

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

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

**DR. VASASNÉ JÓNÁS ÁGOTA**

Témavezető  
Dr. Karaffa Levente  
egyetemi docens

DEBRECENI EGYETEM  
Természettudományi Doktori Tanács  
Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola  
Debrecen, 2016

## A doktori értekezés betétlapja

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi Doktori Tanács a **Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola Biológia** programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.  
Debrecen, 2016.

.....  
Dr. Vasasné Jónás Ágota

Tanúsítom, hogy **Dr. Vasasné Jónás Ágota** doktorjelölt 2011- 2014 között a fent megnevezett Doktori Iskola **Biológia** programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult.  
Az értekezés elfogadását javasolom.  
Debrecen, 2016.

.....  
Dr. Karaffa Levente

**A doktori értekezés betétlapja**

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

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

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében a Biológia  
tudományágban

Írta: **Dr. Vasasné Jónás Ágota** okleveles biológus-ökológus

Készült a Debreceni Egyetem **Juhász-Nagy Pál Doktori Iskolája**  
(**Biológia Doktori** programja) keretében

Témavezető:

Dr. Karaffa Levente

.....

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Dr. Biró Sándor

.....

tagok: Dr. Miklós Ida

.....

Dr. Kredics László

.....

A doktori szigorlat időpontja: 2015.12.18.

Az értekezés bírálói:

.....

.....

.....

.....

A bírálóbizottság:

elnök: .....

.....

tagok: .....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Az értekezés védésének időpontja: .....

# TARTALOMJEGYZÉK

<b>RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE</b> .....	6
<b>1. BEVEZETÉS</b> .....	7
<b>2. CÉLKITŰZÉS</b> .....	8
<b>3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS</b> .....	9
3.1. A gombák laktóz anyagcseréjének áttekintése.....	10
3.2. A gombák D-galaktóz anyagcseréjének áttekintése.....	14
<b>4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK</b> .....	19
4.1. Törzsek és tenyésztési körülmények.....	19
4.2. Sejtmentes kivonatok és tápoldat minták készítése.....	22
4.3. Genomiális DNS és totál RNS izolálás.....	22
4.4. Northern-blot és reverz transzkriptáz-PCR (RT-PCR) analízis.....	23
4.5. Analitikai módszerek.....	26
4.6. Hidroláz vizsgálatok.....	26
4.7. Galaktokináz enzim vizsgálat.....	27
4.8. Bioinformatika.....	28
4.9. Reprodukálhatóság.....	30
4.10. Felhasznált vegyszerek.....	30
<b>5. EREDMÉNYEK</b> .....	31
5.1. A <i>Penicillium chrysogenum</i> növekedése laktózon.....	31
5.1.1. Béta-galaktoszidáz aktivitás: mesterséges kontra természetes szubsztrátok.....	32
5.1.2. Az extra- és intracelluláris $\beta$ -galaktoszidáz tevékenység időprofiljai.....	33
5.1.3. Béta-galaktoszidáz-aktivitás indukálása.....	36
5.1.4. A laktóz asszimilációban potenciálisan részt vevő glikozil hidroláz és permeáz gének <i>in silico</i> kiválasztása.....	38
5.1.5. A feltételezett bGal és laktóz permeáz gének expressziós profilja.....	40
5.2. A <i>Penicillium chrysogenum</i> növekedése D-galaktózon.....	45
5.2.1. A Leloir-út vonal génjeinek <i>in silico</i> azonosítása.....	46
5.2.2. A Leloir-út vonal expressziója D-galaktózon és egyéb cukrokon.....	48
<b>6. DISZKUSSZIÓ</b> .....	51
<b>7. ÖSSZEFOGLALÁS</b> .....	62
<b>8. SUMMARY</b> .....	64

<b>9. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....</b>	<b>66</b>
<b>10. IRODALOMJEGYZÉK.....</b>	<b>67</b>
<b>11. PUBLIKÁCIÓS LISTA.....</b>	<b>80</b>
<b>12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....</b>	<b>82</b>
<b>13. FÜGGELÉK.....</b>	<b>83</b>

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

<b>ONPG</b>	orto-nitro-fenil- $\beta$ -D-galaktopiranozid
<b>ATP</b>	adenozin-trifoszfát
<b>UMP</b>	uridin-monofoszfát
<b>UDP</b>	uridin-difoszfát
<b>NAD</b>	nikotinamid-adenin-dinukleotid
<b>GH</b>	glikozid hidroláz
<b>MM</b>	Minimal Medium (minimál tápközeg)
<b>DCW</b>	Dry Cell Weight (száraz sejttömeg)
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction (polimeráz-lánreakció)
<b>RT-PCR</b>	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
<b>HPLC</b>	High Pressure Liquid Chromatography (nagy teljesítményű folyadékkromatográfia)
<b>bGal</b>	béta-galaktozidáz
<b>X-gal</b>	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktopiranozid hidroláz
<b>gal-1-P</b>	galaktóz-1-foszfát
<b>SDR</b>	Short-chain Dehydrogenase/Reductase (rövid láncú dehidrogenáz/reduktáz)
<b>NCBI</b>	National Center for Biotechnology Information
<b>MFS</b>	Major Facilitator Superfamily

## 1. BEVEZETÉS

A biológiai tudományok lendületes fejlődése következtében rengeteg új felfedezés születik a sejtműködés, a genetika vagy a biokémia területén, melyeket egyre rövidebb időn belül gyakorlati felhasználás követ. A biotechnológia legújabb eredményeit gyakran gombákkal végzett kísérletek alapozzák meg.

A számos, nem patogén mikroorganizmus közül a fonalas gombák kiemelt szerepet töltenek be viszonylag könnyű tenyésztésük, relatíve gyors növekedésük, valamint komoly gyakorlati jelentőséggel bíró metabolitjaik és enzimeik miatt. Számos olyan kedvező tulajdonsággal rendelkeznek, melyek egyszerűbbé teszik fermentációs úton történő előállításukat pl. alacsony pH-n és magas só koncentrációnál is szaporodnak, számos, kémiaiailag merőben eltérő vegyületet képesek szubsztrátumként hasznosítani. A leggyakrabban alkalmazott fungális eredetű enzimek a hidrolázok csoportjába tartoznak. Számos gombák által termelt enzimet hasznosítanak, pl. a keményítő, üdítők, élelmiszerek, textíliák, takarmányok előállítása során, a papír-, bőr-, és sütőiparban, valamint vegyipari és orvosbiológiai területeken (Bennett, 1998).

Mindezek ellenére a gombák növekedési és szaporodási folyamatainak szabályozása, így többek között a szubsztrátumok lebontása a molekuláris mechanizmusok szintjén még nagyrészt feltáratlan terület. A fehér foltok, feltérképezése nagy lendülettel folyik (Jakucs, 2009) többek között a Debreceni Egyetem Biomérnöki Tanszékén is, ahol régóta folynak kutatások nagy termelőképességű *Penicillium chrysogenum* törzsekkel a fermentációs ipar szempontjából jelentős kérdések tudományos igényű magyarázatára.

A *Penicillium* nemzetség tagjai a természetben széles körben elterjedt penészgombák, melyek magas cukortartalmú termékek, gabonafélék, olajos magvak, fűszerek, sajtok, kenyér penészesedését okozhatják. A *Penicillium chrysogenum* a legkülönbözőbb talajtípusokban a mikroflóra egyik elterjedt képviselője. Fontos szerepe van a növényi és állati eredetű szerves anyagok lebontásában, gyakran izolálható friss vagy raktározott növényi eredetű élelmiszerről. Telepei szélesen terjedők, kékeszöld színűek, a konídiumok ellipszoid alakúak, sima falúak (Pesti, 2001).

## 2. CÉLKITŰZÉS

A *Penicillium chrysogenum* komoly biotechnológiai jelentőséggel bíró fonalas gomba, a penicillin beta-laktám típusú antibiotikumot termeli. Az antibiotikum fermentációs ipari előállítására évtizedekig laktóz tartalmú tejsavó szénforráson történt, ennek ellenére laktóz asszimilációs mechanizmusairól, illetve a katabolizmusban résztvevő struktúrgénekről és az általuk kódolt enzimekről keveset tudunk. Hasonló a helyzet az egyik laktóz monomernek, a D-galaktóznak a lebontásával kapcsolatban is.

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.

---

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

### 3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Az antibiotikumok a leggyakrabban felírt, életmentő gyógyszerek közé tartoznak. Az első antibiotikum, a penicilin 1928-as, Alexander Fleming nevéhez kötődő felfedezése alapjaiban változtatta meg az orvostudományt. Ipari előállítására azonban csak az 1940-es években indulhatott meg, ami ma már a *Penicillium chrysogenum*-mal történik, mely lényegesen több penicillint termel, mint Fleming *P. notatum*-ja.

A laktóz a penicillin gyártás klasszikus szénforrása volt, mivel lassú hasznosulása miatt karbon katabolizmust derepressziót vált ki a termelő organizmusban, ami az antibiotikum bioszintézis utak aktiválásával jár együtt. A lassú laktóz hasznosulás oka a hidrolízis illetve a D-galaktóz monomer epimerizációjának időigénye.

Napjainkban világméretű egészségügyi problémát jelent a túlzott antibiotikum-használat, mivel a baktériumok rezisztenssé váltak számos antibiotikummal szemben, sőt egyes baktériumok már multi rezisztenciával rendelkeznek, mint például a kórházi MRSA (methicillin-rezisztens *Staphylococcus aureus*) törzsek.

Bár az utóbbi évtizedben folyamatos kutatások folynak újabb antibiotikumok kifejlesztésére a multirezisztens törzsek ellen, ezek számos, részben regulációs és pénzügyi természetű ok miatt jóval nehezebben kivitelezhetőek, mint korábban. Ezért is bír gyakorlati jelentőséggel a laktóz hasznosítás molekuláris hátterének tisztázása a *P. chrysogenum*-ban.

### 3.1. 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-galaktozról a D-glükózra helyezi (Brüssow és mtsai. 2013). A bélben a laktózt a membránhoz kötött laktáz/florizin hidroláz hasítja monomereire (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-galaktoz) 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.

Mindkét esetben a laktóz molekula hidrolízisekor a  $\beta$ -galaktozidáz (laktáz, EC 3.2.1.23.) enzim hasítja fel a kötéseket a molekularészek között. A  $\beta$ -galaktozidáz enzimek a glikozid hidrolázok (GH) 1, 2, 35 és 42 családjában találhatóak meg ([www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html](http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html)). Előfordulnak a növényvilágban (Biswas és mtsai. 2003, Balasubramaniam és

mtsai. 2005, Kestwal és mtsai. 2007, Kishore és mtsai. 2012), az állatvilágban (Taniguchi és mtsai. 2004), valamint számos mikroorganizmus is szintetizálja.

A növényi eredetű enzimek oldott formában a citoplazmában vagy sejtfalhoz kötött állapotban fordulnak elő. Elsősorban gyümölcsfélékben és magvakban mutattak ki  $\beta$ -galaktozidáz aktivitást. Ez gyümölcsök esetében az érés, míg magok esetében a csírázás során detektálható a legnagyobb mértékben (Kestwal és mtsai. 2007).

Az emlősök egy jó részében a laktáz csak újszülöttkorban működik. Az ember (*Homo*) egyes csoportjaiban és a háziállatok egy jó részében azonban aktivitása a későbbiekben is megmaradhat, így a tejcukrot felnőttkorban is fel tudják használni. Mindazonáltal becslések szerint világszerte a felnőtt népesség 75%-a nem képes teljes egészében lebontani a tejcukrot (Pribila és mtsai. 2000). Ezt laktóz-érzékenységnek vagy laktóz-intoleranciának nevezzük (Misselwitz és mtsai. 2013).

A mikroorganizmusok által termelt  $\beta$ -galaktozidáz enzimekre vonatkozóan egyre szélesebb körű kutatások folynak. Az élesztőgombák nagy mennyiségben termelnek  $\beta$ -galaktozidáz enzimet, amelyet sokrétűen alkalmaznak az iparban és az élelmiszergyártásban. Többek között a tejben lévő laktóz lebontásával a laktóz-intolerancia tüneteinek enyhítésére (Milchová és mtsai. 2006), továbbá galakto-oligoszacharidok előállítására, amelyek prebiotikumokként hasznosíthatók (Iqbal és mtsai. 2010). Az *E. coli*-ban a *LacZ* gén kódolja ezt az enzimet, amely a *lac operon* egyik struktúr génje. A *lacZ* gént a molekuláris klónozásban máig markerként alkalmazzák az ún. kék-fehér szelekciós rendszerekben a nem-rekombináns plazmidot tartalmazó baktérium kolóniák kiszűrésére.

