

**Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei**  
**Thesis of PhD dissertation**

**A *PENICILLIUM CHRYSOGENUM* FONALAS GOMBA  
LAKTÓZ ÉS D-GALAKTÓZ ANYAGCSERÉJÉNEK VIZSGÁLATA**

**LACTOSE AND D-GALACTOSE METABOLISM IN THE FILAMENTOUS  
FUNGUS *PENICILLIUM CHRYSOGENUM***

**Dr. Vasasné Jónás Ágota**

Témavezető/Supervisor: Dr. Karaffa Levente



**DEBRECENI EGYETEM**  
**Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola**

**Debrecen, 2016**

## TARTALOMJEGYZÉK

<b>1. BEVEZETÉS</b> .....	3
3.1. A gombák laktóz anyagcseréjének áttekintése.....	3
3.2. A gombák D-galaktóz anyagcseréjének áttekintése.....	4
<b>2. CÉLKITŰZÉS</b> .....	5
<b>4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK</b> .....	5
4.1. Törzsek és tenyésztési körülmények.....	5
4.2. Sejtmentes kivonatok és tápoldat minták készítése.....	7
4.3. Genomiális DNS és totál RNS izolálás.....	7
4.4. Northern-blot és reverz transzkriptáz-PCR (RT-PCR) analízis.....	7
4.5. Analitikai módszerek.....	9
4.6. Hidroláz vizsgálatok.....	9
<b>5. EREDMÉNYEK</b> .....	10
5.1. A <i>Penicillium chrysogenum</i> növekedése laktózon.....	11
5.1.1. Az extra- és intracelluláris $\beta$ -galaktozidáz tevékenység időprofiljai.....	11
5.1.2. A feltételezett bGal és laktóz permeáz gének expressziós profilja.....	12
5.2. A <i>Penicillium chrysogenum</i> növekedése D-galaktózon.....	15
5.2.1. A Leloir-útvonal expressziója D-galaktózon és egyéb cukrokon.....	16
<b>7. ÖSSZEFOGLALÁS</b> .....	18
<b>9. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK</b> .....	19
<b>10. IRODALOMJEGYZÉK</b> .....	20
<b>HITELESÍTETT PUBLIKÁCIÓS LISTA</b> .....	22

# 1. BEVEZETÉS

## 1.1. A gombák laktóz anyagcseréjének áttekintése

A heterodiszacharid laktóz (1,4-O- $\beta$ -D-galaktopiranozil-D-glükóz) kizárólag a tejben fordul elő, ahol a szárazanyag-tartalom 2-8%-át teszi ki (Roelfsema és mtsai. 2010). A laktóz szintetáz nevű enzim hozza létre, amely a galaktozil egységet az UDP-galaktózzal a D-glükózra helyezi (Brüssow és mtsai. 2013). A bélben a laktózt a membránhoz kötött laktáz/florizin hidroláz hasítja monomerjeire (laktóz galaktohidroláz; EC 3.2.1.108), ami a 35-ös glikozil hidroláz család tagja (Naz és mtsai. 2011). A tejsavó a sajtgyártás laktózban gazdag mellékterméke, amit olcsó növekedési szubsztrátumként régóta használnak értékes metabolitok előállítására; ilyen például a fonalas gombák által termelt penicillin vagy a (hemi)cellulolitikus enzimek (Persson és mtsai. 1991, Brakhage és mtsai. 1998). A *Trichoderma reesei* erős, laktózzal indukálható celluláz promotereit rekombináns fehérjék előállítására használják (Penttilä és mtsai. 2004).

Gombákban a laktóz lebontásának kétféle módja ismert: extracelluláris hidrolízis, majd a felszabadított monomerek (a D-glükóz és a D-galaktóz) felvétele, illetve a diszacharid felvétele után bekövetkező intracelluláris hidrolízis (Seiboth és mtsai. 2007). Néhány jól tanulmányozott *Ascomycetes*, mint például a *Kluyveromyces lactis* (Sheetz és mtsai. 1981, Riley és mtsai. 1987, Lodi és mtsai. 2005) és az *Aspergillus nidulans* (Fekete és mtsai. 2012b) intracelluláris laktóz anyagcserével rendelkezik, míg az *Aspergillus niger* (Nevalainen és mtsai. 1981, O'Connell és mtsai. 2010) laktóz hidrolízise extracellulárisan következik be.

A gombák  $\beta$ -galaktozidázain ( $\beta$ -D-galaktozid galaktohidroláz; EC 3.2.1.23) belül megkülönböztetünk extracelluláris enzimeket, amelyeket savas pH-optimum jellemez és intracellulárisakat, amik semleges pH-n működnek megfelelően. Az előbbieket általában a 35-ös glikozid hidroláz családhoz tartoznak (GH35, Gamauf és mtsai. 2007), míg az utóbbiak jellemzően GH2 fehérjék, bár néhány  $\beta$ -glükozidáz (GH1 család) is képes laktózt hidrolizálni (Ishikawa és mtsai. 2005). *Neurospora crassa*-ban, laktózt tartalmazó tápoldatban mindkét féle  $\beta$ -galaktozidáz (bGal) izoenzim termelődik (Bates és mtsai. 1964). Meg kell jegyezni, hogy a  $\beta$ -galaktozidáz aktivitást általában nem laktózon, hanem mesterséges kromogén szubsztrátokkal, leggyakrabban *orto*- vagy *para*-nitro-fenil- $\beta$ -D-galaktopiranozidon (O/PNPG) vizsgálják.

A *P. chrysogenum* törzseket [fajkomplex *P. chrysogenum sensu lato*, filogenetikai faj: *Penicillium rubens* (Houbraken és mtsai. 2011b)] penicillin és más szerkezetileg rokon antibiotikumok ipari termelésére használják. A *P. chrysogenum* ezért az egyik legfontosabb gombafaj a biotechnológiában. Több ezer tanulmány foglalkozott a felfedezése óta eltelt évtizedekben a természetes és félszintetikus antibiotikumok termeltetésének lehetőségével (Van den Berg és mtsai. 2011, Barreiro és mtsai. 2012, Weber és mtsai. 2012). Eltekintve azonban a penicillin bioszintézishez közvetlenül kapcsolódó jellegektől, a szénanyagcsere általános tulajdonságai kevés figyelmet kaptak. A laktóznak és monomerjének, a D-galaktóznak nem vizsgálták még alaposan az asszimilációját, ami meglepő annak fényében, hogy a penicillint évtizedeken át tejsavón (laktózon) állították elő ipari körülmények között.

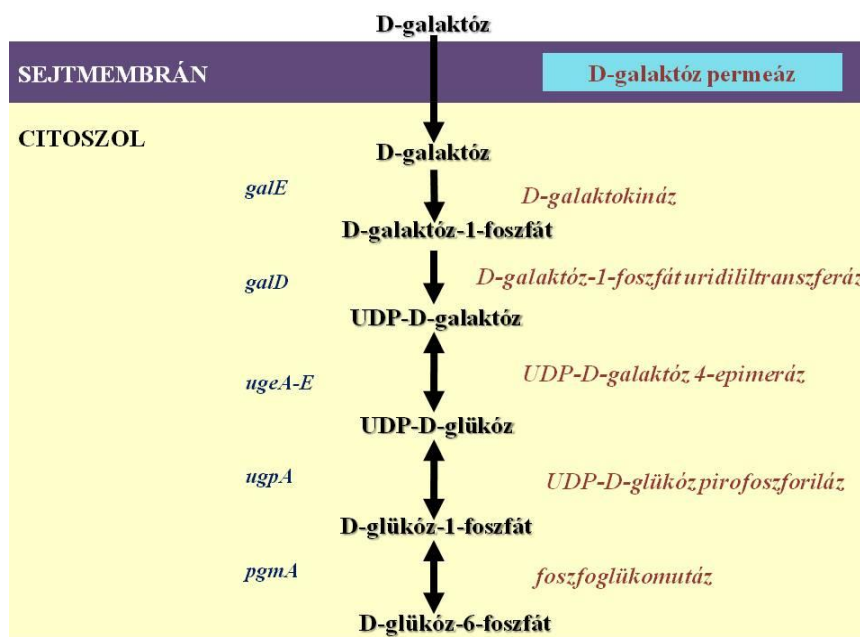
## 1.2. A gombák D-galaktóz anyagcseréjének áttekintése

A lignocellulóz tartalmú növényi biomassza a legnagyobb mennyiségben előforduló szerves anyag a természetben. Három fő komponense a cellulóz, a hemicellulóz és a pektin (Cragg és mtsai. 2015). A hemicellulóz tovább osztható három fő típusra: xilán, mannán és xiloglukán (De Vries és mtsai. 1994). A D-galaktóz (a D-glükóz C-4-es epimere) az egyetlen olyan monoszacharid alkotó, amely közös mindhárom osztályban, és fontos pektintartalmú polimerekben is jelen van (Pauly és mtsai. 2010). Azoknak a mikrobiális enzim rendszereknek a mélyreható ismerete, melyek részt vesznek a D-galaktóz növényi biomasszából való felszabadításában és annak későbbi felvételében ill. katabolizmusában, potenciálisan nagy jelentőségű lehet ipari és környezetvédelmi szempontból is (Bhat és mtsai. 2000).

Az aszkomikóta fonalas gombák minden más mikroorganizmus csoportot felülmúlnak a lignocellulóz biodegradációjának képességében, széles körű növényi sejtfalbontó enzimtevékenységük és fehérjeszekréciós képességük miatt. Sok fungális eredetű enzim működik szélsőséges környezeti feltételek és ipari tenyésztési körülmények között, mint például magas hőmérséklet, extrém pH, magas sókoncentráció vagy nagy nyomás.

A második világháború óta a *P. chrysogenum* törzseket folyamatosan alkalmazták és fejlesztették a penicillin és a szerkezetileg rokon antibiotikumok ipari termelésére (Ozcengiz és mtsai. 2013). Újabban mind gyakrabban használják platformként a különböző gombaeredetű hidrolizáló enzim koktélok előállítására olcsó agráripari maradványokon és (más) bőségesen rendelkezésre álló növényi anyagokon (Sakamoto és mtsai. 2013). Mindezek ellenére keveset tudunk a D-galaktóz és más, monomerként D-galaktózt tartalmazó lignocellulóz jellegű anyagok metabolizmusáról.

A D-galaktóz katabolizmus Leloir-útvonala (**1. ábra**) általánosan elterjedt a prokarióta és eukarióta sejtekben (Frey és mtsai. 1996).



**1. ábra:** A Leloir-útvonal D-galaktóz katabolizmusának sematikus ábrázolása, és a D-glükóz/D-galaktóz nukleotid bioszintézise.

A lebontó folyamat első lépése a D-galaktóz foszforilezése D-galaktóz-1-foszfáttá a galaktokináz (galaktóz: ATP foszfortranszferáz) enzim által (Trucco és mtsai. 1948). Az útvonal további lépésében a gal-1-P egy enzim és egy kofaktor jelenlétében glükóz-1-foszfáttá alakul (Caputto és mtsai 1949). Az enzim neve D-galaktóz-1-foszfát uridilil transzferáz, 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 származó 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. A Leloir-útvonalban az UDP-galaktóz - UDP-glükóz átalakulást (az epimerizációt) az UDP-galaktóz-4-epimeráz katalizálja; az így létrejött UDP-glükóz készen áll egy újabb gal-1-P aktiválására.

A három enzimet összefoglalóan Leloir-útvonalnak nevezzük (Leloir és mtsai 1951).

## 2. CÉLKITŰZÉS

Doktori értekezésem elsődleges célja az volt, hogy azonosítsuk azon strukturális géneket (vagyis a hidrolázokat és a transzportereket) a *P. chrysogenum*-ban, amelyek feltehetően részt vesznek a laktóz asszimilációjában. Vizsgálatainkhoz egy vad típusú referencia törzset (NRRL<sup>1</sup> 1951), valamint egy ipari penicillin termelő törzset (AS-P-78) használtunk.

A laktóz hidrolízis eredményeként D-galaktóz szabadul fel; munkám második részében ezért a D-galaktóz lebontás Leloir-útvonalának szabályozását vizsgáltam.

## 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 3.1. Törzsek és tenyésztési körülmények

Munkánk során a *P. chrysogenum* két törzsét használtuk. Az NRRL 1951 törzset természetből izolálták (Raper és mtsai. 1944), ez az a törzs, amiből a továbbfejlesztett penicillin-termelők nagy többsége származik (Newbert és mtsai. 1997). Az egyik ilyen megnövekedett titerű törzset, az AS-P-78-at ajándékba kaptuk az Antibioticos SA-tól (León, Spanyolország).

