére. Célunk egy valódi ipari tápközeg reprodukálása volt, ezért kiindulási szénforrásként D-glükózt és a lassabban metabolizálódó szaharózt, ráadagolt szénforrásként D-glükózt, illetve szójaolajat használtunk. A növényi olajok lassan hasznosuló szénforrások (PAN és mtsai 1982). A D-glükóz jelenléte a fonalas gombák vad típusaiban represszálja a glicerín és a zsírsavak közti észterkötés hasítását végző lipázokat (DEMAIN 1990), nemesített ipari törzsekben azonban jellemzően nem. Az általunk használt *A. chrysogenum* törzs is képes D-glükóz jelenlétében lipázok kifejezésére (KARAFFA és mtsai 1999).

A leoltást követően meginduló gyors növekedés (biomassza gyarapodás) nagyrészt leállt a kiindulási glükóz elfogyása után, de a glükóznál később hasznosuló szacharózon is megfigyelhető volt kismértékű biomassza gyarapodás (**71. ábra**). Az egymást követő két D-glükóz ráadagolás után a növekedés újból erőteljesen megindult, azonos mennyiségű szójaolaj hozzáadása után azonban csak nagyon kis mértékben fokozódott. A tenyészet biomasszája ezután a fermentáció befejeződéséig (vagyis az összes felhasználható szénforrás elfogyásáig) lassú csökkenést mutatott. A tenyészet szén-dioxid termelése⁴⁸ a növekedéshez hasonlóan változott a fermentáció során. A gyors, glükóz alapú növekedés alatt a szén-dioxid termelés fokozatosan emelkedett, a szacharóz hasznosulásával együtt járó lassúbb növekedés alatt a szén-dioxid termelés növekedésének üteme is csökkent. A növekedés leállásakor – a szénforrás hiányában (46-48 óra között) – a tenyészet szén-dioxid termelése meredeken csökkent. A D-glükóz ráadagolások után a szén-dioxid termelés igen gyors emelkedését, majd a glükóz elfogyása után meredek visszaesését tapasztaltuk. Szójaolaj hozzáadása után viszont a szén-dioxid termelése igen kismértékű emelkedés után folyamatosan csökkent.

A tenyészet szén-dioxid termelése a növekedéshez hasonlóan változott a fermentáció során. A gyors, glükóz alapú növekedés alatt a szén-dioxid termelés fokozatosan emelkedett, a szacharóz hasznosulásával együtt járó lassúbb növekedés alatt természetesen a szén-dioxid termelés növekedésének üteme is csökkent. A növekedés leállásakor – a szénforrás hiányában (46-48 óra között) – a tenyészet szén-dioxid termelése meredeken csökkent. A glükóz ráadagolások után a szén-dioxid termelés igen gyors emelkedését, majd a glükóz elfogyása után meredek visszaesését tapasztaltuk. Szójaolaj hozzáadása után viszont a szén-dioxid termelése igen kis mértékű emelkedés után folyamatosan csökkent.

A CPC termelése a gomba gyors növekedési szakaszának befejeződése után vált jelentőssé (**71. ábra**). A változások mértékét jól szemlélteti a száraztömegre vonatkoztatott specifikus antibiotikumtermelés (**71. ábra**), amely a D-glükóz elfogyása után kezdett el nőni. Az emelkedés a glükóz ráadagolásig tartott, ezt követően stagnált, majd csökkenni kezdett. A második adag D-glükóz ráadagolása után hasonló változásokat tapasztaltunk. A lassan hasznosuló szójaolaj szénforrás hozzáadása után azonban fokozatosan növekedett a specifikus antibiotikumtermelés mértéke, egészen a fermentáció 87. órájáig. Az egységnyi biomassza által előállított CPC mennyisége (=specifikus antibiotikumtermelés) ebben az időpontban volt a legmagasabb.

⁴⁸ A szén-dioxid termelődést a fermentor elmenő levegő vezetékeéhez kapcsolt on-line működésű tömegspektrométerrel határoztuk meg.



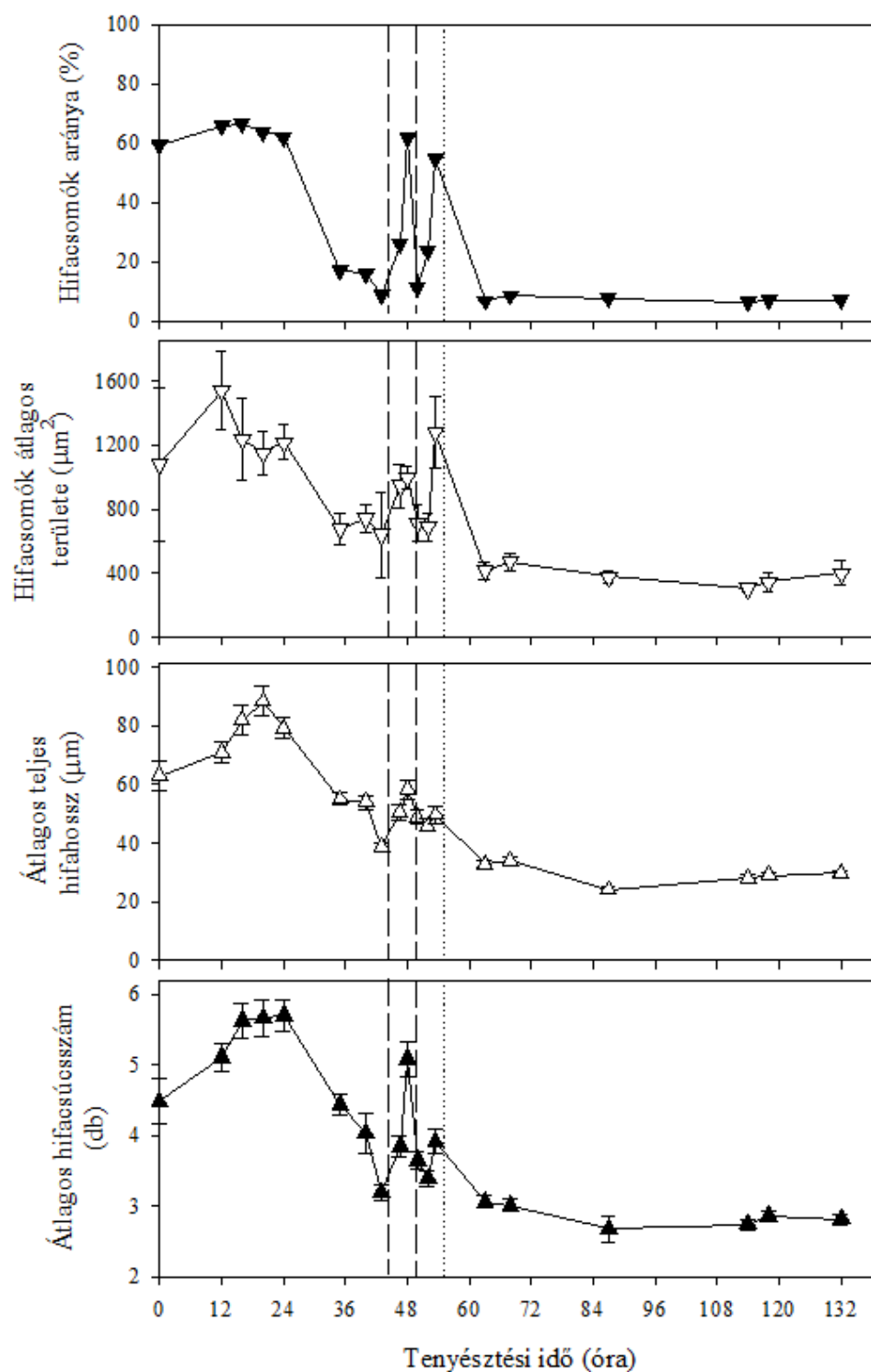
71. ábra. Az *A. chrysogenum* élettani paramétereit ráadagolásos fermentáció során. A zölden festődő terület aránya az AO-festés eredményét mutatja. A D-glükóz ráadagolások időpontját szaggatott vonalak, az olajráadagolást pontozott vonalak jelzik.

A fermentáció időtartama alatt a tenyészet Akridin Narancs (AO) festéssel jellemzett metabolikus aktivitása (lásd 4.2.1. fejezet) is jelentős változásokon ment keresztül (71. ábra). Az inokulum tenyészetből bekerült sejtekben magas volt a pirosan fluoreszkáló inaktív régiók aránya. Ez az arány a 24. órára fokozatosan csökkent, a sejtek csaknem kizárólag zöld színben fluoreszkáltak, vagyis metabolikusan aktívak voltak. Ezt követően fokozatosan növekedett a

pirosan fluoreszkáló régió aránya a 43. óráig (az első glükóz ráadagolásig), amikor igen gyors változások következtek be. A sejtek előbb “bezöldültek”, majd a D-glükóz elfogyásával újra megjelentek a pirosan festődő régiók. A második D-glükóz ráadagolásnál megismétlődtek az elsőnél leírt változások. A szójaolaj ráadagolását követően (54. óra) szintén lecsökkent a pirosan fluoreszkáló régió aránya. A fermentáció végére (az összes elérhető szénforrás kimerülésekor) azonban a micéliumok ismét piros színben tündököltek. Az eredményekből megállapítható, hogy az AO festékkel zölden festődő aktív régiók aránya a fermentáció első szakaszában és a D-glükóz ráadagolások alatt a szén-dioxid termeléssel és a növekedéssel megegyező módon változott. Szójaolaj ráadagolása után – bár csak kismértékű biomassza gyarapodás történt – a sejtekben sokáig magas volt a zölden festődő régiók aránya, a magas specifikus antibiotikum termeléssel párhuzamosan.

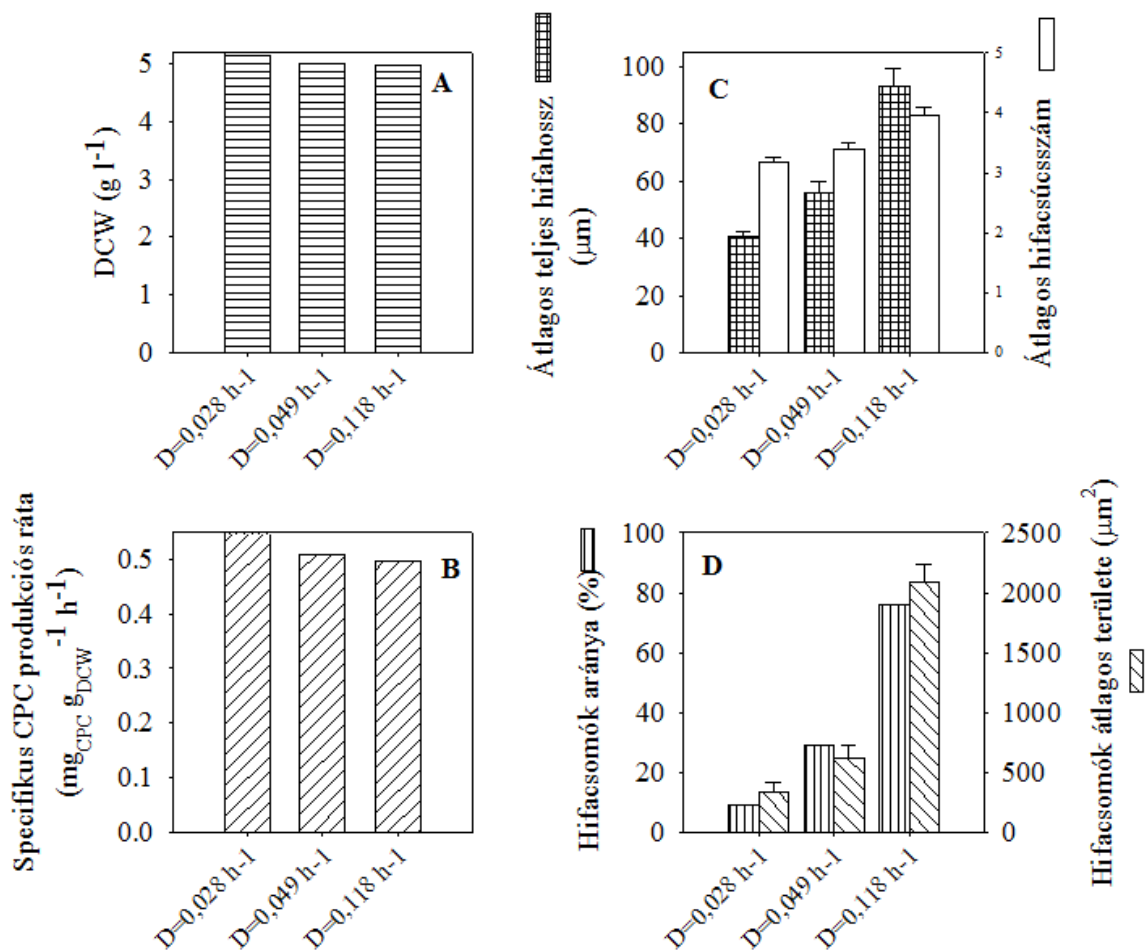
Ami a morfológiai változásokat illeti, D-glükóz ráadagolása után a növekedés újból megindult, és megfordult a fragmentációt jellemző paraméterek tendenciája is. A hifacsomók területaránya – ami a növekedési fázis befejeződése után jelentős mértékben lecsökkent – a D-glükóz adagolásokat követően, a növekedés megindulásával párhuzamosan emelkedni kezdett (72. ábra). Hasonlóképpen változott a hifacsomók átlagos területe is (72. ábra). Szójaolaj hozzáadása után 10 órával mindkét paraméter igen alacsony értékre csökkent, s a fermentáció hátralévő részében nem változott jelentősen. A D-glükóz ráadagolását követő száraztömeg gyarapodását jól jelezte az átlagos teljes hifahossz és az átlagos hifacsúcsszám növekedése is (72. ábra). A növényi olaj hozzáadása után 10 órával, hasonlóan a hifacsomók morfológiai vizsgálatánál tapasztaltakhoz, mind a hifacsúcsszám, mind a átlagos teljes hifahossz értéke jelentősen csökkent, s a fermentáció végéig igen alacsony értéken maradt.

Az adatokat összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a gyorsan hasznosuló D-glükóz és a jelenlétéből következő magas specifikus növekedési ráta egybeesett a hifák és a hifacsomók méretének növekedésével, vélhetően a hifák megnyúlása és összetapadása következtében. A D-glükóz elfogyása és a lassabban metabolizálódó szaharóz hasznosulása viszont erőteljes fragmentációt eredményezett, amit a szójaolaj adagolás (szemben a D-glükózzal) nem tudott visszafordítani, vagyis ilyenkor elmaradt a hifák megnyúlása és csomókká tapadása. A fentiek alapján a fragmentáció indító szignáljának vagy a biomassza produkció visszaesését (a növekedési ráta csökkenését) vagy a gyorsan hasznosuló szénforrás elfogyását tekinthetjük. Mivel egy fed-batch fermentációt elemezve a két hatás között lehetetlen különbséget tenni, D-glükóz-limitált kemosztát tenyészetekben vizsgáltuk tovább a kérdést.



72. ábra. *A. chrysogenum* morfológiai elemzése ráadagolásos fermentáció során. A D-glükóz ráadagolást szaggatott, az olaj ráadagolást pontozott vonal jezi.

Kemosztát tenyészetekben a specifikus növekedési rátát magunk állíthattuk be, míg a reziduális D-glükóz koncentráció gyakorlatilag nulla volt mindegyik fermentáció során. Az így kapott eredményeket a 73. ábra mutatja.



73. ábra. *A. chrysogenum* D-glükóz limitált kemosztát tenyészteteinek élettani paramétereit

Az alacsonyabb specifikus növekedési ráta tehát fokozott fragmentációt eredményez. Mindez azt jelenti, hogy a D-glükóz elfogyása önmagában nem a szignálja (elindítója), hanem inkább előfeltétele a fragmentációnak a növekedés leállításán keresztül. A növekedési ráta ellenben ok-okozati összefüggésben van a fragmentációval. Az alacsony növekedési ráta fokozódó vakuolizációhoz, elvékonyuló, gyenge hifákhoz és fokozódó fragmentációhoz vezet, melyek a mechanikus keverő nyírőereje következtében könnyen eltörnek.

Régóta ismert, hogy gyorsan hasznosuló szénforrások jelenlétében az antibiotikumok többségéhez hasonlóan a CPC bioszintézise is gátlódik, a lassan felvehető és / vagy lassan metabolizálható szénforrások viszont előnyösek a termelésre nézve (AHARONOWITZ és mtsai 1992, KARAFFA és mtsai 1999). A D-glükóz valóban visszavetette a CPC produkciót, míg a szacharóz és a szójaolaj jelenléte serkentő hatású volt.

Munkánk legfőbb tanulsága, hogy noha fed-batch vagy batch tenyésztetekben úgy tűnhet, hogy az *A. chrysogenum* gomba morfológiája és a CPC produktivitás összefüggésben

áll egymással, ez csupán azért van így, mert mindkét folyamat párhuzamosan ugyanazon fiziológiai változásokra reagál a szénforrás limitált elérhetőségének függvényében. Szénforrás ráadagolásakor ez a kapcsolat megszűnik. Hipotézisünket a kemosztát tenyészetek vizsgálata is alátámasztotta, hiszen a CPC produkcióját alig befolyásolta a specifikus növekedési ráta megváltoztatása, szemben a morfológiára kifejtett jelentős hatással (az alacsonyabb hígítási ráta alacsonyabb hifacsomó-arányokat, és kisebb méretű hifacsomókat is eredményezett). A CPC termelés és a növekedés tehát egymástól független folyamatok, hasonlóan a *P. chrysogenum* penicillin termeléséhez (PIRT 1975).

D-glükóz ráadagolásoknál a tenyészet metabolikus aktivitását jelző AO festődés és a növekedés között összefüggés mutatkozott, szójaolaj ráadagolás után azonban a két paraméter eltérően változott. Szójaolaj adagolásakor ugyanis a jelentős metabolikus aktivitás (amit a nagyarányú zöld fluoreszcencia jelzett) a megnövekedett CPC termelés és nem a biomassa produkció következménye volt (lásd **58. ábra**).

4.3.2.1. A sejtsűrűség hatása a cephalosporin C termelésére

Bármely sülllesztett (gomba) tenyészetnek fontos, jóllehet fiziológiai szempontból ritkán tanulmányozott jellemzője a sejtsűrűség, vagyis a száraztömeg térfogategységre vonatkozó mennyisége. Ahhoz, hogy egy sülllesztett kultúrából nagy sejtsűrűségű tenyészetet hozzunk létre, első közelítésben jól (gyorsan) hasznosuló szubsztrátumokat, elsősorban szénforrást kell magas kiindulási koncentrációban alkalmaznunk. Ismert azonban, hogy a CCR miatt ilyen körülmények között a mikróbákban (köztük az *A. chrysogenum*-ban is) azok a gének, melyek a lassabban hasznosuló szénforrások lebontását ill. metabolitok képződését kódolják, gátolva vannak (AHARONOWITZ és mtsai 1992). Ráadagolós fermentáció során, amikor a gyorsan hasznosuló szubsztrátum koncentrációját limitált értéken tartják, ez a hatás kiküszöbölhető, viszont a sejtkoncentráció sokszor nem éri el a kívánatos mértéket. Ennek jellemző oka valamilyen gátló hatású metabolit (vagy metabolitok) felszaporodása, amit, ha egy kritikus sejtkoncentráció fölötti érték elérése a célunk, el kell távolítani a tápközegből. Kezdetben ezt egy külső, dializáló modulnak a fermentorhoz kapcsolásával végezték. Bár fakultatív anaerob mikróbák (pl. *E. coli*, *S. cerevisiae*) esetén ez a rendszer kielégítő eredményt hozott (CHANG és mtsai 1993), a ki-és bevezetés során óhatatlanul fellépő oxigénhiány az aerob sejteket súlyosan károsította, a lokális kémhatás és hőmérsékletbeli eltérések pedig kedvezőtlenül befolyásolták az eredmények értékelhetőségét.

A Bioengineering cég által az 1980-es évek végén kifejlesztett, osztott terű dializáló fermentorban a sejteket tartalmazó belső teret membrán választja el az őt körülvevő külső

tértől (**4. melléklet**). A külső tér bruttó térfogata 5,5 l, hasznos térfogata 4,5 l, a belső térnél ezek az értékek 1,5 L, illetve 1 L. A fermentor külső falát 80 µm vastag poliamid fólia alkotja, aminek köszönhetően a fermentor kívülről teljesen átlátszó, de az üvegfalú fermentoroknál kevésbé balesetveszélyes. A féligáteresztő (szemi-permeábilis) belső membránon keresztül, a koncentráció gradienseknek megfelelően, a szubsztátumok molekulái a külső térből a belsőbe mozdulnak el, a fermentációs termékek (köztük a gátló hatásúak) pedig kihígulnak onnan. Mivel a tápanyag betáplálása nem jár együtt a sejtek egy részének eltávolításával (mint a folytonos rendszerekben) és a fermentációs térfogat sem növekszik (szemben a rátáplálásos tenyészetekkel), rendkívül magas mikroba koncentráció érhető el. Használatával elkerülhető továbbá a kétmodulos dializáló rendszereknél fellépő stresszhatás, és a sterilizációs problémák is leegyszerűsödnek (MÄRKL és mtsai 1990; KRAHE és mtsai 1996).

Noha a dializáló membránfermentorok számos mikrobiológiai laborban megtalálhatók, fonalas gombák tenyésztésére előttünk senki nem alkalmazott ilyen készüléket. Célunk annak eldöntése volt, hogy vajon hatással van-e a sejtsűrűség az *A. chrysogenum* specifikus CPC termelésére és a szénforrásra (D-glükóz) vonatkoztatott hozamkonstansára.

Mivel a jellemzően szaprofita fonalas gombák erőteljes celluláz és észteráz aktivitással rendelkeznek, a baktériumtenyészetek esetében használt, cellulóz alapú kuprofán membránt nem tudtuk belső membránként alkalmazni. Helyette egy 110 ± 10 µm vastagságú poliéter-szulfon polimer fóliát használtunk (levágási érték: 0,2 µm, vízre vonatkozó transzmembrán érték $T = 20$ °C-on: 6600×10^6 ml m⁻² h⁻¹ bar⁻¹). A membrán nem átlátszó, ezért a fermentlé sem vizsgálható szabad szemmel. Ezt kiküszöbölendő a külső fóliából ragasztottunk be egy, összfelületének kb. 8 százalékát kitevő darabot a belső membránba. Az „ablak” nem volt észlelhető hatással az áteresztőképességre, viszont jelentős könnyebbéget jelentett a készülék összeszerelésekor és a fermentáció alatt.

A sejtkoncentráció 0,4 és 40 g/l közti értékeinél a CPC produkció lineárisan változott a sejtkoncentrációval és a hozamkonstans értékekkel. A magas antibiotikum produkció időben mindig egybeesett a D-glükóz jelentős részének elfogyásával. Dializáló körülmények között a belső tér csökkenő D-glükóz koncentrációja a külső térből folyamatosan pótlódott, és hosszú ideig a kezdeti (20 g/l) érték közelében maradt. Ennek következtében meghosszabbodott a növekedési fázis. Amikor a külső tér glükóztartalmának fogyása (vagyis a glükózra vonatkozó koncentrációgradiens csökkenése) miatt a tenyészet a lassulási majd a stacioner fázisba került, a CPC produkció emelkedni kezdett. A szárazanyagtartalomra vonatkoztatott specifikus érték azonban nem tért el a hagyományos körülmények között mérhetőtől (**XV. táblázat**).