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 családkhoz 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 szubsztátokkal, leggyakrabban *orto*- vagy *para*-nitro-fenil- $\beta$ -D-galaktopiranozidon (O/PNPG) vizsgálják.

Az intracelluláris hidrolízis esetében szükség van egy fehérjére, mely a laktózt a sejten belülré juttatja: ez a laktóz permeáz. Segítségével a sejtbe bejutott tejcukor a citoszolban is hidrolizálható, megkönnyítve az anyagcsere folyamatait.

A laktóz permeáz az MF („major facilitator”) szuperfamilia, azon belül a cukor transzporterek családjába tartozik. Az MF szuperfamilia egyike a két legnagyobb Földön található membrán transzporter családnak (Stephanie és mtsai. 1998). Megtalálható prokariótákban, archeákban, eukariótákban. A cukor transzporter családban található permeázok képesek a különböző cukrokat (glükóz, galaktóz, laktóz, maltóz, arabinóz, stb.) a sejten belülré juttatni. Elmondható, hogy ezek a transzporterek specifikusak és kifejeződésük szoros együttműködése figyelhető meg az intracelluláris  $\beta$ -galaktozidáz enzimmel. Az *E. coli* baktériumban a permeáz enzim képzéséért a *lacY* gén felelős, mely, elősegíti a laktóz transzportját a sejtbe. Több gombafajban is leírták, vizsgáltak laktóz permeáz kódoló gént, pl. *Kluyveromyces lactis*-ban (Yuan-Di és mtsai. 1988) és *A. nidulans*-ban is. Utóbbiban sikeresen azonosították a laktóz permeáz enzimet kifejező gén (*lacpA*) clustert is (Fekete és mtsai. 2012b).

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.

ONPG-vel szemben működőképes intracelluláris hidroláz aktivitást egy ipari *P. chrysogenum* törzsben (NCAIM 00237) már leírtak, és az enzimet részlegesen jellemezték (Nagy és mtsai. 2011b). A nem publikált adatok (Bíró és Szentirmai, személyes közlés) azt sugallják, hogy a megfigyelt aktivitás sejtfalhoz kötött, és egy mellékaktivitás lehet a fő N-acetil-glükózaminidáz aktivitás mellett (Díez és mtsai. 2005, Ike és mtsai. 2006). Másrészt pedig extracelluláris  $\beta$ -galaktozidáz aktivitás meglétéről számoltak be a rokon fajoknál pl. *Penicillium canescens* (Nikolaev és mtsai. 1998) és a *Penicillium simplicissimum* (Cruz és mtsai. 1999) esetén.

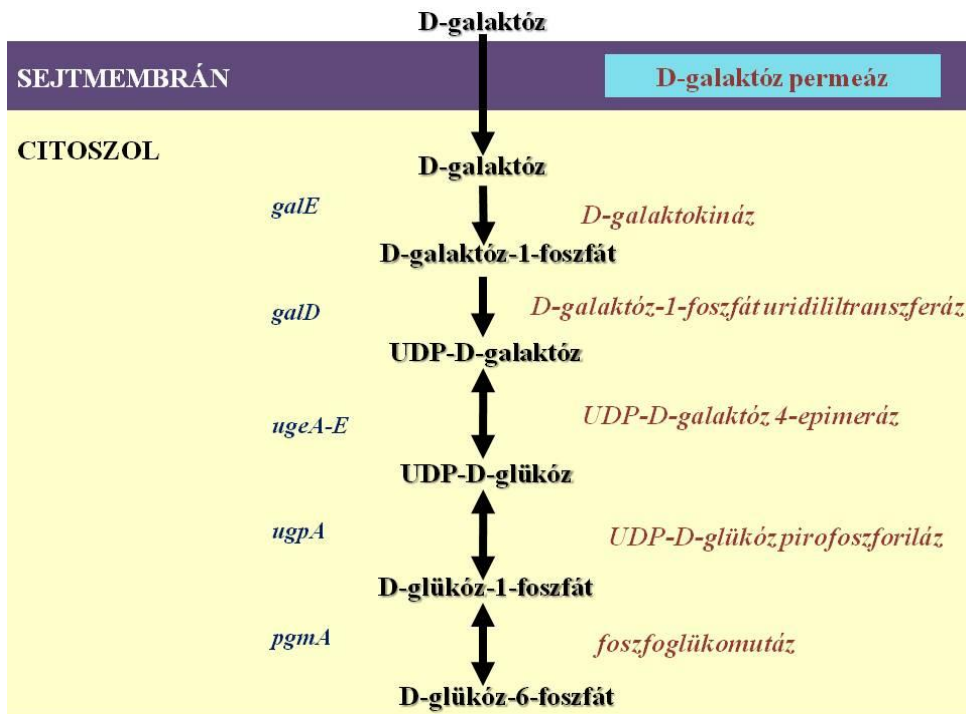
### 3.2. A gombák D-galaktóz anyagcseréjének áttekintése

A lignocellulóz tartalmú növényi biomassa 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 fehérjeszokrációs 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 foszotranszferáz) enzim által (Trucco és mtsai. 1948).

A galaktokináz nem a cukorkinázok közé tartozik, hanem az ATP függő enzimeket csoportosító GHMP-szupercsalád tagja (Tang és mtsai. 2010). Először emlős májából izolálták sikeresen, de részletesen tanulmányozták élesztőkben (Schell és mtsai. 1979, Sellick és mtsai. 2006), archeákban (Hartley és mtsai. 2004), növényekben (Foglietti és mtsai. 1976) és emberben egyaránt (Holden és mtsai. 2004, Megarity és mtsai. 2011).

Az enzim deficienciája emberekben a II-es típusú galaktozémia kialakulásához vezet. A betegség eredményeként a galaktóz nem metabolizálódik glükózzá, a galaktitol felhalmozódik a szervezetben, így a lencse sejtek károsodását és apoptózisát eredményezi (Frey és mtsai. 1996).

A galaktokináz érdekessége, hogy igen változatos cukorspecifitással rendelkezik az eltérő fajok esetén. Az *E. coli* galaktokináz a 2-deoxi-D-galaktóz, a 2-amino-deoxi-D-galaktóz, a 3-deoxi-D-galaktóz és a D-fukóz foszforilezésére képes (Yang és mtsai. 2003). A 2-deoxi-D-galaktóz foszforilezésére a patkány és az emberi galaktokináz is alkalmas (Walker és mtsai. 1968, Timson és mtsai. 2003). A *S. cerevisiae*-ből származó enzim specifikus a D-galaktózra, de nem képes a mannóz, glükóz, arabinóz, laktóz, galaktitol vagy a 2-deoxi-D-galaktóz foszforilezésére (Schell és mtsai. 1979, Sellick és mtsai. 2006). Mindezek mellett a galaktokináz kinetikai paraméterei is jelentősen eltérhetnek az egyes fajok között (Holden és mtsai. 2004).

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 kapcsolódó uridin-monofoszfát (UMP) csoportot transzferál a gal-1-P-ra, UDP-galaktózt és glü-1-P-ot hozva ezzel létre. A folyamat úgy is felfogható, hogy a D-galaktóz két lépésben (előbb egy foszfát- majd egy UMP-csoport ráépülésével) aktiválódik, és így kellően instabillá válik a négyes szénatomon bekövetkező enzimes epimerizációhoz.

A D-galaktóz-1-foszfát uridilil transzferáz expresszióját emberben a *FOXO3* gén működése szabályozza. Az enzim hiánya klasszikus galaktozémiát eredményez az emberi szervezetben, mely az újszülöttek esetében akár halálos kimenetelű is lehet, a laktóz lebontásának hiánya miatt (Anderson és mtsai. 1998). Az enzim röntgen krisztallográfiával végzett strukturális analízise Wedekind, Frey és Rayment nevéhez köthető, akik sikeresen azonosították az enzim működésében kulcsfontosságú aminosavakat. Ezek: Leu4, Phe75, Asn77, Asp78, Phe79, és a Val108 (Wedekind és mtsai.1995).

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.

Az UDP-glükóz-4- epimeráz egy homodimer epimeráz, mely baktérium, növényi és emlős sejtekben is megtalálható (Holden és mtsai. 2003). Az enzim szorosan köt egy NAD kofaktort, mely szükséges a katalitikus aktivitáshoz (Liu és mtsai. 1996). A Leloir útvonalban betöltött szerepét már Luis Leloir felismerte, ekkor még waldenázként azonosítva az enzimet (Leloir 1951). Az UDP-glükóz-4- epimeráz a rövid láncú dehidrogenáz/reduktáz (SDR) szupercsalád tagja (Kavanagh és mtsai. 2008). Szereketét számos élőlény esetében feltárták, beleértve az *E. coli*-t és az embert is (Thoden és mtsai. 1996, 2000). Az enzim működésében kialakuló negatív változások ember esetében a III. típusú galaktozémiát eredményezik (Lai és mtsai. 2009). Fonalas gombák esetén főként *Aspergillus nidulans* epimeráz enziméről szól a szakirodalom. Az enzim igen nagy hasonlóságot mutat az emberi epimerázzal (Dalrymple és mtsai. 2013).

A három enzimet összefoglalóan Leloir-útvonalnak nevezzük.

A Leloir-útvonal utolsó három enzime azonban a D-galaktóz kivételével bármely más szénforráson ellentétesen (anabolikus irányba) is működik, UDP-glükóz és UDP-galaktóz cukor nukleotidokat állítva elő glükóz-6-foszfátból<sup>2</sup>. Ezek alapvető fontosságúak a fő gombasejtfal komponensek (pl.  $\beta$ -1,3-glükán,  $\alpha$ -1,3-glükán és galaktofuranóz-tartalmú glikánok; Free és mtsai. 2013) uridilált monomer prekursorainak bioszintéziséhez.

Az anabolikus Leloir-útvonalon fruktóz-6-foszfátból, ammóniumból és acetyl-CoA-ból jönnek létre az uridilált aminocukrok, az UDP-N-acetil-glükózamin és az UDP-N-acetil-galaktózamin, funkcionálisan hasonló foszfomutáz felhasználásával. A pirofoszforiláz és a 4-epimeráz tevékenységeit más gének kódolják [az UDP-N-acetil-glükózamin bioszintézisének áttekintését élesztőben, lásd Milewski és mtsai. (2006); annak UDP-N-acetil-galaktózaminná történő epimerizációjáról, lásd Edson és mtsai. (1976)]. Ezek az aminocukor nukleotidok nélkülözhetetlen prekursorok a fonalas gombák sejtfal komponenseinek bioszintéziséhez, többek között a kitin-, kitozán- és a galaktozamino galaktánhoz. Korábban kilenc *Aspergillus* fajban már azonosították a D-galaktóz anyagcsere Leloir útvonalának (feltételezett) strukturális génjeit (Flipphi és mtsai. 2009).

Az *Aspergillaceae* családon belül az *Aspergillus* a *Penicillium* testvérnemzetsége (Houbraken és mtsai. 2011b). Több száz fajt foglal magába, köztük olyan gombákat, melyeket elterjedten használnak a fermentációs iparban – pl. az *A. niger* és az *A. oryzae* – továbbá az opportunista humán patogén *A. fumigatus* és a genetikai modell szervezet *A. nidulanst*.

---

<sup>2</sup> Az argentin biokémikus Luis Federico Leloir (1906 – 1987) a cukor nukleotidok felfedezéséért illetve a szénhidrát bioszintézisben betöltött szerepük vizsgálatáért 1970-ben kémiai Nobel-díjat kapott.

## 4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 4.1. 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):

- 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\* $\text{H}_2\text{O}$  -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 glicerin 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* spóraoldattal oltottuk be, mely  $5 \times 10^6$  spórát 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 (**2. ábra**).

