

EGYETEMI DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

***A *PENICILLIUM CHRYSOGENUM* LAKTÓZ
HASZNOSÍTÁSÁNAK VIZSGÁLATA***

Nagy Zoltán

Témavezető: Dr. Biró Sándor

Debreceni Egyetem
Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék

2002

BEVEZETÉS

A penicillin ipari előállítása *Penicillium chrysogenum*mal történik. Régóta ismert, hogy a bioszintézis szénforrás szabályozás alatt áll. Könnyen metabolizálható szénforrásokon (glükóz, fruktóz, galaktóz) a penicillin titer alacsony, míg nehezebben metabolizálható szénforráson (laktóz) a titer magas. A glükóz és más könnyen hasznosítható szénforrások represszálják a penicillin bioszintetikus gének expresszióját, ám laktózt használva szénforrásként, ilyen represszió nem megfigyelhető meg. Éppen ezért sokáig a penicillin termelés laktóz szénforráson történt. Ma az optimális titer elérését szubrepresszálo mennyiségű glükóz adagolásával oldják meg. Mivel általában a gombák jobban nőnek glükózon, mint laktózon, ezek alapján úgy tűnik, hogy szuboptimális növekedési körülmények kedveznek a penicillin termelésnek (Brakhage, A. A., 1998. Molecular regulation of β -lactam biosynthesis in filamentous fungi. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **62**: 547-585). Noha *Penicillium chrysogenum*ban a glükóz represszálo hatására és a penicillin bioszintézis szabályozásában betöltött szerepére vonatkozólag elég sok ismeret áll rendelkezésre, addig a laktóz hasznosításáról és annak szabályozásáról csak alig, pedig ennek megértése közelebb vihetne nagyobb termelőképességű törzsek előállításához és tenyésztésük optimalizálásához.

A laktóz hasznosítás vizsgálata abból a szempontból is érdekes, hogy a *Penicillium chrysogenum* természetes körülmények között a laktózzal mint szénforrással gyakorlatilag nem „találkozhatott”, ellentétben sok baktériummal, élesztővel és fonalas gombával, amelyek számára potenciális szénforrás, így a laktóz hasznosítás mechanizmusának tanulmányozása alternatív hasznosítási útra, szabályozó rendszerre világíthat rá. A mechanizmusok sokféleségére, olykor fajon belüli több út párhuzamos meglétére, és a szabályozás bizonyos elemeinek szinte faj specifikus voltára, már eddig is számos tanulmány rámutatott.

A laktóz hasznosítás kulcslépése, a molekula hidrolízise glükózra és galaktózra. A reakciót, a glikozid-hidrolázok közé tartozó, β -galaktozidáz aktivitással rendelkező enzimek katalizálják, melyek megtalálhatók az állatokban, a növényekben és a mikroorganizmusokban is. A baktériumok, az élesztők és a fonalas gombák β -galaktozidáza általában intracelluláris enzim, és a tápközegben jelenlévő laktózzal indukálható, de számos fajban az enzim extracelluláris.

Ismert tény, hogy a glükóz és más gyorsan hasznosuló cukrok gátolják a β -galaktozidáz szintézisét karbon repressziót előidézve. Legalaposabban az *Escherichia coliban* tanulmányozták az enzimet és az enzim termelődésének szabályozását.

Sokáig a karbon katabolit represszióknak csak az *Escherichia coliban* megfigyelt cAMP-függő mechanizmusa volt részleteiben ismert. A katabolit érzékeny enzimeknek, mint például a β -galaktozidáznak, glükóz jelenlétében mért alacsony aktivitása és az alacsony cAMP szint közötti összefüggés jól demonstrálható. Később két cAMP-től független katabolit represszió mechanizmus is ismertté vált baktériumokban, az egyik *Escherichia coliban*, a másik *Bacillus subtilisben* (Saier, M. H. Jr. 1996. Cyclic AMP-independent catabolite repression in bacteria. FEMS Microbiol. Lett. **138**: 97-103.).