Kiindulási D-glükóz koncentráció (g/l)	Tenyésztés módja	A D-glükóz elfogyása (óra)	DCW _{max} (g/l)	CPC _{max} (mg/l)	Hozam- konstans (DCW)	Hozam- konstans (CPC)	Specifikus CPC produkció (g/g _{DCW})
1	Batch	2,33	0,41	42,2	0,41	0,042	0,10
2	Batch	4	0,78	83,1	0,39	0,041	0,10
5	Batch	8,33	2,13	216	0,42	0,043	0,10
10	Batch	15,5	3,90	385	0,39	0,038	0,10
15	Batch	22,4	5,66	542	0,37	0,03	0,10
20	Batch	28,5	8,32	814	0,41	0,040	0,09
20 / 20	Dialízis*	95	39,87	3814	0,36	0,034	0,09

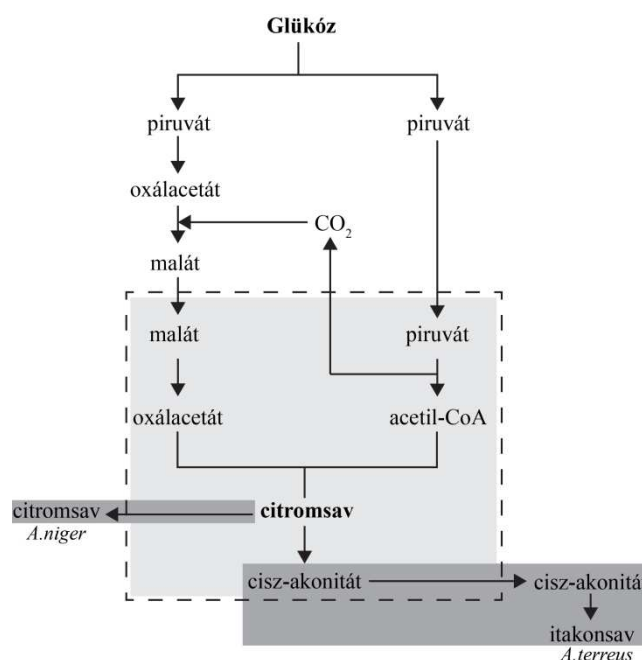
XV. táblázat. A fermentáció során elért legmagasabb biomassza (DCW_{max}) és CPC koncentráció (CPC_{max}), valamint a D-glükózra számított hozamkonstansok értékei

* A kiindulási D-glükóz koncentráció 20 g/l volt mind az 1 L térfogatú belső (fermentációs), mind a 4,5 L térfogatú külső térben. Így összesen 20 + 90 = 110 g glükóz hasznosult a fermentáció során, s a hozamkonstansokat is ennek megfelelően számítottuk ki.

4.3.3. Itakonsav túltermelés *Aspergillus terreus*-ban

Az itakonsav (2-metilén butándisav) egy telítetlen dikarbonsav, melyet a citromsav pirolízis termékeként fedeztek fel (BAUP 1837). Fermentációs előállítását még a II. világháború előtt egy ozmotoleráns gomba (*A. itaconicus*) vizsgálata kapcsán írták le (CALAM és mtsai 1939). Később az NRRL több, mint 300 gombafaj IA produkcióját értékelte; legjobb termelőnek az *A. terreus* bizonyult. IA túltermelőként írtak le több *Candida* és *Rhodotorula* fajt is (MEENA és mtsai 2010; Voll és mtsai 2012). Mivel enyhén mérgező, élelmiszer-ipari felhasználása – szemben a citromsavval – nincs, de szerves szintéziseknél gyakran használják kiindulási anyagként, elsősorban műanyagok, vízálló festékek és gyanták előállítása során (OKABE és mtsai 2009). Az IA fermentáció a citromsavéhoz hasonlóan a primer anyagcsere túltermelődés klasszikus példája, de annál jóval kevésbé ismert illetve tanulmányozott.

Az IA bioszintézis a citromsavéval megegyező biokémiai útvonalakon történik, de tartalmaz egy további (citoszolikus) enzimet, a *cis*-akonitát dekarboxilázt, melyet a *cadA* gén kódol (STEIGER és mtsai 2013). A *cadA* klasztert képez az *mttA* és az *mfsA* génekkel, melyek egy feltételezett mitokondriális illetve egy feltételezett sejtmembrán transzportert kódolnak; mindkettőnek szerepe lehet a Krebs-ciklus intermedier *cis*-akonitát mitokondriális illetve az IA sejtből történő exportjában (LI és mtsai 2013; **74. ábra**).



74. ábra. Az *A. niger* citromsav illetve az *A. terreus* itakonsav túltermeléséhez vezető metabolikus útvonalainak összehasonlítása. A mitokondriális lépések a szaggatott vonalon belül, szürke háttérben találhatóak. A fajspecifikus reakciókat sötét háttér jelzi, a fajnév feltüntetése mellett.

A hasonlóságok ellenére az IA fermentációk végső titere illetve szénforrásra számított hozama jóval alatta marad a citromsavnak (OKABE és mtsai 2009), melyet közel 200 g/l végkoncentráció és 0,95 %-ot elérő hozamkonstans mellett gyártanak ipari körülmények között (KUBICEK és KARAFFA 2010). A citromsav fermentációs technológia kritikus része – a megfelelő *A. niger* mutáns törzsek mellett – a táptalaj összetételének gondos beállítása. A legfontosabb szempontok a Mn(II) mennyiségének erőteljes limitálása (SHU és JOHNSON 1948; CLARK és mtsai 1966), illetve a gyorsan hasznosuló szénforrás (biokémiai szempontból a D-glükóz) magas koncentrációja. Szemben a citromsavval, a Mn(II) hatását az itakonsav termelésre szisztematikusan még nem vizsgálták. Munkahipotézisünk szerint az itakonsavat a citromsavhoz hasonló koncentrációban illetve titer mellett lehet termelni, ha a Mn(II) és a D-glükóz koncentrációt a táptalajban megfelelően szabályozzuk.

A citromsav bioszintézisre kritikus Mn(II) koncentráció alatta van a standard csapvíz Mn(II) tartalmának. Mivel a kationok könnyen kötődnek a cukor tartalmú szénforrásokhoz, a kísérleti rendszer esszenciális része a Mn(II) kationcserés eltávolítása⁴⁹ a vízből és a D-glükóz oldatból, illetve koncentrációjának rendszeres meghatározása⁵⁰ (XVI. táblázat). Mivel a fém falú fermentorokból a képződött szerves sav ionokat, köztük Mn(II)-t oldhat ki, munkánk során viszonylag nagyobb (bruttó 9, nettó 6 l) térfogatú üvegfermentorokat használtunk.

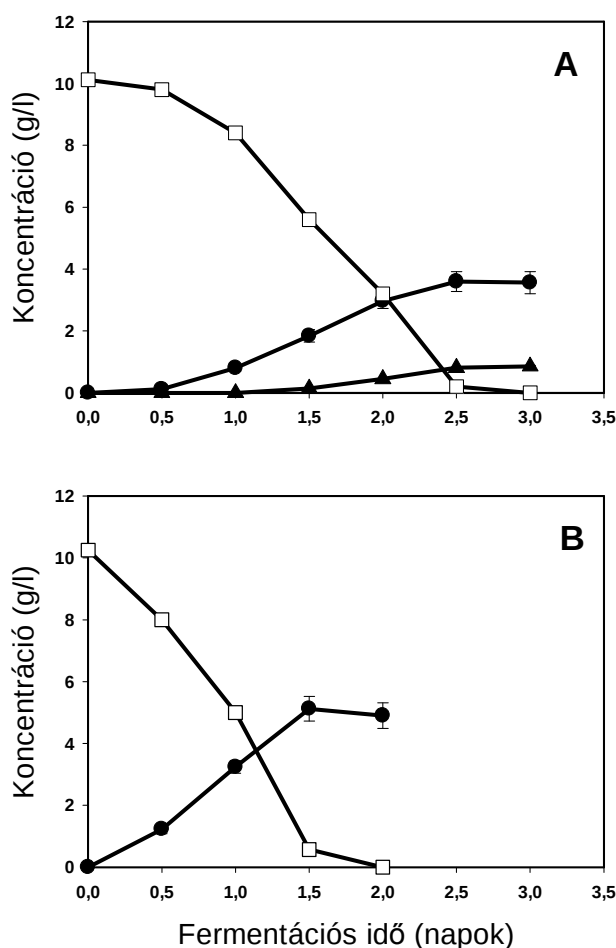
⁴⁹ Dowex 50 W-X8 (100/200-mesh) kation cserélő gyanta (440 x 45 mm oszlopban) segítségével.

⁵⁰ Induktív csatolású plazma tömegspektrométer (ICP-QMS) segítségével.

	csapvíz	desztillált víz	1 % D-glükóz	15 % D-glükóz
Kezelt	$0,46 \pm 0,03$	$< 0,05$	$1,78 \pm 0,05$	$2,54 \pm 0,15$
Kezeletlen	$3,25 \pm 0,05$	$0,43 \pm 0,02$	$10,12 \pm 0,25$	$149,5 \pm 2,12$

XVI. táblázat. Mn(II) koncentrációk kezeletlen illetve ioncserélővel kezelt csap/desztillált vízben illetve D-glükóz oldatokban.

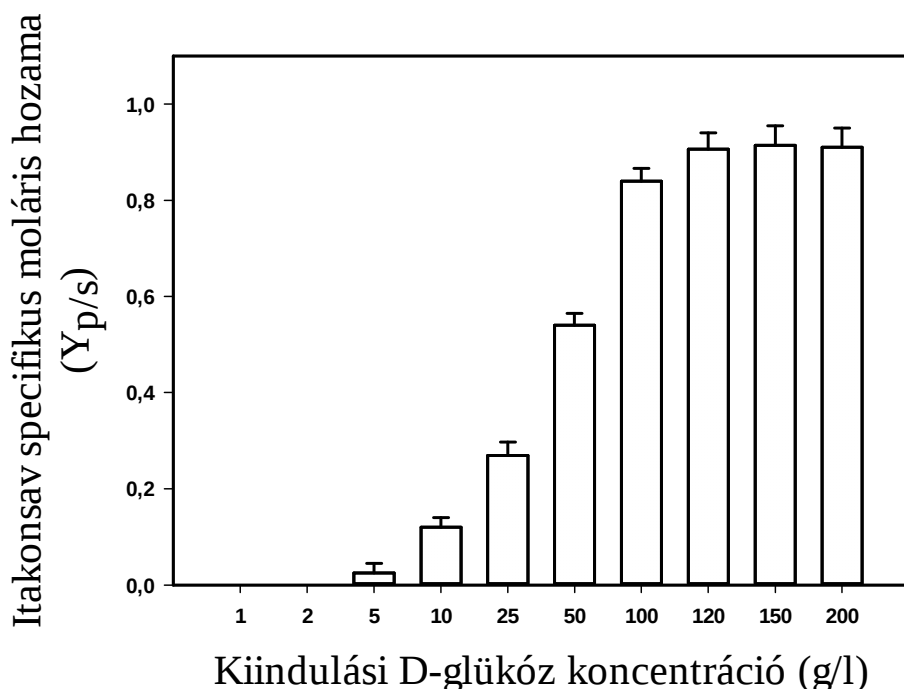
Elsőként egy standard laboratóriumi szénforrás-koncentráció (1 %) hatását vizsgáltuk meg az IA termelésre Mn(II) ion limitáció mellett illetve 0,25 mg/l Mn(II) jelenlétében – ez utóbbi a gomba fermentációknál jellemzőnek mondható (DAHOD 1999). Mn(II) jelenlétében az *A. terreus* gyorsabban, erőteljesebben nőtt, mint Mn(II) hiányában (75. ábra).



75. ábra. *A. terreus* NRRL 1960 tenyészet időprofiljai. A: Mn(II) limitált tenyészet ([Mn(II)] < 0,3 µg/l); B: 0,25 mg/l Mn(II)-t tartalmazó tenyészet. (□): aktuális D-glükóz koncentráció. (●): biomassa (DCW) koncentráció. (▲): itakonsav koncentráció.

A Mn(II) limitált – a kationt 0,3 µg/l-nél alacsonyabb koncentrációban tartalmazó – tenyészet biomassza hozama $Y_{x/s} = 0,35$, a normál mennyiségű Mn(II)-t tartalmazó tenyészeté $Y_{x/s} = 0,50$ volt. Ezzel összhangban a Mn(II)-t tartalmazó tenyészet nem termelt itakonsavat, a Mn(II)-limitált tenyészetben megjelent viszont kis mennyiségben (0,86 g/l); a specifikus moláris hozam (= képződött itakonsav/elfogyott D-glükóz molaránya) ez alapján 0,12 volt. A kísérlet tehát igazolta, hogy Mn(II)-limitáció szükséges az IA képződéséhez.

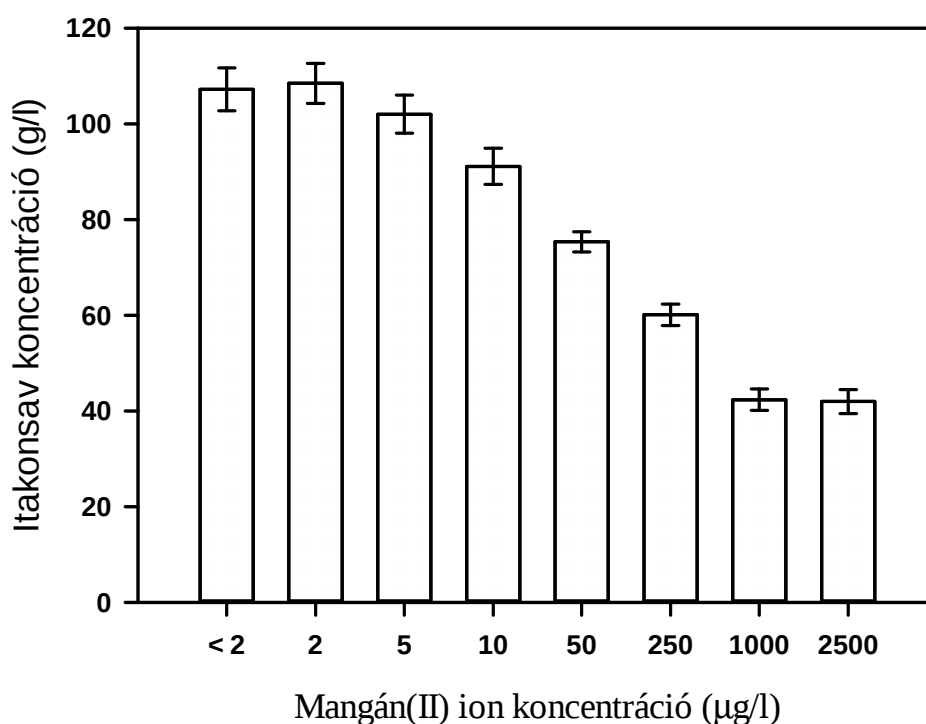
Mivel citromsav esetén a moláris hozam a szénforrás koncentrációjának 5 % (w/v) fölé emelésével rohamosan emelkedik, megvizsgáltuk a D-glükóz koncentráció hatását Mn(II) limitáció mellett. Az IA 5 g/l kiindulási D-glükóz koncentrációnál jelent meg, 100 g/l értékig rohamosan, ezt követően enyhén emelkedett; 120 g/l és 200 g/l között statisztikusan nem változott. A 120 g/l kiindulási D-glükóz értéknél elért IA koncentráció (~133 g/l) megközelíti a 90 %-os termékhozam értéket ($Y_{p/s}$). A keletkezett biomasszát is figyelembe véve az elért végső IA koncentráció megközelítette az elméleti maximumot, s egyben az itakonsavnak a fermentáció hőmérsékletén ($T = 33\text{ °C}$) érvényes maximális oldékonyságát is (1,0623 M/kg $T = 306,15\text{ K}$ hőmérsékleten; APELBLAT és MANZUROLA 1997). Ez azt jelzi, hogy a kiindulási D-glükóz koncentráció további emelése vélhetően nem fokozná az elérhető IA koncentrációt (76. ábra).



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

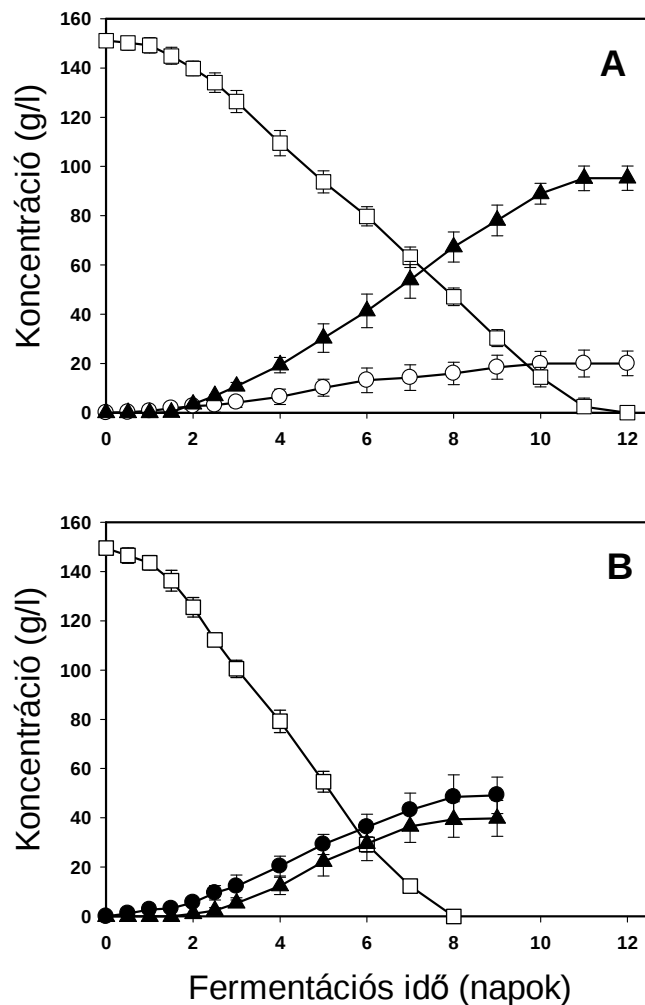
A fenti eredmények azt mutatják, hogy sikerült – legalábbis laboratóriumi léptékben – optimalizálnunk az *A. terreus* IA fermentációját. A továbbiakban a Mn(II) ion koncentráció hatását vizsgáltuk ezen körülmények között. A kiindulási D-glükóz koncentrációt 180 g/l értékre állítottuk, az Mn(II) kiindulási koncentrációját 2 µg/l és 2,5 mg/l között változtattuk. A fermentorok oldott oxigén (DO) szintjét 40 %-os telítettségre állítottuk be, és a keveréssel szabályoztuk.

Az *A. niger* citromsav túltermeléséhez hasonlóan az IA hozam > 5 µg/l Mn(II) koncentráció fölött szignifikánsan csökkenni kezdett, viszont 1 mg/l fölött már nem csökkent tovább (77. ábra). Ennél az értéknél 31 %-os termékhozam értéket ($Y_{p/s}$) értünk el, ami magasabb, mint a hasonló Mn(II) koncentrációnál elérhető citromsav kihozatal.



77. ábra. Maximális itakonsav koncentráció az *A. terreus* NRRL 1960 fermentlevében különböző Mn(II) koncentrációk mellett. A D-glükóz kiindulási koncentrációját egységesen 180 g/l-re állítottuk be.

A következőkben a Mn(II) limitált (termelésre optimalizált) illetve Mn(II)-kiegészített (növekedésre optimalizált) IA fermentációk időprofiljait vetettük össze (78. ábra). Az utóbbi esetben a D-glükóz és a biomassa koncentrációk változásai, illetve a biomassa és a termék hozamok ($Y_{x/s} = 0,49$ és $Y_{p/s} = 0,36$) az alacsony szénforrás koncentrációjú, D-glükóz alapú fermentációkat idézték. A maximális biomassa koncentráció $x = 20,05$ g/l (DCW) volt, ami kb. 60 %-al alacsonyabb a standard mennyiségű Mn(II) ionnal kiegészített tenyészeténél.



78. ábra. Biomassza, szénforrás és itakonsav koncentrációk változásai *A. terreus* NRRL 1960 tenyésztésében, 150 g/l kiindulási D-glükóz koncentráció mellett. (●): Biomassza (DCW); (□): D-glükóz; (▲): itakonsav. A: Mn(II) hiányos tenyészet (< 3 µg/l). B: 0,25 mg/l kiindulási Mn(II) koncentráció.

A Mn(II) ion hiányos tenyészetekben azonban – limitált növekedés mellett – drámaian megnőtt a keletkezett itakonsav mennyisége. A maximális érték 95,3 g/l volt, ami 87 %-os specifikus moláris hozamot, vagyis rendkívül hatékony cukor-sav konverziót jelent. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az itakonsavat is lehet a citromsavéhoz hasonló magas hozam mellett termeltetni, ha két kritikus paramétert: a (gyorsan hasznosuló, pl. D-glükóz) szénforrás és a Mn(II) ionok koncentrációját optimált értéken tartjuk. A szénforrás esetében ez az érték magas (> 10 %), a Mn(II) ionok esetében extrém alacsony (< 5 µg/l). Mindez azt is jelenti, hogy csak technológiai szempontból⁵¹ nincs szükség az *A. niger* platformon történő heterológ itakonsav termeltetésre, hiszen az *A. terreus* törzsekkel is az elméleti maximumot megközelítő kihozataalt lehet elérni.

⁵¹ Megjegyzendő azonban, hogy az *A. terreus* potenciális mikotoxin termelő gombaként egyes EU-tagállamokban „Biosafety 2” szintű besorolást kapott, szemben a GRAS-státuszú *A. niger*-rel.

4.4. TERMINÁLIS OXIDÁCIÓ: A SZÉNFORRÁS ASSZIMILÁCIÓ UTOLSÓ ÁLLOMÁSA

4.4.1. Az *Acremonium chrysogenum* alternatív légzésének szabályozása

A CPC-t termelő *A. chrysogenum* cianid-rezisztens alternatív légzését a mi laboratóriumunk vizsgálta először (KOZMA és mtsai 1991, 1993; KOZMA és KARAFFA 1996a; KARAFFA és mtsai 1996, 1999). Az alternatív légzés aktivitása a citokróm-függő elektrontranszport gátlása során fokozódik. Ilyenkor az ubiquinon-állomány redukciós szintje megemelkedik, és fokozódó mitokondriális hidrogén-peroxid (H_2O_2) képződés észlelhető (MINAKAMI és mtsai 1989), ami az intracelluláris peroxid koncentráció emelkedésével jár. Az alternatív légzés és a peroxidok jelenléte/mennyisége közti összefüggést növényen (*Petunia hybrida*; WAGNER 1995) és a *Hansenula anomala* élesztőn (Minagawa 1990) is demonstrálták.