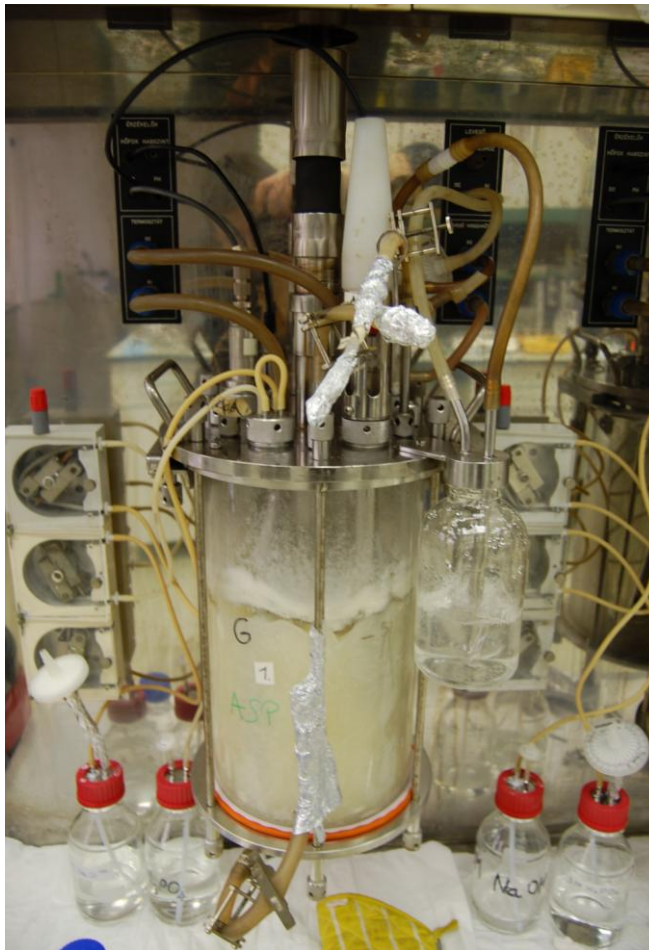
Fermentációs paraméterek: pH 6,0; 28°C és 0,5 vvm<sup>3</sup> (beáramló levegő térfogata/fermentor térfogata/perc). Az oldott oxigén szintjét 20% telítettségben tartottuk és a keverés sebességével kontrolláltuk. A párolgási

---

<sup>3</sup> vessel volume per minute

veszteség minimalizálása érdekében a kimenő gázt átvezettük egy visszafolyó hűtőn, ami egy külső hűtőhöz kapcsolódik (4°C).

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 sejttömeg (DCW) mérésével számoltuk a szénforrás kimerüléséig (Pirt és mtsai. 1975).



**2. ábra:** INEL BR92K Laboratóriumi Blokkfermentor

(forrás: DE TTK Biomérnöki Tanszék, készítette: Fekete Zoltán tanszéki mérnök)

## 4.2. 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.

A galaktokináz aktivitás meghatározásánál a rázott lombikos tenyészetekből 10 ml mintát vettünk ki háromszoros ismétlésben, a micélium átmosása után 10 és 24 óra elteltével. A sejtfeltárás a korábbiakkal megegyező módon történt 0,1 M, pH = 7,6 nátrium-foszfát pufferrel. A friss sejtmentes extraktumot 8500 x g (5 perc, 4°C) centrifugáltuk, és a felülúszót azonnal felhasználtuk a vizsgálatokhoz.

## 4.3. 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 préssel 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).

#### **4.4. 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 µg 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 alkalmaztuk. 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 transzlációs elongációs alfa faktort (*tefI*) használtuk expressziós kontrollként (Linz és mtsai. 1986).

**1. táblázat:** A specifikus próbák amplifikációjához használt primerek, ill. a feltételezett  $\beta$ -galaktozidáz, laktóz permeáz és a Leloir-útvonal struktúrgénjei *Penicillium chrysogenum*-ban.

Elnevezés	Feltételezett funkció	Gén-azonosító	Oligonukleotid szekvencia (5'-3')	Amplikon méret, bázispár
<i>bgaA</i>	extracelluláris $\beta$ -galaktozidáz	Pc16g12750	Pc16g12750F: AACTCTGCCTACAACACTACG  Pc16g12750R: TCTCATACTTAGGCTGGTC	1300
<i>bgaB</i>	extracelluláris $\beta$ -galaktozidáz	Pc06g00600	Pc06g00600F: TACTCGGCACCAATCTCAG  Pc06g00600R: AGCCAGAAATCATACGC	639
<i>bgaC</i>	extracelluláris $\beta$ -galaktozidáz	Pc14g01510	Pc14g01510F: TAAGAAGACAGCCTACGG  Pc14g01510R: TCTTGGACCTTTGTATC	665
<i>bgaD</i>	intracelluláris $\beta$ -galaktozidáz	Pc22g14540	Pc22g14540F: ACGGTAGAGAGCAACAGCC  Pc22g14540R: GAGACCATCCATCACAAAG	1.080
<i>bgaE</i>	intracelluláris $\beta$ -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: ACTACCGCCAGACTTTG  Pc13g10140R: CGTGTATCCCTCTTCTTGTG	973
<i>galD</i>	D-galaktóz-1-P uridilil- transzferáz	Pc15g00140	Pc15g00140F: AGACAACCCTGCCAACTAC  Pc15g00140R: TCTCTTCCCTCGGTGCCATC	919
<i>ugeA</i>	UDP-D- galaktóz 4-epimeráz	Pc21g10370	Pc21g10370 F: GGCTCATTACCACCCTTG  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: GGTCCTCCTTCTCTGTAA	697
<i>ugeD</i>	UDP-D- galaktóz 4-epimeráz	Pc21g12170	Pc21g12170 F: CTCCAGGCGTGAACAATC  Pc21g12170 R: CAACCTTCTCCAACCCATC	744
<i>ugeE</i>	UDP-D- galaktóz 4-epimeráz	Pc16g12790	Pc16g12790 F: GACCTCACCTCCACCAAAG  Pc16g12790 R: GGCTGGCAAACCTGTCTAATG	790
<i>galF</i>	UDP-D-glükóz pirofoszforiláz	Pc21g12790	Pc21g12790F: TCCAAGGCTCTACCCACTC  Pc21g12790R: GCGTTGGACAGGAAGATG	1.075
<i>pgmA</i>	foszfo- glükomotáz	Pc18g01390	Pc18g01390F: GGTCTTTCTCTCGTCATTG  Pc18g01390R: TCACCGTCACCATCACTG	756

## 4.5. Analitikai módszerek

A micélium száraz sejttömegét (Dry Cell Weight, DCW) a folyékony tenyészet 5, ill. 10 ml-es mintájából határoztuk meg. A biomasszát 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.

## 4.6. Hidroláz vizsgálatok

Az intracelluláris  $\beta$ -galaktozidáz aktivitást az alábbi protokoll szerint mértük: 0,5 ml sejtmentes kivonat és 0,5 ml 6 mM orto-nitro-fenil- $\beta$ -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 Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>-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

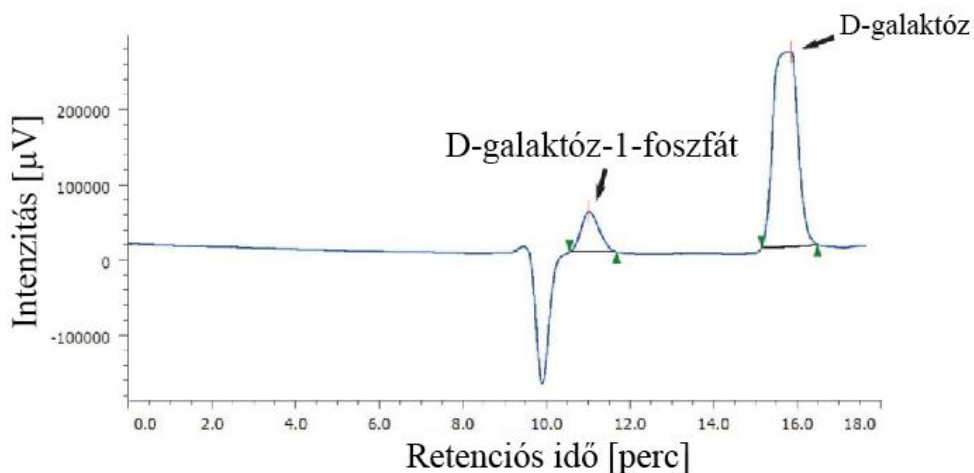
percenként felszabadult 1  $\mu\text{mol}$  orto-nitrofenolnak. A koncentrációkat kalibrációs görbe alapján számoltuk ki. A sejtmentes kivonat és a tápoldat protein tartalmát módosított Lowry módszerrel határoztuk meg (Peterson és mtsai. 1983), szarvasmarha szérum fehérjét (BSA) használva a kalibráláshoz. A specifikus aktivitást  $\text{U (mg fehérje)}^{-1}$  fejeztük ki.

A laktóz hidrolizáló (laktáz) aktivitását oly módon határoztuk meg, hogy  $28^{\circ}\text{C}$ -on 30 percig inkubáltuk a 0,5 ml enzimforrást tartalmazó oldatot és az azonos térfogatú 6 mM-os laktóz oldatot 0,1 M nátrium-foszfát-pufferben, a megfelelő pH-n (azaz, pH 7,0 intra- ill. pH 5,0 az extracelluláris mintáknál). A laktóz hidrolízist hőinaktiválással állítottuk le,  $80^{\circ}\text{C}$ -on 5 percen keresztül. A kontroll reakció laktóz nélkül ment végbe. A foszfátpuffer szolgált vak próbaként a reakcióknál mindkét pH-n. A laktóz enzimatis hidrolízise során felszabaduló D-glükóz mennyiségét D-glükóz-oxidáz-peroxidáz módszerrel határoztuk meg (Hugget és mtsai. 1957). Ehhez a D-glucose assay kittet (Sigma-Aldrich) használtuk a gyártó utasításai szerint. Egy egység (U) laktóz hidroláz aktivitása megfelel 1  $\mu\text{mol}$  glükóz kialakulásának percenként, a specifikus aktivitást  $\text{U (mg fehérje)}^{-1}$  fejeztük ki.

#### **4.7. Galaktokináz enzim vizsgálat**

A vizsgálatot Fekete és mtsai. (2002, 2004) által leírtak alapján végeztük el. A D-galaktóz-1-foszfát koncentrációját egy reakcióelegyben követtük nyomon az idő függvényében, ami 10 mM ATP-t, 20 mM D-galaktózt, 10 mM  $\text{MgSO}_4$ , és 0,7 ml sejtmentes kivonatot tartalmazott 0,1 M foszfát pufferben (pH = 7,6). Nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC) módszert alkalmaztunk a meghatározáshoz, ugyanabban a pufferben készült foszforilezett cukor oldatok kalibrációs görbéinek segítségével.

A **3. ábra** a D-galaktóz-1-foszfát csúcs egy tipikus kromatogramját mutatja, ahogyan világosan elkülönül a valós idejű mintából.



**3. ábra:** Egy tipikus HPLC-kromatogram, melyen az *in vitro* galaktokináz assay reakció mintára jellemzően, világosan elkülönülnek a D-galaktóz-1-foszfát és a D-galaktóz csúcsok. (Forrás: DE TTK Biomérnöki Tanszék)

## 4.8. Bioinformatika

Az első publikált *P. chrysogenum* teljes genom szekvencia (Van Den Berg és mtsai. 2008) az alacsony penicillin titerű Wisconsin 54-1255 törzsé volt, amely közvetlen laboratóriumi leszármazottja az NRRL 1951 törzsnek.

A National Center for Biotechnology Information ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) nem-redundáns nukleotid (nt/nr) adatbázisát TBLASTN<sup>4</sup>-algoritmussal vizsgáltuk (Altschul és mtsai. 1997), referencia-szekvenciaként (bait) használva az *Aspergillus* β-galaktozidáz (2-es vagy 35-ös glikozil

---

<sup>4</sup> Átírt nukleotid (Translated Nucleotide) szekvenciák keresése fehérje szekvencia alapján

hidroláz család) illetve laktóz permeáz, a *Saccharomyces cerevisiae* galaktokináz, az *Escherichia coli* D-galaktóz-1-foszfát uridilil transzferáz, az *A. nidulans* UDP-glükóz-4-epimeráz, az UDP-glükóz-pirofoszforiláz és a foszfoglukomutáz fehérjéket. A gén modelleket manuálisan vezettük le a kiválasztott, ill. kinyert genomiális DNS szekvenciákból. Az *in silico* vizsgálatok felhasználták a nemrégiben közzétett genom szekvenciákat is a *Penicillium* nemzetség további négy fajából: *P. paxilli* ATCC 26601 (NCBI teljes genom shotgun szekvenálás projekt szám AOTG01000000); *P. decumbens* (AGIH00000000 és GII00000000); *P. digitatum* (AKCT00000000 és AKCU00000000); és *P. chrysogenum sensu strictu* (<http://genome.jgi.doe.gov/Pench1/Pench1.home.html>) (Houbraken és mtsai. 2011a). A filogenetikai elemzés és a fehérje szekvenciák illesztésének összehangolását a CLUSTALW szoftverrel (Thompson és mtsai. 1994) végeztük, majd a végleges változatot kézzel szerkesztettük meg GeneDock segítségével (Nicholas és mtsai. 2007). A filogenetikai törzsfarekonstruálásához a betáplált adatokat a MEGA-5 software-rel rendeztük össze (Tamura és mtsai. 2011) a neighbour-joining algoritmus (Saitou és mtsai. 1987) JTT (Jones-Taylor-Thornton) modellje segítségével. A kládok stabilitását 500 bootstrap révén értékeltük.