Élesztőkben és más gombákban az eddig vizsgáltak alapján a glükóz represszió mechanizmusa teljesen eltérő a baktériumokétól. A glükóz represszióban nem vesz részt közvetlenül a cAMP, s amennyiben szerepe van, az lényegesen eltér a baktériumokban megismerttől (Ronne, H. 1995. Glucose repression in fungi. TIG. **11**: 12-17.). Ismereteink azonban ezen a területen elég hiányosak. A katabolit represszió mechanizmusában a kulcsszerepet „cink-ujj” típusú fehérjék játsszák, mint például élesztőkben a MIG, *Aspergillusban* a CREA represszor fehérjék. Fonális gombákban a karbon represszió mechanizmusa az antibiotikum termeléssel kapcsolatban a leginkább ismert. A szénforrás bizonyítottan több ponton is szabályozza az antibiotikum bioszintézist, és úgy tűnik, hogy a penicillin termelés karbon repressziójának mechanizmusa azonosságot mutat a szénhidrát hasznosítás mechanizmusával *Penicillium chrysogenumban*. A β -galaktozidáz szerepének és szabályozásának vizsgálata további támpontokkal szolgálhat a két mechanizmus közötti összefüggések tisztázásához. β -galaktozidáz aktivitással rendelkező enzimet/enzimeket már számos gombából tisztítottak és meghatározták sajátságaikat. Ezek a vizsgálatok azonban főként extracelluláris enzimekre irányultak, melyek más mikroorganizmusokban megtalálható β -galaktozidázokkal összehasonlítva, magasabb hőmérsékleten is stabilak és alacsonyabb pH-n is jól működnek. Ezen kísérletek célja főként az volt, hogy az enzimet az iparban (pl.: élelmiszeriparban), vagy glikokonjugátumok szintéziséhez használják. Magát az enzimtermelést és a szabályozódását azonban csak néhány esetben vizsgálták.

Mivel *Penicillium chrysogenumban* még nem tanulmányozták a laktóz hasznosítás mechanizmusát, ezért munkánk során ennek vizsgálatát tűztük ki célul.

Elsősorban azokat a jelenségeket tanulmányoztuk, amelyek a laktóznak, mint szénforrásnak a felhasználásával kapcsolatosak, és azokra a kérdésekre igyekeztünk választ adni, amelyek az eddig ismert mechanizmusok ismeretében felvetődnek, megalapozva ezzel egy átfogóbb élettani, genetikai vizsgálatot. Ehhez, egy a tanszékünkön rendelkezésre álló, ipari termelésben használt *Penicillium chrysogenum* törzset használtunk. Vizsgáltuk a β -galaktozidáz intracelluláris termelődését, indukálhatóságát, karbon repressziójának mechanizmusát. Kísérleteinkben a különböző szénforrások hatására bekövetkező enzimaktivitás változást, valamint ezzel párhuzamosan a különböző nukleotidok sejten belüli szintjét mértük, különös tekintettel a cAMP-re. A β -galaktozidáz enzimatis és genetikai jellemzésével együtt, próbáltunk összefüggést keresni a kapott eredmények között és az eddig ismert mechanizmusokkal összevetve a karbon represszió mechanizmusára következtetni.

Ennek alapján a következő vizsgálatokat tűztük ki célul:

1. Hol történik a laktóz hidrolízise, sejten belül vagy kívül? A hidrolízisért felelős β -galaktozidáz intracelluláris vagy extracelluláris? Hogyan változik az aktivitás a tenyésztés során?
2. Különböző szénforrások, hogyan befolyásolják a gomba növekedését? Mely szénforrásokon tapasztalható β -galaktozidáz termelés? Indukálható-e az enzim szintézise? Mennyire hatékony az enzim a laktóz hasznosítása szempontjából?
3. Hogyan befolyásolja a glükóz és más könnyen hasznosuló szénforrás az enzim termelését? Mely szénforrások represszálják a β -galaktozidáz aktivitást? Megfigyelhető-e az enzim szintézis derepressziója?
4. Van-e összefüggés a β -galaktozidáz aktivitás és a sejten belüli cAMP szint között? Lehet-e szerepe a cAMP-nek az enzim termelés szabályozásában? A foszfodiészteráz inhibitor koffein milyen hatással van a szénforrás szabályozásra? A cAMP homológ 6-N-2-O-dibutiril-ciklikus-AMP (dBcAMP) befolyásolja-e a β -galaktozidáz termelést?
5. Milyen enzimatis sajátosságokkal rendelkezik a tisztított enzim? Milyen hasonlóságot mutat más mikrobiális β -galaktozidáz enzimekkel?
6. Hány β -galaktozidáz aktivitással rendelkező enzimet kódoló struktúr gén azonosítható *Penicillium chrysogenum*-ban?
7. Milyen más fehérjék vehetnek részt az enzimműködés szabályozásában?