A minimál tápoldat (MM) a rázatott lombikos és a bioreaktoros tenyésztéshez Haas és mtsai. (1997) szerint alkalmaztuk (egyedüli nitrogénforrásként nátrium-nitrátot használtunk):

---

<sup>1</sup> Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Illinois, U.S.A.

- 25 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 25 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (pH 6.0)
- 30 mM  $\text{NaNO}_3$
- 7 mM  $\text{KCl}$
- 0,3 mM  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
- 2 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

és Vogel nyomelemoldattal egészítettük ki:

- citromsav $\cdot\text{H}_2\text{O}$  -5 g/l
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ -5 g/l
- $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ -1 g/l
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ -0,25 g/l
- $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -0,05 g/l
- $\text{H}_3\text{BO}_3$ -0,05 g/l
- $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ -0,05 g/l

Minden főfermentációs tápoldatot előnövesztett micéliummal oltottunk be. A tápoldat teljesen szintetikus volt, míg az inokuláló tápoldat – amit konidiosporákkal oltottunk le, lásd az Eredmények rész – 0,01% (w/v) peptont tartalmazott. A szénforrásokat (a különböző cukrok és a glicerín esetében) 1,5% (w/v) koncentrációban alkalmaztuk. A kiegészítőket steril törzsoldatokból adtuk a tápoldathoz. A rázatott lombikos tenyészeteket 28°C-on, 500 ml-es Erlenmeyer-lombikokban, horizontális rázógépből (Infors AG) 200 fordulat/perc (rpm) inkubáltuk. A tenyészeteket *P. chrysogenum* spóráldattal oltottuk be, mely  $5 \times 10^6$  spórárt tartalmazott milliliterenként.

Az indukciós kísérletekhez átmosott tenyészeteket használtunk. A micéliumokat 36-48 óráig szénforrásként 1% (w/v) glicerint tartalmazó minimál tápoldatban előnövesztettünk, majd zsugorított üvegszűrőn történő szűréssel összegyűjtöttük. Steril hideg vízzel történő alapos mosás után a biomasszát friss minimál tápoldatban tartalmazó lombikokba helyeztük át, mely ismert (0,1 mM és 25 mM) koncentrációkban tartalmazta a teszteléshez kiválasztott különböző szénforrásokat. A transzkripciós analízishez a micélium transzfer után 4, 8, 12 és 24 órával vettünk mintákat.

A bioreaktoros tenyészeteket 200 ml – kizárólagos szénforrásként glicerint tartalmazó minimál tápoldatban előnövesztett - leszűrt biomassza szuszpenzióval oltottuk be. A fermentációt egy 9 L bruttó, 6 L hasznos térfogatú, üvegfalú bioreaktorban végeztük (Inel, Budapest), amely két db hatlapátos Rushton tárcsás keverővel diszpergálja a reaktortérbe bevezetett sűrített, steril levegőt.

Fermentációs paraméterek: pH 6,0; 28°C és 0,5 vvm<sup>2</sup> (beáramló levegő térfogata/fermentor térfogata/perc). Az oldott oxigén szintjét 20% telítettségen tartottuk és a keverés sebességével kontrolláltuk. A párolgási veszteség minimalizálása érdekében a kimenő gázt átvezettük egy visszafolyó hűtőn, ami egy külső hűtőhöz kapcsolódik (4°C).

---

<sup>2</sup> vessel volume per minute

A hozamkonstanst ( $Y_{x/s}$ ) a fermentáció során elért maximális biomassza koncentráció és a kezdeti szénforrás koncentráció arányából számítottuk. A specifikus növekedési rátát ( $\mu$ ;  $h^{-1}$ ) a száraz sejt tömeg (DCW) mérésével számoltuk a szénforrás kimerüléséig (Pirt és mtsai. 1975).

### 3.2. Sejtmentes kivonatok és tápoldat minták készítése

A sejtmentes kivonat létrehozásához 10 ml fermentlevet vákuummal leszűrtünk, és a micéliumot alaposan átmostuk 0,1 M nátrium-foszfát-pufferrel (pH=7,0). A biomasszát ezután felszuszpendáltuk a fenti puffer 5 ml-ében, és egy előhűtött Potter-Elvehjem üveg homogenizátorba töltöttük. A homogenizátumot 3000 x g-vel lecentrifugáltuk (15 perc, 4°C), és a felülúszót azonnal felhasználtuk az intracelluláris  $\beta$ -galaktozidáz/laktáz aktivitás meghatározásához. Az extracelluláris  $\beta$ -galaktozidáz/laktáz aktivitás meghatározásához is 5 ml fermentlevet használtunk, a micéliumot lecentrifugáltuk (3000 x g, 15 perc), és a felülúszót közvetlenül vizsgáltuk.

### 3.3. Genomiális DNS és totál RNS izolálás

A micéliumot Miracloth nylon hálón (Calbiochem) átszűrtük, ill. összegyűjtöttük és hűtött, steril desztillált vízzel alaposan átmostuk. A felesleges folyadékot itatós papírlapok közötti préseléssel távolítottuk el, és a biomasszát folyékony nitrogénben gyorsan lefagyasztottuk. A nukleinsav izolációhoz a fagyasztott biomasszát száraz porrá őröltük folyékony nitrogénnel hűtött mozsárban, mozsártörő segítségével. A genomi DNS-t Promega's Wizard SV Genomic DNA Purification System ill. NucleoSpin Plant II alkalmazásával vontuk ki, míg a totál RNS-t a Promega's SV Total RNA Isolation System ill. NucleoSpin RNS Plant kittel izoláltuk (Promega, Fitchburg, WI, USA ill. Macherey-Nagel, Düren, Germany).

### 3.4. Northern-blot és reverz transzkriptáz-PCR (RT-PCR) analízis

A mennyiségi meghatározásokhoz, a denaturációhoz, a gél elválasztáshoz, a totál RNS-blottoláshoz és az azt követő hibridizáció során standard molekuláris biológiai technikákat (Sambrook és mtsai. 2001) alkalmaztunk. Az agaróz gélekbe mintahelyenként 5  $\mu$ g RNS-t vittünk fel. A próbák digoxigeninnel való jelölését a PCR DIG Probe Synthesis Kit-el végeztük (Roche Applied Science, Penzberg, Germany). A génspecifikus oligonukleotidokhoz (**1. táblázat**) templátként a vad típusú (NRRL 1951) genomiális DNS-t alkalmaztunk. A génspecifikus hibridizáció láthatóvá tételéhez Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film-et használtunk (Roche Applied Science). Minden transzkript analízist egymástól függetlenül legalább kétszer megismételtünk. A Pc12g11750 (=bgaE) RT-PCR elemzéséhez, az egyszálú cDNS-t egy RevertAid H minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Waltham, MA, USA) segítségével szintetizáltuk, a gyártók iránymutatásai

szerint. Ezt követően a cDNS-t templátként alkalmaztuk a PCR reakciónál ugyanazon génspecifikus primer párnál, mint a Northern-analízisnél (**1. táblázat**).

A vizsgálathoz 25 µl-es PCR reakcióelegyet alkalmaztuk, mely 4 µl cDNS-t, és Dream Taq polimerázt (Thermo Scientific) tartalmazott. A ciklusok kondíciói a kezdő denaturálás után 95°C-on 2 percig a következők voltak: 40 ciklus 95°C-on 1 percig, 59°C-on 1 percig, 72°C-on 1 percig és egy végső lépésben 72°C-on 5 percig. A génkódoláshoz a translációs elongációs alfa faktort (*tef1*) használtuk expressziós kontrollként (Linz és mtsai. 1986).

**1. táblázat:** A specifikus próbák amplifikációjához használt primerek, ill. a feltételezett β-galaktozidáz, laktóz permeáz és a Leloir-út vonal struktúrgénjei *Penicillium chrysogenum*-ban.

Elnevezés	Feltételezett funkció	Gén- azonosító	Oligonukleotid szekvencia (5'-3')	Amplikon méret, bázispár
<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	1.080
<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: CGTGTATCCCTCTTCTTGTG	973
<i>galD</i>	D-galaktóz-1-P uridilil-transzferáz	Pc15g00140	Pc15g00140F: AGACAACCCTGCCCAACTAC Pc15g00140R: TCTCTTCCTCGGTGCCATC	919

<i>ugeA</i>	UDP-D-galaktóz 4-epimeráz	Pc21g10370	Pc21g10370 F: GGTCATTACACCACCCTTG 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: GTTTCGCTATCCCCAATCTG Pc18g01080R: GGTCTCCTTCTCTGTAA	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: GGCTGGCAAAGTGTCTAATG	790
<i>galF</i>	UDP-D-glükóz pirofoszforiláz	Pc21g12790	Pc21g12790F: TCCAAGGCTCTACCCACTC Pc21g12790R: GCGTTGGACAGGAAGATG	1.075
<i>pgmA</i>	foszfo- glükomutáz	Pc18g01390	Pc18g01390F: GGTCTTTCTCGTCATTG Pc18g01390R: TCACCGTCACCATCACTG	756

### 3.5. Analitikai módszerek

A micélium száraz sejtömeget (Dry Cell Weight, DCW) a folyékony tenyészet 5, ill. 10 ml-es mintájából határoztuk meg. A biomassát egy előre lemért szűrőpapír filteren vákuumszűrő segítségével gyűjtöttük be és mostuk át hideg csapvízzel, majd a filtert 80°C hőmérsékleten tömegállandóságig szárítottuk. A száraz tömeg adatok az Eredmények fejezetben találhatóak; a két különálló mérés átlaga, a standard hiba nem haladta meg a 14%-ot. A D-glükóz, D-galaktóz, L-arabinóz, D-xilóz, glicerin és a laktóz koncentrációját a fermentációs tápoldatból HPLC-vel határoztuk meg protoncserélő oszloppal (Bio-Rad Aminex HPX–87H<sup>+</sup>, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Az izokratikus elúcióhoz 10 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-at alkalmaztunk 55°C hőmérsékleten a törésmutató detektálásával. A koncentrációk két egymástól független mérés átlageredményei, a standard hiba nem haladta meg a 3%-ot.

### 3.6. Hidroláz vizsgálatok

Az intracelluláris β-galaktozidáz aktivitást az alábbi protokoll szerint mértük: 0,5 ml sejtmentes kivonat és 0,5 ml 6 mM orto-nitro-fenil-β-D-galaktopiranozid (ONPG) oldat keverékét inkubáltuk 30 percen át 28°C-on. A reakciót 2 ml 1 M Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> hozzáadásával

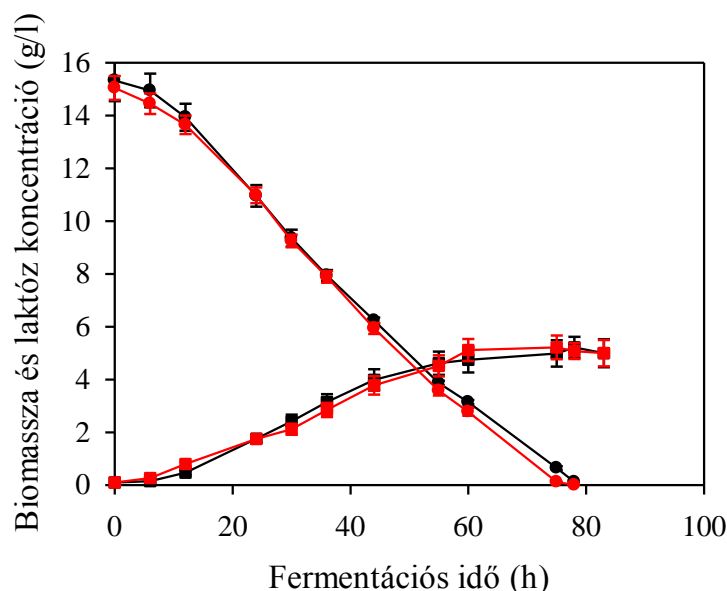
állítottuk le, majd  $\lambda = 410$  nm hullámhosszon határoztuk meg egy Amersham spektrofotométer segítségével (Amersham, UK). Azok a minták, amelyekhez  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ -t adtunk az ONPG szubsztrát előtt, vakpróbaként szolgáltak.