Öt strukturális UDP-glükóz-4-epimeráz paralógot találtunk. Az összes így kapott gén lényegében azonos az öt másik *P. chrysogenum* törzsből kiválasztott génnel (beleértve a jól ismert leszármazottat, az évtizedekkel ezelőtti ipari termelésben is használt P2 törzset, amely szintén az NRRL 1951 családfához tartozik), amelyek genomszekvenciái hozzáférhetőek az NCBI adatbázisában.

## **4.9. Reprodukálhatóság**

Az összes biokémiai és kémiai analitikai adatot 3-5 egymástól független kísérlet eredményezte. Az adatok elemzését és vizualizálását SigmaPlot szoftverrel (Jandel Scientific, San Rafael, CA, USA) végeztük, és minden egyes eljárásnál meghatároztuk a szórásokat.

Az indukciós kísérletek esetében előnövesztett, átmosott biomasszát használtunk. Az enzimaktivitás változásait a nem-indukált és nem represszált állapotban, glicerinen fennálló állapothoz; a biomassza változásait és a maradék D-galaktózt, ill. a D-galaktóz-1-foszfát koncentrációját a termelő tápoldatban a kontroll tenyészetekhez viszonyítottuk és a valószínűségi (p) értékeket a Student-féle teszttel értékeltük, melyek az Eredmények részben olvashatók.

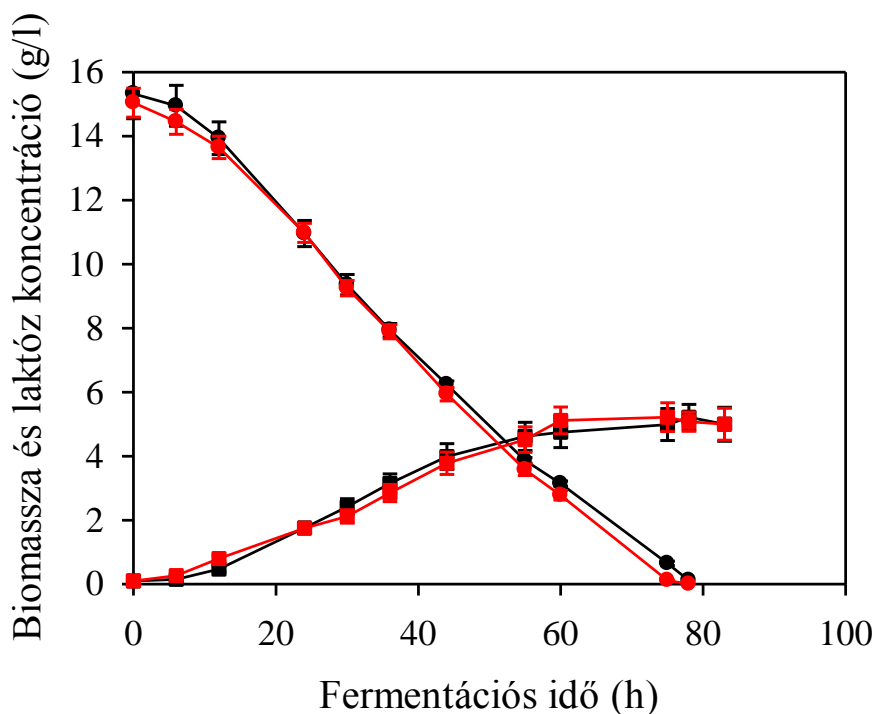
## **4.10. Felhasznált vegyszerek**

A vizsgálatainkhoz felhasznált analitikai tisztaságú vegyszereket a Sigma-Aldrich-től szereztük be (Sigma-Aldrich Kft., Budapest).

## 5. EREDMÉNYEK

### 5.1. 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 (**4. ábra**).



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

Az elért maximális specifikus növekedési ráta  $\mu = 0,045-0,047 \text{ h}^{-1}$  volt a gyors növekedési szakaszban. A különbségek a maximális biomassza koncentrációk ( $5,2 \text{ g l}^{-1}$  illetve  $5,3 \text{ g l}^{-1}$ ) és az elért hozam értékek között ( $Y_{x/s}=0,35-0,36$ ) nem voltak szignifikánsak ( $p < 0,001$ ). Meg kell jegyezni, hogy a 0,01% pepton jelenléte (ami  $< 1\%$ -a a kiindulási laktóz szénforrás mennyiségének) a (minimál) tápoldatban jelentősen lerövidítette ( $\sim 20$  órától  $\sim 4$  órára) a növekedés kezdetén a lag fázist mindkét törzsben anélkül, hogy lényegesen befolyásolta volna a teljesítményüket (a növekedési rátát) a gyors növekedési fázisban. A jelenség pontos magyarázatát nem ismerjük, de úgy véljük, hogy a pepton oldat néhány ismeretlen komponense stimulálja és szinkronizálja a spórák csírázását. Hasonló hatásokat írtak le *A. nidulans* (MacCabe és mtsai. 2003) és *T. reesei* (Seiboth és mtsai. 2005) esetében is. A szakaszos fermentációból származó kinetikai adatok azt sugallják, hogy a *P. chrysogenum* genomjában jelen vannak a laktóz asszimilációhoz szükséges struktúrgének, amelyek expresszálódnak és enzimekké íródnak át az indukció során.

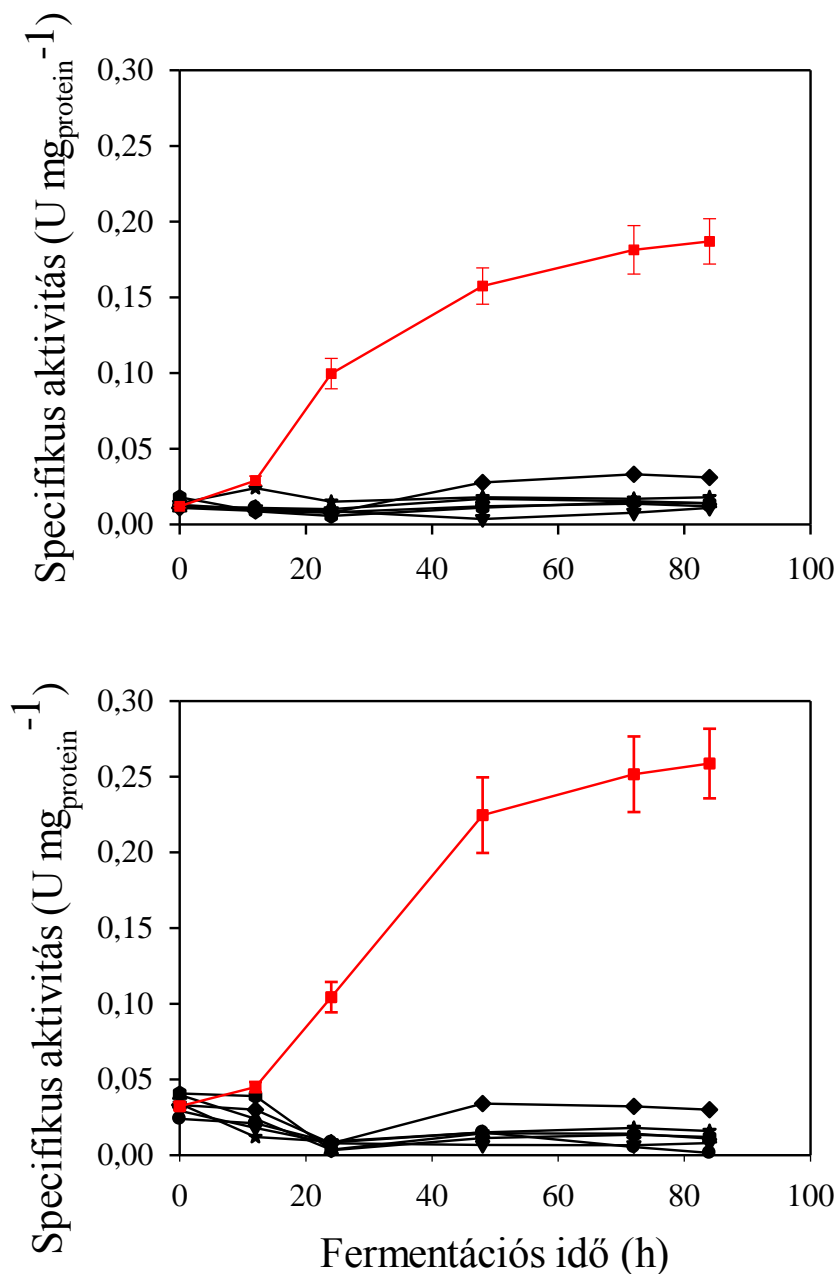
### **5.1.1. Béta-galaktózidáz aktivitás: mesterséges kontra természetes szubsztrátok**

A laktóz szokatlan szénforrás a gombák számára, az extra- és az intracelluláris bGal aktivitásokat pedig - gyakorlati okokból - hagyományosan ONPG hidrolázokként azonosítják. Annak tesztelésre, hogy a kapott enzimaktivitási adatok a mesterséges szubsztráton megegyeznek-e a laktózéval, mint természetes szubsztrátéval, összehasonlítottuk az extra- és intracelluláris bGal aktivitást mindkét *P. chrysogenum* törzsben azokon a szénforrásokon, amelyeket az indukciós vizsgálatok során is használtunk (lásd később) két különböző koncentrációban (1 és 25 mM). Ahogy azt a 2.

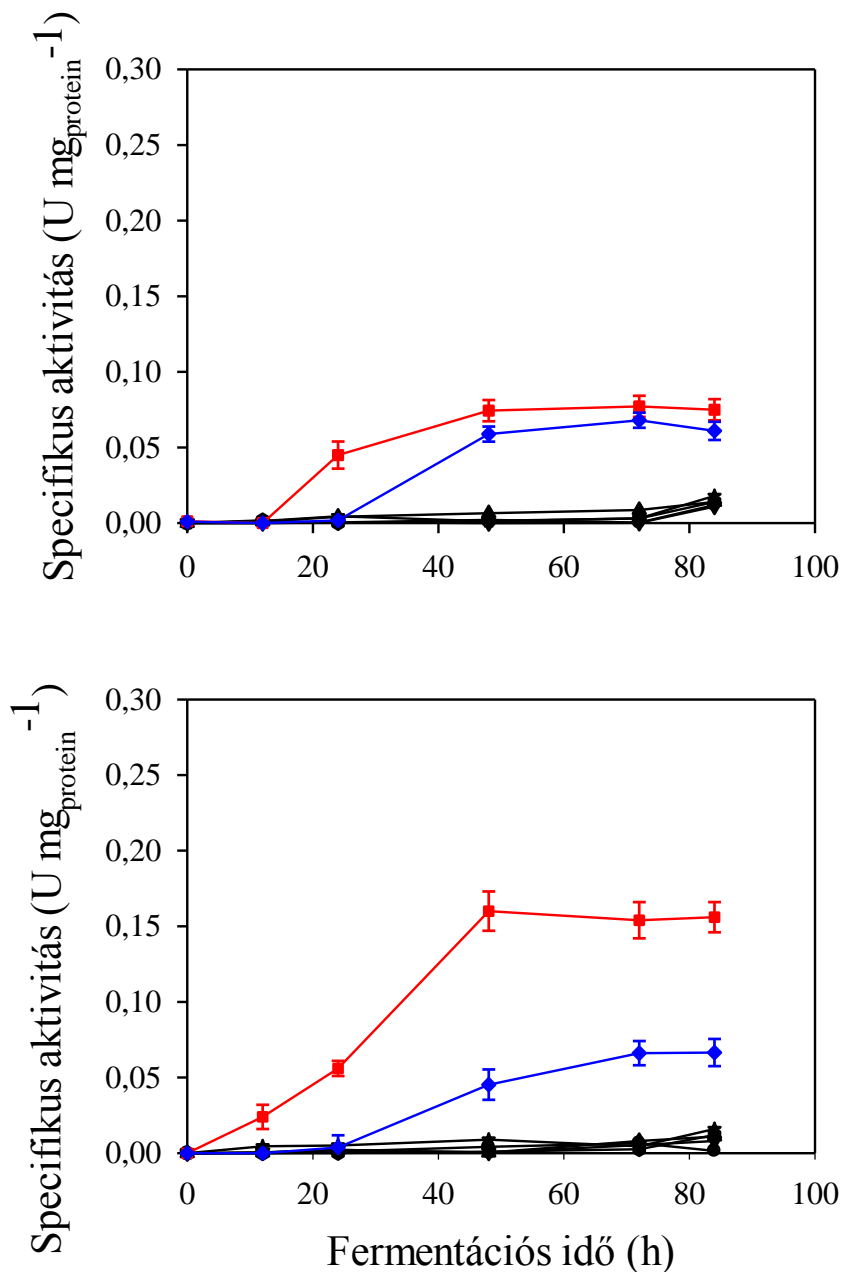
**táblázat** mutatja, hogy bár az *in vitro* szubsztrátum ONPG valóban kissé magasabb bGal aktivitási értékeket eredményezett, a különbség soha nem haladta meg a laktóz hidrolízis értékének 15%-át ( $p < 0,001$ ). Lényegében azonos adatokat kaptunk 25- és 1 mM indukáló koncentrációknál ( $p < 0,001$ ). Ezért az ONPG alapú vizsgálati eljárást alkalmasnak tekintettük a *P. chrysogenum* tanulmányozására.