ALKALMAZOTT VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

Kísérleteinkhez az ipari penicillin termelésben felhasznált *Penicillium chrysogenum* NCAIM 00237 számú törzs folyékony, rázatott tenyészetét használtuk. A β -galaktozidáz, hexózaminidáz, α -glükózidáz, β -glükózidáz aktivitást, valamint a tápközeg glükóz tartalmát spektrofotometriásan határoztuk meg. A tápközeg laktóz tartalmát és a sejten belüli nukleotidok koncentrációját HPLC segítségével mértük. A tenyészetek ammónia koncentrációját ammónia-szenzitív elektróddal detektáltuk. Az intracelluláris β -galaktozidáz enzim tisztítását ammónium-szulfátos kicsapással, ioncserélő kromatográfiával, affinitás kromatográfiával és kromatofókuszálással végeztük. A tisztítási lépéseket, az enzim alegységeinek molekulatömegét és a proteáz aktivitást SDS- és natív poliakrilamid gélelektroforézissel követtük és azonosítottuk. Az enzim natív molekulatömegét Sephacryl S-300 géliszűrő oszlopon határoztuk meg. Az N-terminális aminosav szekvenciák meghatározásához a fehérjét „Semi-Dry System (Single Transfer)” (Millipore Corporation) elektroblottoló módszerrel blottoltuk polvinilidén-fluorid membránra. Az aminosav szekvenciák meghatározása Edman degradációval történt. A munkánk során alkalmazott alapvető molekuláris biológiai módszereket (kromoszómális DNS izolálás, agaróz gélelektroforézis, DNS fragmentumok amplifikálása polimeráz láncreakcióval, plazmid izolálás *E. coli*ből, Southern hibridizáció) a J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis; 1989. Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Second Edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press kézikönyvében található protokollok alapján végeztük. A PCR termék klónozását „Zero Blunt™ PCR Cloning Kit” (Invitrogen) használatával végeztük. A DNS fragmentum szekvenálása ABI 373 automata szekvenátorral (Applied Biosystems) történt. A hibridizáció immunológiai detektálását „DIG Nucleic Acid Detection Kit” (Boehringer Mannheim) alapján végeztük.