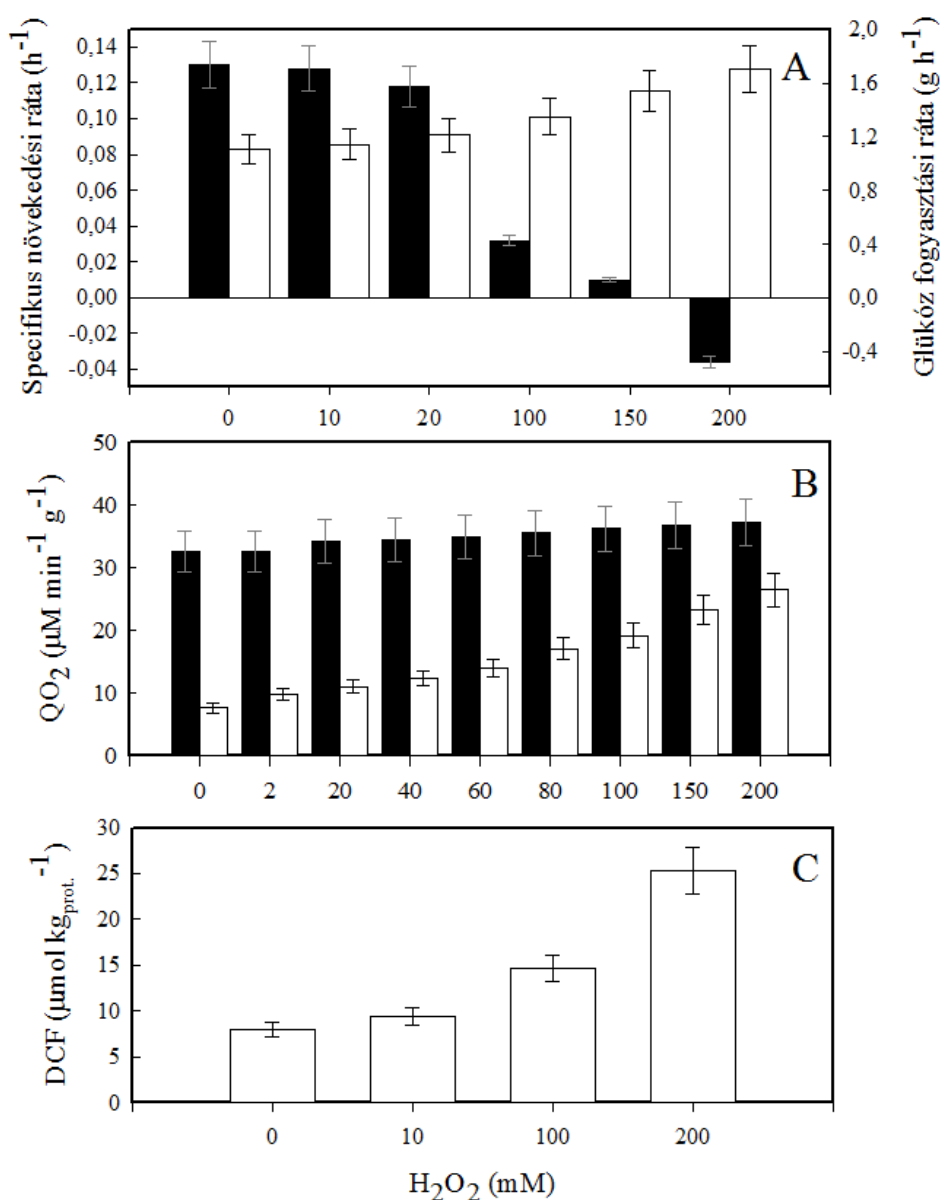
Munkánk első részében azt vizsgáltuk, hogy a citokróm-függő légzés gátlásától eltérő módon megnövelt intracelluláris peroxid koncentráció is együtt jár-e a cianid-rezisztens, SHAM-szenzitív légzés fokozódásával. Ennek során a tápközegbe kívülről bejuttatott H_2O_2 , valamint a (H_2O_2 bomlását katalizáló) kataláz enzimet specifikusan gátló szalicilsav alternatív légzésre gyakorolt hatását tanulmányoztuk, majd szabadgyökfogó szerekkel (α -tokoferol [E-vitamin], metilénkék) csökkentettük az intracelluláris peroxid koncentrációt, s vizsgáltuk meg ennek hatását az alternatív légzésre.

Az *A. chrysogenum* figyelemre méltó ellenállóképességet mutat hidrogén-peroxiddal szemben; a táptalajba juttatott H_2O_2 -t 200 mM koncentrációnál is túlélte. H_2O_2 jelenlétében szignifikánsan ($p < 1\%$) csökken a tenyészetek specifikus növekedési rátája, ami a biomassza produkció hanyatlásával járt (**79. A. ábra**). A H_2O_2 koncentráció emelésével a biomassza produkció és a specifikus növekedési ráta is csökkent ($p < 1\%$), 200 mM H_2O_2 -nál a specifikus növekedési ráta negatívba fordult. A D-glükóz fogyási értékek azonban ellenkező tendenciát mutattak; H_2O_2 hozzáadása után a szénforrás felvételének üteme gyorsult (**79. A. ábra**). Mértéke szintén koncentrációfüggőnek bizonyult, noha kisebb mértékben, mint a biomassza produkció és a specifikus növekedési ráta. Végeredményben a tenyészetek hozamkonstansa (az egységnyi szénforrásból képződött biomassza mennyisége) csökkent drámai módon H_2O_2 kezelést követően. A peroxiddal kezelt tenyészetek negatív növekedése csak ideiglenes volt, 20 h múlva újra megindult a kontroll értékkel összevethető biomassza produkció.

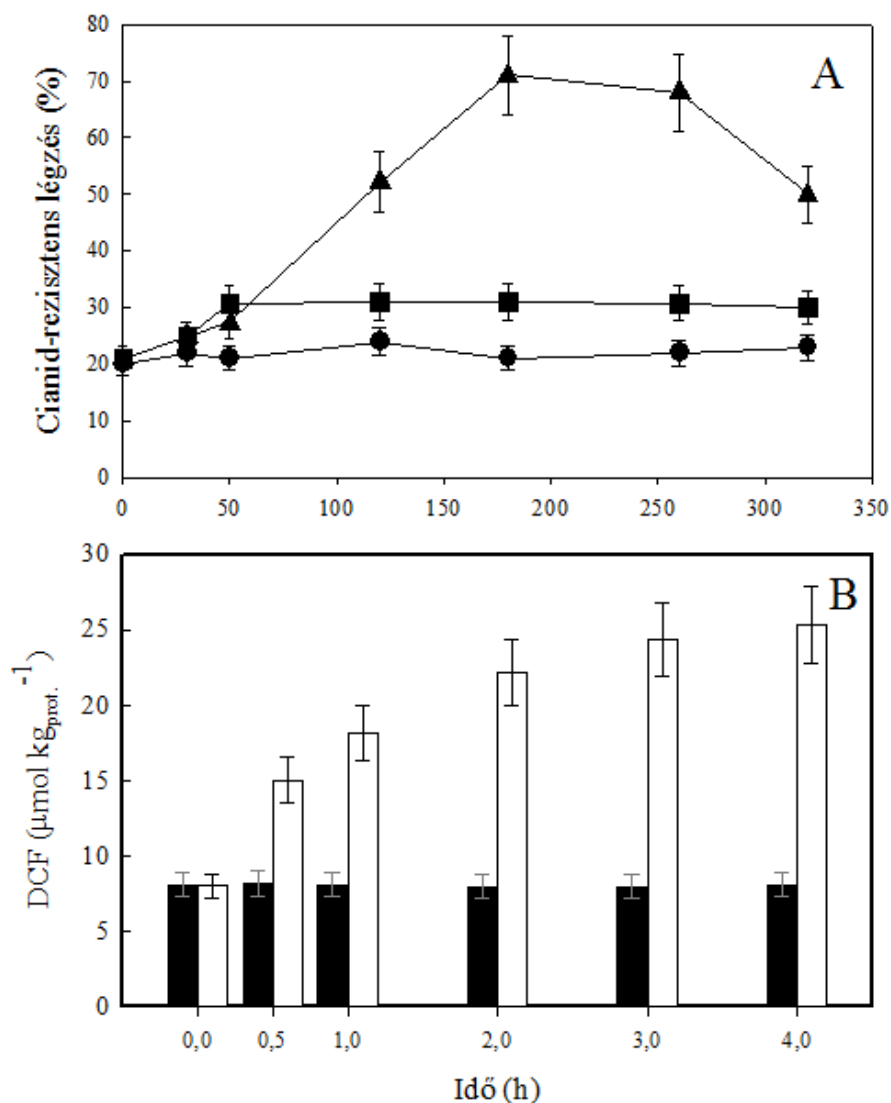
Noha a hidrogén-peroxiddal kezelt tenyészetek gátolatlan (teljes) légzése is valamivel magasabb volt a kontrollnál, szignifikáns ($p < 1\%$) eltéréseket az alternatív légzés mutatott (**79. B. ábra**). Értékei magasabb H_2O_2 koncentrációknál megközelítették a teljes légzés 80%-át, ami csaknem négyszerese a kontrollnak. A változás ez esetben is koncentrációfüggő, időbeli

lefutásuk valamennyi vizsgált H_2O_2 koncentrációnál hasonló (lásd 200 mM; **80. B. ábra**). A kezelés után kb. 3,5 órán át tartó folyamatos emelkedést követően egy platót észleltünk, majd a cianid-rezisztencia csökkenni kezdett. A H_2O_2 alternatív légzésre gyakorolt hatását nagyrészt gátolni lehetett cikloheximides kezeléssel (**80. A. ábra**), ami az alternatív oxidáz fehérje *de novo* szintézisére utalhat.

Az intracelluláris peroxid szintek szignifikánsan és dóziszfüggően magasabbak voltak a kontrollnál (**79. C. ábra**). A változások időbeli lefutása hasonló az alternatív légzéséhez. A maximális értékek itt is a kezelést követő 3-4 óra között jelentkeztek.

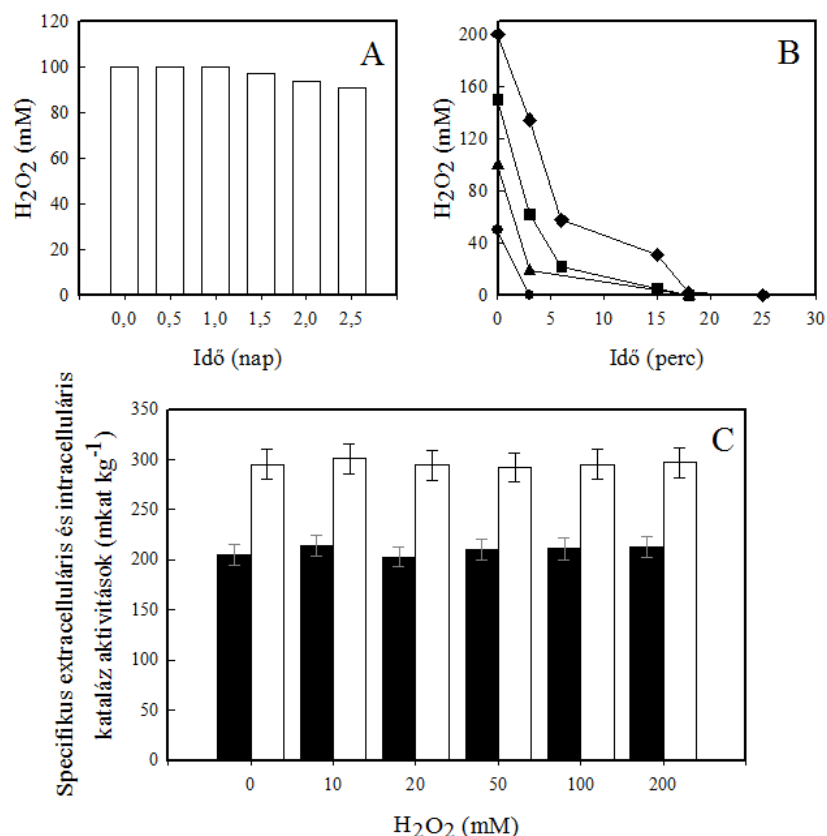


79. ábra. Kívülről adagolt hidrogén-peroxid hatásai *A. chrysogenum* ATCC 46117 süllyesztett tenyészetekre. A. Növekedési (■) és glükóz fogyasztási (□) ráta. B. Gátolatlan (■) és cianid-rezisztens (□) légzés. C. Intracelluláris peroxid szintek.



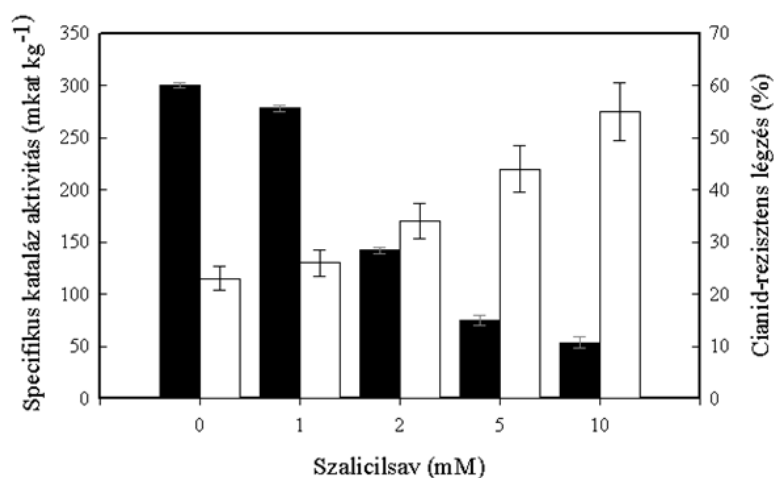
80. ábra. 200 mM hidrogén-peroxidos kezelést követő időbeli változások az *A. chrysogenum* ATCC 46117 tenyészetében. A. Cianid-rezisztens légzés stimulálása (▲), a stimulálás gátlása cikloheximiddel (■), kontroll értékek (●). B. Intracelluláris peroxid szintek (üres oszlopok), kontroll értékek (tömött oszlopok).

A H_2O_2 spontán diszproporcionálódása sejtmentes táptalajban elhanyagolható volt (81. A. ábra), sejtek jelenlétében azonban a bomlás rendkívül gyors; a 200 mM végkoncentrációjú H_2O_2 25-30 perc alatt eltűnt a felülrészből (81. B. ábra). Kisebb koncentrációkhoz arányosan rövidebb bomlási idők tartoztak; ez hatékony, állandó teljesítményű H_2O_2 -elimináló rendszert tételezett fel. Valóban, extra- és intracellulárisan is magas, konstitutív kataláz aktivitásokat mértünk (81. C. ábra), ami magyarázza az *A. chrysogenum* általunk vizsgált törzsének H_2O_2 -val szembeni jelentős ellenállóképességet. *Candida albicans*-ban a kataláz aktivitás csak 98 mkat/kg és indukálható jellegű (JAMIESON és mtsai 1996), míg a *P. chrysogenum* egyik ipari törzse szintén konstitutív, magas (5,8 kat/kg) aktivitással rendelkezik (EMRI és mtsai 1997).



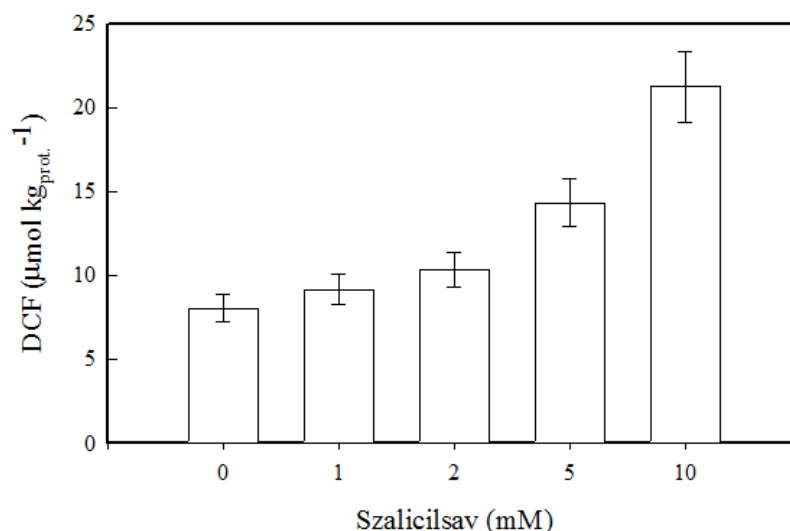
81. ábra. Hidrogén-peroxid elimináció és kataláz aktivitások *A. chrysogenum* ATCC 46117-ben. A: H₂O₂ bomlása sejtmentes tápközegben. B: A H₂O₂ bomlása micéliumok jelenlétében. (♦): 200 mM H₂O₂; (■): 150 mM H₂O₂; (▲): 100 mM H₂O₂; (●): 50 mM H₂O₂. C: Intracelluláris (tömött oszlopok) és extracelluláris (üres oszlopok) kataláz aktivitások.

Magasabbrendű növényekben a kataláz aktivitását szalicilsavval specifikusan gátolni lehet (SÁNCHEZ-CASAS és KLESSIG 1994). Vizsgálataink szerint az *A. chrysogenum* ATCC 46117 törzsben hasonló a helyzet: szalicilsav hatására a kataláz aktivitási értékek jelentősen, koncentrációfüggő módon lecsökkentek (82. ábra).



82. ábra. Szalicilsav hatása az *A. chrysogenum* ATCC 46117 tenyészetekre. Specifikus intracelluláris kataláz aktivitás (tömött oszlopok); Cianid-rezisztens alternatív légzés (üres oszlopok).

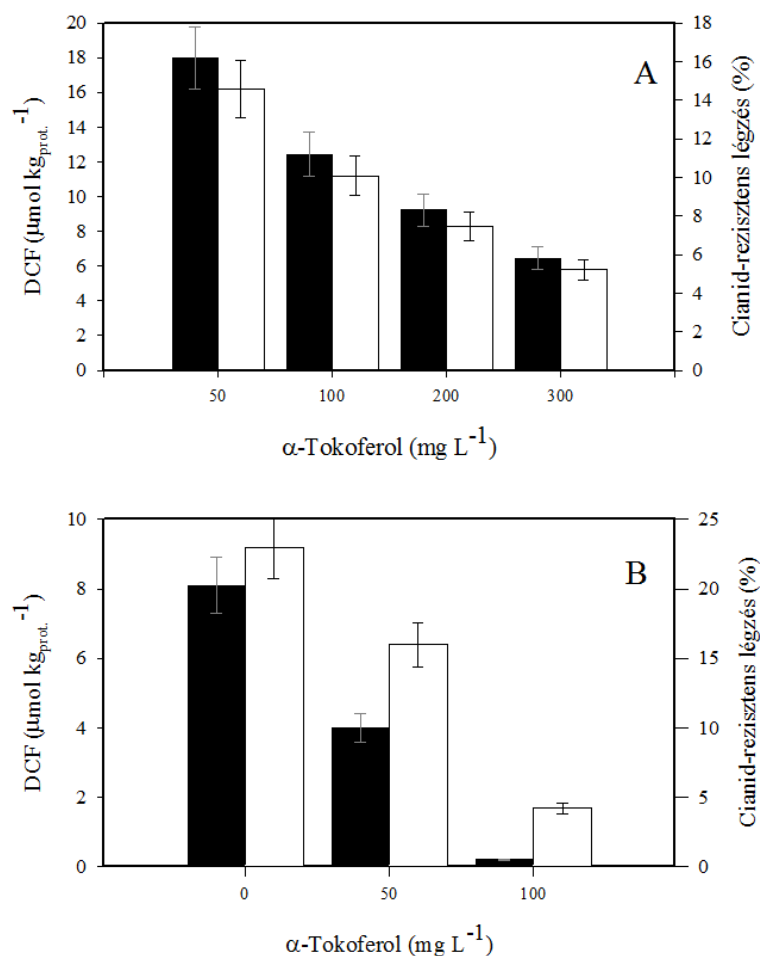
Kataláz aktivitás gátló hatása miatt feltételeztük, hogy a szalicilsav az intracelluláris H_2O_2 értékeket is befolyásolja. Valóban, az intracelluláris peroxid szintek szignifikánsan és koncentrációfüggő módon megnövekedtek szalicilsavas kezelést követően (**83. ábra**), noha a növekedési és a D-glükóz felvételi ráták nem változtak. A kísérlet az intracelluláris peroxid szintek és az alternatív légzés közti korrelációt is újra demonstrálta: a tenyészetek légzésének cianid-rezisztenciája szignifikánsan, a szalicilsav koncentrációjától függő mértékben megnőtt (**82. ábra**).



83. ábra. Szalicilsav hatása az *A. chrysogenum* ATCC 46117 tenyészetek intracelluláris peroxid szintjeire

A továbbiakban a cianid-rezisztens alternatív légzés intenzitása és az intracelluláris peroxid szintek közötti korrelációt a standard állapothoz képest csökkentett peroxid képződés mellett demonstráltuk, amihez a szabadgyökfogó hatású, hidrofób α -tokoferolt (E-vitamin) használtuk. Emelkedő koncentrációban adva a tenyészetekhez az alternatív légzés mértéke és az intracelluláris peroxid koncentráció is dóziszfüggő módon lecsökkent (**84. B. ábra**). Az α -tokoferol a 200 mM H_2O_2 által megemelt intracelluláris peroxid szinteket is dóziszfüggően visszaszorította, s egyidejűleg lecsökkentette a megemelt cianid-rezisztens alternatív légzés értékeit is (**84. A. ábra**).

A reaktív oxigénformák (szuperoxid anion, hidrogén peroxid, hidroxil gyökök) az aerob anyagcsere során folyamatosan képződnek, és lipid peroxidációt elindítva akár végzetes membránkárosodáshoz vezethetnek (HALLIWELL és GUTTERIDGE 1984). Intracelluláris H_2O_2 a terminális citokróm a_3 oxidáz hibás működése következtében, víz helyett keletkezik. Mértéke a terminális elektrontranszport telítettségétől és az oxigént redukáló végoxidáz aktivitásától függ. A citokróm-függő elektrontranszport lánc gátlásakor az elektronok feltorlódnak, az ubiquinol/ubiquinon arány megnő, s gyakoribbá válik az oxigén szabályozatlan redukciója.



84. ábra. α -tokoferol (E-vitamin) hatása az *A. chrysogenum* ATCC 46117 tenyészetekre. A: 200 mM H₂O₂-vel kezelt tenyészet. B: kontroll tenyészet. Specifikus intracelluláris kataláz aktivitás (tömött oszlopok); cianid-rezisztens alternatív légzés (üres oszlopok).

Az alternatív légzés intenzitása olyan folyamatok során emelkedik meg, melyek vagy közvetlenül vezetnek fokozott intracelluláris peroxid képződéshez, vagy a mitokondriális légzési lánc – intracelluláris peroxid képződéshez is vezető – telítettségét (redukációs szintjét) emelik. Az alternatív légzés előtérbe kerülése csökkenti a légzési lánc komponenseinek redukáltságát, ami csökkenti az oxigén véletlenszerű, szabadgyökök képződéshez vezető redukciójának lehetőségét. Ezen model alapján tehát az alternatív légzés elsősorban védelmi funkciót tölt be. A cianid-rezisztencia fokozódásának azonban fontos élettani következménye a biomassza hozam ($Y_{x/s}$) csökkenése, hiszen az ADP foszforilezés mértéke lecsökken, és az ADP-limitáció mértéke is értelemszerűen kisebb. Ez – mint az ipari túltermelő folyamatoknál láttuk (lásd **2.3. fejezet**) – sokszor kifejezetten előnyös. Technológiai körülmények között a cianid-rezisztens alternatív légzés intenzitásának fokozódását jellemzően a DO emelésével érik el. Megvizsgáltuk ezért, hogy a „magas DO – megnövekedett alternatív légzés” kapcsolat szintén az intracelluláris peroxid szinteken keresztül közvetítődik-e.

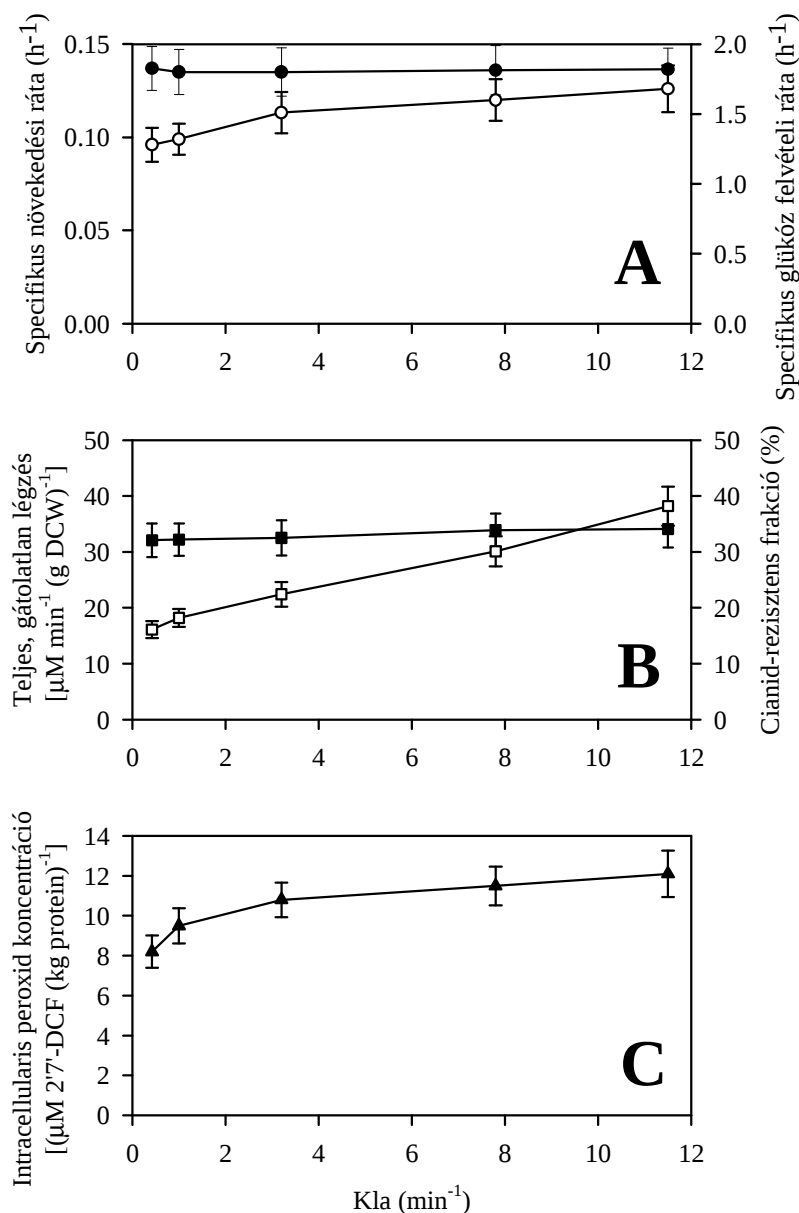
A vizsgálatokhoz öt különböző *A. chrysogenum* tenyészetet hasonlítottunk össze; a különbség köztük a bioreaktorok (rázott lombikok) egyesített tömegátviteli koefficiens (Kl_a) értékében volt (**XVII. táblázat**), melyeket KOZMA és KARAFFA (1996b) módszere alapján határoztunk meg.