### **5.1.2. 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 törzsben a cukorfogyás időprofilja megegyezett az intra-, és az extracelluláris bGal aktivitásokéval (**4., 5. és 6. 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 (**5. és 6. ábra**). Amikor laktóz helyett D-galaktozt 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 (**5. és 6. ábra**), értéke a laktóz tartalmú tápoldatban mért maximális érték felét érte el mind a két vizsgált törzsben. Más általánosan előforduló monoszacharidokon való tenyésztés esetén - mint például a D-glükóz, D-fruktóz, és a glicerín - sem extra- sem intracelluláris bGal aktivitás nem volt kimutatható egyik törzs esetében sem.



**5. 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), glicerín (▼), D-xilóz (□) és L-arabinóz (○). Az ábra egyértelműbbé tételéhez, a laktózon növesztett minták esetén feltüntettük a szórást is.



**6. ábra:** A *Penicillium chrysogenum* NRRL 1951 (A panel) és *P. chrysogenum* AS-P-78 (B panel) törzsek specifikus extracelluláris béta-galaktoszidáz 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.

### 5.1.3. Béta-galaktozidáz-aktivitás indukálása

A D-glükóztól lassabban hasznosuló szénforrások - mint a laktóz - megkövetelik az adott szubsztrátum lebontó anyagcsere útvonalának indukcióját. A *P. chrysogenum* bGal indukciójának vizsgálatára, mindkét törzs micéliumát glicerinen, egy "semleges", azaz nem indukáló, nem represszáló szénforráson növesztettük elő, és azután átmostuk a különböző egyedüli szénforrásokat eltérő koncentrációkban tartalmazó minimál tápoldatokba (részleteket lásd az Anyagok és Módszerek részben). Ahogy a **2. táblázat** mutatja, sejten belüli bGal aktivitás először csak laktózon jelent meg, míg a két monomer (D-glükóz és D-galaktóz), a pentózok (D-xilóz és az L-arabinóz), valamint a D-fruktóz és a glicerín nem voltak képesek indukálni a bGal aktivitást. Mivel a szubsztrátum koncentrációja a tápoldatban a kísérlet ideje alatt folyamatosan csökkent, az eredmény nyilvánvalóan nem tekinthető inducer kizárásnak.

Az extracelluláris bGal aktivitás kialakulásának elemzéséből a szénforrás függvényében csak egy jelentős különbség derült ki a sejten belüli indukciós profilhoz képest: az L-arabinóz megjelenése befolyásolja a bGal aktivitást ( $p < 0,001$ ), elérve a laktózon keletkezett érték  $\sim 65\%$  -át (ld. **2. táblázat**). A tesztelt többi monoszacharid egyike sem indukált detektálható bGal aktivitást a *P. chrysogenum* vad típusú, ill. termelő törzsében. Az aktivitási profilok minőségileg hasonlóak voltak, de mindkét aktivitás- az extracelluláris különösen- a későbbi tenyésztési fázisokban (48 h után) magasabbnak tűnt az AS-P-78-ban. Az extra enzimaktivitás azonban nem serkenti a növekedési teljesítményt vagy a laktóz fogyást az AS-P-78-nál (**4. ábra**), ami arra utal, hogy a felvétel lehet a sebességmeghatározó lépés a laktóz katabolizmusában.

**2. táblázat:** Extracelluláris és intracelluláris ONPG- és laktóz-hidrolizáló aktivitás *Penicillium chrysogenum*-ban különböző szénforrásokon (kiindulási koncentráció = 25 mM) a 8 órás tenyészetben. **A panel:** NRRL-1951 törzs; **B panel:** AS-P-78 törzs.

<b>A</b>	<b>Specifikus béta-galaktózidáz aktivitás U (mg fehérje)<sup>-1</sup></b>			
	<b>extracelluláris</b>		<b>intracelluláris</b>	
	<b>ONPG</b>	<b>laktóz</b>	<b>ONPG</b>	<b>laktóz</b>
D-glükóz	< 0,004	< 0,004	< 0,004	< 0,004
D-xilóz	< 0,004	< 0,004	< 0,004	< 0,004
L-arabinóz	0,12 ± 0,01	0,10 ± 0,01	< 0,004	< 0,004
laktóz	0,156 ± 0,014	0,131 ± 0,019	0,25 ± 0,023	0,21 ± 0,022
D-galaktóz	0,006 ± 0,001	< 0,004	0,005 ± 0,001	< 0,004
D-fruktóz	< 0,004	< 0,004	< 0,004	< 0,004
glicerin	< 0,004	< 0,004	< 0,004	< 0,004

<b>B</b>	<b>Specifikus béta-galaktózidáz aktivitás U (mg fehérje)<sup>-1</sup></b>			
	<b>extracelluláris</b>		<b>intracelluláris</b>	
	<b>ONPG</b>	<b>laktóz</b>	<b>ONPG</b>	<b>laktóz</b>
D-glükóz	< 0,004	< 0,004	< 0,004	< 0,004
D-xilóz	< 0,004	< 0,004	< 0,004	< 0,004
L-arabinóz	0,13 ± 0,016	0,10 ± 0,01	0,006 ± 0,01	< 0,004
laktóz	0,20 ± 0,024	0,19 ± 0,021	0,23 ± 0,025	0,18 ± 0,021
D-galaktóz	< 0,004	< 0,004	< 0,004	< 0,004
D-fruktóz	< 0,004	< 0,004	< 0,004	< 0,004
glicerin	< 0,004	< 0,004	< 0,004	< 0,004

#### 5.1.4. A laktóz asszimilációban potenciálisan részt vevő glikozil hidroláz és permeáz gének *in silico* kiválasztása

Az *Aspergillus*ok körében – amely az *Eurotiales*-ek *Eurotiomycetes* rendjén belül a *Penicillium* testvér nemzetsége (Houbraken és mrtai. 2011a) -, a laktóz hidrolízis mind extra, - mind intracelluláris módját leírták. Az *A. niger* a laktózt extracellulárisan hidrolizálja a (legalább egy) laktózzal indukálható 35-ös (GH35) családba tartozó glikozil hidroláz révén, amit *LacA*-nak hívnak (Nevalainen és mtsai. 1981, Kumar és mtsai. 1992), és ami megfelel az An01g12150 annotált lókusznak az *A. niger* CBS 513.88 genom adatbázisában (Pel és mtsai. 2007). A CBS 513,88 genom további négy *lacA*-paralóg gént tartalmaz a következő lókuszon: An14g05820, An01g10350, An06g00290 és An07g04420. Az öt *A. niger* GH35 fehérje filogenetikailag megfelel négy pontosan meghatározott, azonos eredetű kládnak. A négy paralóg gén képviselői megtalálhatók a *Pezizomycotina* különböző osztályaiban is (**F1. ábra**).

A *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1225 genom három GH35 paralóg gént tartalmaz a Pc16g12750, Pc06g00600 és Pc14g01510 annotált lókuszon. Az átírt fehérjék mindegyike tartalmaz egy, a szekréciónak szükséges szignálszekvenciát, amely alapján ki tudtuk választani őket a transzkripciós vizsgálatra, kísérletesen bizonyítani lehetséges érintettségüket a laktóz asszimilációban. A géneket *bgaA*, *bgaB* és *bgaC*-nek neveztük el (**1. táblázat**). A Pc16g12750 lókuszon lévő *lacA*-ortológ (pl.: *bgaA*) megfelel a közeli rokonságban lévő *Penicillium* fajok: *P. expansum* és *P. canescens* (Hozzáférsi számok: ACD75821, CAA49852 és CAF32457) szekvenált  $\beta$ -galaktozidáz génjeinek. Az An14g05820 (**F1. ábra**, 2. klád) teljes hosszúságú ortológja nem található meg a *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1225 genomjában, sem a szűkebb értelemben vett *P. chrysogenum*-ban, viszont sértetlen *P. paxilli*-ban és *P. digitatum*-ban. Feltételezhető, hogy

pszeudo-génné fejlődött vissza (Pc00c21; nukleotid koordináták: 2.240.190-től 2.243.618-ig a komplementer szálon).

Az *A. nidulans* a laktózt intracellulárisan hidrolizálja. Ebben a fajban munkacsoportunk azonosított egy génklasztert, ami egy intracelluláris béta-galaktozidáz (*bgaD*) és egy laktóz permeáz (*lacpA*) génből épül fel. A klaszter összehangoltan reagál a laktóz indukcióra (Fekete és mtsai. 2012b). A génklaszter (lókuszok: AN3199 és AN3201) jelentős számú aszkomikótában konzerválódott. A *BgaD* ortológjai megtalálhatóak a *P. chrysogenum* és a *P. paxilli* törzsekben, míg a *P. decumbens*-ben egy paralog GH2 fehérje határozható meg, az *A. nidulans* AN2463 és GH2 fehérjéivel csoportosulva (**F2. ábra**). Az egyetlen AN3201 ortológ GH2 *P. chrysogenum* gént választottuk ki (lókusz: Pc22g14540- lásd az 1. ábrát Fekete és mtsai. 2012b közleményében), hogy megvizsgáljuk lehetséges részvételét a sejten belüli laktóz hidrolízisben az NRRL 1951 és az AS-P-78 törzsekben. A gént *bgaD*-nek neveztük el (**1. táblázat**).

*A. nidulans*-ban a *bgaD-lacpA* gén klaszter komponensei között egy kisméretű gén található, amely feltételezhetően egy intracelluláris GH2 enzimet kódol (Hozzáférés: JQ681216, Fekete és mtsai. 2012b, ld. **F3. ábra**). Ez a gén (helye az AN3200 lókuszon található) nem reagál a laktóz indukcióra, de alacsony, konstitutív szinten expresszálódik. A GH2 gén Wisconsin 54-1255 orthológja (a Pc12g11750 lókuszon lévő, *bgaE* elnevezésű gén, ld. **1. táblázat**) megtalálható a filogenetikai törzsfa *Penicillium* specifikus ágában az AN3200 ortológjaként (**F3. ábra**), amelyet szintén kiválasztottunk expressziós analízisre az NRRL 1951- AS-P-78 törzsek esetén.

*P. chrysogenum*-ban a laktózt szállító gén (lókusz: Pc22g14530) a *bgaD*-tól eltérően íródik át, nincs közeli rokonságban a jellemzett *A. nidulans* laktóz permeáz génjével (lásd 2. ábra Fekete és mtsai. közleményében). A

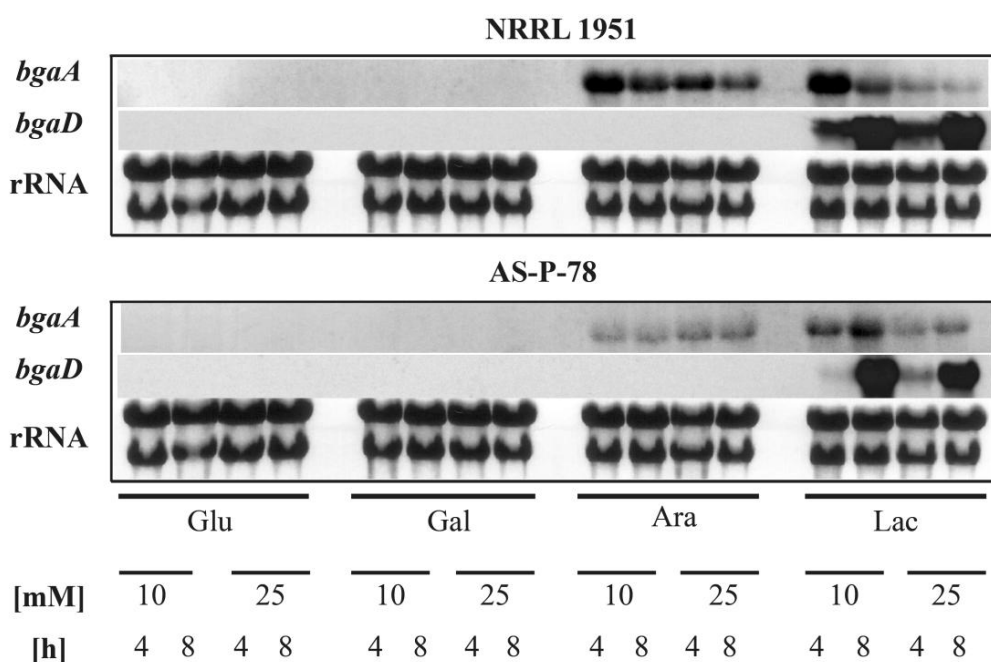
vizsgált genom szekvenciák azt sugallják, hogy a *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255, valamint a szűkebb értelemben vett *P. chrysogenum*-ból hiányzik a *LacpA* ortológ. Azonban az *A. nidulans*-ban egynél több fiziológias laktóz felvételi rendszer működik (Fekete és mtsai. 2012b) a genomban pedig három olyan feltételezhetően cukortranszporter gén található (lókuszok: AN1577, AN6831 és AN2814), amelyek a paralóg *lacpA* strukturális orthológjának tekinthetők. A Wisconsin 54-1255 genom két ortológot tartalmaz a három *A. nidulans lacpA* paralóg génből, az alábbi lókuszokon: Pc13g08630 és Pc16g06850, miközben ugyanez igaz a szűkebb értelemben vett *P. chrysogenum*-ra is (**F4. ábra**). A két említett, Wisconsin 54-1255 lókuszon lévő cukortranszporter géneket (*lacA* és *lacB*-nek neveztük el, lásd **1. táblázat**) választottuk ki, hogy megvizsgáljuk expressziós profiljukat.