EREDMÉNYEK

Fiziológiai vizsgálatok

- Kísérleteink azt mutatták, hogy az általunk vizsgált *Penicillium chrysogenum* törzsben a β -galaktozidáz aktivitás sejthez kötött. Jelentősebb extracelluláris aktivitást csak a sejtlízis megindulása után tapasztaltunk. Az intracelluláris β -galaktozidáz aktivitás a növekedés 60-70 órás szakaszában érte el maximumát 2 % laktóz szénforrást tartalmazó komplex tápoldatban.
- A legjobb szénforrásnak a könnyen metabolizálódó glükóz, szacharóz és érdekes módon a galaktóz bizonyult, mindhárom esetben gyors növekedést tapasztaltunk. A tenyészetek körülbelül a 48. órára érték a legnagyobb biomassza tömeget, ezután a növekedés megállt és a sejtek lízise is megindult. A glicerint, bár az előbbi szénforrásoknál lassabban metabolizálódott, szintén kielégítő növekedést biztosított. Szemben *Aspergillus nidulans*-szal és más fajokkal, kísérleteinkben a laktóz nehezen metabolizálható szénforrásnak bizonyult, amit a gyenge növekedés és a lassú laktóz fogyás is mutatott. A laktóz szénforráson nőtt tenyészetben magas kezdeti ammóniatermelés volt megfigyelhető, ami ebben az esetben azt mutatja, hogy a gomba számára a pepton könnyebben hozzáférhető energiaforrás, mint a laktóz.
- *Penicillium chrysogenum*-ban az általunk vizsgált szénforrások közül csak a laktózon nőtt tenyészetekben volt magas a β -galaktozidáz aktivitás. Glükóz, szacharóz, galaktóz és glicerint szénforráson nőtt *Penicillium chrysogenum* tenyészetekben gyakorlatilag nem lehetett β -galaktozidáz aktivitást detektálni az exponenciális növekedési fázisban. A megvizsgált szénforrások közül csak a laktóz indukálta az enzimszintézist, a többi, köztük a galaktóz, nem. Ez ellentétes azzal, amit más fonalas gombákban (pl.: *Aspergillus nidulans*-ban, *Neurospora crassa*-ban) és élesztőkben tapasztaltak, ahol a laktóz és a galaktóz is indukálta az enzimszintézist.
- Ha glükózt, galaktózt, szacharózt vagy glicerint adtunk laktózon nőtt tenyészetekhez, az enzimszint lecsökkent, s mindaddig alacsony maradt míg ezek a szénforrások el nem fogytak. A galaktóz tehát nemcsak nem indukálta, de a glükózhoz, szacharózhoz és glicerinhoz hasonlóan, még represszálta is a β -galaktozidáz bioszintézist. A glükóz represszáló hatása, hasonlóan a penicillin bioszintézis repressziójához, koncentráció függő a β -galaktozidáz termelés szabályozásában.

- Glükóz szénforráson, komplex tápoldatban nőtt tenyészetben tapasztalt összefüggés a glükóz elfogyása, a növekedés leállása és az alacsony β -galaktozidáz aktivitás megjelenése között arra enged következtetni, hogy *Penicillium chrysogenum*-ban az enzimnek egy indukció nélküli, derepresszált szintézise is megtalálható. A derepresszió mértéke alacsony, de szignifikáns volt.

- Eredményeink azt mutatták, hogy a laktózon nőtt sejtekben viszonylag magas a cAMP szint, míg glükózon nőtt sejtekben alacsony. Glicerinen nőtt tenyészetben nem volt detektálható mennyiségű cAMP jelen, ám szacharózon, a laktózhoz hasonlóan jól detektálható cAMP szintet mértünk. Mivel a glükózhoz hasonlóan erősen represszálta a β -galaktozidáz szintézist és fokozta a növekedést, feltételezhető, hogy *Penicillium chrysogenum*-ban sincs, hasonlóan más fonalas gombákhoz, közvetlen összefüggés a cAMP szint és a karbon represszió illetve szénéhezés között.

A koffein hatását vizsgáló kísérletek eredményei azt mutatták, hogy a cAMP nem befolyásolta közvetlenül a β -galaktozidáz szintézist. Elfogadva, hogy a koffein fő hatása a cAMP szint megemelése, a cAMP-nek nincs szerepe a β -galaktozidáz szintézis karbon repressziójában, viszont erősen gátolta a glükóz fogyást, ami feltehetőleg a glükóz felvétel gátlásának tulajdonítható.

A dBcAMP-vel végzett kísérletek során azt tapasztaltuk, hogy ez a cAMP analóg nem volt hatással sem a növekedésre, sem a β -galaktozidáz aktivitásra.

- Ezek az eredmények, összevetve a penicillin bioszintézis szénforrás szabályozásáról eddig rendelkezésre álló ismeretekkel, megerősítik azt a feltételezést, mely szerint a szénhidrát hasznosítás és a penicillin bioszintézis szénforrás szabályozása hasonló mechanizmus révén valósulhat meg.