A tenyészet sorszáma	500 ml-es, rázott lombikos tenyészetek levegőztetéssel kapcsolatos jellemzői	Egyesített oxigénátviteli koefficiens (Kl_a ; 1/perc)
I.	30 ml tápfolyadék, torlós, porózus lombikfedő	11,5
II.	80 ml tápfolyadék, torlós, porózus lombikfedő	7,8
III.	80 ml tápfolyadék, torlótlan, porózus lombikfedő	3,2
IV.	80 ml tápfolyadék, torlótlan, laza fémkupak	1,0
V.	150 ml tápfolyadék, torlótlan, laza fémkupak	0,42

XVII. táblázat. Rázott lombikos *A. chrysogenum* ATCC 46117 tenyészetek levegőztetést (=oxigénellátást) érintő fizikai tulajdonságai

Az összehasonlíthatóság érdekében glicerinen előnövesztett, D-glükózt kizárólagos szénforrásként tartalmazó táptalajra átmosott tenyészeteket hoztunk létre, melyeket – 1 óras adaptációs időt követően – 4 óras időintervallumban tanulmányoztunk.

A specifikus növekedési rátában nem találtunk szignifikáns ($p < 0,1$ %) különbséget a vizsgált időtartam alatt. Ezzel szemben a D-glükóz felvétel szignifikánsan ($p < 0,1$ %) eltérő volt; a magasabb oxigén transzfer ráta gyorsabb glükóz felvételt eredményezett (**85. A. ábra**). Noha a tenyészetek oxigén transzfer ráta értékeiben tekintélyes különbségeket hoztunk létre, a teljes, gátolatlan légzés értékei alig tértek el egymástól; a különbségek alacsony probabilitási értéknél ($p < 1$ %) sem voltak szignifikánsak, bár a Kl_a csökkenésével nagyon enyhe légzési aktivitás csökkenést észleltünk. A legmagasabb illetve legalacsonyabb oxigén transzfer rátájú két tenyészet gátolatlan légzési aktivitásai között 8 %-nyi volt a különbség (**85. B. ábra**). Ezzel szemben a teljes légzés cianid-rezisztens frakciójának mértéke szignifikánsan ($p < 0,1$ %) változott az oxigén transzfer ráta függvényében; magasabb Kl_a nagyobb cianid-rezisztens frakciót, vagyis intenzívebb alternatív légzést eredményezett (**85. B. ábra**).

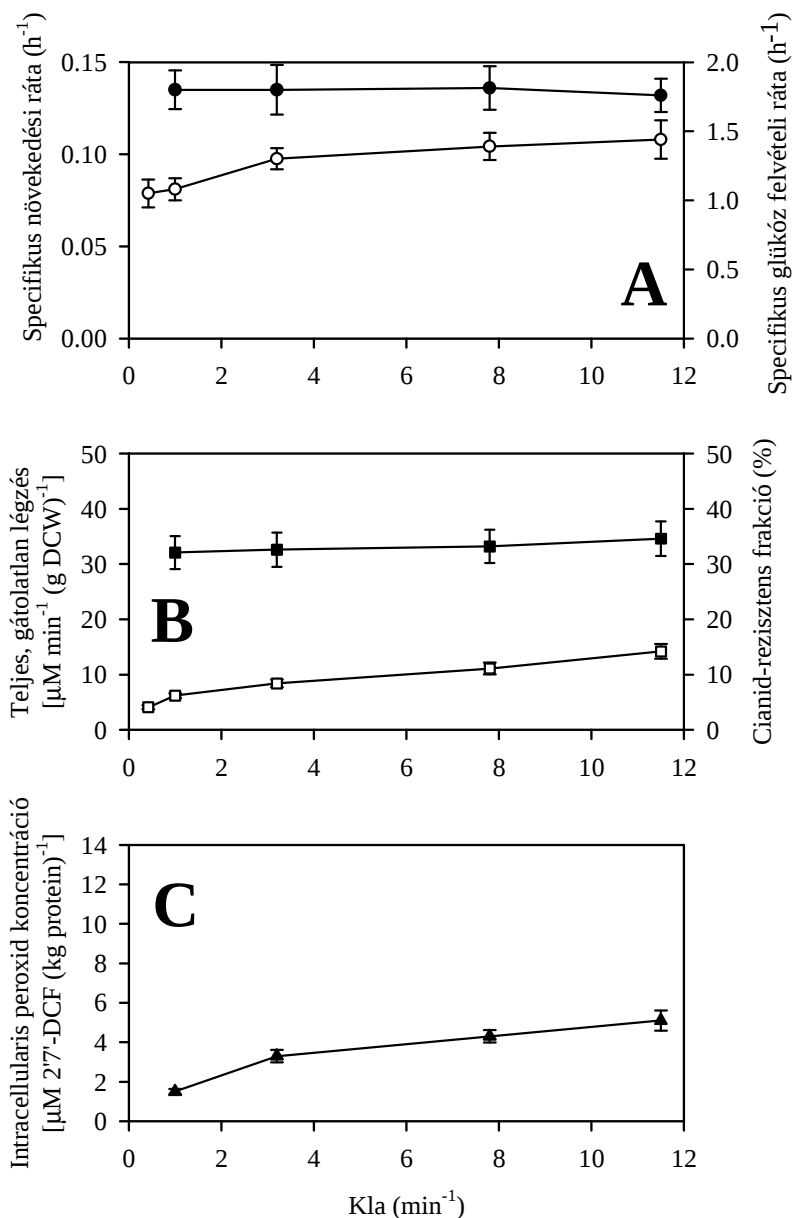


85. ábra. *A. chrysogenum* ATCC 46117 tenyészetek időprofiljai az egyesített tömegátviteli koefficiens (K_{La}) függvényében. A: növekedési ráta (●) és D-glükóz felvételi ráta (○). B: Teljes, gátolatlan légzés (■) és a légzés cianid-rezisztens frakciója (□). C: Intracelluláris peroxid szintek (▲)

Egyértelmű korrelációt találtunk a K_{La} értékek és az intracelluláris peroxid szintek között. A magasabb oxigéntranszfer ráta szignifikánsan ($p < 1\%$) magasabb intracelluláris peroxid szinteket eredményezett. $K_{La} = 11,5$ 1/perc értéknél 50 %-al magasabb intracelluláris peroxid szinteket mértünk, mint $K_{La} = 0,42$ 1/perc esetén (85. C. ábra).

A cianid-rezisztens alternatív légzés intenzitása és az intracelluláris peroxidok szintje közötti korreláció bizonyításához újra a DL- α -tokoferolt használtuk (86. ábra). A két releváns ábra (85. A. vs. 86. A.) összevetése mutatja, hogy a gyökfogó nem befolyásolta a tenyészetek növekedési rátáját a vizsgált periodusban ($p < 0,1 \%$), a D-glükóz felvétel rátáját

azonban 18-25 %-al csökkentette. A DL- α -tokoferol az alternatív légzés (85. B. és 86. B. ábrák) és az intracelluláris peroxid szintek (85. C. és 86. C. ábrák) értékét is csökkentette ($p < 0,1$ %) minden vizsgált tenyészetben, függetlenül az oxigén ellátottságtól. Ezek az adatok világosan mutatják, hogy az intracelluláris peroxid koncentrációk befolyásolása (akár emelés, akár csökkentés révén) hatással van a cianid-rezisztens alternatív légzés aktivitására. Fontos megjegyezni, hogy a teljes, gátolatlan légzés egyetlen lombikban sem változott meg a DL- α -tokoferol kezelést követően (86. B. ábra).



86. ábra. *A. chrysogenum* ATCC 46117 tenyészetek időprofiljai az egyesített tömegátviteli koefficiens (K_{La}) függvényében, 0,2 mM DL- α -tokoferol jelenlétében. A: növekedési ráta (●) és D-glükóz felvételi ráta (○).

B: Teljes, gátolatlan légzés (■) és a légzés cianid-rezisztens frakciója (□). C: Intracelluláris peroxid szintek (▲)

5. ÖSSZEFOGLALÁS - ÚJ EREDMÉNYEK (TÉZISEK)

A természetben csak elvétve fordulnak elő azonnal hasznosítható mono- és diszacharidok, így a mikroorganizmusok, köztük a tipikusan szaprofita illetve növénypatogén 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 illetve enzimes hidrolízis) váltják ki, azonnal felvehető szénvázát biztosítva a sejteknek. Kutatásaink során ezt a megközelítést adaptáltuk. Három olyan cukor – laktóz, D-glükóz, D-galaktóz – közvetlen asszimilációját (transzport, lebontás) 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 metabolit termeléstől. Másfelől, ugyanazon szacharid lebontására hasonló metabolikus stratégiák alakultak ki és konzerválódtak olyan, egymástól evolúciósan távol álló gombafajokban⁵² is, mint az *A. niger* és a *T. reesei*. A D-galaktóz lebontás Leloir-útvonala pedig minden vizsgált eukariótában, és számos prokariótában is változatlan módon fordul elő.

A dolgozat alapjául szolgáló kutatások során az alábbi új eredményeket értük el:

1) *A. nidulans*-ban azonosítottunk egy VI. kromoszómán elhelyezkedő génpárt; tagjai egy intracelluláris β -galaktozidázt (*bgaD*) és egy laktóz permeázt (*lacpA*) kódolnak. A *bgaD/lacpA* génklaszter ortológjait *in silico* további 15, filogenetikailag diverz *Ascomycetes* fajban is megtaláltuk, ami evolúciós konzervációra utal. A *bgaD/lacpA* génpár tagjai divergensen íródnak át, hasonlóan az *in silico* vizsgált *Ascomycetes*-ek túlnyomó többségéhez. A divergens génpárok közti távolság – az *A. nidulans* kivételével – 810 és 2034 bp közé esik. *A. nidulans* esetében a két gén közötti távolság 5,6 kb, amit egy konstitutívan kifejeződő, GH2 hidroláz gén tölt ki.

2) Bebizonyítottuk, hogy az *A. nidulans bgaD/lacpA* génpár tagjainak kifejeződése – a vizsgált körülmények között – hasonló mintázatot követ. A *bgaD* és a *lacpA* párhuzamosan indukálódott – a génextpressziók erősségének sorrendjében – D-galaktózon, laktózon és L-

⁵² Az *Aspergilli* és a *Sordariomycetes*-ek *Hypocreaceae* csoportja (ahová a *Trichoderma* tartoznak) kb. 400 M évvel ezelőtt vált szét (Taylor és Berbee 2006). Összehasonlításként, a halak kb. 380 M évvel ezelőtt jelentek meg a Földön.

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, azaz a génpár tagjai CreA-függő, konstitutív alap-expresszióval rendelkeznek.

A CreA a (D-galaktóz és a laktóz általi) indukcióval is kölcsönhat: laktóz/D-galaktóz illetve D-glükóz együttes jelenlétében, vad típusú törzsekben nem íródik át transzkriptum a *bgaD/lacpA* génpárról, karbon katabolit derepresszált törzsben viszont gyenge kifejeződések és alacsony β -galaktozidáz enzimaktivitás detektálható. A laktóz/D-galaktóz indukció hatása a *bgaD/lacpA* génpárra CreA-hiányos törzsben erőteljesebb volt, amit enzimaktivitási adatokkal is alátámasztottunk. Végezetül, a D-glükóz teljesen leállítja vad típusban a laktózfelvételt, de a gátlás elmarad a CreA-hiányos mutáns törzsekben. A D-glükóz hatása az *A. nidulans* laktóz anyagcseréjére tehát legalább 3 szinten jelentkezik, és ezek 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 β -galaktozidáz aktivitás képződése a 2) **tézispontban** megadott szénforrásokon – a D-xilóz kivételével – jól korrelál. D-xilózon *bgaD* expressziót nem, β -galaktozidáz aktivitást viszont tudtunk mérni, jelezve, a *bgaD* géntermék nem az egyetlen β -galaktozidáz aktivitású enzim *A. nidulans*-ban. Ezt támasztotta alá az is, hogy folyékony laktóz-minimál táptalajon a *bgaD*-hiányos illetve *bgaD*-túltermelő mutáns törzsek a vad típushoz hasonlóan nőttek. Noha a *bgaD* géntermék az egyetlen olyan enzim *A. nidulans*-ban, mely a laktóz-analóg mesterséges szubsztrátum X-gal-t hidrolizálni képes, a laktóz hasznosítás szempontjából mégis nélkülözhetőnek bizonyult. Az eredmény az X-gal alapú rendszerek korlátait is jelzi.

4) Bebizonyítottuk, hogy a klasszikus *A. nidulans lacA1* laktóz anyagcsere mutáció nem a *lacpA* génhez kötődik. A *lacpA* – génkiütés révén végrehajtott – funkcionális elemzése azonban rávilágított, hogy a *lacpA* géntermék egy élettanilag releváns 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 bizonyítottuk, hogy az *A. nidulans* laktóz lebontásakor a transzport a sebesség meghatározó lépés. Az eredményeket ^{14}C -el jelölt laktóz felvételi rátájának mérésével is megerősítettük.

5) A *lacpA* géntermék hiánya nem eredményezett teljes fenotípust laktózon, jelezve, az *A. nidulans* laktóz felvételi rendszere egynél több transzporterből áll. Ennek megfelelően azonosítottuk az AN2814 lókuszt által jelölt *LacpA*-paralóg MFS-fehérjét kódoló gént, melyet *lacpB*-nek neveztünk el. A *lacpB* hiánya szignifikánsan visszavetette a laktóz felvétel és a biomassza képződés mértékét a referencia törzsekhez képest, jelezve, a *lacpB* géntermék egy élettanilag releváns laktóz permeáz. A 4) **tézispontban** megfogalmazott állítást, miszerint *A. nidulans*-ban a laktóz anyagcsere sebesség meghatározó lépése a felvétel, a *lacpB* révén is bizonyítani tudtuk: kópiaszáma – hasonlóan a *lacpA*-hoz – arányos volt a laktózfelvételi és a biomassza produkciós potenciállal. Kimutattuk, hogy az *A. nidulans lacpA/lacpB* kettős hiánymutáns képtelen csírázni vagy nőni laktózon, és más szénforráson kinövesztett, laktózra átmosott micéliuma sem képes a laktóz felvételére és belőle új biomassza létrehozására. Ezzel bebizonyítottuk, hogy az *A. nidulans* laktóz felvétele kétkomponensű: a *LacpA* és a *LacpB* vesz benne részt. Az MFS-cukor-transzporterek száma *A. nidulans*-ban meghaladja a százat, vagyis a faj laktóz felvétele csak kissé 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/enzimeik mintegy véletlenül képesek a laktóz transzportjára illetve hidrolízisére, és eredeti funkciójuk más – növényi vagy fungális eredetű – cukor-polimerek degradációjával kapcsolatos. Megállapítottuk továbbá, hogy a *lacpB* egy élettanilag releváns cellobióz permeáz enzimet kódol, ami része az *A. nidulans* cellulolitikus rendszerének. A cellobióz fenotípus azonban csak részleges – a *lacpB* mutáns csírázik, nő és spórázik cellobiózon – vagyis a cellobióz transzportnak további, ismeretlen komponensei is vannak ebben a gombafajban.

7) A fungális laktóz anyagcsere modell-szervezetének számító *Kluyveromyces lactis* élesztőben a galaktokináz a Leloir-útvonal nélkülözhetetlen enzime, hiányában nem nő a D-galaktózt kizárólagos szénforrásként tartalmazó táptalajon. Ezzel ellentétben megállapítottuk, az *A. nidulans galE* (galaktokináz) mutánsok felveszik és hasznosítják a D-galaktózt, de csak

akkor, ha egyedüli nitrogénforrásként nem nitrát, hanem ammónium ionokat használunk. A jelenség vizsgálata során genetikai és biokémiai bizonyítékokat szereztünk egy oxido-reduktív (alternatív) D-galaktóz lebontási útvonal léteéről *A. nidulans*-ban, melynek során a D-galaktóz először galaktitollá (dulcitol) redukálódik, majd L-szorbozzá oxidálódik. Az útvonal nem tartalmaz specifikus enzimeket: a galaktitol oxidáció a fungális pentóz anyagcserében részt vevő L-arabinitol dehidrogenáz, az L-szorboz foszforilezése a hexokináz révén történik. Az útvonal egésze a gombák hemicellulóz pentóz (D-xilóz, L-arabinóz) lebontására emlékeztet.

8) Megállapítottuk, hogy az *A. nidulans bgaD/lacpA* katabolikus génpár 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* génpár 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 génpár indukciójához a D-galaktózon növekedés képessége sem szükséges, ahogy azt egy galaktokináz és hexokináz hiányos, D-galaktózon emiatt nem növvő kettős mutánsal végzett kísérletek bizonyították: a D-galaktózra történő transzfert követően a *bgaD* és a *lacpA* transzkriptumok jól detektálhatóan kialakultak a mutánsban. Megegyező eredményeket kaptunk D-galaktóz illetve glicerol (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.

9) A D-galaktóz lebontás oxido-reduktív útvonalának meglétét az *A. nidulans*-tól rendszertanilag távol álló, celluláz enzim termelése miatt ipari biotechnológiai jelentőségű *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.

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 galaktóz-1-foszfát mennyiségi meghatározása törésmutató alapján. A módszert az *A. nidulans*, az *A. niger* és a *T. reesei* esetében teszteltük. Ennek során bebizonyítottuk, hogy a korábbi irodalmi adatokkal

szemben 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, hogy az *A. niger* konidiospórák D-galaktóz negatív fenotípusa (vagyis 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, transzkriptum pedig mindegyikről, minden vizsgált szénforráson keletkezik. A kifejeződés L-arabinózon, D-xilózon és D-galaktózon a legerősebb. A Leloir-útvonal enzimeit kódoló gének minimálisan illetve nem fejeződnek ki konidiumokban, a micéliumban ellenben az expressziók erőteljesek. Megállapítottuk: a D-galaktóz lebontás Leloir-útvonalának működése *A. niger*-ben a vegetatív növekedési ciklus aktuális szakaszától függ. Mivel a konidiumok nem képesek D-galaktózt transzportálni, a Leloir-útvonal csökkent működése ennek – az inducer hiányának – lehet a következménye, vagyis vélhetően másodlagos jelenség.

12) Az *A. niger* extracelluláris illetve az *A. nidulans* intracelluláris laktóz anyagcsere annotált komponensei alapján öt β -galaktozidázt (*bgaA-E*) illetve két laktóz permeázt (*lacA-B*) azonosítottunk *in silico* a *P. chrysogenum* genomban, melyek szerepet játszhatnak a gomba laktóz asszimilációjában. Transzkripció analízisünk alapján a három extracelluláris hidrolázt kódoló génből kettő (*bgaB*, *bgaC*) nem fejeződött ki laktózon. Az extracelluláris *bgaA* illetve az intracelluláris *bgaD* és *bgaE* expressziós jellemzőit az alkalmazott laktóz koncentráció nem befolyásolta. A *bgaE* gyenge, konstitutív expressziót mutatott minden vizsgált körülmény között. A *lacA* kizárólag laktózon fejeződött ki, a *lacB* transzkriptum viszont egyetlen vizsgált szénforráson, így laktózon sem volt detektálható. Génkiütések nélküli (közvetett) bizonyítékot szereztünk tehát arra, hogy a *P. chrysogenum* kettős laktóz asszimilációs mechanizmussal rendelkezik: genomjában egy *A. niger lacA*-ortológ feltételezett extracelluláris β -galaktozidáz, továbbá egy *A. nidulans lacpB*-ortológ feltételezett laktóz permeáz és egy *A. nidulans bgaD*-ortológ feltételezett intracelluláris β -galaktozidáz gén is megtalálható. Egyik feltételezett β -galaktozidáz illetve laktóz permeáz gén sem indukálható D-galaktózzal, ami a vonatkozó szakirodalomban példa nélküli. **3) tézisponiban** leírtakhoz hasonlóan a D-xilóz *P. chrysogenum*-ban sem indukálta a feltételezett β -galaktozidáz géneket.

13) A *P. chrysogenum* laktóz anyagcseréjére irányuló kutatásainkhoz egy vad típusú kontrollt (NRRL 1951) és egy penicillin túltermelő ipari törzset (AS-P-78) használtunk. A megnövekedett kihozatal részben olyan mutációk következménye is, melyek befolyásolják a primer anyagcserét irányító általános szabályozási utakat. A tenyészetek kinetikai paraméterei

azonban azt bizonyították, hogy az NRRL 1951 törzshöz képest az AS-P-78 megnövekedett penicillin-termelő potenciálja nem jár együtt a laktóz asszimilációs ráta változásával. Ezek alapján a *P. chrysogenum* laktóz metabolizmusa – legalábbis a korai generációból származó AS-P 78 törzs esetén – 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 viszont a fenti két enzimet (feltételezhetően) kódoló gének konstitutív alapexpresszió nélküliek, de szelektíven indukálhatók D-galaktózzal és laktózzal. A jelenség a D-galaktóz anyagcsere eddig nem ismert szabályozási mechanizmusai felé mutat.

15) Módszert dolgoztunk ki a metabolikus aktivitás és a specifikus növekedési ráta kapcsolatának modellezésére. Az eljárás az Akridin narancs (AO) fluoreszcens festékkel való kezelésen 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. A festődés eredménye a mintavételt követően 15 perccel már látható, megörökíthető illetve elmenthető. A modellt a cephalosporin-C gyártás körülményeit szimuláló *A. chrysogenum* fermentációk során teszteltük, sikerrel.

16) Tudományos bizonyítékot szolgáltatunk a fermentációs ipar régi tapasztalatára, miszerint a karbon katabolit represszió kikerülhető, ha alacsony specifikus növekedési rátán tartjuk tenyészetünket – vagyis a specifikus növekedési ráta determinánsa a karbon katabolit repressziónak. Állításunkat az *A. nidulans* és a *T. reesei* bizonyítottan CreA ill. CRE1-függő karbon katabolit represszió alatt álló génjeinek vizsgálatával támasztottuk alá. Eredményeink rávilágítottak a kemosztát-típusú folytonos tenyészetek jelentőségére a specifikus növekedési rátával kölcsönható szabályozási mechanizmusok vizsgálata során. A fenti eredmények úgy is értelmezhetők, hogy CreA-függő karbon katabolit represszió esetén a „represszálo szénforrás” fogalom felülvizsgálatra szorul. A szénforrás(ok) által kialakított metabolikus fluxus (= az anyagcsere sebessége) szabályozza elsődlegesen a karbon katabolit repressziót, nem pedig a szubsztrátum(ok) anyagi (kémiai) minősége.

17) A *T. reesei* cellulázokat ipari léptékben jellemzően laktóz tartalmú szénforráson állítják elő, mivel a laktóz kiváló induktora a celluláz géneknek. A laktóz *T. reesei*-ben csak extracellulárisan hidrolizálódik; a reakcióért lényegében egyedül felelős β -galaktozidáz enzim – a *bga1* gén terméke – kifejezetten alacsony aktivitású. Mindezek miatt feltételezték, hogy a

laktózból csak lassan felszabaduló D-galaktóz, vagy pedig annak egy lebontási intermediere a cellulázok induktora.

