

AZ EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**A KITINOLÍTIKUS ENZIMEK ÉS A
SZABADGYÖKÖK SZEREPE A *PENICILLIUM*
CHRYSOGENUM GOMBA AUTOLÍZISÉBEN**

Sámi László

Témavezető: Dr. Pócsi István

Debreceni Egyetem

Orvos- és Egészségtudományi Centrum

Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék

2003

1. BEVEZETÉS

A *Penicillium chrysogenum* a penicillin V felfedezése óta kiemelt biotechnológiai jelentőségű fonalas gomba. Ugyanakkor azonban általánosan elmondható, hogy bár a fermentációs iparban a mai napig komoly gondot jelent a tenyészetek kontrollálatlan fragmentációja, autolízise és öregedése – ami hátrányosan befolyásolja mind a produktivitást, mind a termékkinyerést – ezen folyamatok, illetve szabályozottságuk, mint például a sejtek differenciálódása és öregedése során zajló redox változások, mind a mai napig csak részben felderítettek. Az ezirányú kutatások eredményeitől olyan új stratégiák kidolgozása remélhető, melyek hatékonyabbá tehetik a gombák biotechnológiai alkalmazását, illetve a fonalas és dimorf patogén gombák okozta fertőzésekkel szembeni védekezést.

A fonalas gombák autolízise az öregedő tenyészetek “önemésztésének” összetett, többfázisú folyamata, melynek része a sejtburrok részleges permeabilizációja, majd az intracelluláris anyag fokozatos elvesztése (White *et al.*, 2002). Az ipari fermentációk során a fonalas gombák süllyesztett tenészeiben ez az általános sejtleépülés a stacioner fázis végén veszi kezdetét; ekkor az autolízisben kulcsszerepet játszó hidrolázok (proteázok, glükánázok és kitinolitikus enzimek) kerülnek a tápközegbe, melyek gyengülő sejtstruktúrát és vakuolarizációt eredményeznek. Ennek következtében pedig csökken a hifák mechanikai stressz-tűrése, és fokozódik a fragmentáció (White *et al.*, 2002). Az autolízis szabályozása egyelőre csak részben tisztázott, de az mára világos, hogy – a korai elképzelésekkel ellentétben – dinamikus, energiaigényes, és igen magas fokon, génszinten szabályozott jelenség, melyet számos külső és belső tényező kiválthat, illetve befolyásolhat (McIntyre *et al.*, 1999). Ide tartozik többek között a tápanyag-limitáció (Pusztahelyi *et al.*, 1997), és az autolitikus hidrolázok (például kitinázok) tápközegbe kerülése (White *et al.*, 2002). Az ipari fermentációk esetében a cél az autolízis elkerülése, vagy késleltetése az antibiotikum-termelés folyamatossá tétele, illetve a heterológ proteinek – az autolitikus proteázok általi – degradációjának megakadályozása végett.

A kitinázoknak fontos szerepet tulajdonítanak a gombák különféle morfogenetikus folyamataiban, többek között a kor-függő fragmentációban és autolízisben (Gooday, 1992, 1997). Az enzimek fiziológiai szerepének vizsgálatához ideális lehetőséget kínál a különféle inhibitorok, például az allózamidin *in vitro* és *in vivo* alkalmazása.

A gombák morfológiai változásaiért – többek között az autolízisért és dimorf átalakulásért – felelős gének expresszióját különböző stressz-folyamatok is befolyásolhatják. Az intracelluláris ROS akkumuláció például elindíthatja a spórák csírázását (Lledías *et al.*, 1999), és akár az autolízist (Hansberg & Aguirre, 1990). Újabb vizsgálatok alapján az átmeneti hiperoxidáns állapotok igen fontos korai szignál-transzdukciós eseményeknek tekinthetők. Hansberg “a sejt differenciálódás

dioxidigén kizárási elmélete”-nek megfelelően (Hansberg & Aguirre, 1990) lehetséges, hogy a morfológiai változások mozgatója az instabil hiperoxidáns állapotokban a molekuláris oxigén kizárására való törekvés, ami által a mikroorganizmus új, a környezeti körülményeknek megfelelő, stabil morfológiai és élettani állapotba jut. Például a *Neurospora crassa* aszexuális életsiklusának minden stabil állapotát megelőzte egy GSH/GSSG redox egyensúlyvesztéssel párosuló átmeneti hiperoxidáns állapot (Hansberg *et al.*, 1993).

A sejtek többféle védelmi rendszerrel is rendelkeznek a káros szabadgyökök elminálására. Az elsődleges védelemhez tartoznak a különféle antioxidáns molekulák (glutation, tioredoxin), valamint az antioxidáns enzimek, például a szuperoxid dizmutáz, kataláz, glutation-peroxidáz (Davis *et al.*, 2001). Magasabbrendű eukariótákban a GSH/GSSG redox arányok felborulása és a tartós oxidatív stressz igazoltan fontos szerepet játszanak az apoptózist iniciáló szignál-transzdukciós folyamatokban. Újabb kutatások alapján feltételezhető, hogy a gomba-sejtek autolitikus pusztulása a magasabbrendű eukarióta szervezetek apoptózisához hasonló, vagy azzal egyenértékű folyamat (McIntyre *et al.*, 1999).

Az oxidatív stressz és autolízis kapcsolatát kereső kutatások eredményei igen fontosak lehetnek a süllyesztett ipari fermentációkban, mivel a legtöbb ipari folyamatban alkalmazott mikroorganizmus magas oldott O₂ koncentrációt igényel. Ilyen körülmények között ezek a mikrobák folyamatos oxidatív stressznek lehetnek kitéve (White *et al.*, 2002). A penicillin termelésben alkalmazott oldallánc-prekursorok szintén generálhatnak oxidatív stresszt (White *et al.*, 1999), és megfelelő koncentrációban kiüríthetik a sejtek GSH készletét (Emri *et al.*, 1997). A GSH ugyanakkor a β -laktám bioszintézis egyik legfontosabb intermedier vegyülete, az ACV szerkezeti analógja, ennél fogva erősen gátolja a penicillin termelést. Ezért célszerű volna csökkenteni a sejtek intracelluláris GSH koncentrációját anélkül, hogy ez negatívan befolyásolná az idiofázisú micéliumok fiziológiai állapotát – miáltal remélhetőleg növelni lehetne az ipari penicillin-termelést. Korábbi kísérleteink alapján az intracelluláris GSH szintek nem csökkenthetők a szén, nitrogén és kénforrások minőségének és mennyiségének a változtatásával úgy, hogy ez ne befolyásolná az antibiotikum-képződést negatívan (Emri *et al.*, 1998). Az egyetlen lehetőség a GSH szintek alacsonyan tartására szelektív módon az oldallánc-prekursorok indukálta GSH-függő detoxifikáció kihasználásában rejlik (Emri *et al.*, 2000).