Az extracelluláris aktivitást hasonlóan vizsgáltuk, kivéve, hogy a tápoldat felülúszójának 0,5 ml sejtmentes kivonatához és az azonos térfogatú 6 mM-os ONPG-oldathoz (pH = 5,0) 0,1 M nátrium-foszfát-puffert használtunk. Egy egység (Unit)  $\beta$ -galaktozidáz aktivitás megfelel a percenként felszabadult 1  $\mu\text{mol}$  orto-nitrofenolnak. A koncentrációkat kalibrációs görbe alapján számoltuk ki. A sejtmentes kivonat és a tápoldat protein tartalmát módosított Lowry módszerrel határoztuk meg (Peterson és mtsai. 1983), szarvasmarha szérum fehérjét (BSA) használva a kalibráláshoz. A specifikus aktivitást U (mg fehérje)<sup>-1</sup> fejeztük ki.

## 4. EREDMÉNYEK

### 4.1. A *Penicillium chrysogenum* növekedése laktózon

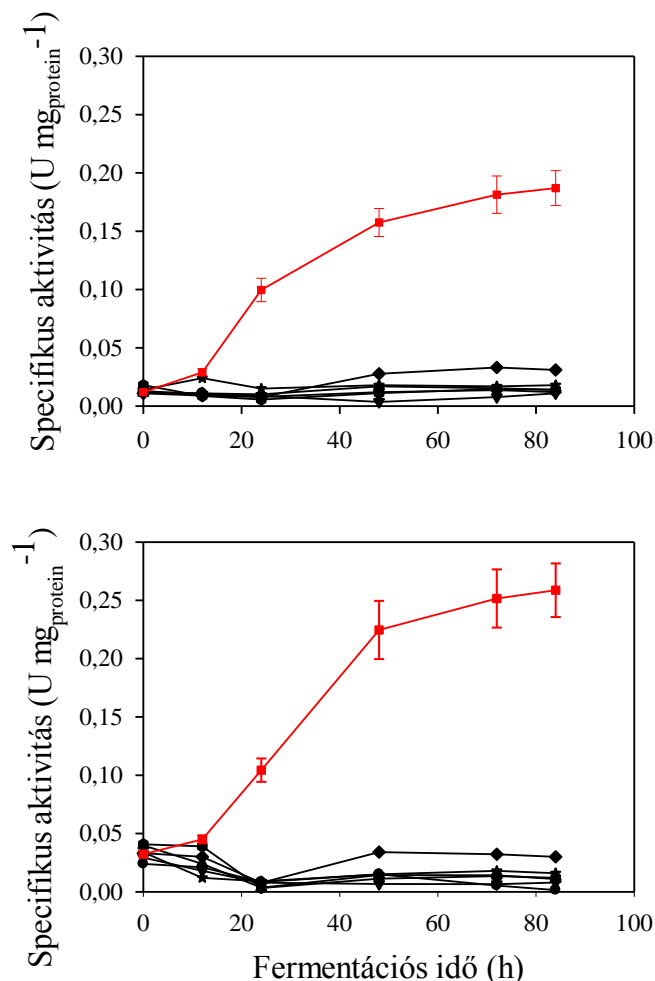
A laktóz anyagcserével kapcsolatos alapvető élettani információk összegyűjtése céljából a vad típusú referencia törzset és a túltermelésre szelektált utód törzset, az AS-P-78-at egyedüli szénforrásként laktózt tartalmazó minimál tápoldatban növesztettük. Mindkét törzs növekedése figyelemre méltó hasonlóságot mutatott szakaszos (batch) körülmények között, 15 g l<sup>-1</sup> laktózt körülbelül 74 óra alatt fogyasztottak el (**2. ábra**).



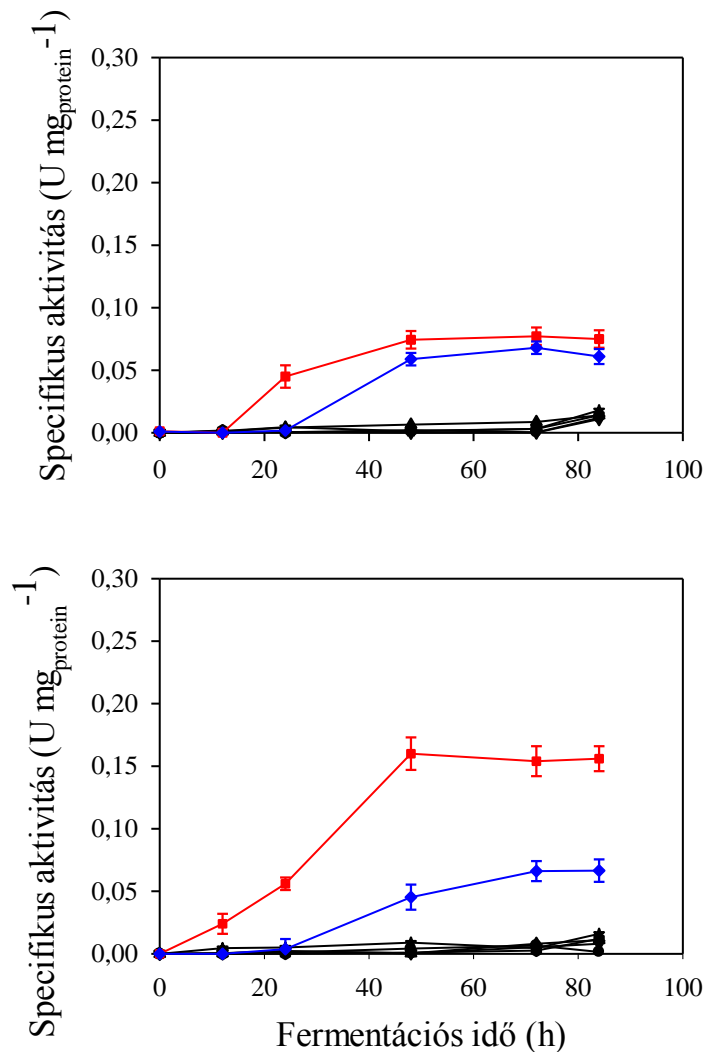
**2. ábra:** A *Penicillium chrysogenum* NRRL 1951 (piros szimbólumok) és *P. chrysogenum* AS-P-78 (fekete szimbólumok) törzsek tenyésztése laktózon. Idő-profil: a biomassza (négyzetek) és maradék laktóz koncentráció (körök) függvényében.

#### 4.1.1. Az extra- és intracelluláris $\beta$ -galaktozidáz tevékenység időprofiljai

A képződött bGal aktivitás időbeli lefolyását elemeztük laktózon, mint egyedüli szénforráson batch fermentáció során. Inokulumként glicerinen előnövesztett, átmosott micéliumot alkalmaztunk. Mindkét törzsből a cukorfogyás időprofilja megegyezett az intra-, és az extracelluláris bGal aktivitásokéval (2., 3. és 4. ábra), melyeket – mint már említettük – ONPG-hidrolizáló képességként definiáltunk. Az aktivitás laktózon gyorsan emelkedett a gyors növekedési fázis során, majd a szakasz végére az aktivitás stabilizálódott (3. és 4. ábra). Amikor laktóz helyett D-galaktózt használtunk, érdekes módon – ellentétben az *A. nidulans*-ban (Fekete és mtsai. 2002) mért intracelluláris bGal aktivitással – mind az extracelluláris mind az intracelluláris bGal aktivitás alacsony maradt, alig haladta meg a reprodukálhatóan detektálható értéket. L-arabinózon mérsékelt extracelluláris ONPG-hidrolizáló aktivitás volt mérhető (3. és 4. ábra), értéke a laktóz tartalmú tápoldatban mért maximális érték felét érte el mind a két vizsgált törzsből. Más általánosan előforduló monoszacharidokon való tenyésztés esetén - mint például a D-glükóz, D-fruktóz, és a glicerinnel - sem extra- sem intracelluláris bGal aktivitás nem volt kimutatható egyik törzs esetében sem.



**3. ábra:** A *Penicillium chrysogenum* NRRL 1951 (A panel) és *P. chrysogenum* AS-P-78 (B panel) törzsek specifikus intracelluláris  $\beta$ -galaktozidáz aktivitásának időprofilja; az alábbi cukrokon, mint egyedüli szénforráson növesztve: D-glükóz (●), D-fruktóz (▲), laktóz (■), a D-galaktóz (Δ), glicerinnel (▼), D-xilózzal (□) és L-arabinózzal (○). Az ábra egyértelműbbé tételéhez, a laktózon növesztett minták esetén feltüntettük a szórásértéket is.



**4. ábra:** A *Penicillium chrysogenum* NRRL 1951 (A panel) és *P. chrysogenum* AS-P-78 (B panel) törzsek specifikus extracelluláris béta-galaktózidáz aktivitásának időprofilja; az alábbi cukrokon, mint egyedüli szénforráson növesztve: D-glükóz (●), D-fruktóz (▲), laktóz (■), a D-galaktóz (Δ), glicerín (▼), D-xilóz (□) és L-arabinózt (◐). Az ábra egyértelműbbé tételéhez, a laktózon és L-arabinózon növesztett minták esetén feltüntettük a szórást is.

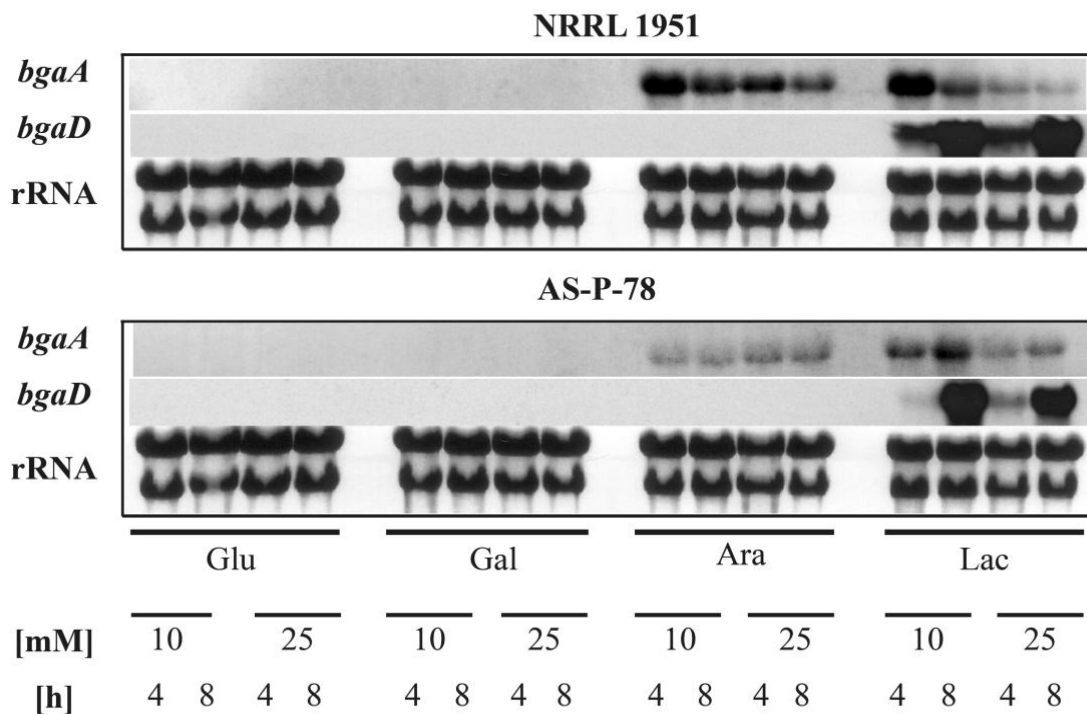
#### 4.1.2. A feltételezett bGal és laktóz permeáz gének expressziós profilja

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 katabolizmusban feltehetően részt vevő gének (**1. táblázat**) transzkripcióanalízisét laktózon, D-galaktózon és az L-arabinózon végeztük el, negatív kontrollként D-glükózt alkalmaztunk. Az előnővesztett micéliumot hasonlóan kezeltük az indukciós kísérleteknél leírtakhoz, kivéve, hogy a mintákat két különböző időpontban vettük: a micélium átmosása után 4 illetve 8 órával.