### **5.1.5. 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**) transzkripciót analízisét 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, 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.

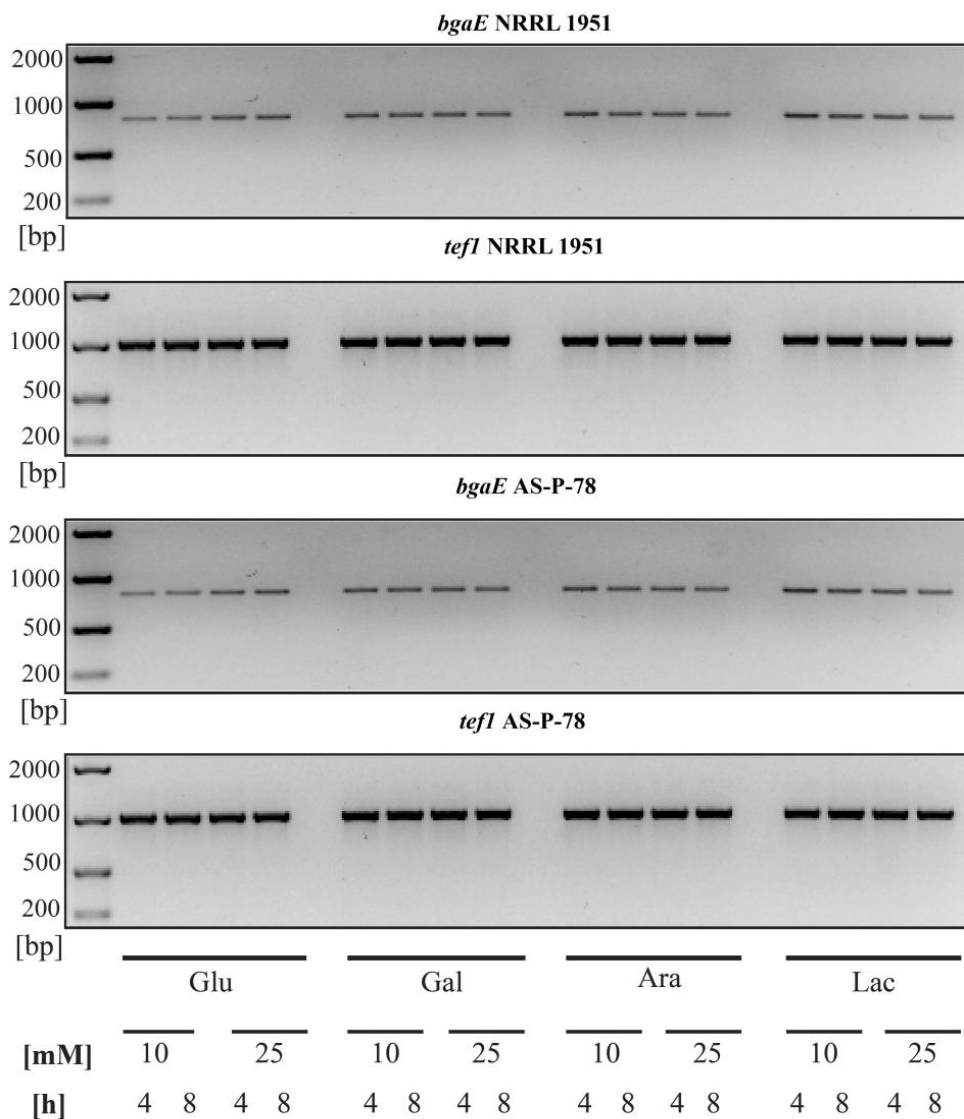


**7. ábra:** A két feltételezett béta-galaktozidáz gén (a *bgaA*: feltehetően egy extracelluláris- a *bgaD*: feltehetően egy intracelluláris bGal-t kódol) indukciós spektrumának transzkripciós analízise, D-glükózon (Glu), D-galaktózon (Gal), L-arabinózon (Ara) és laktózon (Lac) tesztelve a *Penicillium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

A közeli rokonságban álló *A. nidulans*-ban a *P. chrysogenum bgaD* orthológja (amit szintén *bgaD*-nek neveznek) egyedül felelős az intracelluláris 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktopiranozid hidroláz (X-gal) formációért (Fekete és mtsai. 2012b).

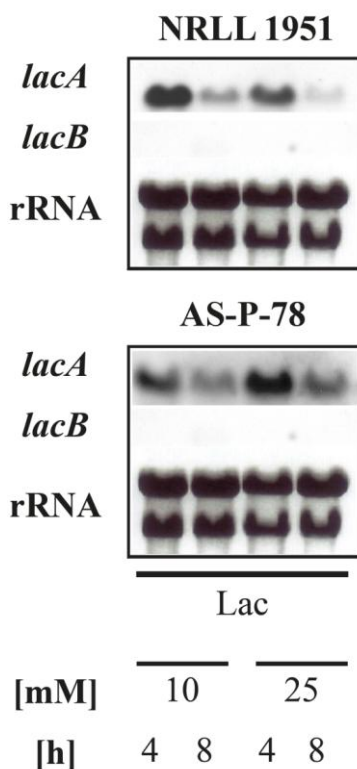
Mivel a *P. chrysogenum* a laktóz kivételével nem képez intracelluláris bGal aktivitást egyetlen szénforráson sem, nem volt meglepő, hogy a *bgaD* transzkripciója kizárólag laktózon történt meg, és nem lehetett más szénforrás által kiváltani, ideértve a D-galaktózt is, ami a laktóz hidrolízis egyik terméke (**7. és 8. ábra**).

A *bgaE* gyenge, konstitutív expressziót mutatott minden tesztelt körülmény között, hasonlóan az *A. nidulans* AN3200 ortológhoz. 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.



**8. ábra:** A *bgaE* gén expressziós jellemzői. A gén feltételezhetően egy intracelluláris béta-galaktozidázt kódol a *Penicillium chrysogenum* NRRL 1951 és a *P. chrysogenum* AS-P-78 törzsekben. Az alkalmazott szimbólumok, azonosak a 7. ábrán lévőkkel. Az eukarióta transzlációs 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* törzsből, mindkét indukáló koncentrációt és inkubációs időt figyelembe véve (**9. ábra**). 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 (**9. ábra**), vagy bármely más tesztelt szénforráson, jelezve, hogy irreleváns a disszacharid asszimilációjának szempontjából.



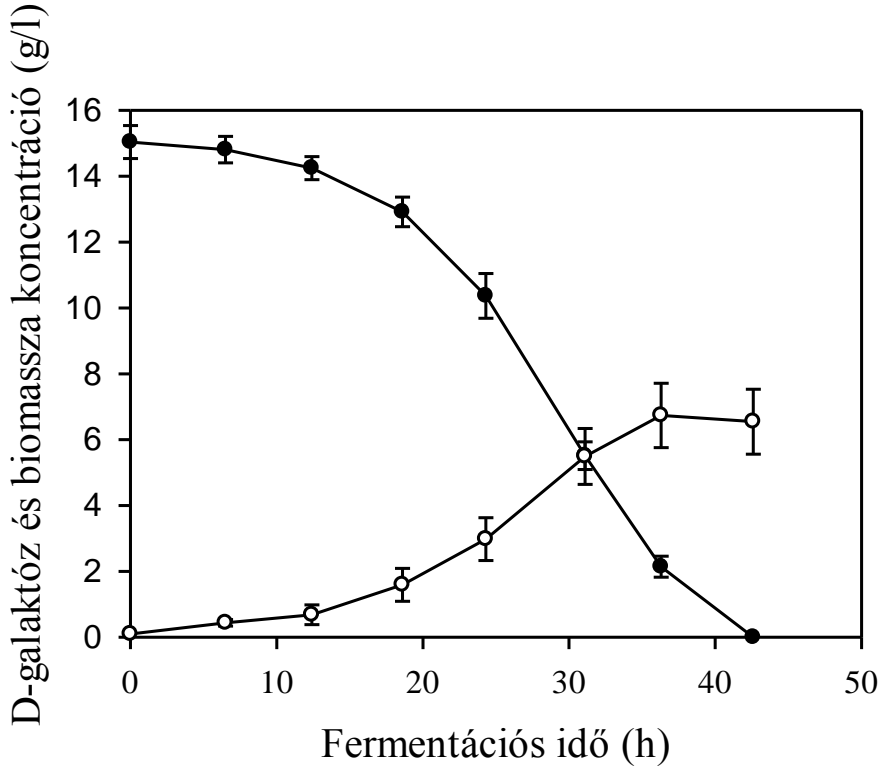
**9. ábra:** A két feltételezett laktóz permeáz gén (*lacA* és *lacB*) indukációs spektrumának transzkripciós elemzése laktózon (Lac) a *Penicillium chrysogenum* NRRL 1951 és a *P. chrysogenum* AS-P-78 törzsekben. Transzkripció nem volt megfigyelhető a többi tesztelt szénforráson. Az RNS minőségének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

## 5.2. 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 süllyesztett kultúrában és jól nőtt D-galaktózon. Mintegy 40 óra alatt  $15 \text{ g l}^{-1}$  cukor fogyott el (**10. ábra**), és elérte a maximális fajlagos növekedési rátát ( $\mu_{\text{max.}} = 0,085 \pm 0,006 \text{ 1/h}$  a gyors növekedési szakaszban). A fermentációk maximális biomassza koncentráció és a hozamkonstans értékei,  $X_{\text{max.}} = 6,73 \pm 0,49 \text{ g/L}$  ill.  $Y_{x/s} = 0,45 \pm 0,04$  voltak.

Egy párhuzamos kísérletben a *P. chrysogenum* konídiosporákat glicerinen csíráztattuk és az előnövesztett micéliumot D-galaktózt, mint egyedüli szénforrást tartalmazó friss tápoldatba mostuk át. Ez a tenyészet is csaknem azonos kinetikai paramétereket mutatott, mint a spórával leoltott kultúrák. Összehasonlításképpen, a megfelelő paraméterek süllyesztett kultúrában D-glükózon, mint egy egyedüli szénforráson növesztve a következők voltak:  $\mu_{\text{max.}} = 0,125 \pm 0,01 \text{ 1/h}$ ,  $X_{\text{max.}} = 7,54 \pm 0,39 \text{ g/L}$  and  $Y_{x/s} = 0,51 \pm 0,04$ . Noha ezek az értékek szignifikánsan ( $p < 0,001$ ) magasabbak, mint a D-galaktózon kapottak, mégis azt mutatják, hogy a D-galaktózt egy gyorsan katabolizálódó ("jó") szénforrásnak lehet tekinteni a *P. chrysogenum* esetében. Szeretnénk megjegyezni, hogy a korábbiakhoz hasonlóan a 0,01% (w/v) pepton jelenléte (ami  $< 1\%$  -a a kiindulási D-galaktóz koncentrációnak) a minimál tápoldatban itt is jelentősen lerövidítette a *lag* fázist a

konidiospórával leoltott süllyesztett tenyésztés kezdetén (Jónás és mtsai. 2014, és az ott hivatkozott közlemények).