2. CÉLKITŰZÉSEK

A Debreceni Egyetem Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszékén egy β -laktám termelő *P. chrysogenum* törzzsel évek óta folytatott élettani kutatások célja a tenyészetek öregedésekor

megfigyelhető morfológiai és élettani változások (például autolízis és hidroláz-produkció), valamint a sejtek glutation metabolizmusának és antibiotikum-termeléssel való kapcsolatának részletes feltérképezése volt. Jelen dolgozat – szervesen építve az öregedő *P. chrysogenum* tenyészetekkel kapcsolatos eddigi vizsgálatok eredményeire – az alábbi célkitűzésekkel készült:

I. Az ipari *P. chrysogenum* NCAIM 00237 törzs öregedő tenyészeinek morfológiai és fiziológiai jellemzése.

1. Milyen szerepet játszanak a gomba kitinolitikus enzimek a csírázó, aktívan növekvő, illetve a szénlimitált, öregedő tenyészetek morfológiai változásaiban, különös hangsúllyal az autolízis és fragmentáció folyamataira? A kitinázok *in vivo* gátlásának fiziológiai következményei.

2. Az öregedő tenyészetek vitalitásának, illetve metabolikus aktivitásának és légzés-intenzitásának változásai szénlimitáció alatt és után. A gomba glükóz-hasznosítása.

3. A fiatal és öregedő tenyészetek redox-státuszának, illetve glutation anyagcseréjének változásai (enzim- és metabolit-szinten), különös tekintettel a megfigyelt morfológiai változásokkal való lehetséges kapcsolatukra.

4. A szabadgyökképződés, illetve a fiatal és öregedő tenyészetek reaktív oxigénformák elleni védelmi rendszerei és lehetséges védekező stratégiái. A dioxigén kizárási elmélet alkalmazhatósága a megfigyelt jelenségekre.

II. Egy ipari *P. chrysogenum* törzs glutation-metabolizmusa és β -laktám termelése közötti kapcsolat vizsgálata.

1. Indukálhat-e a tápközeg pH-jának változtatása az oldallánc-prekurzorok által előidézett GSH-függő detoxifikációt ipari körülmények között? Növelhető-e ily módon a β -laktám termelés?

3. VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

A *P. chrysogenum* NCAIM 00237 törzsének növekedését és az öregedő gomba morfológiai és fiziológiai változásait komplex táptalajon, 1% glükóz szénforráson nevelt, rázottlombikos tenyészetek felhasználásával tanulmányoztam. A tenyészetekhez 35 órákor 9,6 μ M allóزامидint (kitináz-inhibitor) és/vagy 115 órákor 57 mM glükózt adtam, és nyomon követtem a száraztömeg, fehérje, egyes metabolit koncentrációk (GSH, GSSG, peroxid, szuperoxid, glükóz, glükonát), valamint enzim-aktivitások (GOX, AOX, GR, GPx, GST, γ GT, kataláz, SOD, kitináz, HexAm) változásait. Ehhez különféle kolorimetrikus “rate assay” és néhány esetben (HexAm, kitináz, γ GT) végpont-méréseket alkalmaztam. A GOX enzimaktivitást a glükóz-mérés módosításával, a glükonát-koncentrációkat pedig a glükonát-dehidrogenáz assay módosításával határoztam meg. A

szabadgyökök detektálása fluoriméterrel történt. A mintákat X-press, sav, vagy folyékony nitrogén segítségével tártam fel, illetve (extracelluláris enzimek és metabolitok esetén) közvetlenül a szűrt (centrifugált) fermentlét használtam a méréshez. A kitináz-inhibitor eltávolítása érdekében az extracelluláris mintákat előzetesen dializáltam. Az izoenzim-tisztításhoz ammónium-szulfátos precipitációt és affinitás-kromatográfiát, a relatív móltömegek meghatározásához nemredukáló poliakrilamid-gélelektroforézist alkalmaztam. A sejtfal elemanalíziséhez a mintákat lúgos hidrolízissel preparáltam.

A morfológiai és metabolikus aktivitás vizsgálatokat vitalitásfestéssel kombinált "félaautomatikus" komputerizált image analízis technikával, valamint (lemezöntéses) élőcsíra- és mikroszkópos alakoselem-számlálással végeztem, majd statisztikai módszerekkel (Student-féle t-teszt) értékeltem. A sejtek túlélő képességét friss táptalajra való átmosással teszteltem. A teljes és alternatív légzési aktivitások vizsgálata egy házi készítésű oxigrafikus cellában, oxigén-elektroda segítségével történt. Az ipari *P. chrysogenum* törzs kontrollált, átmeneti pH csökkentést követő, GSH-függő detoxifikációját és β -laktám termelését 5 literes fermentorokban vizsgáltam. Ekkor a fermentlé szacharóz tartalmát egy Cobas Mira robottal végeztem, míg a képződött antibiotikum koncentrációját egy penicillin-hiperszenzitív törzs segítségével becsültem meg.

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELEÉSÜK

4.1. A *P. chrysogenum* morfológiai és fiziológiai változásai allózamidin jelenlétében

A tenyészetek száraztömege az exponenciális fázisban (20-34 óra) meredeken növekedett; a sejtek igen aktívan metabolizálták a glükózt. Ezt a szakaszt a hifák intenzív nyúlása valamint elágazása jellemezte, ami végül jellegzetes, pelletes morfológia kialakulásához vezetett. A rövid, néhány órás stacioner fázist követően erőteljes vakuolarizáció, majd intenzív autolízis és fragmentáció indult meg a tenyészetekben; az inkubáció 115. órájára a fonalas elemek helyett főként lekerekedett végű, két sejtből álló élesztörszerű fragmentumok váltak domináns túlélő képletekké.

A kitinázoknak jelentős szerepet tulajdonítanak a kitint tartalmazó gombák morfogenezisében és alakváltozásaiban, beleértve ebbe a spórák duzzadási és csírázási folyamatait, a növekvő hifák csúcsi megnyúlását és elágazását csakúgy, mint a tenyészetek korfüggő autolízisét és fragmentációját (Gooday, 1997). Valójában, a kitinázok feltételezett szerepét a fent említett folyamatokban a legtöbb esetben az enzim *in vivo* gátlásával (Gooday *et al.*, 1992; Sándor *et al.*, 1998), illetve a kitináz-gének elrontásával, azaz mutáns törzsek vizsgálatával (Takaya *et al.*, 1998) igazolták. Az allózamidint és felszintetikus származékait a nyolcvanas évek vége óta igen potens