Az öt *P. chrysogenum* gént feltehetően bGal-t kódoló szekvenciaként azonosítottuk. A három extracelluláris génből kettő (*bgaB* és *bgaC*) nem expresszáldott laktózon egyetlen időpontban és koncentrációnál sem, egyik törzsben sem. A fennmaradó három hidroláz gén

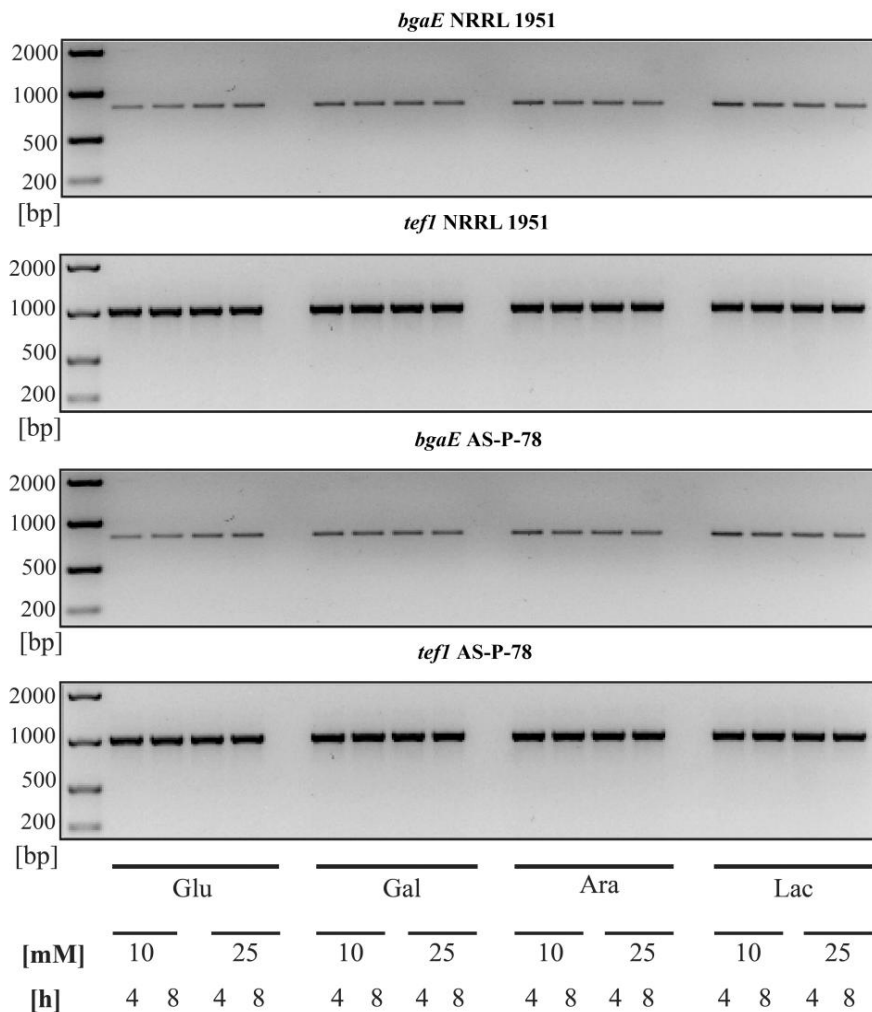
expressziós jellegei (az extracelluláris *bgaA*, valamint az intracelluláris *bgaD* és *bgaE*) közel azonosak voltak a két *P. chrysogenum* törzsnél, főleg intenzitásukban tértek el egymástól és látszólag nem befolyásolta az alkalmazott laktóz koncentráció (10 vagy 25 mM). Figyelemre méltó, hogy a hosszabb (8 h) inkubációs idő a 4 órás periódushoz viszonyítva megnövelte az átíródott *bgaD* mennyiségét.

Mivel a *P. chrysogenum* a laktóz kivételével nem képez intracelluláris bGal aktivitást egyetlen szénforráson sem, nem volt meglepő, hogy a *bgaD* transzkripciója kizárólag laktózon történt meg, és nem lehetett más szénforrás által kiváltani, ideértve a D-galaktózt is, ami a laktóz hidrolízis egyik terméke (5. ábra).



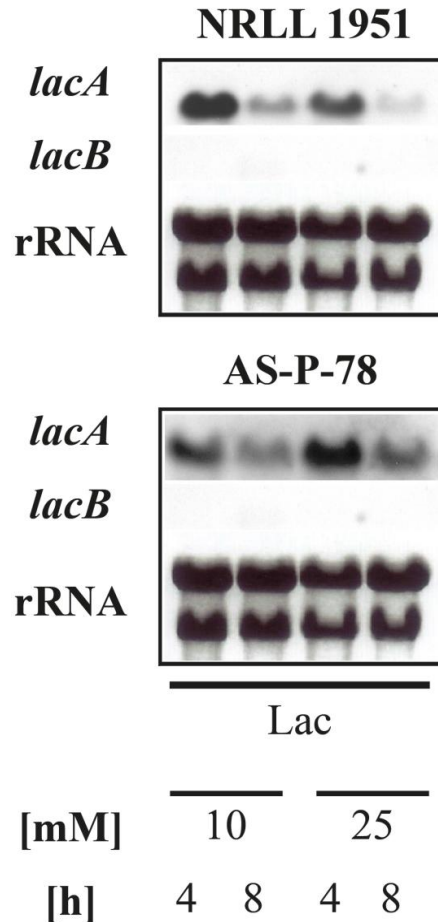
**5. ábra:** A két feltételezett béta-galaktoszidáz gén (a *bgaA*: feltehetően egy extracelluláris- a *bgaD*: feltehetően egy intracelluláris bGal-t kódoló) indukciós spektrumának transzkripciós analízise, D-glükózon (Glu), D-galaktózon (Gal), L-arabinózon (Ara) és laktózon (Lac) tesztelve a *Penicillium chrysogenum* NRRL 1951 és *P. chrysogenum* AS-P-78 törzsében.

A *bgaE* gyenge, konstitutív expressziót mutatott minden tesztelt körülmény között, hasonlóan az *A. nidulans* AN3200 ortológához. A *bgaE* transzkripció gyakorlatilag nem volt kimutatható Northern analízissel, így az érzékenyebb RT-PCR-t alkalmazásával, próbáltuk meg a gén expresszióját kimutatni. A *bgaE* alacsony szinten fejeződött ki minden vizsgált körülmény között, beleértve azokat is, amelyeken nem tudtunk enzimaktivitást mérni sem ONPG-vel, sem laktóz szubsztrátummal. Hasonlóképpen az *A. nidulans*-béli ortológjához, valószínűleg a *P. chrysogenum* *bgaE* sem játszik fontos szerepet a laktóz katabolizmusában (6. ábra).



**6. ábra:** A *bgaE* gén expressziós jellemzői. A gén feltételezhetően egy intracelluláris béta-galaktózidázt kódol a *Penicillium chrysogenum* NRRL 1951 és a *P. chrysogenum* AS-P-78 törzsekben. Az alkalmazott szimbólumok, azonosak a 7. ábrán lévőkkel. Az eukarióta translációs elongációs faktort kódoló gén 1-alfa komponens (*tef1*) expressziója, konstitutív kontrollként szolgált a RT-PCR-analízisnél.

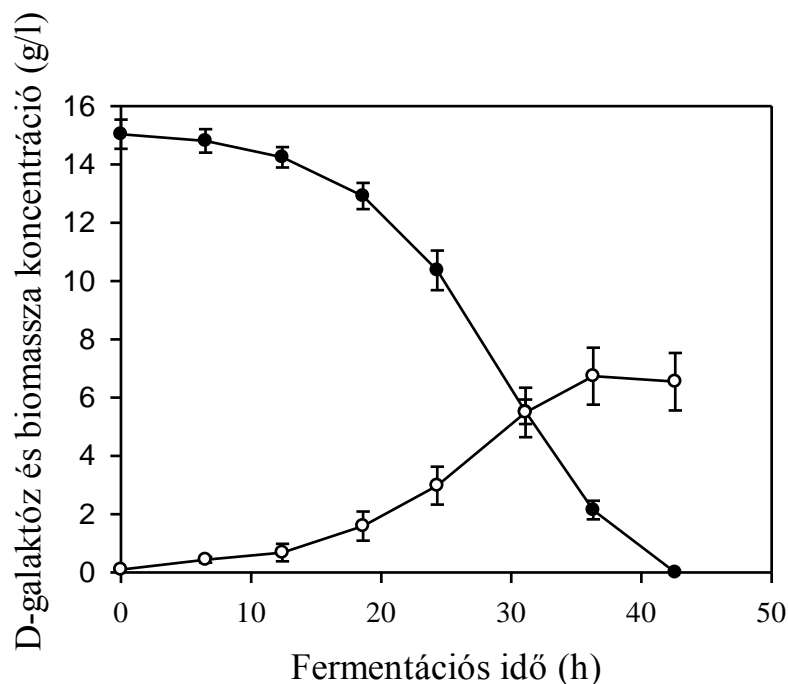
Ami a két feltételezett laktóz permeáz gént illeti, a *lacA* kizárólag laktózon fejeződött ki mindkét *P. chrysogenum* törzsben, mindkét indukáló koncentrációt és inkubációs időt figyelembe véve. Érdekes, hogy a *lacA* expressziós szintje lényegesen magasabbnak tűnt 4 órával a tápoldat váltás után, mint 8 órával. Ez pontosan a fordítottja annak, ami már megfigyelhető volt az intracelluláris *bgaD* gén esetében. Másrészt, a *lacB* transzkripcióját nem lehetett megfigyelni laktózon, vagy bármely más tesztelt szénforráson, jelezve, hogy irreleváns a disszacharid asszimilációjának szempontjából (7. ábra).



**7. ábra:** A két feltételezett laktóz permeáz gén (*lacA* és *lacB*) indukciós spektrumának transzkripciós elemzése laktózon (Lac) a *Penicillium chrysogenum* NRRL 1951 és a *P. chrysogenum* AS-P-78 törzsekben. Transzkripció nem volt megfigyelhető a többi tesztelt szénforráson. Az RNS minőségének és mennyiségének kontrolljaként a riboszómális RNS-t (28S és 18S) etidium-bromiddal tettük láthatóvá.

#### 4.2. A *Penicillium chrysogenum* növekedése D-galaktózon

Egyes fonalas *Ascomycetes* gombák konídiosporái - ilyen az ipari szempontból is fontos *Aspergillus niger* - D-galaktózon, mint egyedüli szénforráson nem csíráznak ki (Fekete és mtsai. 2012a). Másrészt, ezen fajok micéliuma képes új biomasszát létrehozni D-galaktózon, ha előtte más szénforráson kicsírázott. Annak ellenőrzésére, hogy a *P. chrysogenum* képes-e hasznosítani a D-galaktózt, mint egyedüli szénforrást a növekedési szakasztól függően vagy sem, konídiosporákkal leoltottunk 1,5% D-galaktózt, mint egyedüli szénforrást tartalmazó folyékony MM tápoldatot. A gomba kicsírázott a sülyesztett kultúrában és jól nőtt D-galaktózon. Mintegy 40 óra alatt 15 g<sup>l</sup> cukor fogyott el (**8. ábra**).



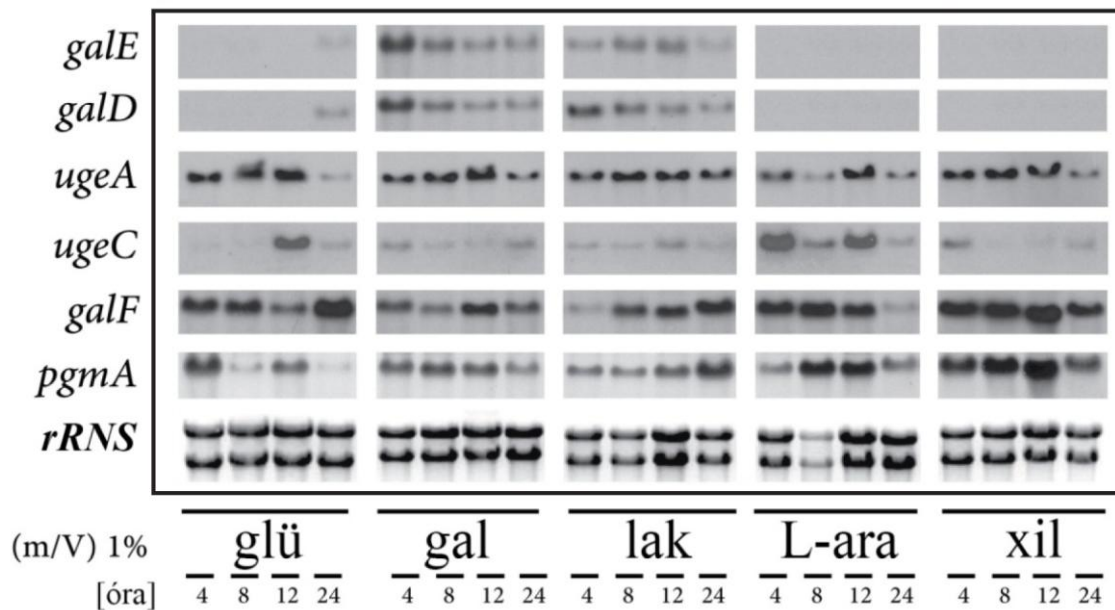
**8. ábra:** A *Penicillium chrysogenum* NRRL 1951 batch fermentációjának növekedési idő-profilja (üres szimbólumok), valamint az elfogyott D-galaktóz koncentrációja (teli szimbólumok). A tápoldat konidiospórával lett beoltva.