Szénforrás-limitált kemosztát tenyészetek alkalmazásával bizonyítékot szolgáltatunk arra, hogy a fent leírt hipotézis csak részben igaz. A cellulázokat modellező cellobiohidroláz (*cbh2*) gén magas hígítási rátán valóban nem fejeződött ki, alacsony hígítási rátán pedig enyhe kifejeződést tapasztaltunk. Ugyanezen – ipari körülményeket modellező – alacsony hígítási azonban rátán a laktóz négyszer jobb induktornak bizonyult a D-galaktóznál, a génkifejeződés és a keletkezett celluláz enzimek mennyiségi meghatározása alapján egyaránt. Noha D-glükóz illetve (ekvimoláris D-galaktóz + D-glükóz) limitált kemosztát tenyészetek, továbbá karbon katabolit represszió által szabályozott vs. nem szabályozott celluláz gének kifejeződésének összehasonlító vizsgálatával be tudtuk bizonyítani, hogy a *cbh2* kifejeződés D-galaktózon specifikus indukciós hatás következménye, nyilvánvaló volt, hogy a laktóz illetve D-galaktóz általi celluláz indukció mértékében mutatkozó különbség magában a laktózban, és nem a két monomerjében keresendő.

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. Kimutattuk, hogy a mutarotáz hatása specifikus a laktózra: a természetes celluláz induktor cellulózon nem észlelhető.

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

20) Ipari körülményeket szimuláló fermentációk során megállapítottuk, hogy noha fed-batch és batch tenyészetekben úgy tűnhet, hogy az *A. chrysogenum* gomba morfológiája és a cephalosporin-C antibiotikum produktivitása összefüggésben áll egymással, ez csupán

azért van így, mert mindkét folyamat párhuzamosan ugyanazon fiziológiai változásokra reagál a szénforrás limitált elérhetőségének függvényében. Szénforrás ráadagolásakor ez a kapcsolat megszűnik. Hipotézisünket karbon-limitált kemosztát tenyészetek vizsgálata is alátámasztotta: a CPC produkcióját alig befolyásolta a specifikus növekedési ráta megváltoztatása, szemben a morfológiára kifejtett jelentős hatással (az alacsonyabb hígítási ráta alacsonyabb hifacsomó-arányokat, és kisebb méretű hifacsomókat is eredményezett). A CPC termelés és a növekedés tehát egymástól független folyamatok, hasonlóan a *P. chrysogenum* penicillin termeléséhez. Megállapítottuk továbbá, hogy 0,4 – 40 g/l közötti biomassa koncentráció értékeknél az *A. chrysogenum* CPC produkciója lineárisan változik a sejtkoncentrációval és a hozamkonstans értékekkel.

21) Ipari körülményeket szimuláló *A. terreus* fermentációk révén bebizonyítottuk, hogy az itakonsavat is lehet a citromsavéhoz hasonló magas hozam mellett termeltetni, ha két kritikus fermentációs paramétert: a (gyorsan hasznosuló, pl. D-glükóz) szénforrás és a Mn(II) ionok koncentrációját optimált értéken tartjuk. A szénforrás esetében ez az érték magas (> 10 %), a Mn(II) ionoknál extrém alacsony (< 5 µg/l). A maximális itakonsav kihozatali érték 95,3 g/l, ami 87 %-os specifikus moláris hozamot, vagyis rendkívül hatékony cukor-sav konverziót jelent. Megállapítottuk: technológiai szempontból nincs szükség (*A. niger* platformon történő) heterológ itakonsav termeltetésre, mivel az *A. terreus* törzsekkel is az elméleti maximumot megközelítő kihozatalt lehet elérni.

22) A szénforrás asszimiláció eredményeként keletkező ATP allosztérikusan gátolja a lebontó anyagcsere enzimeit. Metabolit túltermelés során, a stacioner fázisban ezért a szénváz lebontást és az ATP szintézist szét kell kapcsolni, amiért a cianid-rezisztens alternatív légzés a felelős. Az *A. chrysogenum* cianid-rezisztens alternatív légzésének aktivitása erősen függ a fermentlé oldott oxigén szintjétől (DO). Bebizonyítottuk, hogy a jelenség élettani hátterében olyan folyamatok állnak, melyek vagy közvetlenül vezetnek fokozott intracelluláris peroxid képződéshez, vagy a mitokondriális légzési lánc – intracelluláris peroxid képződéshez vezető – telítettségét (redukciós szintjét) emelik. Az alternatív légzés fokozódása csökkenti a légzési lánc redukáltságát és az oxigén szabadgyökök képződéshez vezető redukciójának lehetőségét. Ezen modell alapján tehát az alternatív légzés elsősorban védelmi funkciót tölt be, bár ettől függetlenül a (fungális) túltermelő folyamatokban szerepe esszenciális.

6. IRODALMI HIVATKOZÁSOK

- Adam AC, Rubio-Teixeira M, Polaina J (2004): Lactose: The milk sugar from a biotechnological perspective. *Crit Rev. Food Sci. Nutr.* **44**: 553-557.
- Aeschlimann A, von Stockar U (1990): The effect of yeast extract supplementation on the production of lactic acid from whey permeate by *Lactobacillus helveticus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**: 398-402.
- Aharonowitz Y, Cohen G, Martín JF (1992): Penicillin and cephalosporin biosynthetic genes: structure, organization, regulation and evolution. *Ann. Rev. Microbiol.* **46**: 461-495.
- Alam K, Kaminskyj SGW (2013): *Aspergillus* galactose metabolism is more complex than that of *Saccharomyces*: the story of GalDGAL7 and GalEGAL1. *Botany* **91**: 467-477.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.
- Andersen MR, Salazar MP, Schaap PJ, Van De Vondervoort PJI, Culley D, Thykaer J, Frisvad JC, Nielsen KF, Albang R, Albermann K, Berka RM, Braus GH, Braus-Stromeier SA, Corrochano LM, Dai Z, Van Dijck PWM, Hofmann G, Lasure LL, Magnuson JK, Menke H, Meijer M, Meijer SL, Nielsen JB, Nielsen ML, Van Ooyen AJJ, Pel HJ, Poulsen L, Samson RA, Stam H, Tsang A, Van Den Brink JM, Atkins A, Aerts A, Shapiro H, Pangilinan J, Salamov A, Lou Y, Lindquist E, Lucas S, Grimwood J, Grigoriev IV, Kubicek CP, Martinez D, Van Peij NNME, Roubos JA, Nielsen J, Baker SE (2011): Comparative genomics of citric-acid-producing *Aspergillus niger* ATCC 1015 versus enzyme-producing CBS 513.88. *Genome Res.* **21**: 885-897.
- Apelblat A, Manzurola E (1997): Solubilities of L-aspartic, DL-aspartic, DL-glutamic, p-hydroxybenzoic, o-anistic, p-anisic, and itaconic acids in water from T=278K to T=345K. *J. Chem. Thermodyn.* **29**: 1527-1533.
- Aro N, Ilmén M, Saloheimo A, Penttilä M (2003): ACEI of *Trichoderma reesei* is a repressor of cellulase and xylanase expression. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 56-65.
- Arst HN Jr, Tollervey D, Dowzer CE, Kelly JM (1990): An inversion truncating the *creA* gene of *Aspergillus nidulans* results in carbon catabolite derepression. *Mol. Microbiol.* **4**: 851-854.
- Arvas M, Pakula T, Smit B, Rautio J, Koivistoinen H, Jouhten P, Lindfors E, Wiebe M, Penttilä M, Saloheimo M (2011): Correlation of gene expression and protein production rate - a system wide study. *BMC Genomics* **12**: 616.
- Ashour SA, El-Shora HM, Metwally M, Habib SA (1996): Fungal fermentation of whey incorporated with certain supplements for the production of proteases. *Microbios* **86**: 59-69.
- Bahl OP, Agrawal KM (1969): Glycosidases of *Aspergillus niger*. I. Purification and characterization of alpha- and beta-galactosidases and beta-N-acetylglucosaminidase. *J. Biol. Chem.* **244**: 2970-2978.
- Bahl CP, Wu R, Stawinsky J, Narang SA (1977): Studies on the lactose operon. Minimal length of the lactose operator sequence for the specific recognition by the lactose repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 966-970.
- Barredo JL, Díez B, Alvarez E, Martín JF (1989): Large amplification of a 35 kb DNA fragment carrying two penicillin biosynthetic genes in high penicillin producing strains of *Penicillium chrysogenum*. *Curr. Genet.* **16**: 453-459.
- Barreiro C, Martín JF, García-Estrada C (2012): Proteomics shows new faces for the old penicillin producer *Penicillium chrysogenum*. *J. Biomed. Biotechnol.* Art. No. 105109.
- Billard P, Ménart S, Blaisonneau J, Bolotin-Fukuhara M, Fukuhara H, Wésolowski-Louvel M (1996): Glucose uptake in *Kluyveromyces lactis*: role of the HGT1 gene in glucose transport. *J. Bacteriol.* **178**: 5860-5866.
- Bajpai P, Gera RK, Bajpai PK (1992): Optimization studies for the production of α -amylase using cheese whey medium. *Enzyme Microb. Technol.* **14**: 679-683.
- Bartoletti F (1633): *Methodus in dyspnoeam, seu De respirationibus libri IV: cum synopsisibus. Quibus quintus ... accessit de curationibus ex dogmaticorum et hermeticorum poenu depromptis*. Kiadó: per heredes Evangelistae Dozzae (eredeti forrás: Genti Egyetem).
- Baruffini E, Goffrini P, Donnini C, Lodi T (2006): Galactose transport in *Kluyveromyces lactis*: Major role of the glucose permease Hgt1. *FEMS Yeast Res.* **6**: 1235-1242.
- Bates WK, Woodward DO (1964): *Neurospora* β -galactosidase: evidence for a second enzyme. *Science* **146**:

777-778.

- Bates WK, Hedman SC, Woodward DO (1967): Comparative inductive responses of two beta-galactosidases of *Neurospora*. *J. Bacteriol.* **93**: 1631-1637.
- Baup S (1837): Über eine neue pyrogen- citronensäure, und über benennung der pyrogen säure überhaupt. *Ann. Chim. Phys.* **19**: 29–38.
- Becerra M, Baroli B, Fadda AM, Blanco Méndez J, González Siso MI (2001): Lactose bioconversion by calcium-alginate immobilization of *Kluyveromyces lactis* cells. *Enzyme Microb. Technol.* **29**: 506-512.
- Bentley R (1962): Itaconic acid enzymes. *Methods Enzymol.* **5**: 593-596
- Berry GT (2014): *Classic Galactosemia and Clinical Variant Galactosemia*. In: *Gene Reviews* (Eds.: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Bird TD, Dolan CR, Fong CT, Smith RJH, Stephens K). University of Washington, Seattle, pp. 1993-2014. ISSN: 2372-0697.
- Bhargava A, Jelen P (1996): Lactose solubility and crystal growth as affected by mineral impurities. *J. Food Sci.* **61**: 180-184.
- Bhuyan BK, Johnson MJ (1957): The effect of medium constituents on penicillin production from natural materials. *Appl. Microbiol.* **5**: 262–267.
- Bischof R, Fourtis L, Limbeck A, Gamauf C, Seiboth B, Kubicek CP (2013): Comparative analysis of the *Trichoderma reesei* transcriptome during growth on the cellulase inducing substrates wheat straw and lactose. *Biotechnol. Biofuels* **6**: 127.
- Boze H, Moulin G, Galzy P (1987): Uptake of galactose and lactose by *Kluyveromyces lactis*: biochemical characteristics and attempted genetical analysis. *J. Gen. Microbiol.* **133**: 15-23.
- Bourgeois S, Riggs AD (1970): The *lac* repressor-operator interaction. IV. Assay and purification of operator DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **38**: 348-354.
- Bódalo A, Gómez E, Máximo MF, Gómez JL, Bastida J (1991a): Immobilization of β -Galactosidase by physical adsorption on Chromosorb-W. *Biotechn. Techn.* **5**: 393-394.
- Bódalo A, Gómez E, Gómez JL, Bastida J, Máximo MF, Díaz F (1991b): A comparison of different methods of β -galactosidase immobilization. *Proc. Biochem.* **26**: 349-353.
- Bos CJ, Debets AJM, Swart K, Huybers A, Kobus G, Slakhorst SM (1988): Genetic analysis and the construction of master strains for assignment of genes to six linkage groups in *Aspergillus niger*. *Curr. Genet.* **14**: 437–443.
- Bucior I, Burger MM (2004): Carbohydrate-carbohydrate interaction as a major force initiating cell-cell recognition. *Glycoconj J.* **21**: 111-123.
- Brakhage AA (1998): Molecular regulation of β -lactam biosynthesis in filamentous fungi. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 547–585.
- Brown NA, Ries LNA, Goldman GH (2014): How nutritional status signalling coordinates metabolism and lignocellulolytic enzyme secretion. *Fung. Genet. Biol.* **72**: 48-63.
- Burland V, Plunkett III G, Daniels DL, Blattner FR (1993): DNA sequence and analysis of 136 kilobases of the *Escherichia coli* genome: Organizational symmetry around the origin of replication. *Genomics* **16**: 551-561.
- Calam CT, Oxford AE, Raistrick H (1939): Studies in the biochemistry of microorganisms: itaconic acid, a metabolic product of a strain of *Aspergillus terreus*. *Thom. Biochem. J.* **33**: 1488–1495.
- 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.
- Caputto R, Leloir RL, Cardini CE, Paladini AC (1949): The enzymatic transformation of galactose into glucose derivatives. *J. Biol. Chem.* **179**: 497-498.
- Caputto R, Leloir RL, Cardini CE, Paladini AC (1950): Isolation of the coenzyme of the galactose phosphate-glucose phosphate transformation. *J. Biol. Chem.* **184**: 333-350.
- Cardini CE, Paladini AC, Caputto R, Leloir RL (1950): Liver uridine phosphorylase. *Acta Physiol. Lat. Am.* **1**: 57-63.
- Castillo FJ, De Sanchez SB (1978): Studies on the growth of *Kluyveromyces fragilis* in whey for the production of yeast protein. *Acta Científica Venezolana* **29**: 113-118.
- Cederlund A, Kai-Larsen Y, Printz G, Yoshio H, Alvelius G, Lagercrantz H, Strömberg R, Jörnvall H, Gudmundsson GH, Agerberth B (2013): Lactose in human breast milk an inducer of innate immunity with implications for a role in intestinal homeostasis. *PLoS ONE* **8**: Art. No. e53876.

- Cerqueira GC, Arnaud MB, Inglis DO, Skrzypek MS, Binkley G, Simison M, Miyasato SR, Binkley J, Orvis J, Shah P, Wymore F, Sherlock G, Wortman JR (2014): The *Aspergillus* Genome Database: multispecies curation and incorporation of RNA-Seq data to improve structural gene annotations. *Nucleic Acids Res.* **42** (Database issue): D705-710.
- Chang HN, Lee WG, Kim BS (1993): Cell retention culture with an internal filter module: continuous ethanol fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* **41**: 677-681.
- Chiang C, Knight SG (1959): D-Xylose metabolism by cell-free extracts of *Penicillium chrysogenum*. *Biochim. Biophys. Acta* **35**: 454-463.
- Chiang C, Sih CJ, Knight SG (1958): The conversion of D-xylose to xylitol by *Penicillium chrysogenum*. *Biochim. Biophys. Acta* **29**: 664-665.
- Chulkin AM, Vavilova EA, Benevolenskii SV (2011): Mutational analysis of carbon catabolite repression in filamentous fungus *Penicillium canescens*. *Mol. Biol.* **45**: 804-810.
- Christensen U, Gruben BS, Madrid S, Mulder H, Nikolaev I, de Vries RP (2011): Unique regulatory mechanism for D-galactose utilization in *Aspergillus nidulans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**: 7084-7087.
- Chuprina VP, Rullmann JA, Lamerichs RM, van Boom JH, Boelens R, Kaptein R (1993): Structure of the complex of *lac* repressor headpiece and an 11 base-pair half-operator determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy and restrained molecular dynamics. *J. Mol. Biol.* **234**: 446-462.
- Clark DS, Ito K, Horitsu H (1966): Effect of manganese and other heavy metals on submerged citric acid fermentation of molasses. *Biotechnol. Bioeng.* **8**: 465-471.
- Clutterbuck AJ (1981): An arabinose non-utilizing mutant *araA1*. *Aspergillus Newslett.* **15**: 21.
- Coghill RD, Moyer AJ (1947): Method for production of increased yields of penicillin. US Patent 2,423,873.
- Cronin CA, Gluba W, Scrable H (2001): The *lac* operator-repressor system is functional in the mouse. *Genes. Dev.* **15**: 1506-1517.
- Cubero B, Scazzocchio C (1994): Two different, adjacent and divergent zinc finger binding sites are necessary for CRE-mediated carbon catabolite repression in the proline gene cluster of *Aspergillus nidulans*. *EMBO J.* **13**: 407-415.
- Dahod SK (1999): Raw materials selection and medium development for industrial fermentation process. In: *Manual of industrial microbiology and biotechnology*, 2nd edn. (Eds. Demain AL, Davies JE). ASM, Washington DC, pp. 213-220.
- Davila-Vazquez G, Alatríste-Mondragón F, de León-Rodríguez A, Razo-Flores E (2008): Fermentative hydrogen production in batch experiments using lactose, cheese whey and glucose: Influence of initial substrate concentration and pH. *Int. J. Hydrogen Energy* **33**: 4989-4997.
- De León-Rodríguez A, Rivera-Pastrana D, Medina-Rivero E, Flores-Flores JL, Estrada-Baltazar A, Ordóñez-Acevedo LG, de la Rosa APB (2006): Production of penicillin acylase by a recombinant *Escherichia coli* using cheese whey as substrate and inducer. *Biomol. Eng.* **23**: 299-305.
- De Ley J, Doudoroff M (1957): The metabolism of D-galactose in *Pseudomonas saccharophila*. *J. Biol. Chem.* **227**: 745-757.
- Dean RT, Jessup W, Roberts CR (1984): Effects of exogenous amines on mammalian cells, with particular reference to membrane flow. *Biochem. J.* **217**: 27-40.
- Decleire M, van Huynh N, Motte JC, De Cat W (1985a): Hydrolysis of whey by whole cells of *Kluyveromyces bulgaricus* immobilized in calcium alginate gels and in hen egg white. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 438-441.
- Decleire M, van Huynh N, Motte JC (1985b): Hydrolysis of lactose solutions and wheys by whole cells of *Kluyveromyces bulgaricus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**: 103-107.
- De Vries RP, Flipphi MJA, Witteveen CFB, Visser J (1994): Characterization of an *Aspergillus nidulans* L-arabitol dehydrogenase mutant. *FEMS Microbiol. Letts.* **123**: 83-90.
- De Vries RP, van den Broek HC, Dekkers E, Manzanares P, de Graaff LH, Visser J (1999a): Differential expression of three α -galactosidase genes and a single β -galactosidase gene from *Aspergillus niger*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 2453-2460.
- De Vries RP, Visser J, de Graaff LH (1999b): CreA modulates the XlnR-induced expression on xylose of *Aspergillus niger* genes involved in xylan degradation. *Res. Microbiol.* **150**: 281-285.
- De Vries RP, Visser J (2001): *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**: 497-522.

- Demain AL (1990): Regulation and exploitation of enzyme biosynthesis. In: *Microbial Enzymes and Biotechnology* (Eds. Fogarty WM, Kelly CT). Elsevier Applied Science, London-New York, pp. 331-369.
- Díaz M, Pedregosa AM, de Lucas JR, Torralba S, Monistrol IF, Laborda F (1996): Purification and properties of β -galactosidase from *Aspergillus nidulans*. *Microbiología SEM* **12**: 585-592.
- Dickson RC, Riley MI (1989): The lactose-galactose regulon of *Kluyveromyces lactis*. *Biotechnol.* **13**:19-40.
- Dowzer CE, Kelly JM (1991): Analysis of the *creA* gene, a regulator of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 5701-5709.
- Dujon B, Sherman D, Fischer G, Durrens P, Casaregola S, Lafontaine I, De Montigny J, Marck C, Neuvéglise C, Talla E, Goffard N, Frangeul L, Algie M, Anthouard V, Babour A, Barbe V, Barnay S, Blanchin S, Beckerich JM, Beyne E, Bleykasten C, Boisramé A, Boyer J, Cattolico L, Confanioleri F, De Daruvar A, Despons L, Fabre E, Fairhead C, Ferry-Dumazet H, Groppi A, Hantraye F, Hennequin, C, Jauniaux, N, Joyot, P, Kachouri, R, Kerrest, A, Koszul, R, Lemaire M, Lesur I, Ma L, Muller H, Nicaud JM, Nikolski, Oztas S, Ozier-Kalogeropoulos O, Pellenz S, Potter S, Richard GF, Straub ML, Suleau A, Swennen D, Tekai F, Wésolowski-Louvel M, Westhof E, Wirth B, Zeniou-Meyer M, Zivanovic I, Bolotin-Fukuhara M, Thierry A, Bouchter C, Caudron B, Scarpelli C, Gaillardin C, Weissebach J, Wincker P, Souciet JL (2004): Genome evolution in yeasts. *Nature* **430**: 35-44.
- Durand H, Clanet M, Tiraby G (1988): Genetic improvement of *Trichoderma reesei* for large scale cellulase production. *Enzyme Microbiol. Technol.* **10**: 341-346.
- Dwevedi A, Kayastha AM (2009): Stabilization of β -galactosidase (from peas) by immobilization onto Amberlite MB-150 beads and its application in lactose hydrolysis. *J. Agr. Food Chem.* **57**: 682-688.
- El-Ganiny AM, Sanders DAR, Kaminskyj SGW (2008): *Aspergillus nidulans* UDP-galactopyranose mutase, encoded by *ugmA* plays key roles in colony growth, hyphal morphogenesis, and conidiation. *Fung. Genet. Biol.* **45**: 1533-1542.
- El-Ganiny AM, Sheoran I, Sanders DAR, Kaminskyj SGW (2010): *Aspergillus nidulans* UDP-glucose-4-epimerase *UgeA* has multiple roles in wall architecture, hyphal morphogenesis, and asexual development. *Fung. Genet. Biol.* **47**: 629-635.
- El-Gindy A (2003): Production, Partial Purification and Some Properties of β -Galactosidase from *Aspergillus carbonarius*. *Folia Microbiol.* **48**: 581-584.
- Elorza MV, Arst HN Jr. (1971): Sorbose resistant mutants of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* **111**: 185-193.
- Elshafei AM, Abdel-Fatah OM (2001): Evidence for a non-phosphorylated route of galactose breakdown in cell-free extracts of *Aspergillus niger*. *Enzyme Microb. Techn.* **29**: 76-83.
- Emri T, Pócsi I, Szentirmai A (1997): Glutathione metabolism and protection against oxidative stress caused by peroxides in *Penicillium chrysogenum*. *Free Rad. Biol. Med.* **23**: 125-131.
- Entner N, Doudoroff M (1952): Glucose and gluconic acid oxidation of *Pseudomonas saccharophila*. *J. Biol. Chem.* **196**: 853-862.
- Espeso EA, Peñalva MA (1994): *In vitro* binding of the two-finger repressor CreA to several consensus and non-consensus sites at the *ipnA* upstream region is context dependent. *FEBS Lett.* **342**: 43-48.
- Fantes PA, Roberts CF (1973): β -Galactosidase activity and lactose utilization in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* **77**: 471-486.
- Feijoo G, Moreira MT, Roca E, Lema JM (1999): Use of cheese whey as a substrate to produce manganese peroxidase by *Bjerkandera sp.* BOS55. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 86-90.
- Fischer E, Morrell RS (1894): Über die Configuration der Rhamnose und Galactose. *Berichte der Deutschen chemischen Gesellschaft zu Berlin* **27**: 382-394.
- Flippin M, Mathieu M, Cirpus I, Panozzo C, Felenbok B (2001): Regulation of the aldehyde dehydrogenase gene (*aldA*) and its role in the control of the coinducer level necessary for induction of the ethanol utilization pathway in *Aspergillus nidulans*. *J. Biol. Chem.* **276**: 6950-6958.
- Flippin M, Kocialkowska J, Felenbok B (2002): Characteristics of physiological inducers of the ethanol utilization (*alc*) pathway in *Aspergillus nidulans*. *Biochem. J.* **364**: 25-31.
- Flippin 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.* *Fung. Genet. Biol.* **46**: S19-S44.
- Foreman PK, Brown D, Dankmeyer L, Dean R, Diener S, Dunn-Coleman NS, Goedegebuur F, Houfek TD,