antifungális szerként tartják számon; sajnos azonban minden eddigi próbálkozás, amely a gombák exponenciális növekedésének allóزامidinnel történő gátlására irányult, sikertelen maradt (Dickinson *et al.*, 1989; Sándor *et al.*, 1998). Az általam vizsgált törzs csírázó és exponenciálisan növekvő tenyészeiben ez a kitináz-inhibitor szintén hatástalannak bizonyult. Bár kitinázok mindig megtalálhatóak az aktívan növekvő micéliumokban (Rast *et al.*, 1991), könnyen elképzelhető, hogy – szterikus, vagy egyéb okokból – védettek voltak az allóزامidin gátló hatásával szemben (Gooday, 1995; Gooday *et al.*, 1997). Egy másik lehetséges magyarázat – a Wessels-féle “steady state” hifanövekedési modell (Wessels, 1984) alapján – az lehet, hogy ezek a hidrolázok talán mégsem játszottak jelentős (talán semmilyen) szerepet az apikális sejtfal-nyúlásban. Ennek megfelelően, az allóزامidin segítségével nem sikerült egyértelműen igazolnom a kitinázok szerepét a fiatal hifák csúcsi növekedésében. Ugyanakkor, a kitinázok elfogadottan nagy jelentőséggel bírnak a hifa-elágazási és a csírázási folyamatokban, ahol a merev sejtfal lokális és időleges fellazítása alapvető fontosságú lehet (Gooday *et al.*, 1997; Wessels, 1984). Eredményeim teljesen alátámasztják eme nézetet. Kísérleteimben az allóزامidin szignifikánsan gátolta az autolítikus biomassza-vesztést az autolizáló tenyészetekben. Ez a hatás a legszembetűnőbb az inkubáció 60-88. órája között volt. Az allóزامidin-kezelt micéliumok feldarabolódása az autolítikus fázis végére ugyanakkor a kontroll tenyészetekéhez teljesen hasonló, lekerekedett végű, kétsejtes fragmentumokat eredményezett. Ám a kontroll tenyészetekkel ellentétben, ahol a tápközeghez adott extra adag glükóz hatására intenzív csírázás és biomassza-gyarapodás volt megfigyelhető, az allóزامidin jelenlétében egyáltalán nem történt száraztömeg-növekedés. A kitináz-inhibitor tehát az autolízis mellett a kriptikus növekedést, illetve az újrainduló vegetatív hifaképződést is igen látványosan gátolta. Ugyanakkor mind a kezelt, mind a kontroll tenyészetek effektíven felhasználták a friss szénforrást, bár kissé eltérő sebességgel. A 165 órás, alkáli-oldhatatlan (kitin-glükán) sejtfal-alkotók elem-analízise alapján a gomba-sejtfal kitintartalma jelentős mértékben növekedett (2,6 %_{kontroll} → 7,0 %_{allóزامidin-kezelt}); ez ugyanakkor semmilyen, fázis-kontraszt mikroszkóppal megfigyelhető morfológiai változással nem járt. A beépült kitin mennyiségének fokozódása (ami valószínűsíti a sejtfal kitinrétegének megvastagodását is) több, egymástól független folyamat eredménye lehetett. Egyrészt, a sejtfal szintézise és lízise közötti egyensúly (Bartnicki-Garcia, 1973) felborulhatott, másrészt a kitináz inhibitor megakadályoz(hat)ta a sejtfal mátrixot alkotó polimerek autolítikus degradációját (Reyes *et al.*, 1988). Az extracelluláris kitinázok effektív inhibíciója és a sejtek növekvő kitintartalma között mindenesetre valószínűsíthető ok-okozati kapcsolat.

Az autolítikus hidrolázokat illetően elmondható, hogy mind az extracelluláris hexóزامinidáz (HexAm), mind pedig a kitináz aktivitások gyakorlatilag elhanyagolhatóak voltak az exponenciálisan növő tenyészetekben, majd növekedni kezdtek a stacioner fázisban, és a 115. órára elérték maximumukat. Az allóزامidin nem befolyásolta szignifikánsan az extracelluláris hidroláz

termelést. Ugyanakkor azonban az allóزامidin-kezelt tenyészeteknél glükóz-pótlás után a karbon-katabolit represszió alatt álló extracelluláris kitináz és HexAm aktivitások – bár szignifikánsan – sokkal kisebb mértékben csökkentek, mint a kitináz inhibitor nélkül. A vizsgált törzs mikroszomális kitinázai – legalábbis az exponenciális növekedés alatt – membrán-kötött zimogén formában voltak jelen (Sámi *et al.*, 2001b), ami szintén hozzájárulhatott az allóزامidin gátló hatása elleni védekezéshez *in vivo*. Később, az autolízis során, tripszines kezelésre semmiféle további aktiváció nem volt megfigyelhető (Sámi *et al.*, 2001b), ekkorra tehát feltehetőleg az összes kitináz aktiválódott és érzékennyé vált az allóزامidin jelenlétére. Mindez jól magyarázhatja eme kitináz-inhibitor korfüggő, csak az autolizáló *P. chrysogenum* tenyészetekre kifejtett fungisztikus hatását. Az *in vitro* enzim-gátlási kísérletekben az allóزامidin az extracelluláris kitinázok potens inhibitorának mutatkozott, $IC_{50}=1,4 \mu M$ értékkel, ami jól illeszkedik az irodalomban közölt adatokhoz (Rast *et al.*, 2000). A fiziológiai kísérleteimben alkalmazott $9,6 \mu M$ allóزامidin koncentráció teljes kitináz-gátlást okozott. A 115 órás fermentlé affinitás-kromatográfiával végzett enzimsztításából származó kontroll, illetve allóزامidin-kezelt, majd dializált minták azonos izoenzim-profilut mutattak. Az autolitikus szakaszban kimutatható különböző izoenzimok jelenlétére többféle magyarázat adható. Egyrészt valószínű, hogy több kitináz gén van jelen a sejtekben; másrészt a részleges proteolitikus degradáció sem kizárt. A legtöbb esetben az egyes izoenzimok speciális szerepe egyelőre nem felderített. A vizsgált *P. chrysogenum* törzsnél a kontroll és allóزامidin-kezelt tenyészetek hasonló izoenzim-profilja, az *in vitro* enzim-inhibíciós kísérletek és a megfigyelt morfológiai változások egyaránt arra engedtek következtetni, hogy a gomba autolitikus kitinázai allóزامidin-szenzitívek.

A morfológiai vizsgálatok adatainak statisztikai analízise alapján elmondható, hogy az összes alakos elem, valamint a kétsejtes fragmentumok száma szignifikánsan csökkent a tenyésztés 115-166. órája között; ezeket a változásokat az allóزامidin jelenléte kismértékben ugyan, de szignifikánsan csökkentette. A minimum két szeptumot tartalmazó képletek (“hifák”) száma szintén csökkent, az egysejtes fragmentumoké pedig nőtt az idő függvényében; ezek a változások azonban statisztikailag általában nem voltak szignifikánsak. Ezen morfológiai elemek számát és arányát az allóزامidin jelenléte nem befolyásolta. Az öregedő tenyészetek élőcsíra-számlálással nyert eredményei minden vizsgált esetben szignifikánsan alacsonyabbak voltak, mint a mikroszkópos alakoselem-számlálással nyert adatok. Az allóزامidin-kezelt és kontroll tenyészetek élőcsíra-számai között nem találtunk szignifikáns eltérést. Ezzel egyezően, az allóزامidin-kezelt és kezeletlen micéliumok friss, allóزامidin-mentes tápközegbe való átmosásakor minden tesztelt időpontban nagyon hasonló csírázási frekvencia és növekedési profil volt megfigyelhető. Ez demonstrálta, hogy az allóزامidin csírázást gátló hatása reverzibilis.

Az allóزامidin fiziológiai hatása nem volt kedvező a mikroorganizmus számára. Ennek jeleként például a 115 órai glükózpótlást követően az extracelluláris kitináz és HexAm aktivitások, glükóz koncentrációk és a tápközeg pH-jának csökkenései egyértelműen mérsékeltebbek voltak a kontroll tenyészetekben megfigyelhetőknél. Azonban lényegi eltérést sem a vitalitás-festés és image analízis kombinálásával nyert adatok alapján, sem az élőcsíra-számlálással nem sikerült kimutatni a kontroll, illetve az allóزامidin-kezelt tenyészetek metabolikus aktivitása között. Az allóزامidin nem befolyásolta továbbá a GSH/GSSG redox egyensúlyt sem. Bár a kontroll tenyészetekhez képest a specifikus GSH és GSSG koncentrációk csökkentek autolízis és kriptikus növekedés alatt, ezek a változások az allóزامidin okozta nagyobb száraztömeg-értékek következményeként jelentkeztek, és egyetlen vizsgált időpontban sem voltak szignifikánsak. Mindez valószínűtlenné teszi, hogy az allóزامidin súlyos károkat okozott volna a sejteknek. A 115. órai glükózpótlást követően, a specifikus GSH koncentrációk nem csökkentek a kitináz inhibitor jelenlétében, míg a kontroll tenyészetekben figyelemreméltó GSH szint esés volt megfigyelhető.