#### 4.2.1. A Leloir-út vonal expressziója D-galaktózon és egyéb cukrokon

Az expressziós vizsgálatokat a D-galaktózon, a galaktopiranoz-tartalmú diszacharid laktózon, ill. D-glükózon végeztük. A kifejeződések megvizsgáltuk továbbá a növényi sejt fal két legnagyobb mennyiségű pentózan, az L-arabinózon és a D-xilózon.

A *P. chrysogenum* genomból kiválasztott összes gén a Leloir-út vonal öt szerkezeti enzimét kódolja, amelyek D-galaktózon konstitutívan fejeződnek ki, függetlenül a mintavétel időpontjától (azaz, 4, 8, 12 vagy 24 órával a glicerinen előnövesztett micélium atmosása után). A feltételezett 4-epimeráz gének közül, az *ugeA* expressziós szintje következetesen és lényegesen magasabb, mint az *ugeC*. Nem észleltünk transzkripciót a három másik kiválasztott feltételezett epimeráz gén, az *ugeB*, *ugeD* ill. az *ugeE* esetén, sem D-galaktózon, sem más vizsgált szénforráson. Laktóz jelenlétében lényegében megegyező expressziós profilokat figyeltünk meg. A vizsgált gének expressziós profiljai D-glükózon, L-arabinózon és a D-xilózon jelentősen különböztek a D-galaktózon vagy laktózon észleltektől (**9. ábra**).

A gének kódolnak egy UDP-D-galaktóz-4-epimerázt (*ugeA*), továbbá egy (feltételezett) UDP-D-glükóz-pirofoszforilázt (*galF*) és egy foszfo-glükomutázt (*pgmA*) is, amelyek mind hasonló módon, elsősorban konstitutívan fejeződtek ki a tesztelt szénforrásokon, akár D-galaktózt vagy laktózt alkalmaztunk (egyedüli) növekedési szubsztrátként. Kifejeződésük nagy valószínűséggel kapcsolatban áll a Leloir-út vonal alapvető anabolikus funkcióival, a gomba sejt felszintézisével a növekedés során.



**9. ábra:** A katabolikus Leloir-útvonal génjeinek transzkripciós elemzése a *Penicillium chrysogenum* NRRL 1951 törzsében. A kísérlet részleteit lásd az Anyagok és Módszerek részben. Génrövidítések: ld. az 1. táblázat szerint. A riboszomális RNS-eket (28S és 18S) egy 2% -os natív agaróz gélen etídium-bromiddal tettük láthatóvá, az RNS minták pedig mennyiségi és minőségi kontrollként szolgáltak.

Ezzel éppen ellenkezőleg, a katabolikus Leloir-útvonal első két génjének (*galE* és *galD*) transzkripciója - amelyek elméletileg nem relevánsak a sejtfal szintézisben – a D-galaktózon és a laktózon kívül más szénforráson csupán egyetlen mintavételi pontban volt megfigyelhető Northern analízissel.

Sem a *galE* sem a *galD* expresszióját nem lehetett megfigyelni egyik pentózon sem Northern analízissel. Ezzel összhangban, a pentózon növesztett micéliumokból sem lehetett statisztikailag értékelhető galaktokináz aktivitást mérni (**9. ábra**). Megjegyezzük, hogy szemben a D-glükóz tenyésztettel, a másik négy cukor tenyészetéből nem fogytak el a szénforrások 24 órával a tápoldat transzfer után. Mindezen eredmények együtt azt sugallják, hogy a *galE* és *galD* alacsony szintű, folytonos expressziója mehet végbe a D-glükózon növesztett tenyészeteknél 24 órával a tápoldat transzfer után, mint ahogy azt a galaktokináz méréseink igazolják. Ez része lehet az éhezésre adott válaszreakciónak, amely során a tartalék szénhidrát, beleértve a D-galaktózt is, lassan felszabadul a gomba sejtfalából.

Arra a következtetésre jutottunk, hogy a Leloir-útvonal D-galaktóz katabolizmusának az első két lépése inkább szubsztráttal indukálható, mintsem konstitutív *P. chrysogenum*-ban.

## 5. ÖSSZEFOGLALÁS

A penicillin ipari ellőállítására *Penicillium chrysogenum*-mal történik. Megvizsgáltuk és összehasonlítottuk a vad típusú NRRL 1951 és a nagy termelőképességű AS-P-78 törzsek laktóz lebontását, amely a penicillin fermentációhoz használt tejsavó egyik fontos összetevője. Mindkét törzs hasonlóan nőtt laktózon, mint egyedüli szénforráson batch kultúrában, és a cukorfogyás idő-profiljuk is szinte azonos volt.

A genom szekvenciák *in silico* elemzéséből kiderült, hogy a *P. chrysogenum*-ban legalább öt feltételezett béta-galaktozidáz kódoló gén található az alábbi annotált lókuszon: Pc22g14540 (*bgaD*), Pc12g11750 (*bgaE*), Pc16g12750 (*bgaA*), Pc14g01510 (*bgaC*) és Pc06g00600 (*bgaB*). Az első két fehérje orthológoknak tűnik két *Aspergillus nidulans* intracelluláris család laktózon kifejeződő 2 glikozil hidroláz génjével. A többi három *P. chrysogenum* fehérje az *Aspergillus niger* extracelluláris  $\beta$ -galaktozidázának (*LacA*) elkülönült paralógjaként fordul elő, mely a 35-ös (GH35) családba tartozó glikozil hidroláz. A *P. chrysogenum* genom tartalmaz, két feltételezett laktóz transzporter gént is a Pc16g06850 (*lacB*) és Pc13g08630 (*lacA*) annotált lókuszon. Ezek ortológjai a nagy affinitású laktóz permeáz (*lacpA*) kódoló gének paralógjainak az *A. nidulans*-ban, melynek az orthológja *P. chrysogenum*-ból hiányzik.

A *bgaD* transzkripció elemzése azt mutatta, hogy kizárólag laktózon fejeződik ki, míg *bgaE* gyengén expresszálódik valamennyi vizsgált szénforráson, beleértve a D-glükózt is. A *bgaA* együtt expresszálódik a két feltételezett intracelluláris béta-galaktozidáz génnel laktózon és reagál az L-arabinózra is. A *lacA* kizárólag laktózon fejeződik ki.

Az adatok azt sugallják, hogy a *P. chrysogenum* kettős asszimilációs stratégiával rendelkezik a laktóz lebontására, egyidejűleg alkalmazva az extracelluláris és az intracelluláris hidrolízist, anélkül hogy a lebontás hatékonysága korrelálna a vizsgált törzsek penicillin-termelő potenciáljával.

Munkám során elemeztük azon strukturális gének kifejeződésének szénforrás-függését is, melyek feltételezhetően a Leloir-útvonal öt enzimét kódolják *P. chrysogenum*-ban.

A *P. chrysogenum* genom tartalmaz egy feltételezett galaktokináz gént a Pc13g10140 (*galE*) annotált lókuszon, ami erős szerkezeti hasonlóságot mutat az élesztők galaktokinázával és csak laktózon, valamint D-galaktózon fejeződött ki. A Pc15g00140 (*galD*) annotált lókuszon lévő galaktóz-1-foszfát uridilil transzferáz gén expressziós profilja lényegében megegyezik a galaktokinázéval. Ez ellentétes más vizsgált gombafajokkal (*A. nidulans*, *Trichoderma reesei* és *A. niger*), ahol az orthológ galaktokináz és galaktóz-1-foszfát uridilil transzferáz gének konstitutívan expresszálódnak. Az UDP-glükóz-4-epimeráz kódoló gén esetében öt jelöltet azonosítottunk. Nem észleltünk expressziót a Pc16g12790 (*ugeE*), Pc21g12170 (*ugeD*) és Pc20g06140 (*ugeB*) esetén egyetlen tesztelt szénforráson sem, míg a másik két lókus (Pc21g10370-*ugeA* és Pc18g01080-*ugeC*) transzkripciója egyértelműen megfigyelhető volt valamennyi vizsgált körülmény között. A Pc21g10370 lókuszon lévő feltételezett 4-epimeráz génhöz hasonlóan a Leloir-útvonal másik két feltételezett struktúrgénje – az UDP-glükóz-pirofoszforiláz (Pc21g12790-*galF*) és foszfo-glükomutáz (Pc18g01390-*pgmA*) kódoló gének - szintén erősen és konstitutívan fejeződött ki, amint az várható is az olyan génektől, amelyek nélkülözhetetlen funkciót töltenek be a gombasejttel képződésében.

## 6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

A munkánk során született új tudományos eredmények alapján az alábbi téziseket fogalmaztuk meg:

1. A *Penicillium chrysogenum*-ot kettős laktóz asszimilációs rendszer jellemzi, amely tartalmaz egy extracelluláris bGal-t (feltételezett) laktóz permeázt és az intracelluláris bGal-t.
2. *Penicillium chrysogenum*-ban sem az extra-, sem az intracelluláris bGal aktivitás, és egyik feltételezett Bgal és permeáz gén sem indukálható D-galaktózzal.
3. A *bgaA* és a *bgaD* gének élettanilag releváns hidrolázokat kódolnak, amik *Penicillium chrysogenum*-ban is részt vesznek az extra- és intracelluláris laktóz lebontásban.
4. A *Penicillium chrysogenum* csak egy fiziológiailag releváns laktóz transzporterrel rendelkezik.
5. A *Penicillium chrysogenum* laktóz metabolizmusa nincs összefüggésben a gomba penicillin-termelő potenciáljával az AS-P 78 törzs esetén.
6. A galaktokinázt és a D-galaktóz-1-P-uridililtranszferázt kódoló gének kifejeződése szelektíven indukálható D-galaktózzal és laktózzal *Penicillium chrysogenum*-ban.

## 7. IRODALOMJEGYZÉK / REFERENCES

1. 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
2. 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.
3. Bates WK, Woodward DO (1964) *Neurospora*  $\beta$ -galactosidase: evidence for a second enzyme. *Science* 146:777-778
4. Bhat MK (2000) Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechn Adv* 18:355-383
5. Brüssow H (2013) Nutrition, population growth and disease: A short history of lactose. *Environ Microbiol* 15:2154-2161
6. Caputto R, Leloir LF, Trucco RE, Cardini CE (1949) The enzymatic transformation of galactose into glucose derivatives. *J Biol Chem* 179:497-498
7. Cardini CE, Paladini AC, Caputto R, Leloir LF (1950) Uridine Diphosphate Glucose: the Coenzyme of the Galactose-Glucose Phosphate Isomerization. *Nature* 165:191-192
8. Cragg SM, Beckham GT, Bruce NC, Bugg TDH, Distel DL, Dupree P, Etxabe AG, Goodell BS, Jellison J, McGeehan JE, McQueen-Mason SJ, Schnorr K, Watts JEM, Zimmer M (2015): Lignocellulose degradation mechanisms across the Tree of Life. *Curr Opin Chem Biol* 29:108-119
9. De Vries RP, Flipphi MJA, Witteveen CFB, Visser J (1994) Characterization of an *Aspergillus nidulans* L-arabitol dehydrogenase mutant. *FEMS Microbiol Lett* 123:83-90
10. Fekete E, De Vries RP, Seiboth B, Van Kuyk PA, Sándor E, Fekete E, Metz B, Kubicek CP, Karaffa L (2012a) D-galactose uptake is nonfunctional in the conidiospores of *Aspergillus niger*. *FEMS Microbiol Lett* 329:198-203
11. Fekete E, Karaffa L, Seiboth B, Fekete E, Kubicek CP, Flipphi M (2012b) Identification of a permease gene involved in lactose utilisation in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* 49:415-425
12. 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
13. Gamauf C, Marchetti M, Kallio J, Vehmaanperä J, Allmaier G, Kubicek CP, Seiboth B (2007) Characterization of the *bga1*-encoded glycoside hydrolase family 35  $\beta$ -galactosidase of *Hypocrea jecorina* with galacto- $\beta$ -D-galactanase activity. *FEBS J* 274:1691-1700
14. 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
15. Houbraken J, Frisvad JC, Samson RA (2011a) Fleming's penicillin producing strain is not *Penicillium chrysogenum* but *P. rubens*. *IMA Fungus* 2:87-95
16. Ishikawa E, Sakai T, Ikemura H, Matsumoto H, Abe H (2005) Identification, cloning, and characterization of a *Sporobolomyces singularis*  $\beta$ -galactosidase-like enzyme involved in galacto-oligosaccharide production. *J Biosci Bioeng* 99:331-339
17. Leloir LF (1951) The enzymatic transformation of uridine diphosphate glucose into a galactose derivative. *Arch Biochemi Biophys* 33: 186-190
18. Linz JE, Lira LM, Sypherd PS (1986) The primary structure and the functional domains of an elongation factor-1 $\alpha$  from *Mucor racemosus*. *J Biol Chem* 261: 15022-15029
19. Lodi T, Donnini C (2005) Lactose-induced cell death of  $\beta$ -galactosidase mutants in *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Res* 5:727-734