- England GJ, Kelley AS, Meerman HJ, Mitchell T, Mitchinson C, Olivares HA, Teunissen PJM, Yao J, Ward M (2003): Transcriptional regulation of biomass-degrading enzymes in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *J. Biol. Chem.* **278**: 31988-31997.
- Frey PA (1996): The Leloir pathway: a mechanistic imperative for three enzymes to change the stereochemical configuration of a single carbon in galactose. *FASEB J.* **10**: 461-470.
- Friedman AM, Fischmann TO, Steitz TA (1995): Crystal structure of *lac* repressor core tetramer and its implications for DNA looping. *Science* **268**: 1721-1727.
- Fukuhara H (2003): The Kluyver effect revisited. *FEMS Yeast Res.* **3**: 327-331.
- Gajewski W, Litwińska J, Paszewski A, Chojnacki T (1972): Isolation and characterization of lactose non-utilizing mutants in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* **116**: 99-106.
- Galazka JM, Tian C, Beeson WT, Martinez B, Glass NL, Cate JH (2010): Cellodextrin transport in yeast for improved biofuel production. *Science* **330**: 84-86.
- Gauba P (2015): Lactose intolerance - A review. *Curr. Nutr. Food Sci.* **11**: 209-212.
- Gänzle MG, Haase G, Jelen P (2008): Lactose: Crystallization, hydrolysis and value-added derivatives. *Int. Dairy J.* **18**: 685-694.
- Geisler N, Weber K (1977): Isolation of amino-terminal fragment of lactose repressor necessary for DNA binding. *Biochemistry* **16**: 938-943.
- Gilbert W, Muller-Hill B (1966): Isolation of the Lac repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **57**: 1891-1898.
- Gilbert W, Muller-Hill B (1967): The *lac* operator is DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **58**: 2415-2421.
- Gilbert W, Maxam A (1973): The nucleotide sequence of the *lac* operator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**: 3581-3584.
- Goppert F (1917): Galaktosurie nach Milchzuckergabe bei angeborenem, familiaerem chronischem Leberleiden. *Klin. Wschr.* **54**: 473-477.
- Gödecke A, Zachariae W, Arvanitidis A, Breunig KD (1991): Coregulation of the *Kluyveromyces lactis* lactose permease and β -galactosidase genes is achieved by interaction of multiple LAC9 binding sites in a 2.6 kbp divergent promoter. *Nucleic Acids Res.* **19**: 5351-5358.
- Gross KC, Pharr DM (1982): A potential pathway for galactose metabolism in *Cucumis sativus* L., a stachyose transporting species. *Plant Physiol.* **69**: 117-121.
- Gruber F, Visser J, Kubicek CP, de Graaff LH (1990): The development of a heterologous transformation system for the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei* based on a *pyrG*-negative mutant strain. *Curr. Genet.* **18**: 71-76.
- Haas H, Angermayr K, Zadra I, Stöffler G (1997): Overexpression of *nreB*, a new GATA factor-encoding gene of *Penicillium chrysogenum*, leads to repression of the nitrate assimilatory gene cluster. *J. Biol. Chem.* **272**: 22576-22582.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1984): Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* **219**: 1-14.
- Hasan N, Durr IF (1974): Induction of beta-galactosidase in *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* **120**: 66-73.
- Hasper AA, Visser J, de Graaff LH (2000): The *Aspergillus niger* transcriptional activator XlnR, which is involved in the degradation of the polysaccharides xylan and cellulose, also regulates D-xylose reductase gene expression. *Mol. Microbiol.* **36**: 193-200.
- Hofsten B (1956): Synthesis of β -galactosidase in *Ophiostoma multiannulatum* and some properties of the enzyme. *Nature* **177**: 844-845.
- Holden HM, Rayment I, Thoden JB (2003): Structure and function of enzymes of the Leloir pathway for galactose metabolism. *J. Biol. Chem.* **278**: 43885-43888.
- Houbraken J, Frisvad JC, Samson RA (2011): Fleming's penicillin producing strain is not *Penicillium chrysogenum* but *P. rubens*. *IMA Fungus* **2**: 87-95.
- Ike M, Isami K, Tanabe Y, Nogawa M, Ogasawara W, Okada H, Morikawa H (2006): Cloning and heterologous expression of the exo- β -D-glucosaminidase encoding gene (*gls93*) from a filamentous fungus, *Trichoderma reesei* PC-3-7. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **72**: 687-695.
- Isobe K, Takahashi N, Chiba S, Yamashita M, Koyama T (2013): Acidophilic fungus, *Teratosphaeria acidotherma* AIU BGA-1, produces multiple forms of intracellular β -galactosidase. *J. Biosci. Bioeng.* **116**: 171-174.
- Isselbacher KJ, Anderson EP, Kurahashi K, Kalckar HM (1956): Congenital galactosemia, a single enzymatic

- block in galactose metabolism. *Science* **13**: 635–636.
- Ivanova C, Bååth JA, Seiboth B, Kubicek CP (2013): Systems analysis of lactose metabolism in *Trichoderma reesei* identifies a lactose permease that is essential for cellulase induction. *PLoS ONE* **8**: art. no. e62631
- Jacob F, Monod J (1961): Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* **3**: 318-356.
- Jamieson DJ, Stephen DWS, Terriere EC (1996): Analysis of the adaptive oxidative stress response of *Candida albicans*. *FEMS Microbiol. Letts.* **138**: 83-88.
- Jones SA, Arst Jr. HN, MacDonald DW (1981): Gene roles in the *prn* cluster of *Aspergillus nidulans*. *Curr. Genet.* **3**: 49-56.
- Kalnins A, Otto K, Rütther U, Müller-Hill B (1983): Sequence of the *lacZ* gene of *Escherichia coli*. *EMBO J.* **2**: 593-597.
- Karaffa L, Sándor E, Kozma J, Szentirmai A (1996): Cephalosporin C production, morphology and alternative respiration of *Acremonium chrysogenum* in glucose-limited chemostat. *Biotechnol. Letts.* **18**: 701-706.
- Karaffa L, Sándor E, Kozma J, Szentirmai A (1997) Methionine enhances sugar consumption, fragmentation, vacuolation and cephalosporin C production in *Acremonium chrysogenum*. *Proc. Biochem.* **32**: 495–499.
- 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*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**: 633-638.
- Käfer E (1977): Meiotic and mitotic recombination in *Aspergillus* and its chromosomal aberrations. *Adv. Genet.* **19**: 33-131.
- Kooistra R, Hooykaas PJJ, Steensma HY (2004): Efficient gene targeting in *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* **21**: 781-792.
- Kozma J, Lucas L, Schügerl K (1991): Alternative respiration of *Acremonium chrysogenum*. *Biotechnol. Letts.* **13**: 899-900.
- Kozma J, Lucas L, Schügerl K (1993): Alternative respiration and antibiotic production of *Acremonium chrysogenum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**: 463-465.
- Kozma J, Karaffa L (1996a): Effect of oxygen on the respiratory system and cephalosporin C production in *Acremonium chrysogenum*. *J. Biotechnol.* **48**: 59-66.
- Kozma J, Karaffa L (1996b): Estimation of dissolved oxygen in shake-flask. *Hung. J. Ind. Chem.* **24**: 225-227.
- Krahe M, Antranikian G, Märkl H (1996): Fermentation of extremophilic microorganisms. *FEMS Microbiol. Rev.* **18**: 271–285.
- Kubicek CP, Zehentgruber O, El-Kalak H, Röhr M (1980): Regulation of citric acid production by oxygen: effect of dissolved oxygen tension on adenylate levels and respiration in *Aspergillus niger*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **9**: 101-115.
- Kubicek CP, Karaffa L (2006): Organic Acids. In: *Basic Biotechnology*, 3rd Edition (Ratledge C., Kristiansen B., eds.), 359-381. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- 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.
- Kumar V, Ramakrishnan S, Teeri TT, Knowles JKC, Hartley BS (1992): *Saccharomyces cerevisiae* cells secreting an *Aspergillus niger* β -galactosidase grow on whey permeate. *Bio/Technology* **10**: 82-85.
- Kumari S, Panesar PS, Panesar R (2011): Production of β -galactosidase using novel yeast isolate from whey. *Int. J. Dairy Sci.* **6**: 150-157.
- Lai K, Elsas LJ (2000): Overexpression of human UDP-glucose pyrophosphorylase rescues galactose-1-phosphate uridylyltransferase-deficient yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **271**: 392-400.
- Lai K, Boxer MB, Marabotti A (2014): GALK inhibitors for classic galactosemia. *Future Med. Chem.* **6**: 1003-1015.
- Lambers H (1980): The physiological significance of cyanide-resistant respiration in higher plants. *Plant Cell. Environ.* **3**: 293-302.
- Landman OE, Bonner DM (1952): *Neurospora* Lactase. I. Properties of lactase preparations from a lactose utilizing and a lactose non-utilizing strain. *Arch. Biochem. Biophys.* **41**: 253-265.
- Le Crom S, Schackwitz W, Pennacchio L, Magnuson JK, Culley DE, Collett JR, Martin J, Druzhinina IS, Mathis H, Monot F, Seiboth B, Cherry B, Rey M, Berka R, Kubicek CP, Baker SE, Margeot A (2009): Tracking the roots of cellulase hyperproduction by the fungus *Trichoderma reesei* using massively parallel DNA

- sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**: 16151-16156.
- Lederberg J, Tatum EL (1946): Gene recombination in *Escherichia coli*. *Nature* **158**: 558.
- Leiter É, Park HS, Kwon NJ, Han KH, Emri T, Oláh V, Mészáros I, Dienes B, Vincze J, Csernoch L, Yu JH, Pócsi I (2016): Characterization of the *aodA*, *dnmA*, *mnSOD* and *pimA* genes in *Aspergillus nidulans*. *Sci. Rep.* **6**: 20523.
- Leloir LF (1951): The enzymatic transformation of uridine diphosphate glucose into a galactose derivative. *Arch. Biochem. Biophys.* **33**: 186-190.
- Leloir LF (1964): Nucleoside diphosphate sugars and saccharide synthesis. *Biochem J.* **91**: 1-8.
- Lewis M, Chang G, Horton NC, Kercher MA, Pace HC, Schumacher MA, Brennan RG, Lu P (1996): Crystal structure of the lactose operon repressor and its complexes with DNA and inducer. *Science* **271**: 1247–1254.
- Lewis M (2011): A tale of two repressors. *J. Mol. Biol.* **409**: 14-27.
- Lewis M (2013): Allosterity and the *lac* operon. *J. Mol. Biol.* **425**: 2309-2316.
- Li A, Caspers M, Punt P (2013): A systems biology approach for the identification of target genes for the improvement of itaconic acid production in *Aspergillus* species. *BMC Res. Notes* **6**: 505.
- Lichtentaler FW (1998): Towards improving the utility of ketoses as organic raw materials. *Carbohydrate Res.* **313**: 69-89.
- Lodi T, Donnini C (2005): Lactose-induced cell death of beta-galactosidase mutants in *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Res.* **5**: 727 – 734.
- MacCabe AP, Miro P, Ventura L, Ramon D (2003): Glucose uptake in germinating *Aspergillus nidulans* conidia: involvement of the *creA* and *sorA* genes. *Microbiol-SGM* **149**: 2129-2136.
- Majumdar S, Ghatak J, Mukherji S, Bhattacharjee H, Bhaduri A (2004): UDP-galactose 4-epimerase from *Saccharomyces cerevisiae*: A bifunctional enzyme with aldose 1-epimerase activity. *Eur. J. Biochem.* **271**: 753–759.
- Marwaha SS, Kennedy JF (1988): Review: whey pollution problem and potential utilization. *Int. J. Food Sci. Technol.* **23**: 323–336.
- Mason HH, Turner ME (1935): Chronic galactemia, report of case with studies on carbohydrates. *Am. J. Dis. Child.* **50**: 359–374.
- Mathieu M, Felenbok B (1994): The *Aspergillus nidulans* CREA protein mediates glucose repression of the ethanol regulon at various levels through competition with the ALCR-specific transactivator. *EMBO J.* **13**: 4022-4027.
- Märkl H, Lechner M, Götz F (1990): A new dialysis fermentor for the production of high concentrations of extracellular enzymes. *J. Ferm. Bioeng.* **69**: 244–249.
- Meena V, Sumanjali A, Dwarka K, Subburathinam KM, Sambasiva Rao KRS (2010): Production of itaconic acid through submerged fermentation employing different species of *Aspergillus*. *Rasayan J. Chem.* **3**: 100-109.
- Mendez R, Blazquez R, Lorenzo F, Lema JM (1989): Anaerobic treatment of cheese whey: Start-up and operation. *Water Sci. Technol.* **21**: 1857-1860.
- Menon BB, Sarma NJ, Pasula S, Deminoff SJ, Willis KA, Barbara KE, Andrews B, Santangelo GM (2005): Reverse recruitment: the Nup84 nuclear pore subcomplex mediates *Rap1/Gcr1/Gcr2* transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**: 5749-5754.
- Millot C, Millot J-M, Morjani H, Desplaces A, Manfait M (1997): Characterization of acidic vesicles in multi-drug-resistant and sensitive cancer cells by Acridine Orange staining and confocal microspectrofluorometry. *J. Histochem. Cytochem.* **45**: 1255-1264.
- Minagawa N, Sakajo S, Komiyama T, Yoshimoto A (1990): A 36 kDa mitochondrial protein is responsible for cyanide-resistant respiration in *Hansenula anomala*. *FEBS Letts.* **264**: 149-152.
- Minakami H, Takahashi A, Suzuki S, Nakano M (1989): In: *Medical, Biochemical and Chemical Aspects of Free Radicals* (Eds: Hayaishi O, Niki E, Kondo M, Yoshikawa T), pp. 83-87. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands.
- Mojzita D, Koivistoinen OM, Maaheimo H, Penttilä M, Ruohonen L, Richard P (2012a): Identification of the galactitol dehydrogenase, LadB, that is part of the oxido-reductive D-galactose catabolic pathway in *Aspergillus niger*. *Fungal Genet. Biol.* **49**: 152-159.
- Mojzita D, Herold S, Metz B, Seiboth B, Richard P (2012b): L-xylo-3-hexulose reductase is the missing link in

- the oxidoreductive pathway for D-galactose catabolism in filamentous fungi. *J. Biol. Chem.* **287**: 26010–26018.
- Monod J, Changeux JP, Jacob F (1963): Allosteric proteins and cellular control systems. *J. Mol. Biol.* **6**: 306–329.
- Montenecourt BS, Eveleigh DE (1978): Preparation of mutants of *Trichoderma reesei* with enhanced cellulase production. *Appl. Environ. Microbiol.* **34**: 777–782.
- Moulin G, Boze H, Galzy P (1980): Inhibition of alcoholic fermentation by substrate and ethanol. *Biotechnol. Bioeng.* **22**: 2375–2381.
- Moyer AJ (1948): Method for production of penicillin. US Patent 2,442,141.
- Moyer AJ (1949): Method for production of penicillin. US Patent 2,476,107.
- Mustapha A, Jiang T, Savaiano DA (1997): Improvement of lactose digestion by humans following ingestion of unfermented acidophilus milk: influence of bile sensitivity, lactose transport, and acid tolerance of *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.* **80**: 1537–1545.
- Nagy Z, Kiss T, Szentirmai A, Biró S (2001a): β -Galactosidase of *Penicillium chrysogenum*: Production, purification, and characterization of the enzyme. *Protein Expr. Purif.* **21**: 24–29.
- Nagy Z, Keresztessy Z, Szentirmai A, Biró S (2001b): Carbon source regulation of β -galactosidase biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *J. Basic. Microbiol.* **41**: 351–362.
- Nash CH, Huber FM (1971): Antibiotic synthesis and morphological differentiation of *Cephalosporium acremonium*. *Appl. Microbiol.* **22**: 6–10.
- Natsume M, Marumo S (1984): Arthrospore-inducing substances from *Acremonium chrysogenum*, which stimulate Cephalosporin C production. *Agric. Biol. Chem.* **48**: 567–569.
- Nevalainen KMH (1981): Induction, isolation, and characterization of *Aspergillus niger* mutant strains producing elevated levels of β -galactosidase. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**: 593–596.
- Nikolaev IV, Vinetski YP (1998): L-arabinose induces synthesis of secreted β -galactosidase in the filamentous fungus *Penicillium canescens*. *Biochem. (Moscow)* **63**: 1294–1298.
- Nobelmann B, Lengeler JW (1996): Molecular analysis of the *gat* genes from *Escherichia coli* and of their roles in galactitol transport and metabolism. *J. Bacteriol.* **178**: 6790–6795.
- Nogawa M, Goto M, Okada H, Morikawa Y (2001): L-Sorbose induces cellulase gene transcription in the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei*. *Curr. Genet.* **38**: 329–334.
- Novick A, Szilárd L (1950a): Description of the chemostat. *Science* **112**: 715–716.
- Novick A, Szilárd L (1950b): Experiments with the Chemostat on spontaneous mutations of bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **36**: 708–719.
- O'Connell S, Walsh G (2008): Application relevant studies of fungal β -galactosidase with potential application in the alleviation of lactose intolerance. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **149**: 129–138.
- Oehler S, Eismann ER, Kramer H, Muller-Hill B (1990): The three operators of the *lac* operon cooperate in repression. *EMBO J.* **9**: 973–979.
- Okabe M, Lies D, Kanamasa S, Park EY (2009): Biotechnological production of itaconic acid and its biosynthesis in *Aspergillus terreus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **84**: 597–606.
- Ozcengiz G, Demain AL (2013): Recent advances in the biosynthesis of penicillins, cephalosporins and clavams and its regulation. *Biotechnol. Adv.* **31**: 287–311.
- Palma M, Goffeau A, Spencer-Martins I, Baret PV (2007): A phylogenetic analysis of the sugar porters in hemiascomycetous yeasts. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **12**: 241–248.
- Pan CH, McKillip E, Nash CH, Speth SV (1982): Methyl oleate-based fermentation medium for cephalosporin C production. *Dev. Ind. Microbiol.* **23**: 315–323.
- Panesar PS, Panesar R, Singh RS, Kennedy JF, Kumar H (2006): Microbial production, immobilization and applications of β -D-galactosidase. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **81**: 530–543.
- Panesar PS, Kennedy JF (2012): Biotechnological approaches for the value addition of whey. *Crit. Rev. Biotechnol.* **32**: 327–348.
- Pao SS, Paulsen IT, Saier Jr. MH (1998): Major facilitator superfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 1–34.
- Pasteur L (1856): Note sur le sucre de lait („Note on milk sugar”). *Comptes rendus* **42**: 347–351.
- Paszewski A, Chojnacki T, Litwińska J, Gajewski W (1970): Regulation of lactose utilization in *Aspergillus nidulans*. *Acta Biochim. Pol.* **17**: 385–391.
- Paul GC, Kent CA, Thomas CR (1994): Hyphal vacuolation and fragmentation in *Penicillium chrysogenum*.

- Biotechnol. Bioeng.* **44**: 655-660.
- Paul GC, Thomas CR (1998): Characterisation of mycelial morphology using image analysis. In: *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology* (ed. Scheper T), pp. 1-59. Springer-Verlag, Berlin.
- Paul BC, El-Ganiny AM, Abbas M, Kaminskyj SG, Dahms TE (2011): Quantifying the importance of galactofuranose in *Aspergillus nidulans* hyphal wall surface organization by atomic force microscopy. *Eukaryot Cell* **10**: 646-653.
- Pauly M, Keegstra K (2010): Plant cell wall polymers as precursors for biofuels. *Curr. Opin. Plant Biol.* **13**: 305-312.
- Pel HJ, de Winde JH, Archer DB, Dyer PS, Hofmann G, Schaap PJ, Turner G, de Vries RP, Albang R, Albermann K, Andersen MR, Bendtsen JD, Benen JA, van den Berg M, Breestraat S, Caddick MX, Contreras R, Cornell M, Coutinho PM, Danchin EG, Debets AJ, Dekker P, van Dijck PW, van Dijk A, Dijkhuizen L, Driessen AJ, d'Enfert C, Geysens S, Goosen C, Groot GS, de Groot PW, Guillemette T, Henrissat B, Herweijer M, van den Hombergh JP, van den Hondel CA, van der Heijden RT, van der Kaaij RM, Klis FM, Kools HJ, Kubicek CP, van Kuyk PA, Lauber J, Lu X, van der Maarel MJ, Meulenberg R, Menke H, Mortimer MA, Nielsen J, Oliver SG, Olsthoorn M, Pal K, van Peij NN, Ram AF, Rinas U, Roubos JA, Sagt CM, Schmoll M, Sun J, Ussery D, Varga J, Vervecken W, van de Vondervoort PJ, Wedler H, Wösten HA, Zeng AP, van Ooyen AJ, Visser J, Stam H (2007): Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nat. Biotechnol.* **25**: 221-231.
- Penttilä M, Limon C, Nevalainen H (2004) Molecular biology of *Trichoderma* and biotechnological applications. In: *Handbook of Fungal Biotechnology* (Ed. Arora DK) pp. 413-427. Marcel Dekker, New York, USA.
- Pettersson H, Pettersson G (2001): Kinetics of the coupled reaction catalysed by a fusion protein of beta-galactosidase and galactose dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta – Prot. Structure Mol. Enzymol.* **1549**: 155-160.
- Pirt SJ (1975): Principles of microbe and cell cultivation. Chapter 5: Chemostat culture. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Poch O, L'Hôte H, Dallery V, Debeaux F, Fleer R, Sodoyer R (1992): Sequence of the *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase: comparison with prokaryotic enzymes and secondary structure analysis. *Gene* **118**: 55-63.
- Puri RN, Bhatnagar D, Roskoski R Jr. (1988): Inactivation of yeast hexokinase by o-phthalaldehyde: evidence for the presence of a cysteine and a lysine at or near the active site. *Biochim. Biophys. Acta* **957**: 34-46.
- Ramakrishnan B, Shah PS, Qasba PK (2001): α -lactalbumin (LA) stimulates milk β -1,4 galactosyltransferase I (4Gal-T1) to transfer glucose from UDP-glucose to N-acetylglucosamine. *J. Biol. Chem.* **276**: 37665-37671.
- Reese ET (1976): History of the cellulase program at the U.S. Army Natick Development Center. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **6**: 9-20.
- Ries L, Belshaw NJ, Ilmén M, Penttilä ME, Alapuranen M, Archer DB (2014): The role of CRE1 in nucleosome positioning within the *cbh1* promoter and coding regions of *Trichoderma reesei*. **98**: 749-762.
- Rigamonte TA, Silveira WB, Fietto LG, Castro IM, Breunig KD, Passos FML (2011): Restricted sugar uptake by sugar-induced internalization of the yeast lactose/galactose permease Lac12. *FEMS Yeast Res.* **11**: 243-251.
- Riley MI, Sreekrishna K, Bhairi S, Dickson RC (1987): Isolation and characterization of mutants of *Kluyveromyces lactis* defective in lactose transport. *Mol. Gen. Genet.* **208**: 145-151.
- Roberts CF (1963): The genetic analysis of carbohydrate utilization in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* **31**: 45-58.
- Roberts CF (1970): Enzyme lesions in galactose non-utilizing mutants of *Aspergillus nidulans*. *Biochim. Biophys. Acta* **201**: 267-283.
- Rodicio R, Heinisch JJ (2013): Yeast on the milky way: Genetics, physiology and biotechnology of *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* **30**: 165-177.
- Roelfsema WA, Kuster BFM, Heslinga MC, Pluim H, Verhage M (2010): Lactose and Derivatives. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 7th (eds. John Wiley & Sons, New York, NY).
- Rost FWD, Shepherd VA, Ashford AE (1995): Estimation of vacuolar pH in actively growing hyphae of the fungus *Pissolithus tinctorius*. *Mycol. Res.* **95**: 549-533.
- Rothman JH, Yamashiro CT, Raymond CT, Kane PM, Stevens TH (1989): Acidification of the lysosome-like