**10. 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.

### 5.2.1. A Leloir-útvonal génjeinek *in silico* azonosítása

Az a megfigyelés, hogy a *P. chrysogenum* be tudja futni a teljes (vegetatív) életréteget D-galaktózon, mint egyedüli szénforráson azt sugallta, hogy a Leloir-út "katabolikus" (oxidatív) irányba teljes mértékben

működik. Nem meglepő, hogy az *in silico* analízis kimutatta, a *P. chrysogenum* genom valóban tartalmaz feltételezett homológokat a Leloir-útvonal öt strukturális génje számára (a Wisconsin 54-1255 törzs annotált lókusza az **1. táblázat**ban vannak felsorolva), beleértve az egyedüli 4-epimerázt kódoló *ugeA*-t. Ez a peptid nagyon hasonló az *S. cerevisiae* N-terminális doménjének GAL10 bifunkciós enziméhez (Majumdar és mtsai. 2004). Korábban az *A. nidulans*-ban tanulmányozták a megfelelő *ugeA* gén anabolikus funkcióját, ami uridilált galaktóz monomereket nyújt a sejtfal galaktofuránoknak (El-Ganiny és mtsai. 2010). Az UDP-hexóz 4-epimerázok gyakran elfogadják szubsztrátumként az UDP hexózokat, ezek N-acetilezett-2-amino formáit, valamint az UDP-pentózokat, és azok szubsztituenseit is (Beerens és mtsai. 2015). Az *A. fumigatus*-ban a közelmúltban két szerkezetileg rokon UDP-hexóz 4-epimerázzal mutatták ki, hogy szükségesek a gomba sejtfalban megtalálható galaktózaminogalakán exopoliszacharid szintéziséhez (Lee és mtsai. 2014). A gyengébben kifejeződő *ugeB*-t, az *A. nidulans* paralóg génjének enzimét, már egy korábbi munkában azonosították (Paul és mtsai. 2011). Figyelembe vettük a *P. chrysogenum* ortológját, valamint három további automatikusan annotált epimeráz gént is, amelyek szerkezeti rokonságban vannak az *A. nidulans* AN0746 és AN3119 lókuszaival (Flipphi és mtsai. 2009). Kutatásaink arra vonatkoztak, hogy milyen szerepet játszhatnak ezek a gének a D-galaktóz Leloir katabolizmusában az *ugeA* mellett. Az adatelemzés során kiválasztott további két *P. chrysogenum* gén, a galaktokináz (*galE*) és D-galaktóz-1-foszfát uridilil transzferáz (*galD*) az *A. nidulans* *galE9* ill. *galD5* génjeinek orthológjai. Az *A. nidulans* *galE9* és a *galD5* allélikusan jól jellemzett, klasszikus D-galaktóz anyagcsere mutánsok (Roberts és mtsai. 1970, Alam és mtsai. 2013).

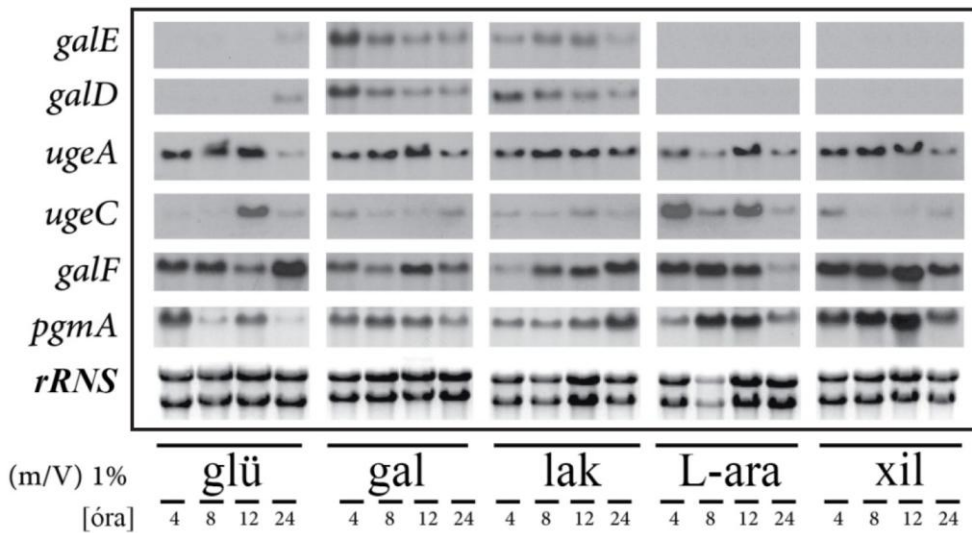
### 5.2.2. A Leloir-útvonal expressziója D-galaktózon és egyéb cukrokon

Az expressziós vizsgálatokat a D-galaktózon, a galaktopiranóz-tartalmú diszacharid laktózon, ill. D-glükózon végeztük. A kifejeződéseket megvizsgáltuk továbbá a növényi sejtfal két legnagyobb mennyiségű pentózán, az L-arabinózon és a D-xilózon.

A *P. chrysogenum* genomból kiválasztott összes gén a Leloir-útvonal 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 átmosása után. ld. **11. ábra**). 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 (**11. ábra**).

A gének kódolnak egy UDP-D-galaktóz-4-epimerázt is (*ugeA*), továbbá egy (feltételezett) UDP-D-glükóz-pirofoszforilázt (*galF*) és egy foszfoglükomutázt (*pgmA*), amelyek mind hasonló módon, elsősorban konstitutívan fejeződtek ki a tesztelt szénforrásokon, akár D-galaktózt vagy laktóz alkalmaztunk (egyedüli) növekedési szubsztrátként. Kifejeződésük nagy valószínűséggel kapcsolatban áll a Leloir-útvonal alapvető anabolikus funkcióival, a gomba sejtfalszintézisével a növekedés során (lásd a Diskusszió részben). 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. Ez az egy kivétel – mely szintén nagyon gyenge expressziót jelentett - a D-glükóz volt az utolsó mintavételi pontban (24 h), a növekedési szubsztrátum teljes elfogyása után.



**11. 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.

A galaktokináz enzimaktivitás meghatározása a micélium transzfer után 10 és 24 órával történt; az eredmények összhangban voltak a transzkripciós adatokkal (**3. táblázat**). Nagyon alacsony aktivitás rendre mérhető volt D-glükózon 24 órával a transzfer után, míg a korábbi időpontban, csak jelentéktelen ( $p < 0,001$ ) háttéraktivitás volt kimutatható.

**3. táblázat:** A *Penicillium chrysogenum* NRRL 1951 fajlagos galaktokináz aktivitása, amelyet glicerinen növesztettünk elő, majd ezt követően egy minimál tápoldatba vittünk át, amely különböző cukrokat tartalmazott. A specifikus aktivitásokat U (mg fehérje)<sup>-1</sup> fejeztük ki. Egy U megegyezik 1 mikrogramm D-galaktóz-1-foszfát képződésével percenként.

A tápoldat-váltás után eltelt idő (h)	Szénforrás				
	D-glükóz	D-galaktóz	laktóz	L-arabinóz	D-xilóz
10	> 0,015	0,350 ± 0,04	0,311 ± 0,04	> 0,015	> 0,015
24	0,020 ± 0,01	0,321 ± 0,03	0,354 ± 0,03	> 0,015	> 0,015

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 (**11. ábra** és **3. táblázat**). Megjegyezzük, hogy szemben a D-glükóz tenyésztéssel, a másik négy cukor tenyészteteiből 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-út vonal D-galaktóz katabolizmusának az első két lépése inkább szubsztráttal indukálható, mintsem konstitutív *P. chrysogenum*-ban.

## 6. DISZKUSSZIÓ

A laktóz a tej fő szénhidrátja. Bár elengedhetetlen az újszülött és fiatal emlősök számára (Brüssow és mtsai. 2013), a legtöbb mikroorganizmusok által benépesített élőhelyen nem fordul elő. Ezért nem meglepő, hogy számos baktérium, élesztő és gomba fajból hiányzik a laktóz hasznosításának képessége; amely fajok pedig tudják hasznosítani, azok gyakran alacsony asszimilációs rátát mutatnak. A laktóz hasznosítás szabályozása az *Escherichia coli lac* operon révén egy klasszikus paradigma a prokarióta genetikában (Wilson és mtsai. 2007), míg a *K. lactis* élesztő *LAC* szabályozása az alacsonyabbrendű eukarióták transzkripciós kontrolljának egyik sokat tanulmányozott modell-rendszere (Rodicio és mtsai. 2013). Mindazonáltal a laktóz hasznosítás a fonalas gombáknál - beleértve a *P. chrysogenum*-ot - több szempontból is kevésbé ismert.

A *Trichocomaceae* család (*Ascomycota*; *Pezizomycotina*; *Eurotiomycetes*; *Eurotiales*) legújabb rendszertani kategorizálása a *Penicillium (sensu strictu)* és az *Aspergillus (sensu strictu)* törzseket testvérnemzettségként alkotta meg az új *Aspergillaceae* családon belül (Houbraken és mtsai. 2011a). Az *Aspergillus* alfajának különböző tagjai - *Circumdati*, *Nidulanti*, *Negri* és *Fumigati* - tehát a *P. chrysogenum* legközelebbi rokonai, melynek teljes genom szekvenciája és annotációja rendelkezésre áll.

Néhány kivételtől eltekintve (Comp és mtsai. 1971, Anumukonda et al. 2010), a gombák általában a két fő stratégia - extracelluláris hidrolízis vagy transzport és intracelluláris hidrolízis- közül csak az egyiket alkalmazzák a laktóz katabolizmusára. Ez jellemző az *A. niger*-re és az *A. nidulans*-ra is.

Értekezésemben beszámoltunk azokról a bizonyítékokról, amelyek azt támasztják alá, hogy a *P. chrysogenum*-ot kettős laktóz asszimilációs

rendszer jellemzi, amely tartalmaz egy extracelluláris bGal-t (feltételezett) laktóz permeáz és az intracelluláris bGal-t. Az *in silico* analízis kimutatta, hogy a *P. chrysogenum* genom tartalmaz további két feltételezett extracelluláris bGal-t kódoló GH35 gént a Pc14g01510 és Pc06g00600 annotált lókuszon (*bgaB* és *bgaC*), de ezek a gének nem expresszázódtak a vizsgált körülmények között, és ezért nem valószínű, hogy fiziológiailag releváns szerepük lenne a laktóz asszimilációjában. Ugyanakkor bGal izoenzimek termelése egy fajon belül nem lenne példa nélküli a gombák körében. Az *A. carbonarius* két, aminosav szekvenciájában különböző extracelluláris bGal-t termel (O'Connell és mtsai. 2008), míg az acidophil *Teratosphaeria acidotherma* gombát (*Ascomycota*; *Pezizomycotina*; *Dothideomycetes*; *Capnodiales*), mint négy különböző, más-más aminosav szekvenciával rendelkező intracelluláris bGal termelőt írták le (Isobe és mtsai. 2013). A növekedési jellemzők (például a maximális specifikus növekedési ráta, a biomasszahozam kontra szénforrás fogyasztás) laktózon a *P. chrysogenum*-nál hasonló volt az *A. nidulans*-nál vagy a *T. reesei*-nél leírtakhoz, azonban érdekes különbségeket találtunk a bGal transzkripció/aktivitás szabályozásban a szénforrás függvényében.

A leginkább figyelemre méltó, hogy sem az extra-, sem az intracelluláris bGal aktivitás, és egyik feltételezett Bgal és permeáz gén sem indukálható D-galaktózzal. Az eddigi szakirodalom szerint minden vizsgált gombában (sőt baktériumokban is, Hasan és mtsai. 1974), a D-galaktóz legalább olyan jó inducere volt a Bgal-t kódoló géneknek, mint a laktóz (Seiboth és mtsai. 2005, Fekete és mtsai. 2002, De Vries és mtsai. 1999).

Mivel a monoszacharid D-galaktóz represszáló szénforrásnak tekinthető (De Vries és mtsai. 2001) és a gomba bGal gének általában karbon-katabolit represszió alá esnek (Fekete és mtsai. 2012b, Nagy és mtsai. 2001a, Seiboth és mtsai. 2005, Chulkin és mtsai. 2011), feltételeztük, hogy *P.*

*chrysogenum*-ban a D-galaktóz esetleges indukáló hatását ellensúlyozza a karbon-katabolit represszió. Ezen hipotézis tesztelése céljából lecsökkentettük az inducer koncentrációkat a standard 25 és 10 mM-ról 1 mM-ra sőt később 0,1 mM-ra. A kísérlet elméleti háttérében az áll, hogy függetlenül az adott szénforrás represszív jellegétől, az ilyen alacsony koncentráció alacsony specifikus növekedési rátát, az pedig karbon katabolit derepressziót fog eredményezni (Illyés és mtsai. 2004). Azonban egyik feltételezett bGal gén sem expresszáldott, még a legalacsonyabb (0,1 mM) vizsgált D-galaktóz koncentrációkon, a micélium átmosása után 1, 2 vagy akár 4 órával sem. Ez arra utal, hogy a *P. chrysogenum*-ban ezek a gének nem reagálnak a monoszacharidra, amely az egyik elsődleges terméke a laktóz hidrolízisnek.