20. Naz S, Siddiqi R, Dew TP, Williamson G (2011) Epigallocatechin-3-gallate inhibits lactase but is alleviated by salivary proline-rich proteins. *J Agr Food Chem* 59:2734-2738
21. Nevalainen KMH (1981) Induction, isolation, and characterization of *Aspergillus niger* mutant strains producing elevated levels of  $\beta$ -galactosidase. *Appl Environ Microbiol* 41:593–596
22. Newbert RW, Barton B, Greaves P, Harper J, Turner G (1997) Analysis of a commercially improved *Penicillium chrysogenum* strain series: Involvement of recombinogenic regions in amplification and deletion of the penicillin biosynthesis gene cluster. *J Ind Microbiol Biotechnol* 19:18–27
23. O'Connell S, Walsh G (2008) Application relevant studies of fungal  $\beta$ -galactosidase with potential application in the alleviation of lactose intolerance. *Appl Biochem Biotechnol* 149:129–138
24. Ozcengiz G, Demain AL (2013) Recent advances in the biosynthesis of penicillins, cephalosporins and clavams and its regulation. *Biotechnol Adv* 31:287-311
25. Pauly M, Keegstra K (2010): Plant cell wall polymers as precursors for biofuels. *Curr Opin Plant Biol* 13:305-312
26. Penttilä M, Limón C, Nevalainen H Molecular biology of *Trichoderma* and biotechnological applications. In *Handbook of Fungal Biotechnol* (ed. Arora, D. K.) 413–427 (Marcel Dekker, New York, 2004).
27. Persson I, Tjerneld F, Hahn-Hägerdal B (1991) Fungal cellulolytic enzyme production: A review. *Process Biochem* 26:65–74
28. Peterson GL (1983) Determination of total protein. *Methods Enzymol* 91:86–105
29. Pirt SJ Principles of microbe and cell cultivation. Blackwell Scientific Publications 156–170 (Oxford, U.K. 1975)
30. Raper KB, Alexander DF, Coghill RD (1944) Penicillin. II. Natural variation and penicillin production in *Penicillium notatum* and allied species. *J Bacteriol* 487:639–659
31. 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
32. Roelfsema WA, Kuster BFM, Heslinga MC, Pluim H, Verhage M Lactose and Derivatives. *Ullmann's Encyclopedia of Ind Chem*, 7<sup>th</sup> (eds John's Wiley & Sons, New York, NY. 2010)
33. 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
34. Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, New York)
35. Seiboth B, Pakdaman BS, Hartl L, Kubicek CP (2007) Lactose metabolism in filamentous fungi: how to deal with an unknown substrate. *Fungal Biol Rev* 21: 42–48
36. Sheetz RM, Dickson RC (1981) *LAC4* is the structural gene for  $\beta$ -galactosidase in *Kluyveromyces lactis*. *Genetics* 98:729–745
37. Trucco RE, Caputto R, LF, Mittelman N (1948) Galactokinase. *Journal Arch Biochem* 18:137-146
38. Van Den Berg MA (2011) Impact of the *Penicillium chrysogenum* genome on industrial production of metabolites. *Appl Microbiol Biotechnol* 92:45-53
39. Weber SS, Bovenberg RA, Driessen AJ (2012) Biosynthetic concepts for the production of beta-lactam antibiotics in *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol J* 7: 225-236



Nyilvántartási szám: DEENK/82/2016.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Jónás Ágota  
Neptun kód: U0CX50  
Doktori Iskola: Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

#### Idegen nyelvű tudományos közlemény(ek) hazai folyóiratban (1)

1. **Jónás, Á.**, Fekete, E., Németh, Z., Flippi, M., Karaffa, L.: D-Galactose catabolism in *Penicillium chrysogenum*: Expression analysis of the structural genes of the Leloir pathway. *Acta Biol. Hung.* "Accepted by Publisher" (2016), p., p.. ISSN: 0236-5383. IF:0.589 (2014)

#### Idegen nyelvű tudományos közlemény(ek) külföldi folyóiratban (1)

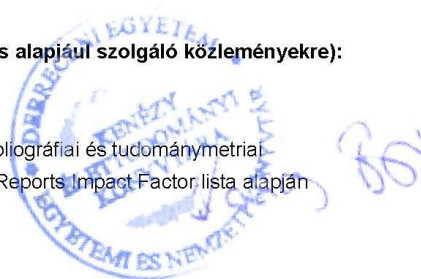
2. **Jónás, Á.**, Fekete, E., Flippi, M., Sándor, E., Jäger, S., Molnár, Á.P., Szentirmai, A., Karaffa, L.: Extra- and intracellular lactose catabolism in *Penicillium chrysogenum*: phylogenetic and expression analysis of the putative permease and hydrolase genes. *J. Antibiot.* 67, 489-497, 2014. ISSN: 0021-8820. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/ja.2014.26> IF:1.73

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 2,319**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 2,319**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2016.03.30.



## CONTENTS

<b>1. INTRODUCTION</b> .....	24
3.1. Lactose metabolism in fungi .....	24
3.2. D-galactose metabolism in fungi .....	25
<b>2. AIMS OF THE DTUDY</b> .....	26
<b>3. MATERALS AND METHODS</b> .....	26
3.1. Strains and cultivation conditions .....	26
3.2. Preparation of cell free extracts and medium samples .....	27
3.3. Genomic DNA and total RNA isolation .....	27
3.4. Northern blot and RT-PCR analysis .....	27
3.5. Analytical methods .....	28
3.6. Hydrolase assays .....	28
<b>4. RESULTS</b> .....	29
4.1. Growth of <i>Penicillium chrysogenum</i> on lactose .....	29
4.1.1. Time-profiles of extra-and intracellular $\beta$ -galactosidase activity .....	29
4.1.2. Expression profiling of the putative beta-galactosidase and lactose permease genes.....	29
4.2. Growth of <i>Penicillium chrysogenum</i> on D-galactose .....	30
4.2.1. Expression of the Leloir pathway on D-galactose and other sugars .....	30
<b>5. SUMMARY</b> .....	31
<b>6. THESIS</b> .....	32
<b>7. LEGENDS TO THE TABLE AND FIGURES</b> .....	33
<b>REFERENCES</b> .....	21
<b>LIST OF PUBLICATIONS</b> .....	34

## 1. INTRODUCTION

### 1.1. Lactose metabolism in fungi

The heterodisaccharide lactose (1,4-O-beta-D-galactopyranosyl-D-glucose) occurs mainly in milk where it makes up 2-8 % of the dry weight (Roelfsema et al. 2010). In mammals, it is formed by the action of lactose synthetase, which transfers the galactosyl unit from UDP-galactose to D-glucose (Brüssow et al. 2013). In the intestine, lactose is hydrolyzed by membrane-anchored lactase/phlorizin hydrolase (lactose galactohydrolase; EC 3.2.1.108), a family 35 glycosyl hydrolase (Naz et al. 2011). Whey, the lactose-rich by-product of cheese manufacture, has long been used as a cheap growth substrate for the production of valuable metabolites such as penicillin or (hemi)cellulolytic enzymes by filamentous fungal cell factories (Persson et al. 1991). The strong, lactose-inducible cellulase gene promoters from *Trichoderma reesei* are also used for commercial recombinant protein production (Pentillä et al. 2004).

Two strategies have been described for the catabolism of lactose in fungi: extracellular hydrolysis and subsequent uptake of the resulting monomers, e.g., D-glucose and D-galactose, and uptake of the disaccharide followed by intracellular hydrolysis (Seiboth et al. 2007). Some well-studied ascomycetes such as *Kluyveromyces lactis* (Sheetz et al. 1981; Riley et al. 1987; Lodi et al. 2005) and *Aspergillus nidulans* (Fekete et al. 2012b) possess an intracellular pathway for lactose assimilation, while in *Aspergillus niger* (Nevalainen et al. 1981; O'Connell et al. 2010), lactose hydrolysis occurs extracellularly. Fungal  $\beta$ -galactosidases ( $\beta$ -D galactoside galactohydrolase; EC 3.2.1.23) can be distinguished into extracellular enzymes, that are characterised by an acidic pH optimum and intracellular ones, that optimally function at neutral pH. The former generally belong to glycosyl hydrolase family 35 (GH35; Gamauf et al. 2007) while the latter usually are GH2 proteins, although some  $\beta$ -glucosidases (GH1) also act on lactose (Ishikawa et al. 2007). In *N. crassa*, both  $\beta$ -galactosidase (bGal) isozymes are produced on lactose medium (Bates et al. 1964). It has to be noted that in the past, both types of activity were commonly studied using artificial chromogenic substrates, like *ortho*- or *para* nitrophenyl-beta-D-galactopyranoside (O/PNPG), rather than lactose.

Strains of *P. chrysogenum* [species complex *P. chrysogenum sensu lato*, phylogenetic species *Penicillium rubens* (Houbraken et al. 2011)] are used as industrial producers of penicillin and structurally related antibiotics. As such, *P. chrysogenum* is amongst the most important fungi employed in biotech industry, with thousands of studies devoted to its potential to produce natural and semi-synthetic antibiotics (Van Den Berg et al. 2011; Barreiro et al. 2012; Weber et al. 2012). However, apart from traits directly related to penicillin biosynthesis, general aspects of their carbon metabolism have received little attention. In particular, its utilization of lactose and that of its monomer product D-galactose have never been studied in depth, which is surprising given the scale on which penicillin has been produced on whey as the growth substrate for decades.

## 1.2. D-galactose metabolism in fungi

Lignocellulosic plant biomass is the most abundantly available organic raw material in nature. It is composed of cellulose, hemicellulose and pectin (recently reviewed by Cragg et al., 2015). Hemicellulose can further be divided into three principal classes of polymers: xylan, mannan and xyloglucan (de Vries and Visser, 2001). D-Galactose (NB. The C-4 epimer of D-glucose) is the only constituent monosaccharide common to all three classes, and is also present in important pectic polymers (Pauly and Keegstra, 2010). In depth knowledge about microbial enzyme systems involved in D-galactose release from plant biomass and its subsequent uptake and catabolism, is of considerable industrial and environmental interest (Bhat, 2000).

Ascomycete filamentous fungi are traditionally deemed superior to any other group of microorganisms in the biodegradation of lignocellulose due to their broad range of plant cell wall degrading enzyme activities and their protein secretion capabilities. Many of these fungal enzymes are operational under extreme environmental and *ditto* industrial cultivation conditions such as high temperature, extremes of pH, high salt concentrations or high pressure. Strains of *Penicillium chrysogenum* (species complex *P. chrysogenum sensu lato*, phylogenetic species *P. rubens* – Houbraken et al. 2011) have been exploited and continuously improved for the industrial production of penicillin and structurally related antibiotics from the Second World War onwards (for recent reviews, see Weber et al., 2012, Ozcengiz and Demain, 2013). More recently, they are increasingly appreciated as efficient production platforms for a variety of hydrolysing enzyme cocktails of fungal origin on cheap agro-industrial residues and (other) abundantly available plant matter (Sakamoto and Ishimaru, 2013). Nevertheless, little is known about the downstream metabolism of D-galactose and other monomeric lignocellulose contents fueling this widely applied fungal cell factory.