A fenti megfigyeléseket összegezve megállapítható, hogy az allóزامidin általános hatása az autolizáló *P. chrysogenum* micéliumokra fungisztatikus volt, nem pedig fungicid. Az allóزامidin öregedő *P. chrysogenum* tenyészetekre gyakorolt fiziológiai és morfológiai hatásait az 1. táblázat foglalja össze.

JELLEMZŐ	HATÁS*
Autolítikus biomassza-vesztés	Csökkent
Hifák és alakos elemek száma	Kismértékben csökkent
Alakos elemek mérete	Kismértékben nőtt
Sejtfal kitin-tartalma	Nőtt
Autolítikus HexAm enzim aktivitása	Nem változott
Autolítikus kitinázok aktivitása	(reverzibilisen) gátolt
Új hifák kinövése glükóz-pótlás után	(reverzibilisen) gátolt
Vitalitás, élőcsíraszám (sejtszámlálással)	Nem változott
Vitalitás, száraztömeg és kinövési frekvencia (átmosással)	Nem változott
Vitalitás (fluoreszcens festéssel)	Nem változott
Intracelluláris GSH, GSSG szintek és redox arányaik	Nem változott
Glükózfelhasználás mértéke és sebessége glükóz-pótlás után	Kismértékben csökkent
A tápközeg-savasodás mértéke és sebessége glükóz-pótlás után	Kismértékben csökkent
Intracelluláris glutation-tartalékok felhasználása glükóz-pótlás után	Csökkent

1. Táblázat. *: Változások 9,6 μ M allóزامidin (35 óra) és/vagy 57 mM glükóz (115 óra) hozzáadása után, 80 és 167 órás fermentációs idő között.

4.2. Szabadgyök-halmozódás

A sejtdifferenciálódás Hansberg-féle “dioxidgén kizárási elmélete” alapján (Hansberg & Aguirre, 1990) a növekvő hifák és a lekerekedett végű, élesztőszerű fragmentumok a mikroorganizmus fiziológiailag stabil, differenciált állapotát képviselték. Az elmélet szerint a differenciálódást átmeneti hiperoxidáns állapot előzi meg a decelerációs és stacioner növekedési fázisokban, azaz közvetlenül az autolízis megindulása előtt. Kísérleteim alapján több érv is szól az elmélet mellett és ellen is. A gomba exponenciális növekedési fázisát meglepően magas intracelluláris peroxid, szuperoxid és GSSG koncentrációk, és ennek következményeként relatíve alacsony GSH/GSSG redox arányok jellemezték. Ennek tulajdonítható, hogy az autolízis megindulását valóban megelőzte néhány antioxidatív enzim (GPx, kataláz, GR) aktivációja, illetve nagy aktivitása. Azonban a glükóz elfogyása után (a decelerációs, illetve korai autolítikus fázisban) a ROS szintje is csökkent; a peroxid-szint 44, a szuperoxid 66 órákor mutatott minimális értéket. Az intracelluláris ROS szintek – a várttal ellentétben – a stacioner (pre-autolítikus) és korai autolítikus fázisokban átmeneti emelkedés helyett tehát egyértelműen csökkentek. Később, az autolízis előrehaladtával, az intracelluláris ROS koncentrációja ugyan jelentős, folyamatos növekedésnek indult, azonban mindeközben a GSH/GSSG arányok is emelkedtek. Azaz, valódi oxidatív stresszről (amit többek között éppen ezen arány határozott csökkenése jelzett volna) ebben az esetben nem beszélhetünk. Az intracelluláris ROS szinteket számos tényező befolyásolhatta, beleértve a sejtek metabolikus aktivitását (hiszen a peroxid képződése a legintenzívebb az exponenciálisan növekvő tenyészetekben és a glükóz-pótlást követően volt), az antioxidáns enzimek kor-függő regulációját és a túlélő fragmentumok öregedését.

Az exponenciális fázisban igen magas specifikus GPx, kataláz és GR aktivitások a szénlimitáció alatt drasztikusan csökkentek. Az antioxidáns enzimek aktivitását szintén több tényező befolyásolhatta *P. chrysogenum*-ban. Például a GPx-t az intracelluláris peroxid szintek regulálták (Emri *et al.*, 1997), valamint a szénéhezés és -pótlás befolyásolta; a GR pedig minden oxidatív jellegű stresszre reagált (Emri *et al.*, 1997, 1998). Meglepő módon, a kataláz aktivitásokat egyedül a szénéhezés, a SOD aktivitásokat pedig csak az intracelluláris szuperoxid szintek befolyásolták.

Az elmélettel összhangban, a 115. órai glükózpótlást követően a túlélő fragmentumok újra-csírázását jelentős átmeneti peroxid-akkumuláció (0,5→2,2 pmol/mg CDW) és néhány antioxidáns enzim (GR, GPx) erőteljes aktivációja jellemezte; azonban mindezt nem kísérte GSH/GSSG redox arány változás. Ugyanakkor – a peroxidokkal ellentétben – a szuperoxid-szintek glükózpótlás után szignifikánsan csökkentek. A specifikus SOD aktivitások a poszt-autolítikus tenyészetekben minden esetben nagyok voltak; sem ezt, sem a kataláz aktivitást nem befolyásolta szignifikánsan a glükózpótlás. Az intracelluláris kataláz aktivitások nem reagáltak a poszt-autolítikus peroxid-halmozódásra sem; az inkubáció 115. órájától konstans, alacsony szinten maradtak. Az antioxidáns

enzim-aktivitások változásai alapján az autolíziskor valószínűleg GSH-független, míg a csírázáskor GSH-függő enzimsziszterek játszottak főszerepet a keletkező oxidatív stressz kivédésében.

A glutation köztudottan számos igen fontos fiziológiai folyamatban vehet részt, például a sejtek redox státuszának fenntartásában, a ROS elleni antioxidatív védelmi rendszerben, a nehézfémek, ártalmas metabolitok és xenobiotikumok detoxifikációjában és eliminációjában, az aminosavak és peptidek felvételében, illetve intracelluláris transzportjában is (Penninckx & Elskens, 1993). Ezen kívül könnyen hasznosítható és mobilizálható endogén kén- és nitrogéntartalékként szolgál a gombasejtek számára (Emri *et al.*, 1998). Az intracelluláris GSH szinteket ezért igen sok tényező befolyásolhatta. Kísérleteimben a tenyészetek specifikus intracelluláris GSH koncentrációi gyakorlatilag az egész inkubáció ideje alatt változatlanul magas értéken (9-11 mmol/g CDW) maradtak; ez alól az egyedüli kivételt a 165 órás minta képviselte, ahol – a tenyészet romló élettani állapotát tükrözve – a GSH szint is alacsonyabb volt (6-9 mmol/g CDW). A glükózpótlást követően a sejtek GSH tartalékai rohamosan fogytak, és – a tenyészet biomassza gyarapodásával fordított arányban – 165 órára egészen alacsony értékre csökkentek. A növekedés re-iniciálódása a glükózpótlást követően maga után vonta az endogén nitrogén és kénforrások mobilizációját. Ennélfogva, a GSH készlet jelentős csökkenése ebben az esetben a komplex metabolikus stressz-válasz részének tekinthető. A specifikus GSSG koncentrációk az exponenciális fázis relatíve nagy értékei (0,4 mmol/g CDW) után (34-66. óra) szignifikánsan csökkentek, majd az autolízis további szakaszában konstans értéken (~0,17 mmol/g CDW) maradtak. Ezt követően – a ROS akkumuláció ellenére – további GSSG csökkenés volt tapasztalható. Ennek következményeként a GSH/GSSG redox arányok a kezdeti, alacsony értékről 133 órára mintegy ötszörösükre növekedtek (25→125).