Enzimológiai vizsálatok

- Munkánk során *Penicillium chrysogenum*-ból származó, intracelluláris β -galaktozidáz aktivitással rendelkező enzimet tisztítottunk és jellemeztünk. A tisztítás eredményeként 66-szoros tisztulást és 8 % kitermelést sikerült elérni. Az enzim széles pH optimumot mutatott a pH=4-5 közötti tartományban, ahol maximális aktivitásának több mint 95 %-át megőrizte. A β -galaktozidáz aktivitás hőmérséklet optimuma 27 és 37 °C közé esett. Izoelektromos pontja pH=4,6 volt. Az enzim kinetikai paraméterei szintetikus szubsztátjára (ONPG) nézve $K_m=1,81$ mM, $V_{max}=40$ nkat/mg, laktózra

vonatkozólag $K_m=27,02$ mM, $V_{max}=9,2$ nkat/mg adódott. Az enzim K_m értékei nagy azonosságot mutatnak *Aspergillus nidulans*ban és *Aspergillus oryzae*ban mért értékekkel. Az enzim szubsztrátspecifitását vizsgálva azt kaptuk, hogy hidrolizálta az ONPG-t, a PNP-GlcNAc-ot és a laktózt, ám a többi vizsgált szubsztrátot nem.

- A szubsztrátspecifitási vizsgálatok azt mutatták, hogy a tisztított enzim hexóزامинидáz aktivitással is rendelkezett. Összehasonlítva enzimátikus sajátosságait a szintén *Penicillium chrysogenum*ból tisztított N-acetil- β -D-hexóزامинидázzal (Pusztahelyi, T. 1997. Öregedő *Penicillium chrysogenum* tenyészetek élettani vizsgálata. Ph.D. értekezés. Kossuth Lajos Tudományegyetem, Debrecen), a következőket kaptuk. A kinetikai paraméterek alapján a β -galaktozidáz nem rendelkezett olyan nagy hexóزامинидáz aktivitással, mint az N-acetil- β -D-hexóزامинидáz, de a β -galaktozidáz aktivitáshoz képest, ez igen jelentős volt. Lényeges különbség, hogy a tisztított N-acetil- β -D-hexóزامинидáz nem hidrolizálta sem a laktózt, sem a β -galaktozidázok legjobb szintetikus szubsztrátját, az ONPG-t. Emellett jelentős volt az eltérés a két enzim hőmérséklet optimumában is. A β -galaktozidáz egy elég nagy méretű, tetramer fehérje, az N-acetil- β -D-hexóزامинидáz dimer szerkezetű *Penicillium chrysogenum*ban. Lényeges hasonlóság, hogy a két enzim alegységeinek molekulatömegei (gyakorlatilag) megegyeztek. Az alegységek N-terminális aminosav sorrendjét meghatározva és összehasonlítva, azt kaptuk, hogy a β -galaktozidáz N-terminális szekvenciája megegyezik az N-acetil- β -D-hexóزامинидáz szignál szekvenciát követő 99-113 aminosav szekvenciájával, ami közvetlenül egy KR (Liz-Arg) hasító hely után következik (Diez, B.; Barredo, J. L. 1998. The beta-N-acetylhexosaminidase encoding gene from *Penicillium chrysogenum*. *Adva. Antibioticos* 59-61.).

- *Penicillium chrysogenum* esetében a β -galaktozidázzal két másik, nehezen elválasztható fehérje tisztult együtt. Meghatározva ennek a két fehérjének az N-terminális aminosav szekvenciáját, azt kaptuk, hogy a 83 kDa méretű fehérje aminosav szekvenciája egy *Aspergillus fumigatus*ból származó dipeptidil peptidáz szignálszekvenciát követő szekvenciájával mutatott nagy homológiát (Beauvais, A.; Monod, M.; Svab, J.; Kobayashi, H.; Diauqin, M.; Hovanessian, A. G.; Latge, J. P. 1997. Biochemical and antigenic characterization of a new dipeptidyl-peptidase isolated from *Aspergillus fumigatus*. *J. Biol. Chem.* **272(10)**: 6238-6244.). A másik, 78 kDa méretű, együtt tisztuló fehérje proteáz aktivitással rendelkezett, melyhez Ca^{2+} jelenléte volt szükséges, de N-terminális aminosav szekvenciája nem mutatott jelentős

homológiát más ismert szekvenciával. Ezek a fehérjék, feltételezéseink szerint, az enzim poszttranszlációs érésében működhetnek közre.