The Leloir pathway of D-galactose catabolism (**Figure 1**) is a ubiquitous trait in prokaryotic and eukaryotic cells (for a review, see Frey, 1996). It is comprised of an ATP-dependent galactokinase (EC 2.7.1.6) that catalyzes the formation of D-galactose-1-phosphate, which is subsequently converted to UDP-galactose by D-galactose-1-phosphate uridylyl transferase (EC 2.7.7.12) using UDP-glucose as the donor and yielding D-glucose 1-phosphate as the second product. Next, UDP-galactose is epimerized into UDP-glucose by UDP-galactose-4-epimerase (EC 5.1.3.2) to recycle the co-factor. To complete the catabolisation of the D-galactose carbon source, UDP-glucose and glucose-1-phosphate are interconverted by UDP-glucose pyrophosphorylase (EC 2.7.7.9) as glucose-1-phosphate feeds into mainstream metabolism after conversion into glucose-6-phosphate, a key primary metabolite, by phosphoglucomutase (EC 5.4.2.2). The last three enzymes called the Leloir catabolic route.

## 2. AIMS OF THE STUDY

The goals of the present study was to identify genes coding for the structural activities (i.e., enzymes and transporters) putatively involved in lactose catabolism in the wild-type reference strain NRRL 1951 as well as the industrial penicillin-producer AS-P-78.

We report here the expression profiles of the Leloir pathway genes on lactose – the main carbohydrate in the profuse dairy residue whey, often used to cultivate *P. chrysogenum* on industrial scale – and the monosaccharides most abundantly present in plant cell wall biomass, D-galactose, D-glucose, D-xylose and L-arabinose.

## 3. MATERIALS AND METHODS

### 3.1. Strains and cultivation conditions

Two strains of *P. chrysogenum* (*sensu lato*) were used in this work. NRRL 1951 was isolated from nature (Raper et al. 1944) and is the parent strain from which the large majority of improved penicillin producers are derived (Newbert et al. 1997). One of those, the increased-titre strain AS-P-78 (Barredo et al. 1989) was a kind gift from Antibióticos S.A. (León, Spain). Minimal Medium (MM) for shake flask and bioreactor cultivations were formulated as described previously (Haas et al. 1997). All growth media inoculated with pregrown mycelia were completely synthetic while 0.01 % (w/v) peptone was included in media that were inoculated with conidia (see Results section for explanation). Carbon sources (i.e., sugars or glycerol) were used at concentrations up to 1.5 % (w/v). Supplements were added from sterile stock solutions. Shake flask cultures were incubated at 28 °C in 500-mL Erlenmeyer flasks in a rotary shaker at 200 revolutions per minute. Where appropriate, cultures were inoculated with  $5 \times 10^6$  *P. chrysogenum* conidia per ml of medium.

For induction experiments, replacement cultures were used for which mycelia were pregrown for 48 h in MM containing 1 % (v/v) glycerol as the carbon source, and harvested by filtration on a sintered glass funnel. After a thorough wash with cold sterile water, biomass was transferred to flasks with fresh MM containing a range of concentrations (from 0.1 mM to 25 mM) of the various carbon sources tested. Samples were taken after 4 h of further incubation to assess inductory ability. Preliminary trails had established that 4 h of contact is the time lapse in which maximal induced activity levels were achieved, with a minimal variation in the biomass concentration. For transcript analysis, samples were taken 4, 8, 12 and 24 h after the transfer of mycelia.

Bioreactor cultures were inoculated with the harvested and washed biomass of 200 ml MM/glycerol-grown cultures. Fermentations were carried out in a 9 L glass bioreactor (Inel) with a culture (working-) volume of 6 L, equipped with one six-blade Rushton disc turbine impeller. Operating conditions were pH 6.0, 28 °C, and 0.5 vvm (volumes of air per volume of liquid per minute). Dissolved oxygen levels were maintained at 20 % saturation and were controlled by means of the agitation rate. To minimize medium loss, the waste gas (from the

headspace) was cooled in a reflux condenser connected to an external cooling bath (4 °C) before exiting the system.

The yield coefficient ( $Y_{x/s}$ ) was calculated as the ratio of the maximal concentration of biomass achieved during fermentation and the initial carbon source concentration. Specific growth rates ( $\mu$ ;  $\text{h}^{-1}$ ) were calculated from the increased Dry Cell Weight (DCW) over the time lapsed until carbon source exhaustion (Pirt et al. 1975).

### 3.2. Preparation of cell free extracts and medium samples

To obtain cell-free extract, 10 ml of culture broth were withdrawn, suction filtered, and the harvested mycelia thoroughly washed with 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.0. The biomass was then resuspended in 5 ml of the same buffer, and homogenized in a pre-cooled Potter-Elvehjem glass homogenizer. The homogenate was centrifuged at 3,000 x g (15 min, 4 °C) and the supernatant was immediately used to assay intracellular  $\beta$ -galactosidase/lactase activity. To determine extracellular  $\beta$ -galactosidase/lactase activity, 5 ml of culture broth were withdrawn, the mycelia spun down (3,000 g for 15 min), and the supernatant was directly assayed.

### 3.3. Genomic DNA and total RNA isolation

Mycelia were harvested by filtration over nylon mesh and thoroughly washed with sterile distilled water. Excess liquid was removed by squeezing between paper sheets and the biomass was quickly frozen in liquid nitrogen. For nucleic acid isolation, frozen biomass was ground to dry powder using liquid nitrogen-chilled mortar and pestle. Genomic DNA was extracted using Promega's Wizard SV Genomic DNA Purification System and NucleoSpin Plant II while total RNA was isolated with Promega's SV Total RNA Isolation System and NucleoSpin RNA Plant (latest kit from Macherey-Nagel).

### 3.4. Northern blot and RT-PCR analysis

Standard procedures (Sambrook et al. 2001) were applied for the quantification, denaturation, gel separation and nylon blotting of total RNA, and the subsequent hybridization of the resultant membranes with gene-specific probes (**Table 1**). Agarose gels were charged with 5  $\mu$ gram RNA per slot. Probes were digoxigenin-labeled using the PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche Applied Science) primed with gene-specific oligonucleotides (listed in Table 1) off wild-type (NRRL 1951) genomic DNA. Gene-specific hybridization was visualized with Lumi-Film Chemiluminescent Detection film (Roche Applied Science). All transcript analyses were independently repeated at least twice. For RT-PCR analysis of Pc12g11750 (= *bgaE*), first strand cDNA was synthesized by a RevertAid H minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas), according to the manufacturer's protocol. cDNA was subsequently used as a template for PCR employing the same gene-

specific primer pair as for Northern analysis (**Table 1**). PCR was performed in a volume of 25  $\mu$ l containing 4  $\mu$ l of cDNA, and Dream Taq polymerase (Thermo Scientific). Cycling conditions after an initial denaturing at 95°C for 2 min were: 40 cycles of 95°C for 1 min, 59°C for 1 min, 72°C for 1 min and a final step of 72°C for 5 min. The gene encoding the translation-elongation factor-*alpha* (*tef1*) was used as an expression control (Linz et al. 1986).

### 3.5. Analytical methods

Mycelial dry weight (Dry Cell Weight, DCW) was determined from 5 and 10 ml culture aliquots. The biomass was harvested and washed on a preweighted glass wool filter by suction filtration and the filter dried at 80 °C until constant weight. Dry weight data reported in the Results section are the average of the two separate measurements, which never deviated more than 14 %. The concentration of D-glucose, D-galactose, L-arabinose, D-xylose, glycerol and lactose in growth media was determined by High Pressure/Performance Liquid Chromatography (HPLC) with a proton exchange column (Bio-Rad Aminex HPX-87H<sup>+</sup>) thermostated at 55 °C, using isocratic elution with 10 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and refractive index detection. The concentrations given are the average of two independent measurements, which never deviated more than 3 %.

### 3.6. Hydrolase assays

Intracellular  $\beta$ -galactosidase activity was assayed by incubating a mixture of 0.5 ml of cell free extract and 0.5 ml of a 6 mM *ortho*-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (ONPG) solution for 30 min at 28°C. Reactions were terminated by the addition of 2 ml 1 M Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> and the OD<sub>410</sub> was determined using an Amersham photospectrometer. For each extract, a sample to which the Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> was added prior to the ONPG substrate, provided a blank measure.

Extracellular activity was assayed similarly except that a mixture of 0.5 ml of cell-free medium supernatant and an equal volume of a 6-mM ONPG solution in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 5.0) was used.

One unit (U) of  $\beta$ -galactosidase activity corresponds to the release of 1  $\mu$ mol of *ortho*-nitrophenol per min, using a concentration calibration curve determined under the conditions of the assay. Cell free extract and medium protein contents were determined with a modified Lowry method (Peterson et al. 1983), using BSA for calibration. Specific activity was expressed as U mg<sup>-1</sup> protein.

## 4. RESULTS

### 4.1. Growth of *Penicillium chrysogenum* on lactose

To gain a first insight, both the wild-type reference strain as well as the industrially improved progeny strain AS-P-78 were grown on lactose as the sole carbon source. Both strains grew remarkably similar under batch conditions, consuming 15 g/L lactose in about 74 hours (**Fig. 1**). Data from these batch fermentations strongly suggested that the structural genetic elements required for lactose assimilation are present in the *P. chrysogenum* genome and that they are expressed and translated into enzymes in the germlings upon induction.

#### 4.1.1. Time-profiles of extra- and intracellular $\beta$ -galactosidase activity

The time-course of bGal activity formation on lactose as a sole carbon source in batch fermentations were analysed using transferred mycelia pregrown on glycerol as inoculum. In both strains, the time-profile of sugar depletion concurred with the presence of both intra- and extracellular bGal activities (**Figs. 2-4**), measured as ONPG hydrolases. Activity on lactose rapidly increased during the phase of fast growth and rapid carbon substrate consumption and subsequently stabilized (**Figs. 3 and 4**). Interestingly, in contrast to the intracellular bGal activity in *A. nidulans* (Fekete et al. 2002), both the extra- and the intracellular bGal activity of cultures growing on D-galactose were low, hardly above the background. On the other hand, a moderate extracellular (but not intracellular) ONPG-hydrolysing activity could be measured on L-arabinose as a sole carbon source (**Figs. 3 and 4**), reaching a maximal value of approximately half of the one measured in lactose media in both of the two investigated strains. Upon growth on other commonly occurring monosaccharides, such as D-glucose, D-fructose, as well as on glycerol, neither extra- nor intracellular bGal could be detected in any of the strains.

#### 4.1.2. Expression profiling of the putative beta-galactosidase and lactose permease genes

Specific bGal activity data on a variety of carbon sources showed that no enzyme was formed on D-glucose, D-xylose, glycerol and D-fructose. Therefore, transcript analysis of the genes identified *in silico* as being putatively involved in lactose catabolism (**Table 1**) was performed on lactose, D-galactose and L-arabinose, using D-glucose as a negative reference. Pre-grown mycelia were treated similarly as described at the induction experiments, except that samples were taken at two different time-points, i.e., at 4 and 8 hours after the transfer of mycelia.

Out of the five *P. chrysogenum* candidate genes identified as putatively encoding a bGal enzyme, two of the three extracellular genes (*bgaB*, *bgaC*) were not expressed on lactose at any time-point or concentration used, in any of the two strains (data not shown). Expression characteristics of the remaining three hydrolase genes (the extracellular *bgaA* as well as the

intracellular *bgaD* and *bgaE*) was identical in the two *P. chrysogenum* strains and was apparently not influenced by the lactose concentration used (e.g., 10 mM or 25 mM). Remarkably, elongated incubation time (up to 8 hours) relative to the 4 hour long period clearly increased transcript abundance of *bgaD*.

In the closely related fungus *A. nidulans*, the *bgaD*-ortholog of *P. chrysogenum* (also called *bgaD*) is solely responsible for intracellular 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (Xgal) hydrolase formation (Fekete et al. 2012a). Since *P. chrysogenum* did not form intracellular bGal activity on any carbon source but lactose, it was no surprise that transcription of *bgaD* exclusively occurred on lactose, and could not be provoked by other carbon sources including D-galactose, one of the products of lactose hydrolysis (**Figs. 5 and 6**). On the other hand, similarly to its *A. nidulans*-ortholog AN3200, *bgaE* exhibited a weak, constitutive expression under all conditions tested. *bgaE* transcripts could hardly be detected by Northern analysis, and we used semi-quantitative Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR) to probe expression of this particular gene. *bgaE* was expressed at a low basal level under all tested conditions, including those in which we were unable to measure either ONPG or lactose hydrolysis. Similarly to its ortholog in *A. nidulans*, *bgaE* unlikely plays an important role in lactose catabolism in *P. chrysogenum*.