Bár az intracelluláris ROS és GSSG szintek, valamint a legtöbb vizsgált antioxidatív enzim aktivitása a tenyészetek exponenciális és decelerációs fázisaiban voltak a legmagasabbak, az autolízist ebben az esetben nem előzte meg hiperoxidáns állapot. Következésképp, annak valószínűsége, hogy a ROS mediálta szignál-transzdukció szerepet játszott volna az autolízis megindításában, ebben az esetben igen csekély. Mindazonáltal, ezen megfigyelések semmiképp nem zárják ki az autolízis és az apoptózis közti valós fiziológiai analógia lehetőségét (McIntyre *et al.*, 1999), mivel ismeretes, hogy a magasabbrendű eukariótákban egy oxidatív stressz-független apoptotikus útvonal is létezik az oxidatív sérülések indukálta mitokondriális út mellett (Coppola & Ghibelli, 2000). Összefoglalva a fentieket, a *P. chrysogenum* tenyészetekben a GSH metabolizmust és a ROS képződését számos külső és belső tényező befolyásolhatta az inkubáció során. A rendszer szabályozottságának összetettsége magyarázatul szolgálhat arra, miért csak bizonyos limitációkkal volt érvényes a dioxigén kizárási elmélet, hogy összefüggő, koherens magyarázatot adjon a vizsgált törzsben megfigyelt differenciálódási és fiziológiai változásokra.

4.3. GOX aktivitások és légzési ráták

Ismeretes, hogy a két fő ROS generáló metabolikus útvonal *P. chrysogenum*-ban a glükóz GOX általi direkt oxidációja, valamint a NAD^+ és FAD koenzimek citokróm-függő, (ciánnal hatásosan blokkolható) regenerációja a mitokondriális légzési láncon keresztül. Az utóbbi folyamatot a sejt az ún. cianid-rezisztens, vagy alternatív oxidázai (AOX) segítségével csökkentheti; ekkor ugyanis a légzés során nem keletkezik ROS; az AOX ezért fontos szerepet játszhat a gombák antioxidatív védekezésében, különösen mikor a sejtek teljes légzési rátája nagy. Ezért – a szabadgyök-képződés tendenciájának ismeretében – megvizsgáltam a *P. chrysogenum* tenyészetek GOX és AOX aktivitásainak, valamint légzés-intenzitásának változását az inkubáció és szénforrás függvényében.

A teljes GOX aktivitás (összes sejthez kötött + extracelluláris) az exponenciális és decelerációs növekedési fázisokban igen intenzív volt, állandó értéken maradt, míg a specifikus aktivitások a növekvő biomassza miatt csökkentek. Az enzim aktív szekrécióval kikerült a tápközegbe; ezt jelezte, hogy az oldott intracelluláris specifikus aktivitások csökkenésével szinkronban növekedett az extracellulárisan mérhető specifikus aktivitás. A sejtfalhoz kötött enzim-aktivitások eközben megközelítőleg konstansak maradtak. Míg az enzim a legfontosabb ipari GOX termelő *A. niger* törzsekben főleg a sejtfalban lokalizálódik, illetve ahhoz kapcsolt, az általam vizsgált törzs GOX enzime túlnyomó többségben szolubilis (akár extracelluláris, akár intracelluláris) formában volt jelen, és az aktivitás csupán elenyésző hányada származott a sejtfal-kötött enzimtől. A szolubilis enzimek lokalizációja (esetleges kompartmentalizációja) egyelőre nem ismert, de feltételezhetően főként a periplazmikus térben akkumulálódtak (Nielsen, 1995). A növekedés korai exponenciális fázisában (az inkubáció első 20 órájában) a sejtek a kiindulási glükóz-koncentráció mintegy 30%-át hasznosították, glükonát-konverzió, és jelentősebb biomassza-növekedés nélkül. Később, a 20-26. óra között, a maradék glükóz (36 mM) pontosan fele alakult át glükonáttá. Az exponenciálisan növekvő tenyészetekben tehát (a nagy GOX aktivitás és az enzim aktív szekréciója következtében) effektív glükóz→glükonát konverzió folyt. A 34. órára a kiindulási glükóz, 36. órára pedig a képződött glükonát is eltűnt a tápközegből; ezzel párhuzamosan a száraztömeg tovább növekedett (8 mg/ml). A korábbi megfigyelésekkel összhangban (Nielsen, 1995), a glükonát addig nem kezdett metabolizálódni, míg az összes glükóz el nem fogyott a tápközegből; ezt követően azonban igen gyorsan hasznosult.

Az exponenciális fázisban megfigyelt nagy (vagy növekvő) antioxidatív enzimaktivitások (kataláz, GR, GPx) nagy valószínűség szerint a GOX működése során előzetesen keletkezett H_2O_2 okozta oxidatív stressz következményei voltak. Az antioxidatív enzimek indukciója a korai exponenciális fázisban kielégítő magyarázattal szolgálhat a *P. chrysogenum* micéliumok késő exponenciális fázisban megfigyelt figyelemreméltó oxidatív stressztűrésére (Emri *et al.*, 1997). A

H₂O₂ igazoltan kiemelkedő szerepet játszik az *A. niger* glükóz oxidáló rendszerének (GOX, laktonázok és katalázok; Witteveen *et al.*, 1993) aktiválásában és a cianid-rezisztens légzés stimulálásában (Karaffa *et al.*, 2001).

A stacioner és autolítikus növekedési fázisokban a GOX aktivitások meredeken csökkenni kezdtek minden vizsgált sejt-frakcióban, és teljesen eltűntek 98 óráskor. Az autolítikus tenyészetekben glükóz-pótlást követően semmilyen érdemleges glükonát keletkezés nem volt tapasztalható, és a GOX aktivitások is elhanyagolhatóak maradtak – annak ellenére, hogy a tenyészetek aktívan felhasználták a kapott szénforrást. Meglepő módon tehát, a glükóz-pótlást követő ROS halmozódás az autolizáló tenyészetekben nem (vagy csak kis részben) volt a GOX aktivitásoknak tulajdonítható. Hangsúlyozandó, hogy bár az intracelluláris peroxid szintek nagyok voltak és a glükóz jelen volt a tápközegben, sem a GOX, sem a kataláz aktivitások nem indukálódtak glükóz-pótlást követően. Ebből következően *P. chrysogenum*-ban a glükóz oxidáló rendszer szinkronizált regulációja (aktivizálása) glükóz és H₂O₂ jelenlétében valószínűleg korfüggő volt.