- vacuole and vacuolar H⁺-ATPase are deficient in two yeast mutants that fail to short vacuolar proteins. *J. Cell. Biol.* **109**: 93–100.
- Röhr M, Zehentgruber O, Kubicek CP (1981): Kinetics of biomass formation and citric acid production by *Aspergillus niger* on a pilot plant scale. *Biotechnol. Bioeng.* **23**: 2433–2445.
- Rubio-Teixeira M (2006): Endless versatility in the biotechnological applications of *Kluyveromyces LAC* genes. *Biotechnol. Adv.* **24**: 212–225.
- Saddoud A, Hassaïri I, Sayadi S (2007): Anaerobic membrane reactor with phase separation for the treatment of cheese whey. *Biores. Techn.* **98**: 2012–2108.
- 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.
- Salmeron Jr. JM, Johnston SA (1986): Analysis of the *Kluyveromyces lactis* positive regulatory gene LAC9 reveals functional homology to, but sequence divergence from, the *Saccharomyces cerevisiae* GAL4 gene. *Nucleic Acids Res.* **14**: 7767–7781.
- Sánchez-Casas P, Klessig DF (1994): A salicylic acid-binding activity and a salicylic acid-inhibitable catalase activity are present in a variety of plant species. *Plant Physiol.* **106**: 1675–1679.
- Sándor E, Pusztahelyi T, Karaffa L, Karányi Zs, Pócsi I, Biró S, Szentirmai A, Pócsi I (1998): Allosamidin inhibits the fragmentation of *Acremonium chrysognum*, but does not influence the cephalosporin C production of fungus. *FEMS Microbiol. Lett.* **164**: 231–236.
- Sauer RT, Yocum RR, Doolittle RF, Lewis M, Pabo CO (1982): Homology among DNA-binding proteins suggests use of a conserved super-secondary structure. *Nature* **298**: 447–451.
- Scheele CW (1780a): Om Mjölck och dess syra („About milk and its acid”). Kongliga Vetenskaps Academiens Nya Handlingar (New Proceedings of the Royal Academy of Science) **1**: 116–124.
- Scheele CW (1780b): Om Mjölck-Säcker-Syra („On milk-sugar acid”), Kongliga Vetenskaps Academiens Nya Handlingar (New Proceedings of the Royal Academy of Science) **1**: 269–275.
- Schneider KH, Jakel G, Hoffmann R, Giffhorn F (1995): Enzyme evolution in *Rhodobacter sphaeroides*: Selection of a mutant expressing a new galactitol dehydrogenase and biochemical characterization of the enzyme. *Microbiol-SGM* **141**: 1865–1873.
- Seeman NC, Rosenberg JM, Rich A (1976): Sequence-specific recognition of double helical nucleic acids by proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**: 804–808.
- Seiboth B, Hofmann G, Kubicek CP (2002): Lactose metabolism and cellulase production in *Hypocrea jecorina*: the *gal7* gene, encoding galactose-1-phosphate uridylyltransferase, is essential for growth on galactose but not for cellulase induction. *Mol. Genet. Genom.* **267**: 124–32.
- Seiboth B, Hartl L, Pail M, Kubicek CP (2003): D-xylose metabolism by *Hypocrea jecorina*: loss of the xylitol dehydrogenase step can be partially compensated by *lad1*-encoded L-arabinitol-4-dehydrogenase. *Euk. Cell* **2**: 867–875.
- 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.
- Seiboth B, Pakdaman BS, Hartl L, Kubicek CP (2007a): Lactose metabolism in filamentous fungi: how to deal with an unknown substrate. *Fung. Biol. Rev.* **21**: 42–48.
- Seiboth B, Gamauf C, Pail M, Hartl L, Kubicek CP (2007b): The D-xylose reductase of *Hypocrea jecorina* is the major aldose reductase in pentose and D-galactose catabolism and necessary for beta-galactosidase and cellulase induction by lactose. *Mol. Microbiol.* **66**: 890–900.
- Shaper NL, Charron M, Lo NW, Shaper JH (1998): β -1,4-galactosyltransferase and lactose biosynthesis: recruitment of a housekeeping gene from the nonmammalian vertebrate gene pool for a mammary gland specific function. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **3**: 315–324.
- Sheetz RM, Dickson RC (1981): LAC4 is the structural gene for β -galactosidase in *Kluyveromyces lactis*. *Genetics* **98**: 729–745.
- Shennan DB, Peaker M (2000): Transport of milk constituents by the mammary gland. *Physiol. Rev.* **80**: 925–951.
- Shi NQ, Prahl K, Hendrick J, Cruz J, Lu P, Cho JY, Jones S, Jeffries T (2000): Characterization and complementation of a *Pichia stipitis* mutant unable to grow on D-xylose or L-arabinose. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **84**: 201–216.

- Shiels A, Hejtmancik JF (2013): Genetics of human cataract. *Clin. Genet.* **84**: 120–127.
- Shroff RA, O'Connor SM, Hynes MJ, Lockington RA, Kelly JM (1997): Null alleles of *creA*, the regulator of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Fung. Genet. Biol.* **22**: 28-38.
- Shu P, Johnson MJ (1948): The interdependence of medium constituents in citric acid production by submerged fermentation. *J. Bacteriol.* **56**: 577–85.
- Shuster CW, Doudoroff M (1967): Purification of 2-keto-3-deoxy-6-phosphohexonate aldolases of *Pseudomonas saccharophila*. *Arch. Mikrobiol.* **59**: 279-286.
- Silva MF, Fornari RCG, Mazutti MA, de Oliveira D, Padilha FF, Cichoski AJ, Cansian RL, Di Luccio M, Treichel H (2009): Production and characterization of xanthan gum by *Xanthomonas campestris* using cheese whey as sole carbon source. *J. Food Eng.* **90**: 119 – 123.
- Singh A, Schügerl K (1992): Induction and regulation of D-xylose catabolizing enzymes in *Fusarium oxysporum*. *Biochem. Int.* **28**: 481-488.
- Singh A, Taylor LE, Vander Wall TA, Linger J, Himmel ME, Podkaminer K, Adney WS, Decker SR (2015): Heterologous protein expression in *Hypocrea jecorina*: A historical perspective and new developments. *Biotechnol Adv.* **33**: 142-154.
- Solomos T (1977): Cyanide-resistant respiration in higher plants. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* **28**: 279-297.
- Steiger MG, Blumhoff ML, Mattanovich D, Sauer M (2013): Biochemistry of microbial itaconic acid production. *Front. Microbiol.* **4**: Art. No. 23.
- Sternberg D, Mandels GR (1980): Regulation of the cellulolytic system in *Trichoderma reesei* by sophorose: induction of cellulase and repression of beta-glucosidase. *J. Bacteriol.* **144**: 1197-1199.
- Stewart PR, Rogers PJ (1983): Fungal Dimorphism. In: *Fungal Differentiation* (Ed.: Smith JE) pp. 267-313. Marcel Dekker Inc., New York és Basel,.
- Stokes HW, Betts PW, Hall BG (1985): Sequence of the *ebgA* gene of *Escherichia coli*: comparison with the *lacZ* gene. *Mol. Biol. Evol.* **2**: 469-477.
- Strauss J, Mach RL, Zeilinger S, Hartler G, Stöffler G, Wolschek M, Kubicek CP (1995): *Crel*, the carbon catabolite repressor protein from *Trichoderma reesei*. *FEBS Lett.* **376**: 103-107.
- Strauss J, Horvath HK, Abdallah BM, Kindermann J, Mach RL, Kubicek CP (1999): The function of CreA, the carbon catabolite repressor of *Aspergillus nidulans*, is regulated at the transcriptional and post-transcriptional level. *Mol. Microbiol.* **32**: 169-178.
- Szentirmai A (1964): Production of penicillin acylase. *Appl. Microbiol.* **12**: 185-187.
- Takada G, Kawaguchi T, Kaga T, Sumitani JI, Arai M (1999): Cloning and sequencing of β -mannosidase gene from *Aspergillus aculeatus* No. F-50. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63**: 206-209.
- Takashima S, Iikura H, Nakamura A, Masaki H, Uozumi T (1996): Analysis of *Cre1* binding sites in the *Trichoderma reesei cbh1* upstream region. *FEMS Microbiol. Letts.* **145**: 361-366.
- Taylor JW, Berbee ML (2006): Dating divergences in the Fungal Tree of Life: review and new analyses. *Mycologia* **98**: 838–849.
- Timson DJ, Reece RJ (2003): Identification and characterisation of human aldose 1-epimerase. *FEBS Lett.* **543**: 21-24.
- Toba T, Nagashima S, Adachi S (1991): Is lactose really present in plants? *J. Sci. Food Agric.* **54**: 305–308.
- Trucco RE, Caputto R, Leloir LF, Mittelman N (1948): Galactokinase. *Arch. Biochem.* **18**: 137-46.
- van den Berg MA, Albang R, Albermann K, Badger JH, Daran JM, Driessen AJ, Garcia-Estrada C, Fedorova ND, Harris DM, Heijne WHM, Joarder V, Kiel JAKW, Kovalchuk A, Martín JF, Nierman WC, Nijland JG, Pronk JT, Roubos JA, van der Klei IJ, van Peij NNME, Veenhuis M, von Döhren H, Wagner C, Wortman J, Bovenberg RAL (2008): Genome sequencing and analysis of the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum*. *Nat. Biotechnol.* **26**: 1161–1168.
- van den Berg MA (2011): Impact of the *Penicillium chrysogenum* genome on industrial production of metabolites. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **92**: 45-53.
- Venema K (2012): Intestinal fermentation of lactose and prebiotic lactose derivatives, including human milk oligosaccharides. *Int. Dairy J.* **22**: 123-140.
- Vesa TH, Marteau P, Korpela R (2000): Lactose intolerance. *J. Am. Col. Nutr.* **19**: 165S-175S.
- Vogel HA (1812): Sur le sucre liquide d'amidon, et sur la transmutation des matières douces en sucre fermentescible („On the liquid sugar of starch, and on the transformation of sweet materials into fermentable sugars”). *Annales de chemie et de physique*, series 1, **82**: 148-164.

- Vogel HA (1812): Ueber die Verwandlung der Stärke und anderer Körper in Zucker („On the conversion of starches and other substances into sugar“). *Annalen der Physik*, new series, **42**: 123-134.
- Voll A, Klement T, Gerhards G, Büchs J, Marquardt W (2012): Metabolic modelling of itaconic acid fermentation with *Ustilago maydis*. *Chem. Eng. Trans.* **27**: 367–72.
- Wagner AM (1995): A role for active oxygen species as second messengers in the induction of alternative oxidase gene expression in *Petunia hybrida* cells. *FEBS Letts.* **368**: 339-342.
- Wang Y, Pierce M, Schnepfer L, Güldal CG, Zhang X, Tavazoie S, Broach JR (2004): Ras and Gpa2 mediate one branch of a redundant glucose signaling pathway in yeast. *PLoS Biology* **2**: e128.
- Weber SS, Bovenberg RA, Driessen AJ (2012): Biosynthetic concepts for the production of beta-lactam antibiotics in *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol. J.* **7**: 225-236.
- Webster TD, Dickson RC (1988): The organization and transcription of the galactose gene cluster of *Kluyveromyces lactis*. *Nucleic Acids Res.* **16**: 8011–8028.
- Weibel KE, Mor JR, Fiechter A (1974): Rapid sampling of yeast cells and automated assays of adenylate, citrate, pyruvate and glucose-6-phosphate pools. *Anal Biochem.* **58**: 208-216.
- Wenzl P, Wong L, Kwang-won K, Jefferson RA (2005): A functional screen identifies lateral transfer of β -glucuronidase (*gus*) from bacteria to fungi. *Mol. Biol. Evol.* **22**: 308-316.
- Witteveen CFB, Busink R, van der Vondervoort P, Dijkema C, Swart K, Visser J (1989): L-arabinose and D-xylose catabolism in *Aspergillus niger*. *J. Gen. Microbiol.* **135**: 2163-2171.
- 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.
- Wray LV Jr, Witte MM, Dickson RC, Riley MI (1987): Characterization of a positive regulatory gene, LAC9, that controls induction of the lactose-galactose regulon of *Kluyveromyces lactis*: structural and functional relationships to GAL4 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 1111-1121.
- Yan JQ, Lo KV, Liao PH (1989): Anaerobic digestion of cheese whey using up-flow anaerobic sludge blanket reactor. *Biol. Wastes* **27**: 289-305.
- Yang P, Zhang R, McGarvey JA, Benemann JR (2007): Biohydrogen production from cheese processing wastewater by anaerobic fermentation using mixed microbial communities. *Int. J. Hydrogen Energy* **32**: 4761-4771.
- Yebra MJ, Perez-Martinez G (2002): Cross-talk between the L-sorbose and D-sorbitol (D-glucitol) metabolic pathways in *Lactobacillus casei*. *Microbiol.-SGM* **148**: 2351-2359.
- Zaman S, Lippman SI, Zhao X, Broach JR (2008): How *Saccharomyces* responds to nutrients. *Ann. Rev. Genet.* **42**: 27-81.
- Zehentgruber O, Kubicek CP, Röhr M (1980): Alternative respiration of *Aspergillus niger*. *FEMS Microbiol. Lett.* **8**: 71-74.
- Zeilinger S, Schmoll M, Pail M, Mach RL, Kubicek CP (2003): Nucleosome transactions on the *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) cellulase promoter *cbh2* associated with cellulase induction. *Mol. Genet. Genomics* **270**: 46-55.
- Zhao FQ (2014): Biology of glucose transport in the mammary gland. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **19**: 3-17.

7. FÜGGELÉK

A dolgozat alapjául szolgáló kutatások során munkatársaimmal nagyszámú mikrobiológiai, fermentációs, enzimológiai, biokémiai, optikai mikroszkópos, bioinformatikai és statisztikai, molekuláris biológiai, analitikai és preparatív kémiai, illetve szerkezetmeghatározási módszert alkalmaztunk. Részletes kifejtésük aránytalanul megnövelné a terjedelmet, de fölösleges is lenne, hiszen a vonatkozó közleményekben ezek hiánytalanul megtalálhatók és elolvashatók. A 7.1. fejezetben (**Anyagok és Módszerek**) az alkalmazott gombatörzsek felsorolása mellett két olyan protokollt mutatok be, melyeken jelentősnek mondható fejlesztéseket, optimalásokat végeztünk, bár új tudományos eredménynek nem tekintjük őket. A 7.2. fejezet (**Mellékletek**) azon ábrákat tartalmazza, melyeket méretük miatt nem mutattam be a 4. fejezetben (**Kísérleti eredmények és megvitatásuk**), de az ott leírtak megértését megkönnyítik, elősegítik.

7.1. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

7.1.1. A dolgozatban szereplő gombatörzsek felsorolása és jellemzése

Aspergillus nidulans

Törzs	Genotípus	Releváns tulajdonság	Hivatkozás
R21	<i>pabaA1; yA2 ; veA1</i>	<i>p</i> -amino-benzoésav auxotrófia, sárga konídium. Laktóz anyagcserére nézve vad típus	FANTES és ROBERTS 1973
creAΔ4	<i>yA2; pabaA1; creAΔ4 argB1; veA1</i>	CreA nullmutáns (szén katabolit derepresszált)	SHROFF és mtsai 1997
creA ^d 30	<i>biA1; creAd30; veA1</i>	CreA mutáns (szén katabolit derepresszált)	ARST és mtsai 1990
FGSC A58 (= G0103)	<i>yA2; pyroA4; lacA1; veA1</i>	Laktózt nem hasznosító klasszikus mutáns	ROBERTS 1963
FGSC A1149 (= TN02A3)	<i>pyrG89; pyroA4; nkuA::argB; veA1</i>	A nem-homológ DNS végek összekapcsolásának defektusa	NAYAK és mtsai 2006
EFLK_155/9	<i>pyrG89; pyroA4 ΔnkuA::argB; ΔbgaD::Tr.pyr4; veA1</i>	<i>bgaD</i> (β-galaktozidáz) hiánymutáns	FEKETE és mtsai 2012
EFLK_161/9	<i>pyrG89; pyroA4 ΔnkuA::argB; ΔlacpA::Tr.pyr4; veA1</i>	<i>lacpA</i> (laktóz permeáz) hiánymutáns	FEKETE és mtsai 2012
EFLK_180/9	<i>pyrG89; ΔbgaD::Tr.pyr4; riboB2; Af.riboB; bgaD³⁺; veA1</i>	<i>bgaD</i> (β-galaktozidáz) túltermelő retranszformáns (3 kópia)	FEKETE és mtsai 2012
EFLK_190/9	<i>pyrG89; ΔlacpA::Tr.pyr4; riboB2; Af.riboB; lacpA³⁺; veA1</i>	<i>lacpA</i> (laktóz permeáz) túltermelő retranszformáns (3 kópia)	FEKETE és mtsai 2012
AOEF007	<i>pyroA4; pyrG89; ΔnkuA::argB; veA1; ΔlacpB::Af.pyroA</i>	<i>lacpB</i> (laktóz permeáz) hiánymutáns	FEKETE és mtsai 2016

AOEF008	<i>pyroA4; pyrG89; ΔnkuA::argB; ΔlacpA::Tr.pyr4 ΔlacpB::Af.pyroA</i>	<i>lacpA/lacpB</i> kettős laktóz permeáz hiánymutáns	FEKETE és mtsai 2016
AOEF011.1	<i>pyroA4; ΔlacpB:: Af.pyroA; veA1; riboB2; Af.riboB; wA3; lacpB¹⁺</i>	<i>lacpB</i> (laktóz permeáz) retranszformáns (1 kópia)	FEKETE és mtsai 2016
AOEF011.9	<i>pyroA4; ΔlacpB:: Af.pyroA; veA1; riboB2; Af.riboB; wA3; lacpB²⁺</i>	<i>lacpB</i> (laktóz permeáz) retranszformáns (2 kópia)	FEKETE és mtsai 2016
AOEF011.7	<i>pyroA4; ΔlacpB:: Af.pyroA; veA1; riboB2; Af.riboB; wA3; lacpB⁵⁺</i>	<i>lacpB</i> (laktóz permeáz) túltermelő retranszformáns (5 kópia)	FEKETE és mtsai 2016
A214	<i>biA1; wA3; galE9</i>	klasszikus galaktokináz mutáns	ROBERTS 1963
G094	<i>biA1, wA3; araA1</i>	klasszikus L-arabinitol dehidrogenáz mutáns	CLUTTERBUCK 1981
G092	<i>yA2; frA1 pyroA4</i>	klasszikus hexokináz mutáns	ROBERTS 1963
EFES3	<i>yA2; frA1 pyroA4; galE9</i>	hexokináz/galaktokináz kettős mutáns	FEKETE és mtsai 2004
EFES4	<i>biA1; wA3; araA1; galE9</i>	L-arabinitol dehidrogenáz/galaktokináz kettős mutáns	FEKETE és mtsai 2004

Trichoderma reesei

Törzs	Genotípus ⁵³	Releváns tulajdonság	Hivatkozás
QM9414 (ATCC 26921)	-	szülői törzs, korai celluláz túltermelő	MONTENECOURT ÉS EVELEIGH 1978
<i>Δgal1</i>	<i>Δgal1:: An.amdS</i> (QM9414 szülői háttérben)	galaktokináz aktivitás hiányos	SEIBOTH és mtsai 2004
<i>Δgal7</i>	<i>Δgal7:: An.amdS</i> (QM9414 szülői háttérben)	D-gal-1-P UT aktivitás hiányos	SEIBOTH és mtsai 2002
<i>Δbga1</i>	<i>Δbga1:: An.amdS</i> (QM9414 szülői háttérben)	β-galaktozidáz aktivitás hiányos	SEIBOTH és mtsai 2005
<i>Δxyl1</i>	<i>Δxyl1:: An.amdS</i> (QM9414 szülői háttérben)	D-xilóz (aldóz) reduktáz aktivitás hiányos	SEIBOTH és mtsai 2007b
<i>Δgal1/Δxyl1</i>	<i>Δgal1:: An.amdS</i>	D-xilóz reduktáz/galaktokináz aktivitás hiányos	SEIBOTH és mtsai 2007b
<i>Δlad1</i>	<i>Δlad1:: An.amdS</i> (QM9414 szülői háttérben)	L-arabinitol dehidrogenáz aktivitás hiányos	SEIBOTH és mtsai 2003
TU-6	<i>ΔpyrG</i>	uridin auxotróf	GRUBER és mtsai 1990
RUT C30 (ATCC 56765)	-	karbon katabolit derepresszált celluláz hiper-túltermelő	LE CROM és mtsai 2009
NG14 (ATCC 56767)	-	celluláz túltermelő	LE CROM és mtsai 2009

⁵³ Az ipari *T. reesei* törzsek kivétel nélkül az 1944-ben izolált QM6 jelű törzs leszármazottjai (REESE 1976); a beszerezhető legjobb termelő törzs, a RUT C30 az NG14 leszármazottja. A két genom között 223 db bázis-eltérést, 15 db kisebb inzerciót/deléciót, valamint 18 db nagyobb deléciót találtak! (LE CROM és mtsai 2009).

Aspergillus niger

Törzs	Genotípus ⁵⁴	Releváns tulajdonság	Hivatkozás
N402 (FGSC A733)	<i>cspA1</i>	rövid konidiofórok; referencia törzs	BOS és mtsai 1988

Aspergillus terreus

Törzs	Genotípus	Releváns tulajdonság	Hivatkozás
NRRL 1960 (CBS 116.46; ATCC 10020)	-	Itakonsav túltermelő	BENTLEY 1962

Acremonium chrysogenum⁵⁵

Törzs	Genotípus	Releváns tulajdonság	Hivatkozás
ATCC 46117 (W 53.25.53 Ciba-Giegy ⁵⁶)	-	Cephalosporin-C túltermelő	NATSUME és MARUMO 1984

7.1.2. A kemosztát teória összefoglalása és technikai megvalósítása

Kemosztát típusú folytonos fermentáció során a tenyészethez meghatározott rátával friss tápközeget adagolunk, miközben a beadagolás mértékével megegyező ütemben fermentlevet távolítunk el. Steady-state jön létre: a keletkező és eltávozó biomassa mennyisége egyforma. A beadagolás mértékének (F ; térfogat/idő) és a fermentlé térfogatának (V) hányadosát hígítási rátának nevezzük, és D -vel ('dilution') jelöljük. Mértékegysége 1/idő.

$$D = F / V \quad [3]$$

A sejtkoncentráció időbeli változása a növekedés és a kivétel különbsége, vagyis:

$$dx/dt = \mu x - Dx \quad [4]$$

Steady-state esetén a sejtkoncentráció állandó ($dx/dt = 0$), ezért

$$\mu x = Dx \quad [5]$$

$$\mu = D \quad [6]$$

⁵⁴ Első körben két *A. niger* törzs: a CBS 513.88 (ipari enzim termelő) és az ATCC 1015 (a citromsav termelő ATCC 11414 szülői törzse) genomját szekvenálták meg. Az akadémiai szektorban azonban a CBS 120.49 és leszármazottai voltak a legelterjedtebb *A. niger* törzsek. A CBS 120.49-et N400-nak nevezték át, s belőle származtatták – UV-mutagenézist követően – az N402 (*cspA1*) izolátumot (BOS és mtsai 1988). Az N402-nek több, mint 300 genetikailag definiált leszármazottját tartja fenn a Fungal Genetics Stock Center (www.fgsc.net), és így a legelterjedtebb *A. niger* referencia törzsnek számít.

⁵⁵ Az eredetileg *Cephalosporium acremonium* nevű, Giuseppe Brotzu (1895 – 1976) által 1948-ban szennyvízből izolált gombafajt 1982-ben nevezték át – a *Penicillium chrysogenum* mintájára, a cephalosporinok gazdasági jelentőségére utalva – *Acremonium chrysogenum*-nak (χρυσοςγεννω = aranypénzt szülő).

⁵⁶ A Ciba-Giegy és a Sandoz Laboratories svájci gyógyszercégek 1996-ban, Novartis néven egyesültek.