Genetikai vizsgálatok

- A *Penicillium chrysogenum* β -galaktozidáz és N-acetil- β -D-hexózáminidáz genetikai vizsgálatainak eredményeként, a β -galaktozidáz aktivitással rendelkező fehérje N-terminális aminosav sorrendje alapján tervezett jelölt oligonukleotiddal végzett hibridizációs kísérlet során egyetlen hibridizáló fragmentumot találtunk az emésztett genomiális DNS-ben. Ez a 45 bázis hosszúságú oligonukleotid az N-acetil- β -D-hexózáminidáz gén 5' végének 1618-1662-ig tartó bázissorrendjével is megegyezik. Tekintve, hogy a hibridizáció során csak egyetlen szignált kaptunk és az általunk tervezett primerekkel amplifikált 689 bp hosszúságú DNS fragmentum szekvenciája, mely a hibridizálódó szakaszt is magában foglalta, 100 %-ig megegyezett az N-acetil- β -D-hexózáminidáz gén 1618-2306 közötti szakaszának bázissorrendjével, feltételezhető, hogy *Penicillium chrysogenum*-ban a β -galaktozidáz és az N-acetil- β -D-hexózáminidáz enzimek alegységeit egyetlen, közös gén kódolja.
- A *Penicillium chrysogenum* β -galaktozidáz és N-acetil- β -D-hexózáminidáz lehetséges közös génjének, meghatározott aminosav szekvenciájának, és az enzimek néhány sajátosságának egyezése, illetve a tisztított β -galaktozidáz hexózáminidáz aktivitása alapján feltételezzük, hogy az ipari, penicillin termelő törzsben a laktóz bontását egy egyéb aktivitással/aktivitásokkal is rendelkező, a laktózt viszonylag rosszul bontó glikohidroláz végzi. Ez is magyarázhatja, hogy a laktóz nehezen metabolizálható szénforrás, és más fajoktól eltérő szabályozást mutat. A fehérje érése/aktiválása poszttranszlációs proteolízissel történhet.

KÖZLEMÉNYEK

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Z. Nagy, T. Kiss, A. Szentirmai, S. Biró: β -Galactosidase of *Penicillium chrysogenum*: Production, Purification, and Characterization of the Enzyme. Protein Expression and Purification, 21(1), 24-29 (2001). Impf.: 1,569

Z. Nagy, Zs. Keresztessy, A. Szentirmai, S. Biró: Carbon source regulation of β -galactosidase in *Penicillium chrysogenum*. J. Basic Microbiol. 41(6), 351-362 (2001). Impf.: 0,613

Z. Nagy, A. Szentirmai, S. Biró: A multifunctional glycohydrolase is responsible for lactose utilisation in an industrial *Penicillium chrysogenum* strain. Előkészületben.

Előadások, poszterek

Nagy Z., Keresztessy Zs., Szentirmai A., Biró S.: Katabolit represszió vizsgálata *Penicillium chrysogenum*-ban. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 15. Nagygyűlése, Miskolc 1998.

Nagy Z., Szentirmai A., Biró S.: Purification and properties of β -galactosidase from *Penicillium chrysogenum*. 13th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Budapest 1999.

Nagy Z., Szentirmai A., Biró S.: Carbon catabolite repression of β -galactosidase biosynthesis by *Penicillium chrysogenum*. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2000. évi Nagygyűlése, 2000.

Nagy Z., Szentirmai A., Biró S.: Laktóz metabolizmus *Penicillium chrysogenum*-ban: mely enzim hidrolizálja a laktózt? A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2001. évi Nagygyűlése, 2001.

Egyéb publikációk

J. Kerékgyártó, **Z. Nagy**, Z. Szirmai: Synthesis of spacer-armed carbohydrate model compounds. Carbohydrate Research, 297, 107-115 (1997). Impf.: 1,606

Z. Nagy, A. Szentirmai, A. J. Clutterbuck, S. Biró: Isolating and mapping β -galactosidase negative mutants of *Aspergillus nidulans* and *Penicillium chrysogenum*. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 46 (2-3), 342 (1999).

Nagy Z., A. J. Clutterbuck., Szentirmai A., Biró S.: *Aspergillus nidulans* β -galaktozidáz mutáns izolálása és térképezése, I. Magyar Mikológiai Konferencia, Budapest 1999.