As for the two putative lactose permease genes, *lacA* was expressed exclusively on lactose in both *P. chrysogenum* strains at both inducer concentrations and incubation times (**Fig. 7**). Interestingly, *lacA* expression levels appeared to be considerably higher at 4 h after the medium shift than at 8 h, i.e., exactly the reversed of what has been observed for the intracellular *bgaD* gene. On the other hand, *lacB* transcript could not be observed on lactose (**Fig. 7**) or on any other carbon sources tested (data not shown), indicating its irrelevance in the assimilation of the disaccharide.

## 4.2. Growth of *Penicillium chrysogenum* on D-galactose

Conidiospores of several filamentous ascomycete fungi – a notable example is the cell factory *Aspergillus niger* – cannot germinate on D-galactose as a sole carbon source (Fekete et al., 2012a). On the other hand, mycelia of these species are perfectly able to form new biomass from D-galactose when germinated on other carbon sources. To verify whether the ability of *P. chrysogenum* to utilize D-galactose as a sole carbon source is growth-stage dependent or not, we inoculated conidiospores in liquid MM with 1.5 % D-galactose as the sole carbon source. The fungus germinated in such submerged cultures and grew well on D-galactose, consuming 15 g/L of the sugar in about 40 h (**Figure 8**).

### 4.2.1. Expression of the Leloir pathway on D-galactose and other sugars

Expression studies were performed on D-galactose, the galactopyranose-containing disaccharide lactose and on the latter's other monomeric constituent, D-glucose. Also tested were the two most abundantly present pentoses in plant cell walls, L-arabinose and D-xylose.

All genes mined from the *P. chrysogenum* genome encoding the five structural enzymes of the Leloir pathway were expressed constitutively on D-galactose, irrespective of

the time of sampling (i.e., 4, 8, 12 or 24 h after a medium shift of glycerol-pregrown mycelia; **Figure 9**). For the putative 4-epimerase genes, the expression levels of *ugeA* appeared consistently considerably higher than those of *ugeC*. We could not detect transcript for the three other selected putative epimerase genes, *ugeB*, *ugeD* and *ugeE*, not on D-galactose nor under any other of the tested growth conditions (results not shown). Essentially identical expression profiles were observed in the presence of lactose. Most importantly, however, the expression profiles of the studied genes on D-glucose, L-arabinose and D-xylose were markedly different from those apparent on D-galactose or lactose (**Figure 9**). The genes coding for one of the UDP-D-galactose 4-epimerases (*ugeA*), the (putative) UDP-D-glucose pyrophosphorylase (*galF*) and the phosphoglucomutase (*pgmA*) were all expressed in a similar, principally constitutive fashion on these latter carbon sources, resembling their profiles in the presence of D-galactose or lactose as (sole) growth substrate.

Their expression is very likely related to the essential anabolic functions of the Leloir pathway(s) in the synthesis of the fungal cell wall during growth until carbon source exhaustion (see Discussion section). On the contrary, transcripts of the first two genes of the catabolic Leloir pathway (*galE* and *galD*) that – in theory – are irrelevant for cell wall synthesis on carbon sources other than D-galactose, could not be observed in our Northern blots but – very modestly – at the last time point of the D-glucose induction experiment (24 h), by which the growth substrate is completely exhausted (the latter, results not shown). Expression of either *galE* or *galD* could not be observed on L-arabinose and D-xylose with Northern blots at any of the four time points of the transfer cultures of either pentose sugar, while no relevant galactokinase activities could be measured in pentose-cultivated mycelia (**Figure 9**). Note that, in contrast to the D-glucose transfer, the cultures on the other four sugars were not carbon exhausted 24 h after medium transfer (results not shown). This suggests that the very modest expression of *galE* and *galD* observed in the D-glucose cultures 24 h after medium transfer is part of a starvation response in which reserve carbohydrate, including D-galactose, is slowly liberated from the fungus' cell walls. We conclude that the first two steps of the Leloir pathway of D-galactose catabolism are substrate inducible in *P. chrysogenum* rather than constitutive.

## 5. SUMMARY

*Penicillium chrysogenum* is used as industrial producer of penicillin. We investigated its catabolism of lactose, an abundant component of whey used in penicillin fermentation, comparing the type strain NRRL 1951 with the high producing strain AS-P-78. Both strains grew similarly on lactose as the sole carbon source under batch conditions, exhibiting almost identical time-profiles of sugar depletion.

*In silico* analysis of the genome sequences revealed that *P. chrysogenum* features at least five putative *beta*-galactosidase-encoding genes at the annotated loci Pc22g14540, Pc12g11750, Pc16g12750, Pc14g01510 and Pc06g00600. The first two proteins appear to be orthologs of two *Aspergillus nidulans* family 2 intracellular glycosyl hydrolases expressed on lactose. The latter three *P. chrysogenum* proteins appear distinct paralogs of the extracellular *beta*-galactosidase from *Aspergillus niger*, LacA, a family 35 glycosyl hydrolase. The *P. chrysogenum* genome also specifies two putative lactose transporter genes at the annotated loci Pc16g06850 and Pc13g08630. These are orthologs of paralogs of the gene encoding the

high-affinity lactose permease (*lacpA*) in *A. nidulans* for which *P. chrysogenum* appears to lack the ortholog.

Transcript analysis of Pc22g14540 showed that it was expressed exclusively on lactose, while Pc12g11750 was weakly expressed on all carbon sources tested, including D-glucose. Pc16g12750 was co-expressed with the two putative intracellular *beta*-galactosidase genes on lactose and also responded on L-arabinose. Pc13g08630 transcript was formed exclusively on lactose. The data strongly suggest that *P. chrysogenum* exhibits a dual assimilation strategy for lactose, simultaneously employing extracellular and intracellular hydrolysis, without any correlation to the penicillin-producing potential of the studied strains.

In this study, we also analyzed the expression of the structural genes encoding the five enzymes comprising the Leloir pathway of D-galactose catabolism in the industrial cell factory *Penicillium chrysogenum* on various carbon sources.

The genome of *P. chrysogenum* contains a putative galactokinase gene at the annotated locus Pc13g10140, the product of which shows strong structural similarity to yeast galactokinase that was expressed on lactose and D-galactose only. The expression profile of the galactose-1-phosphate uridylyl transferase gene at annotated locus Pc15g00140 was essentially similar to that of galactokinase. This is in contrast to results from other fungi such as *Aspergillus nidulans*, *Trichoderma reesei* and *A. niger*, where the ortholog galactokinase and galactose-1-phosphate uridylyl transferase genes were constitutively expressed. As for the UDP-glucose-4-epimerase encoding gene, five candidates were identified. We could not detect Pc16g12790, Pc21g12170 and Pc20g06140 expression on any of the carbon sources tested, while for the other two loci (Pc21g10370 and Pc18g01080) transcript was clearly observed under all tested conditions. Like the 4-epimerase specified at locus Pc21g10370, the other two structural Leloir pathway genes – UDP-glucose pyrophosphorylase (Pc21g12790) and phosphoglucomutase (Pc18g01390) – were expressed constitutively at high levels as can be expected from their indispensable function in fungal cell wall formation.

## 6. THESIS

1. *Penicillium chrysogenum (sensu lato)* features a dual lactose assimilation scheme that comprises an extracellular bGal, a (putative) lactose permease and an intracellular bGals.
2. Neither the extra- nor the intracellular bGal activity, and none of the putative *Bga* and permease genes could be induced by D-galactose.
3. The *bgaA* and *bgaD* encode the (major) hydrolases involved in extra- and intracellular lactose breakdown in *P. chrysogenum*.
4. *P. chrysogenum* seems to harbor only one physiologically relevant lactose transporter.
5. Lactose metabolism of *enicilloium chrysogenum* lacks correlation to the penicillin-producing potential of the fungus in the improved titre strain AS-P-78.
6. The galactokinase- and galactose-1-P uridylyltransferase encoding genes appeared selectively inducible to high levels by D-galactose and lactose in *P. chrysogenum*

## 7. LEGENDS TO THE TABLE AND FIGURES

**Figure 1.** Schematic representation of the Leloir pathway for D-galactose catabolism and D-glucose/D-galactose nucleotide biosynthesis.

**Table 1.** Primers used for the amplification of the putative beta-galactosidase and lactose permease genes in *Penicillium chrysogenum*.

**Figure 2.** Cultivation of *Penicillium chrysogenum* NRRL 1951 (empty symbols) and *P. chrysogenum* AS-P-78 (filled symbols) on lactose. Time-profile of biomass production (squares) and residual lactose concentration (circles).

**Figure 3.** Time-profile of the specific intracellular beta-galactosidase activity of *Penicillium chrysogenum* NRRL 1951 (panel A) and *P. chrysogenum* AS-P-78 (panel B) grown on D-glucose (●), D-fructose (▲), lactose (■), D-galactose (Δ), glycerol (▼), D-xylose (□) and L-arabinose (○) as a sole carbon source. For the clarity of the plots, error bars are shown for the lactose-grown samples.

**Figure 4.** Time-profile of the specific extracellular beta-galactosidase activity of *Penicillium chrysogenum* NRRL 1951 (panel A) and *P. chrysogenum* AS-P-78 (panel B) grown on D-glucose (●), D-fructose (▲), lactose (■), D-galactose (Δ), glycerol (▼), D-xylose (□) and L-arabinose (○) as a sole carbon source. For the clarity of the plots, error bars are shown uniquely for the lactose- and L-arabinose-grown samples.

**Figure 5.** Transcript analysis of the induction spectrum of two putative beta-galactosidase genes (*bgaA*, putatively encoding an extracellular- and *bgaD*, putatively encoding an intracellular bGal) in response to D-glucose (Glu), D-galactose (Gal), L-arabinose (Ara) and lactose (Lac) in *Penicillium chrysogenum* NRRL 1951 and *P. chrysogenum* AS-P-78.

**Figure 6.** Expression characteristics of the *bgaE* gene, putatively encoding an intracellular beta-galactosidase in *Penicillium chrysogenum* NRRL 1951 and *P. chrysogenum* AS-P-78. Symbols used are identical to Fig. 4. Expression of the gene encoding the eukaryotic translation elongation factor 1-alpha component (*tef1*) served as a constitutive control for the RT-PCR analysis.

**Figure 7.** Transcript analysis of the induction spectrum of the two putative lactose permease genes (*lacA* and *lacB*) in response to lactose (Lac) in *Penicillium chrysogenum* NRRL 1951 and *P. chrysogenum* AS-P-78. No transcript was observed for any of the other carbon sources tested. As a control for the quality and quantity of the RNA, ribosomal RNA (28S and 18S) was visualised with ethidium bromide; the negative of the original image is shown at the bottom (rRNA).

**Figure 8.** Time-profile of growth (open symbols) as well as residual D-galactose concentrations (filled symbols) in batch fermentations of *Penicillium chrysogenum* NRRL 1951. Medium was inoculated with conidiospores.

**Figure 9.** Transcript analysis of the catabolic Leloir pathway genes in *Penicillium chrysogenum* NRRL 1951. For experimental details, see the Materials and methods section. Gene abbreviations are according to Table 1. Ribosomal RNAs (28 S and 18 S) were visualized in a 2 % native agarose gel with ethidium bromide and shown as a quantitative and qualitative control of the RNA samples.



Registry number: DEENK/82/2016.PL  
Subject: Ph.D. List of Publications

Candidate: Ágota Jónás

Neptun ID: U0CX50

Doctoral School: Pál Juhász-Nagy Doctoral School of Biology and Environmental Sciences

### List of publications related to the dissertation

#### Foreign language scientific article(s) in Hungarian journal(s) (1)

1. **Jónás, Á.**, Fekete, E., Németh, Z., Flippi, M., Karaffa, L.: D-Galactose catabolism in *Penicillium chrysogenum*: Expression analysis of the structural genes of the Leloir pathway. *Acta Biol. Hung.* "Accepted by Publisher" (2016), p. p.. ISSN: 0236-5383. IF:0.589 (2014)

#### Foreign language scientific article(s) in international journal(s) (1)

2. **Jónás, Á.**, Fekete, E., Flippi, M., Sándor, E., Jäger, S., Molnár, Á.P., Szentirmai, A., Karaffa, L.: Extra- and intracellular lactose catabolism in *Penicillium chrysogenum*: phylogenetic and expression analysis of the putative permease and hydrolase genes. *J. Antibiot.* 67, 489-497, 2014. ISSN: 0021-8820. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/ja.2014.26> IF:1.73

Total IF of journals (all publications): 2,319

Total IF of journals (publications related to the dissertation): 2,319

The Candidate's publication data submitted to the iDEa Tudóstér have been validated by DEENK on the basis of Web of Science, Scopus and Journal Citation Report (Impact Factor) databases.

30 March, 2016