Ami a légzést illeti, a teljes és a cián-rezisztens légzési intenzitások is emelkedtek az exponenciális növekedés alatt, a tenyészet 28 óráskorára érve el maximumukat, majd csökkenni kezdtek a decelerációs fázisban. A teljes sejtlégzés beállt egy relatíve kicsi konstans értékre 88 órási inkubáció után, miközben a cián-rezisztens légzés aránya folyamatosan növekedett a stacioner, autolítikus és kriptikus fázisokban. Glükóz-pótlást követően minden vizsgált időpontban a teljes és cián-rezisztens légzési ráták jelentős mértékben növekedni kezdtek. A teljes légzés ekkor elérte az exponenciális tenyészetekben megfigyelt légzés 26-44 %-át, aminek nem kevesebb, mint 57-70 %-át a cián-rezisztens légzés tette ki. Az exponenciális növekedéshez hasonlóan, az extra adag glükóz elfogyása után csökkent a teljes respiráció és a cián-rezisztens légzés aránya – ez utóbbi azonban ismét növekedni kezdett, mikor a tenyészetek egy második autolítikus fázishoz értek. Ilyen körülmények között a széteső, részben dezorganizált membrán-szerkezetű mitokondriumok lehettek a halmozódó ROS legvalószínűbb forrásai (Karaffa *et al.*, 2001). A mitokondriumok csökkent működését tisztán jelezték a szignifikánsan kisebb teljes légzési ráták glükóz-pótlást követően. Ekkor a növekvő arányú cián-rezisztens légzés és a növekvő GPx, GR, valamint a SOD aktivitások lehettek az oxidatív stressz elleni védelem legfontosabb elemei. Az intracelluláris ROS akkumuláció, a csökkenő mitokondriális funkciók és sejt-vitalitás (a vegetatív növekedésre váltás időben csökkenő képessége), illetve növekvő cianid-rezisztens légzés, jó egyezést mutattak az öregedés szabadgyökös elméletével (Harman, 1993). Ezen jelenségek leírására ezért joggal alkalmazhattuk az “öregedés” kifejezést. A stacioner fázisú hifákkal ellentétben a *P. chrysogenum* túlélő, “élesztőszerű” képleteinél könnyen lehetséges, hogy oxidatív stressz-indukált apoptózis zajlott, ezáltal ideális szervezetekként szolgálhatnak a további gomba-öregedési kutatásokhoz.

4.4. A GSH-függő detoxifikáció vizsgálata β -laktám termelés során

Bár a GST számára szolgáló szubsztrátok (epoxidok és nem-specifikusan hidroxileződött, GSH-konjugált toxikus intermedierek; Emri *et al.*, 2000) jó része továbbra is hipotetikus, fed-batch fermentációkkal teszteltem annak a lehetőségét, hogy a POA GSH-függő detoxifikációjával az intracelluláris GSH szintek alacsonyan tarthatóak-e; hiszen ez igen kedvezően befolyásolhatná a penicillin-termelést (Van de Kamp *et al.*, 1999). A *P. chrysogenum* NN-08 törzzsel végzett kísérletekben a pH átmeneti, jól kontrollált csökkentésekor a termelő fázis elején (45-50 óra között) a POA beáramlott a sejtekbe. A vártak megfelelően, a GSH-függő detoxifikáció két kulcsenzime, a GST és γ GT specifikus aktivitásai ennek következtében 2-3-szorosukra emelkedtek ugyan a fermentáció 45-69. órája között; azonban az intracelluláris GSH szintek ettől függetlenül változatlanok maradtak – még pH=5,0-n is. Minden esetben elhanyagolható maradt továbbá a GSSG koncentrációja. Azaz, a pH csökkentésével nem sikerült érdemben befolyásolni a sejtek redox-állapotát (GSH/GSSG arányát); ennek megfelelően a glutation-arányokra érzékeny GR enzim sem aktiválódott. Korábbi kísérleteink alapján, Na-glutamát N-forráson a *P. chrysogenum* sejtek GSH tartalma – a médium pufferkapacitásától függően – szignifikánsan csökkent (Emri *et al.*, 1997). A Na-glutamát helyett a fermentációk során N-forrásként használt 10 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ valószínűleg jelentősen gátolta a γ GT aktivitás POA általi indukcióját (Emri *et al.*, 1997). A GSH katabolizmus ezen kulcsenzimének nitrogén-repressziója valószínűleg döntő fontosságú volt a nagy intracelluláris GSH koncentrációk fenntartásában POA jelenlétében.

A tenyészetek penicillin-V ekvivalens β -laktám termelése nagyon hasonló volt az egyes tenyészetekben. A sejtek a nagy mennyiségben jelenlévő (5 g/l) toxikus oldallánc-prekursor ellenére igen effektíven hasznosították az adagolt szacharózt. A pH csökkenésével azonban a gomba biomassza-gyarapodása gyengült. Amennyiben 5,0 alá (4,8) csökkentettem a pH-t, a sejtek GSH készlete gyorsan kimerült, és a többi esetben megfigyelt antibiotikum-termelés is elmaradt. A felvett cukrot ilyen körülmények között valószínűleg főleg arra fordította a gomba, hogy a nagy mennyiségben keletkező ROS ellen próbáljon védekezni, és kijavítsa az oxidatív károkat az antibiotikum-termelés, vagy biomassza-gyarapodás támogatása helyett. Ekkor ugrásszerűen megnöttek a specifikus γ GT és GST aktivitások; ám a sejtek ezen erőfeszítése is elégtelennek bizonyult az intenzív, pár óra alatt gyakorlatilag teljessé váló sejtpusztulás kivédésére. Ezen nemkívánt változások elkerülésére a rendkívül szűk (4,8-5,0) pH tartomány az adott kísérleti feltételek mellett tehát igen kritikusnak mutatkozott – nem csupán az antibiotikum termelés, hanem a gomba pusztta túlélése szempontjából is. Mindez – figyelembe véve a nagy volumenű fermentorok reológiai sajátosságait – leküzdhetetlen gyakorlati akadályokat támaszthat ipari körülmények között.

5. ÚJ EREDMÉNYEK (ÖSSZEFOGLALÁS)

- *In vivo* enzim-gátlással igazoltam, hogy a szénlimitált, öregedő *P. chrysogenum* tenyészetekben a kor-függő kitinázok jelentős szerepet játszottak a gomba autolízisében és fragmentációjában.
- A kitináz-inhibitor jelenlétében a sejtek kitintartalma nőtt, metabolikus aktivitása és vitalitása pedig változatlan maradt. Az allóزامidin antifungális hatása az autolizáló *P. chrysogenum* tenyészetekre fungisztatikus volt, nem pedig fungicid.
- Az exponenciálisan növekvő és öregedő tenyészetek eltérő allóزامidin-érzékenységgel rendelkeztek, ami korral változó állapotú és lokalizációjú kitinolitikus enzim(ek) jelenlétére utalhat.
- Feltérképeztem az öregedő tenyészetek redox státuszának, és GSH anyagcseréjének változásait. A különböző növekedési fázisok alatt mind a glutation metabolizmust, mind a reaktív oxigén formák (ROS) képződését számos endogén és exogén faktor befolyásolhatta. A dioxigén kizárási elmélet ezért csak korlátozottan volt érvényes a vizsgált törzs esetében, és nem lehetett szilárd, egyértelmű ok-okozati kapcsolatba hozni a tenyészetekben megfigyelt redox állapotokat, ROS szinteket és morfológiai változásokat.
- A *P. chrysogenum* exponenciális növekedési fázisát intenzív légzés, magas intracelluláris ROS szintek és jelentős antioxidatív enzim-aktivitások jellemezték. A képződő szabadgyökök fő forrása ekkor a légzés mellett a GOX aktivitása lehetett. Az öregedő, glükóz-pótolttal tenyészetekben az intracelluláris ROS emelkedése viszont főként a citokróm-függő mitokondriális légzésnek volt tulajdonítható. A GOX és kataláz aktivitások indukálhatósága kor-függőnek mutatkozott.
- Az exponenciális fázisban a magas kataláz, GR és GPx aktivitások, az öreg, kriptikus növekedésű tenyészetekben pedig a SOD és cianid-rezisztens légzés voltak az antioxidatív védelem fő elemei.
- A *P. chrysogenum* poszt-autolitikus tenyészeiben megfigyelt, Harman szabadgyökös öregedési elméletével ("Free radical theory of ageing") jó egyezést mutató jelenségek alapján elsőként használtuk ezen folyamatokra az "öregedés" fogalmát.
- Ipari méretű fermentációkban a sejten belüli GSH-készlet csökkentése, és ezáltal a β -laktám szintézis fokozása a penicillin-prekurzor POA glutation-függő detoxifikációja révén gyakorlatilag kivitelezhetetlennek tűnt.