Folyamatos tenyészetben tehát a specifikus növekedési rátát a hígítási ráta határozza meg, feltéve, hogy $D < \mu_{\max}$. Ha ez a peremfeltétel nem teljesül, a sejtek növekedése nem tud lépést tartani a hígítással, és a sejtkoncentráció fokozatosan a nulla felé fog tartani. A sejtek valós növekedési ráta-tartományán belül azonban a rendszer önszabályozó: a biomassza koncentráció steady-state érték fölé emelkedése a limitáló szubsztrátum koncentrációjának csökkenését eredményezi (több sejt – állandó hozamkonstans mellett – többet fogyaszt), ami negatívan visszacsatol a biomassza koncentrációra. Ez pedig a szubsztrát koncentrációjának emelkedéséhez és a steady-state érték visszaállásához vezet.

Egy működő kemosztát paraméterei jellemzően eltérnek az elméleti értékektől, aminek legfőbb oka a mikrobák kitapadása a fermentor szilárd belső felületeire („fali növekedés”). A probléma fonalas gombák tenyésztése esetén kerül előtérbe, így a mi kutatásainkat is érintette. Elhárítására az alábbi technikai fogásokat alkalmaztuk:

1) A fermentlé térfogatát úgy állítottuk be, hogy a keverőlapátok a lehető legkevésbé verjék fel a fermentlevet a belső falra. Ehhez a hagyományos, 1/3 : 2/3 (gáztér : folyadéktér) arányt eltoltuk a folyadéktér irányába. Az oxigén transzfer ráta mértéke csökkent, de minimál táptalajon, alacsony sejtkoncentráció mellett oxigén limitáció nem lépett fel.

2) Az üvegfelületeket heptánban oldott, szilikonos anti-adhéziós oldattal (Sigmacote®) kezeltük, ami kovalensen kötődő vékony filmet képzett rajtuk, meggátolva a fali növekedést. A kezelést minden egyes sterilizálás előtt elvégeztük.

3) A kimenő ág szilikoncsöveibe 'Y' alakú elágazást építettünk, s ezen keresztül steril sóoldattal öblítettük át a szilikon- illetve a mintavevő fémcsövet, fizikailag megakadályozva a micélium kitapadását és növekedését.

4) A fermentlé habzását minimális szinten tartottuk.

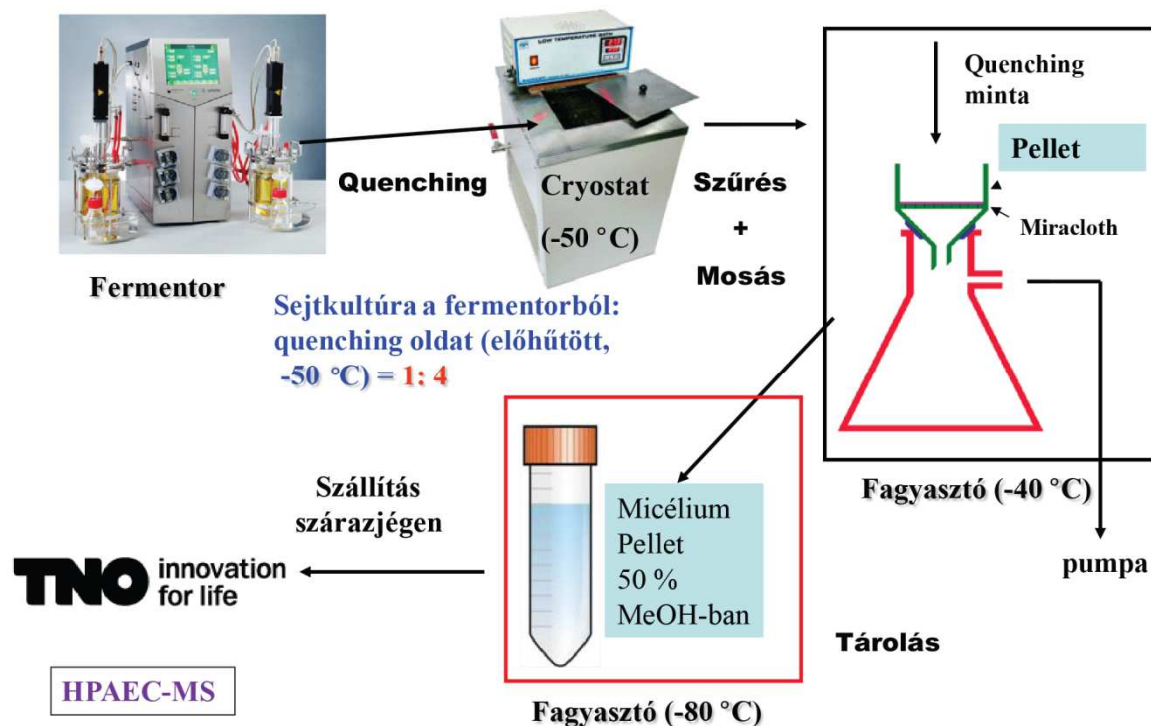
5) Naponta kétszer (reggel és este) a kimenő pumpa lekapcsolása mellett kb. fél percig erőteljesen megemeltük a keverést, lemosva a folyadékszint vonalában az üvegfalra kitapadt sejteket. A művelet után a keverést pontosan a korábbi értékre állítottuk vissza.

6) Minden egyes hígítási ráta értéknél új tenyészetet indítottunk – kerültük az egymást követő steady-state-ek vizsgálatát.

A fentiek betartásával több fonalas gombafajt (*A. chrysogenum*, *A. nidulans*, *T. reesei*) extrémén alacsony hígítási ráta érték mellett tudtunk steady-state állapotban tartani. *T. reesei* esetében stabilan $D = 0,015$ 1/h értéket értünk el, ami a legalacsonyabb publikált adat, és csak minimálisan magasabb a fenntartási energia növekedési ráta igényénél.

7.1.3. Intracelluláris galakto-glycom izolálása *Trichoderma reesei*-ből

A komplex szénhidrát elegyek elemzésének jól bevált módja a Nagy Teljesítményű Anion Cserélő Kromatográfia (HPAEC-MS), melyet esetünkben a holland TNO⁵⁷ végzett el. A lenti folyamatábra a minta előkészítésének lépéseit mutatja be. A protokoll lényege: a mintavétel pillanatában fennálló sejten belüli metabolit-profilról rögzíteni kell. Ennek alapvető eszköze a konstans hideg: a fermentorból kikerült micélium-minta hőmérséklete nem emelkedhet -40 °C fölé – ellenkező esetben az intracelluláris enzimek reakciókat indítanak be, a metabolit-profil megváltozását okozva. A gombatenyészet anyagcseréjének leállítását – az anyagtudományban elterjedt kifejezés analógiájára – „quenching”-nek⁵⁸ neveztük. A quenching oldat (pH 7) 65 % (v/v) metanolt, 35 % desztillált vizet és 100 mM 1-metil-imidazolt tartalmazott; hőmérsékletét kriosztáttal -50 °C-on tartottuk. Ebbe az oldatba juttattuk a lehető leggyorsabban a fermentlé mintát. A kimenő levegőút szelepének lezárásával megnöveltük a fermentor belső nyomását, majd a mintavevőre szerelt félméteres szilikoncsövön keresztül a fermentlevet egyenesen a hűtött quenching oldatba préseltük. A micéliumot egy fagyasztószekrényben felépített, így -40 °C-on tartott vákumszűrőn gyűjtöttük össze, hideg quenching oldattal kétszer átmostuk, majd újra leszűrtük. Az 50 % (v/v) metanolban, mélyhűtőben tárolt mintákat szárazjégen, speciális futárszolgálatkal küldtük ki Hollandiába.



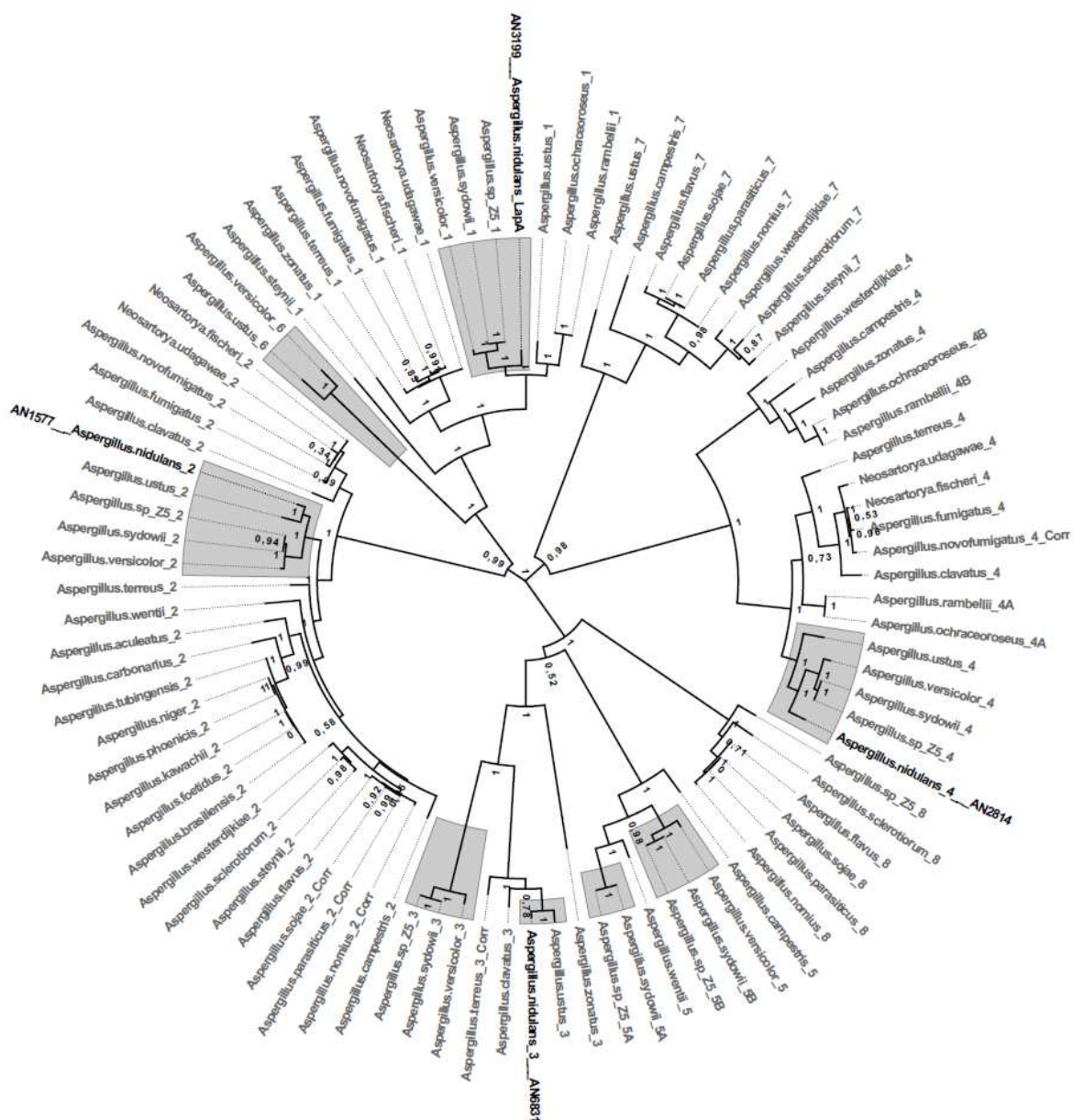
⁵⁷ Nederlandse Organisatie voor Toegepast Natuurwetenschappelijk Onderzoek (Az Alkalmazott Tudományos Kutatás Holland Szervezete; www.tno.nl).

⁵⁸ Magyarul „kioltás”-nak nevezhető.

7.2. MELLÉKLETEK (KIEGÉSZÍTŐ ÁBRÁK ÉS TÁBLÁZATOK)

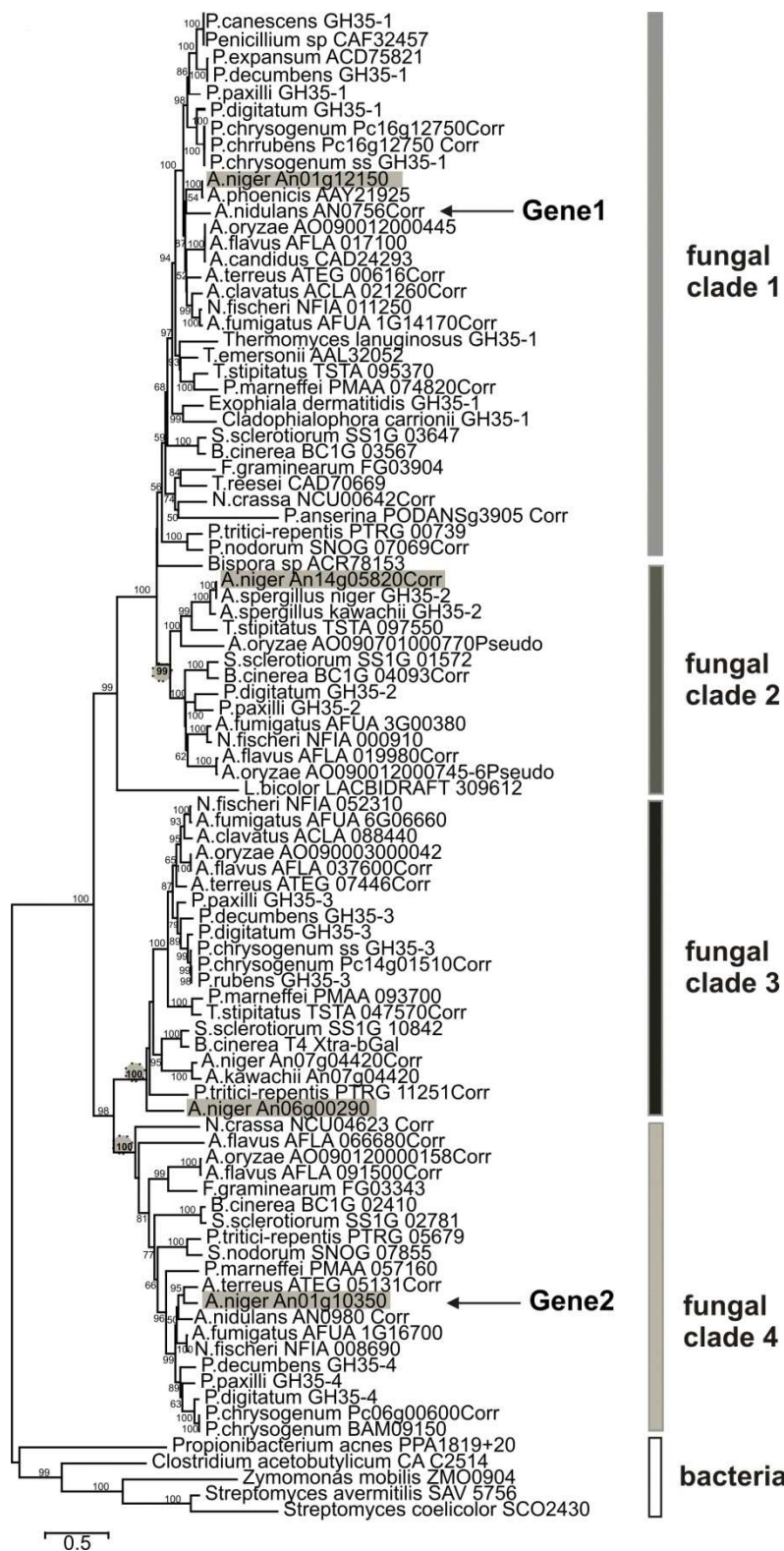
1. melléklet.

Maximum likelihood filogenetikai törzsfa. Célunk az *A. nidulans* LacpA fehérje ortológjai és paralógjai között meglévő szerkezeti összefüggések bemutatása a 31 db elérhető szekvenciájú *Aspergillus* faj felhasználásával.



2. melléklet.

Az extracelluláris GH35 típusú bGal-ok filogenetikai törzsfája. A bemutatott fehérjék az *A. niger* LacA (lókusz: An01g12150) géntermék orthológjai/paralógjai a kiválasztott gombákban és baktériumokban.



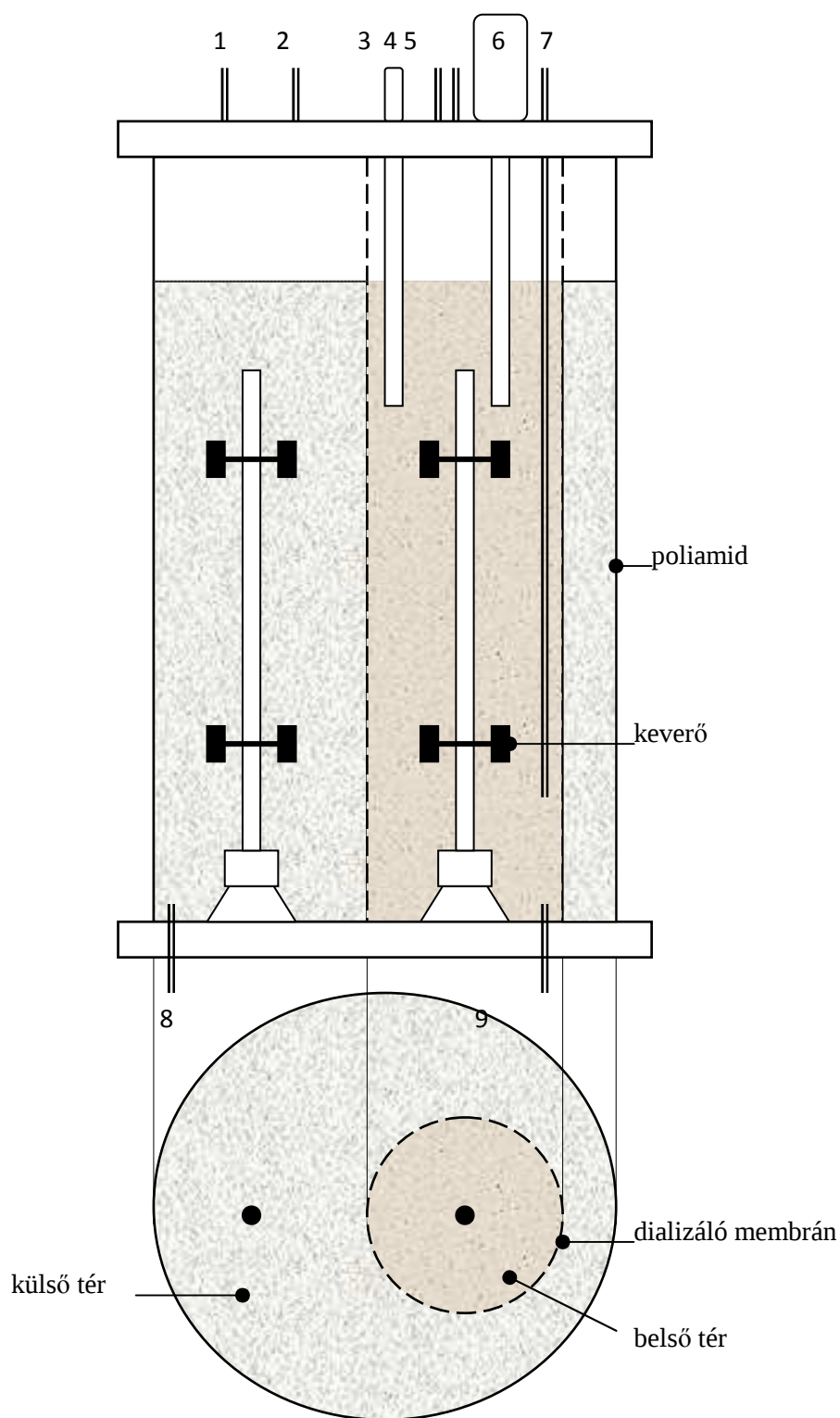
3. melléklet.

A feltételezett bGal, laktóz permeáz és a Leloir-útvonal struktúrgének nómenklatúrája *P. chrysogenum*-ban, illetve az amplifikációjukhoz használt primerek szekvenciái.

Elnevezés	Feltételezett funkció	Gén azonosító	Oligonukleotid szekvencia (5'-3')	Amplikon méret (bp)
<i>bgaA</i>	extracelluláris β -galaktozidáz	Pc16g12750	Pc16g12750F: AACTCTGCCTACAACACTACG Pc16g12750R: TCTCATACTTAGGCTGGTC	1300
<i>bgaB</i>	extracelluláris β -galaktozidáz	Pc06g00600	Pc06g00600F: TACTCGGCACCAATCTCAG Pc06g00600R: AGCCCAGAAATCATACGC	639
<i>bgaC</i>	extracelluláris β -galaktozidáz	Pc14g01510	Pc14g01510F: TAAGAAGACAGCCTACGG Pc14g01510R: TCTTGGACCCTTTGTATC	665
<i>bgaD</i>	intracelluláris β -galaktozidáz	Pc22g14540	Pc22g14540F: ACGGTAGAGAGCAACAGCC Pc22g14540R: GAGACCATCCATCACAAG	1080
<i>bgaE</i>	intracelluláris β -galaktozidáz	Pc12g11750	Pc12g11750F: CTCTCTAAACTGGAACACC Pc12g11750R: TCCAGACTCCATCAACAC	809
<i>lacA</i>	laktóz permeáz	Pc13g08630	Pc13g08630F: GCAAGACAAGAAGGCACG Pc13g08630R: TTTCAACGGCATAGGCAG	800
<i>lacB</i>	laktóz permeáz	Pc16g06850	Pc16g06850F: GGATGTCTGAAATACCAAG Pc16g06850R: GCGAAGAAGTAGATGAACC	930
<i>galE</i>	D-galaktokináz	Pc13g10140	Pc13g10140F: ACTACCGCCCAGACTTTG Pc13g10140R: CGTGTATCCCTCTTCTTGTC	973
<i>galD</i>	D-galaktóz-1-P UT	Pc15g00140	Pc15g00140F: AGACAACCCTGCCCCAACTAC Pc15g00140R: TCTCTTCCTCGGTGCCATC	919
<i>ugeA</i>	UDP-D-galaktóz 4-epimeráz	Pc21g10370	Pc21g10370 F: GGCTCATTACCAACCCTTG Pc21g10370 R: CAGAGGGAGCAGGTTGTAGG	700

<i>ugeB</i>	UDP-D-galaktóz 4-epimeráz	Pc20g06140	Pc20g06140 F: CTCAAAGGTCCGATGCGAAC Pc20g06140 R: CCATCTTCGGTTTCCCAATC	928
<i>ugeC</i>	UDP-D-galaktóz 4-epimeráz	Pc18g01080	Pc18g01080F: GTTCGCTATCCCCAATCTG Pc18g01080R: GGTCCTCCTTCTCTGTAA	697
<i>ugeD</i>	UDP-D-galaktóz 4-epimeráz	Pc21g12170	Pc21g12170 F: CTCCAGGCGTGAACAATC Pc21g12170 R: CAACCTTCTCCAACCCATC	744
<i>ugeE</i>	UDP-D-galaktóz 4-epimeráz	Pc16g12790	Pc16g12790 F: GACCTCACCTCCACCAAAG Pc16g12790 R: GGCTGGCAAACCTGTCTAATG	790
<i>galF</i>	UDP-D-glükóz pirofoszforiláz	Pc21g12790	Pc21g12790F: TCCAAGGCTCTACCCACTC Pc21g12790R: GCGTTGGACAGGAAGATG	1075
<i>pgmA</i>	foszfo-glükomutáz	Pc18g01390	Pc18g01390F: GGTTCTTTCCTCGTCATTG Pc18g01390R: TCACCGTCACCATCACTG	756

4. melléklet. A dializáló membránreaktor vázlatos rajza.



1, 4: sterilizálás utáni beadagolás helye; 2, 5: levegő kimenet; 3: oxigénelektroda; 6: pH elektróda; 7: levegő bemenet; 8, 9: mintavevő.

8. AZ ÉRTEKEZÉSBEN SZEREPLŐ SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

- 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, Flippi 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, Flippi 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, Flippi 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

9. A DOLGOZAT TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ TOVÁBBI KÖZLEMÉNYEK 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, Flipphi 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 PJJ, 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

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