6. RÖVIDÍTÉSEK

ACV	δ -(L- α -aminoadipil)-L-ciszteinil-D-valin
AOX	alternatív (cianid rezisztens) oxidáz
CDW	száraztömeg (cellular dry weight)
GOX	glükóz oxidáz
GPx	glutation peroxidáz
GR	glutation reduktáz
GSH	glutation (γ -L-glutamil-L-ciszteinil-glicin), redukált forma
GSSG	glutation, oxidált forma
GST	glutation S-transzferáz
γ GT	γ -glutamiltranszpeptidáz
HexAm	N-acetil- β -D-hexózaminidáz
NCAIM	National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms
POA	fenoxi-ecetsav
ROS	reaktív oxigén részecskék (reactive oxygen species)
SOD	szuperoxid dizmutáz

7. IRODALMI HIVATKOZÁSOK

- Coppola, S. & Ghibelli, L. (2000) GSH extrusion and the mitochondrial pathway of apoptotic signalling. *Biochemical. Soc. Trans.*, **28**, 56-61.
- Davis, W., Ronai, Z. and Tew, K.D. (2001) Cellular thiols and reactive oxygen species in drug-induced apoptosis. *J. Pharm. Experim. Therap.*, **296**, 1-6.
- Dickinson, K., Keer, V., Hitchcock, C. A. and Adams, D. J. (1989) Chitinase activity from *Candida albicans* and its inhibition by allosamidin. *J. Gen. Microbiol.*, **135**, 1417-1421.
- Emri, T., Pócsi, I. and Szentirmai, A. (1997) Phenoxyacetic acid induces glutathione-dependent detoxification and depletes the glutathione pool in *Penicillium chrysogenum*. *J. Basic Microbiol.*, **37**, 181-186.
- Emri, T., Pócsi, I. and Szentirmai, A. (1998) Changes in the glutathione (GSH) metabolism of *Penicillium chrysogenum* grown on different nitrogen, sulphur and carbon sources. *J. Basic Microbiol.* **38**, 3-8.
- Emri, T., Leiter, É., Pócsi, I. (2000) Effect of phenoxyacetic acid on the glutathione metabolism of *Penicillium chrysogenum*. *J. Basic Microbiol.* **40**, 93-104.
- Gooday, G.W., Zhu, W.-Y. and O'Donnell, R. W. (1992) What are the roles of chitinases in the growing fungus? *FEMS Microbiol. Lett.*, **100**, 387-392.
- Gooday, G.W. (1997) The many use of chitinases in Nature. *Chitin Chitosan Res.*, **3**, 233-243.
- Hansberg, W., Aguirre, J. (1990) Hyperoxidant states cause microbial cell differentiation by cell isolation from dioxygen. *J. Theor. Biol.*, **142**, 201-221.

- Hansberg, W., de Groot, H., Sies, H. (1993) Reactive oxygen species associated with cell differentiation in *Neurospora crassa*. *Free Rad. Biol. Med.* **14**, 287-293.
- Harman, D. (1993) Free radical involvement in aging. *Drugs Aging*, **3**, 60-80.
- Karaffa, L., Váczy, K., Sándor, E., Biro, S., Szentirmai, A., Pócsi, I. (2001) Cyanide-resistant alternative respiration is strictly correlated to intracellular peroxide levels in *Acremonium chrysogenum*. *Free Rad. Res.* **34**, 405-416.
- Lledías, F., Rangel, P. & Hansberg, W. (1999) Singlet oxygen is part of a hyperoxidant state generated during spore germination. *Free Rad. Biol. Med.*, **26**, 1396-1404.
- McIntyre, M., Berry, D. R. and McNeil, B. (1999) Response of *Penicillium chrysogenum* to oxygen starvation in glucose- and nitrogen-limited chemostat cultures. *Enzyme Microb. Technol.*, **25**, 447-454.
- Nielsen, J. (1995) *Physiological Engineering Aspects of Penicillium chrysogenum*. Polyteknisk Forlag, Lyngby, 1995.
- Penninckx, M.J., Elskens, M.T. (1993) Metabolism and functions of glutathione in micro-organisms. *Adv. Microbial Physiol.*, **34**, 239-301.
- Rast, D. M., Horsch, M., Furter, R., Gooday, G. W. (1991) A complex chitinolytic system in exponentially growing mycelium of *Mucor rouxii*: properties and function. *J. Gen. Microbiol.*, **137**, 2797-2810.
- Rast, D. M., Merz, R. A., Jeanguenat, A. and Mössinger, E. (2000) Enzymes of chitin metabolism for the design of antifungals. In *Advances in Chitin Science*, Vol. 4, ed. by Peter, M. G., Domard, A. and Muzzarelli, R. A. A., University of Potsdam, Potsdam, pp. 479-505.
- Sándor, E., Pusztahelyi, T., Karaffa, L., Karányi, Z., 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 the fungus. *FEMS Microbiol. Lett.*, **164**, 231-236.
- Takaya, N., Yamazaki, D., Horiuchi, H., Ohta, A., Takagi, M. (1998) Cloning and characterization of a chitinase-encoding gene (*chiA*) from *Aspergillus nidulans*, disruption of which decreases germination frequency and hyphal growth. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 60-65.
- Wessels, J.H.G. (1984) Apical hyphal wall extension. Do lytic enzymes play a role? In *Microbial Cell Wall Synthesis and Autolysis*, ed. by Nombela, C., Elsevier, Amsterdam, pp. 31-42.
- White, S., Berry, D. R. and McNeil, B. (1999) Effect of phenylacetic acid feeding on the process of cellular autolysis in submerged batch cultures of *Penicillium chrysogenum*. *J. Biotechnol.*, **75**, 173-185.
- White, S., McIntyre, M., Berry, D.R., McNeil, B. (2002) The autolysis of industrial filamentous fungi. *Crit. Rev. Biotechnol.*, **22**, 1-14.
- Witteveen, C.F.B., van de Vondervoort, P.J.I., van den Broeck, H.C., van Engelenburg, F.A.C., de Graaff, L.H., Hillebrand, M.H.B.C., Schaap, P.J., Visser, J. (1993) Induction of glucose oxidase, catalase, and lactonase in *Aspergillus niger*. *Curr. Genet.*, **24**, 408-416.

8. KÖZLEMÉNYEK

Cikkek

1. Pócsi, I., Emri, T., Varecza, Z., Sámi, L. and Pusztahelyi, T. (1999) Allosamidin inhibits the fragmentation and autolysis of *Penicillium chrysogenum*. in: Advances in Chitin Sciences. Edd.: Peter, M.G., Domard, A. and Muzzarelli, R.A.A. Vol.4. pp.:558-564.

2. Emri, T., Sámi, L., Szentirmai, A. and Pócsi, I. (1999) Nitrate assimilation and oxidative stress responses in *Penicillium chrysogenum*. *J. Basic Microbiol.*, **39**(2), 109-115. **Impakt faktor: 0.421**

Hiv: 1. Theilgaard, H.A., van der Berg, M.A., Mulder, C.A., Bovenberg, A.L. and Nielsen, J. (2001) *Biotechnol. Bioeng.*, **72**, 379-388.

3. Pócsi, I., Sámi, L., Leiter, É., Majoros, L., Szabó, B., Emri, T. and Pusztahelyi, T. (2001) Searching for new-type antifungal drugs. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.*, **48**, 533-543.

4. Pócsi, I., Emri, T., Sámi, L., Leiter É. and Szentirmai, A. (2001) The glutathione metabolism of the β -lactam producer filamentous fungus *Penicillium chrysogenum*. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.*, **48**, 393-411.

5. Sámi, L., Emri, T. and Pócsi, I. (2001) Autolysis and aging of *Penicillium chrysogenum* cultures under carbon starvation: III: glutathione metabolism and formation of reactive oxygen species. *Mycol. Res.*, **105**, 1246-1250. **Impakt faktor: 1.346**

Hiv: 1. Madeo, F., Engelhardt, S., Herker, E., Lehmann, N., Maldener, C., Proksch, A., Wissing, S. and Fröhlich, K.-U. (2002) *Curr. Genet.*, **41**, 208-216.

2. Radman, R., Saez, T., Bucke, C. and Keshavarz, T. (2003) *Biotechnol. Appl. Biochem.* **37**, 91-102.

6. Sámi, L., Pusztahelyi, T., Emri, T., Varecza, Z., Fekete, A., Grallert, Á., Karányi, Zs., Kiss, L. and Pócsi, I. (2001) Autolysis and aging of *Penicillium chrysogenum* cultures under carbon starvation: IV: chitinase production and antifungal effect of allosamidin. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **47**, 201-211. **Impakt faktor: 0.512**

Hiv: 1. Fusetti, F., von Moeller, H., Houston, D., Rozeboom, H.J., Dijkstra, B.W., Boot, R.G., Aerts, J.M.F.G. and van Aalten, D.M.F. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 25537-25544.

2. Houston, D.R., Eggleston, I., Synstad, B., Eijssink, V.G. and van Aalten, D.M. (2002) *Biochem. J.* **368**, 23-27.

7. Emri, T., Oláh, B., Sámi, L., Molnár, Zs., Nagy, M., Pusztahelyi, T. and Pócsi, I. (2002) Investigation of glutathione metabolism in filamentous fungi. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.*, **49**, 267-276.

8. Sámi, L., Karaffa, L., Emri, T. and Pócsi, I. (2003) Autolysis and aging of *Penicillium chrysogenum* cultures under carbon starvation: V: respiration and glucose oxidase production. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.*, In Press.

9. Emri, T., Oláh, B., Sámi, L., Pócsi, I. (2003) Does the detoxification of penicillin side-chain precursors depend on microsomal monooxygenase and glutathione S-transferase in *Penicillium chrysogenum*? *J. Basic Microbiol.*, **43** (4), 287-300. **Impakt faktor: 0.421**

10. Pócsi, I., Pusztahelyi, T., Sámi, L., Emri, T. (2003) Autolysis of *Penicillium chrysogenum* – A Holistic Approach. *Ind. J. Biotechnol.*, In Press.

Poszterek, előadások

I. Hazai konferenciák:

1. Sámi, L., Emri, T., Pócsi, I. and Szentirmai, A. (1998) Nitrate assimilation and oxidative stress responses in *Penicillium chrysogenum*. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 15. Nagygyűlése, Miskolc, 1998.

2. Sámi, L., Emri, T., Szentirmai, A. and Pócsi, I. (1999) Protection against oxidative stress in *Penicillium chrysogenum* cells grown on nitrate or nitrite. I. Magyar Mikológiai Konferencia, Budapest, 1999.

3. Pócsi, I., Emri, T., Sámi, L., Varecza, Z., Pusztahelyi, T., Grallert, Á. Kiss, L. (2000) Az allóزامidin hatása öregedő *Penicillium chrysogenum* tenyészetek fragmentálódására, autolízisére és kriptikus növekedésére. A Magyar Kemoterápiai Társaság 15. Konferenciája, Hajdúszoboszló, 2000.

4. Sámi, L., Emri, T., Varecza, Z., Pusztahelyi, T., Pócsi, I. (2000) Fragmentation, autolysis and cryptic growth in ageing *Penicillium chrysogenum* cultures. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 17. Nagygyűlése, Keszthely 2000.

5. Pócsi, I., Emri, T., Sámi, L. and Pusztahelyi, T. (2000) The glutathione metabolism of the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum*. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 17. Nagygyűlése, Keszthely, 2000.

6. Sámi L., Emri T. és Pócsi I. (2000) A dioxigén kizárási elmélet alkalmazhatósága a *Penicillium chrysogenum* autolízisekor és a túlélő morfológiai formák csírázásakor. IX. Fermentációs Kollokvium, Debrecen, 2000.

7. Pócsi, I., Sámi, L., Leiter, É., Majoros, L., Szabó, B., Emri, T., Pusztahelyi, T. (2001) Új típusú antifungális szerek kutatása. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 18. Nagygyűlése, Balatonfüred, 2001.

8. Pócsi, I., Sámi, L., Pusztahelyi, T. és Emri, T. (2001) A *Penicillium chrysogenum* autolízise és öregedése. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 18. Nagygyűlése, Balatonfüred, 2001.

9. Sámi, L., Karaffa, L., Emri, T. és Pócsi, I. (2002) Légzés és glükóz oxidáz termelés *Penicillium chrysogenum* tenyészetekben. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 19. Nagygyűlése, Balatonfüred, 2002.

II. Külföldi konferenciák:

1. Pócsi, I., Emri, T., Varcza, Z., Sámi, L. and Pusztahelyi, T. (1999) Allosamidin inhibits the fragmentation and autolysis of *Penicillium chrysogenum*. Euchis'99 – 3rd International Conference of the European Chitin Society, University of Potsdam.

2. Pócsi, I., Sámi, L., Emri, T., Varcza, Z. and Pusztahelyi, T. (2001) Antifungal effect of allosamidin on autolysing *Penicillium chrysogenum* cultures. 3rd International Symposium on Chitin Enzymology and 4th Conference of the European Chitin Society, University of Ancona, Ancona, Italy.

3. Pócsi, I., Emri, T., Sámi, L. and Pusztahelyi, T. (2002) Autolysis of *Penicillium chrysogenum* - physiological characterization of the post-autolytic phase of growth. VIII. International Fungal Biology Conference, Guanajuato, Mexico.