Egy érdekes vonás a fonalas gombák bGal-t kódoló génjeinek szabályozásában, hogy látszólag indukálhatóak a pentóz monomerek (pl. L-arabinóz vagy D-xilóz) által, amik jellemzően hemicellulóz degradációból származnak (Nikolaev és mtsai. 1998, De Vries és mtsai. 1999). A pontos ok ismeretlen, de a jelenség kapcsolatos lehet a természetes poliszacharidokban való előfordulásukkal, ami szintén tartalmaz D-galaktózt, amely szénforrásként szolgálhat a szaprofita és fitopatogén gombáknak, mint például az arabinogalaktán.

A *P. chrysogenum*-mal végzett kísérleteinkből nyilvánvalóvá vált, hogy egyik feltételezett bGal gén sem reagált D-xilózra, és ONPG hidroláz aktivitást sem tudunk mérni. Ezzel szemben, úgy tűnik, hogy az L-arabinóz támogatja a *bgaA* gén mérsékelt kifejeződését, melynek terméke valószínűleg felelős az L-arabinózon növesztett kultúrákban mért extracelluláris ONPG hidroláz (és laktáz) aktivitásért, mint ahogy ezt korábban is megállapították egy bGal orthológ esetén, a rokon *P. canescens* gombában (Nikolaev és mtsai. 1998).

Azzal a megfigyeléssel egyidejűleg, hogy L-arabinóz jelenlétében csak az extracelluláris bGal expresszáldódik, a *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 genom szekvenciák nem tartalmazzák az ortológját az *A. nidulans* L-arabinózzal indukálható intracelluláris GH2 *BgaD*-paralógjának (AN2364 lókuszt). Az *A. nidulans*-ban az L-arabinóz mérsékelt hatást mutatott a *bgaD* (intracelluláris bGal) és az AN2463 lókuszon lévő paralóg GH2 gén kifejeződésére (Fekete és mtsai. 2012b), míg az utóbbi gén nem reagált a laktózra.

Az is bebizonyosodott, hogy szemben a laktózzal az L-arabinóz látszólagos indukciós hatása a *bgaD*-re nem volt additív hatású a derepresszióra a *creA* hiánymutánsokban. Ez arra utalhat, hogy az L-arabinóz derepresszálo helyett indukáló hatású az *A. nidulans bgaD* kifejeződésére. Sajnos, mivel a *P. chrysogenum*-nak nincsenek nyilvánosan elérhető *creA*-mutánsai, így nem tudtuk tesztelni, hogy az L-arabinóz derepresszálo vagy indukciós hatású az extracelluláris bGal-t kódoló *bgaA* kifejeződése során.

Jól ismert, hogy bizonyos bGal-ok *in vitro* körülmények között hidrolizálják az alfa-L-arabinopiranozid szubsztrátot, tükrözve a hasonlóságot a  $\beta$ -D-galaktopiranoz és az  $\alpha$ -L-arabinopiranoz hemiacetál konfiguráció között (Du és mtsai. 1995). Ebből következően elvileg elképzelhető, hogy a *P. chrysogenum* extracelluláris  $\alpha$ -L-arabinopiranozidázokat termel, amelyek mellékaktivitást mutatnak az ONPG-vel szemben. Azonban a *P. chrysogenum* L-arabinóz - mint *in vitro* szubsztrátum - által indukált extracelluláris hidroláz az ONPG-t és a laktózt is hasítja. Emiatt az  $\alpha$ -L-arabinopiranozidáz hipotézis kevésbé valószínű.

Az ONPG enzimaktivitások korrelálnak a *bgaA* valamint a *bgaD* transzkriptum mintázatával, így az enzimaktivitás profiloknál megfigyelt hatások is jól tükrözik a transzkripciós szabályozást. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy *P. chrysogenum*-ban a laktóz asszimiláció intracelluláris

genetikai struktúr-elemei hasonlítanak az *A. nidulans* esetében leírtakra; egy indukálható bGal génből (*bgaD*), egy indukálható permeázból (*lacA*) és egy konstitutív GH2 génből (*bgaE*) épül fel. Mindeközben az extracelluláris laktóz hidrolízis genetikai struktúrája hasonlít az *A. niger*-hez (De Vries és mtsai. 1999). Ez egyértelműen arra utal, hogy a *bgaA* és a *bgaD* élettanilag releváns hidrolázokat kódolnak, amik *P. chrysogenum*-ban is részt vesznek az extra- és intracelluláris laktóz lebontásban.

*A. nidulans*-ban a *LacpA* laktóz permeáz deléciója nem befolyásolta a tápoldatból való laktóz felvétel képességét, ezért valószínűleg egy második felvételi rendszer is érvényesül, amely lehetővé teszi a laktózon való növekedést (Fekete és mtsai. 2012b). A *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 genomja nem tartalmaz *lacpA* ortológ gént (**F4. ábra**). A gomba bGal/laktóz permeáz génklaszterek meglehetősen komplex evolúciós múltra tekintenek vissza az *Ascomycetes*-ben a duplikációs események és az adaptív gének elvesztésével (Flipphi és mtsai. 2009, FGB).

A megszekvenált *Penicillium* fajok esetében úgy látszik, hogy a *BgaD* ortológia hiányzik a *P. decumbens*-ből és a *P. digitatum*-ból. Másrészt, a *P. paxilli* genom két *BgaD*-szerű fehérjét határoz meg, amelyek közül az egyik, az *Aspergillusok* egyik filogenetikai szubkládjából származó ortológjával alkot egy csoportot, amely az *Eurotiomycetes Chaetothyriales* osztályának két fajából a *Cladophialophora carrionii*-ből és az *Exophiala dermatitidis*-ből szintén tartalmaz fehérjéket. A második *P. paxilli* *BgaD* fehérje egy magányos ortológgal csoportosul, amit megtaláltak a *P. chrysogenum sensu strictu* és a *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1225 egy olyan kládjában is, amely elsősorban *Sordariomycetes* fehérjéket tartalmaz. Mindkét *P. chrysogenum* genomban a cukor transzporter gén a *bgaD*-től eltérő módon íródik át, nem áll közeli rokonságban a jellemzett *A. nidulans* laktóz permeáz génnel.

Ugyanez igaz a *P. paxilli bgaD*-ortológ GH2 génjére a "*Sordariomycetes*" kládban (**F2. ábra**). Meg tudtuk erősíteni, hogy a Pc22g14530 lókuszon lévő MFS gén nem reagál laktózra, és nem expresszálódik együtt a *bgaD*-vel. Ezzel szemben, a második GH2 *P. paxilli* gén, amely kapcsolódik az *A. nidulans BgaD*-vel és más *Aspergillus* ortológokkal, rendelkezik egy *lacpA* permeáz génnel, amely tőle eltérően íródik át. A filogenetikai analízisünk tehát arra utal, hogy a jelenlegi *P. chrysogenum* ortológ *BgaD* fehérje egy horizontális géntranszfer által alakult ki (eredetileg egy ismeretlen *Sordariomycetes*-ből), és létrejötte után, az eredeti "*Eurotiomycetes*" ortológ - eredetileg intracelluláris *bGal* gén - elveszett a vele csoportosult *lacpA* orthológ laktóz transzporter génnel együtt. Ezek az események is magyarázhatják, hogy jelentős különbségek figyelhetők meg az *A. nidulans*-ban és a *P. chrysogenum*-ban a *bgaD* expressziós eredményekben. Ilyen a csak az előbbinél előforduló látható intracelluláris *bGal* indukció, amit a D-galaktóz és az L-arabinóz vált ki.

Úgy tűnik, hogy a *P. chrysogenum* csak egy fiziológiailag releváns laktóz transzporterrel rendelkezik. A *LacA*, az *A. nidulans LacpA* strukturális paralogja, és az *A. nidulans* permeáz orthológja, ami az AN2814 lókuszon kódolódik. A *LacA* az összes átvizsgált *Penicillium* genomban jelen van, beleértve a *P. digitatum*-ot is. Ez egy olyan faj, amelyből hiányzik az intracelluláris GH2 gén, amely szerkezetileg összefügg a *bgaD*-vel (amelyeket már két törzsben is megszekvenáltak, lásd Anyagok és Módszerek rész). Érdekes, hogy ez az orthológ a *N. crassa*-ban (lókus: NCU00801), mint egy cellobióz transzporter (1,4-O- $\beta$ -D-glükopiranozil-D-glükóz) van leírva. Ez egy diszacharid, amely szerkezetileg nagyon hasonló a laktózhoz (1,4-O- $\beta$ -D-galaktopiranozil-D-glükóz) (Galazka és mtsai. 2010).

A másik gént, mint egy feltételezett laktóz transzportert azonosítottuk. Megállapítottuk, hogy a *LacB* – ortológja csak a *P. chrysogenum* Wisconsin

54-1255-ben, a *P. chrysogenum*-ban *sensu strictu* és a *P. digitatum*-ban fordul elő, hiányzik viszont a *P. paxilli*-ből és a *P. decumbrens*-ből - nem expresszálódik semmilyen vizsgált szénforráson. Érdekes, hogy a celluláz termelő *T. reesei*-ben, a *P. chrysogenum* *LacB* és az *A. nidulans* AN6831 ortológját (a *LacpA* egy harmadik paralógja, Fekete és mtsai. 2012b) egy Trire2:3405 azonosítójú fehérjeként azonosították, ami úgy tűnik alapvető fontosságú a laktózon való növekedéshez (Ivanova és mtsai. 2013). A kódoló gén deléciója teljesen blokkolta a *T. reesei* laktózon való növekedését, anélkül, hogy befolyásolta volna a D-glükózon vagy a D-galaktózon való növekedést. Ez utóbbi megállapítás ellentmond annak a régóta fennálló feltételezésnek (Seiboth és mtsai. 2004, Fekete és mtsai. 2008), hogy a laktóz katabolizmus a *T. reesei*-ben kizárólag extracelluláris, mivel az extracelluláris GH35 *Bgal* gén kifejeződött ezen transzporter deléciójakor. Megjegyzendő, hogy az intracelluláris laktóz-hidrolizáló enzimet még azonosítani kell (Ivanova és mtsai. 2013, Karaffa és mtsai. 2013).

Jól dokumentált tény, hogy a megnövekedett penicillintermelés a különböző ipari törzsfajlesztő programok kezdeti leszármazottaiban - beleértve az AS-P-78-at is - egybeesik a penicillin bioszintézis gén klaszter amplifikációjával (Barredo és mtsai. 1989). Azt is felismerték, hogy a penicillin bioszintézis gének overexpressziója nem magyarázható kizárólag a klaszter amplikon kópiaszámának növekedésével (Haas és mtsai. 1997). Ez azt sugallja, hogy a megnövekedett titer egy része mutációk következménye, és befolyásolják azokat az általános szabályozási utakat, amelyek az elsődleges anyagcserét irányítják, és alá vannak rendelve a penicillin génklaszternek (Espeso és mtsai. 1994).

A laktóz egy szokatlan szénforrás a fonalas gombák számára. Lassú növekedést, és ebből következő karbon derepressziót eredményez. (Flipphi és mtsai. 2003; Fekete és mtsai. 2012b). Azonban a növekedési paramétereken

elvégzett összehasonlító elemzés egyértelműen azt mutatta, hogy a vad típusú NRRL 1951 referencia törzshöz viszonyítva az AS-P-78 megnövekedett penicillin-termelő potenciálja nem jár együtt a laktóz asszimilációs ráta csökkenéssel. Ezért a rendelkezésre álló adatok arra utalnak, hogy a *P. chrysogenum* laktóz metabolizmusa nincs összefüggésben a gomba penicillin-termelő potenciáljával, legalábbis a korai generációból származó, megnövelt termelőképességű AS-P 78 törzs esetén.

Számos *Penicillium* faj, köztük a *P. chrysogenum* is termel  $\alpha$ - és  $\beta$ -glükozidáz jellegű hidrolázokat, amelyek lehetővé teszik a gomba számára, hogy felszabadítsa a D-galaktózt a növényi sejtfal poliszacharidjaiból, valamint a laktózból (Jørgensen és mtsai. 2004, Hu és mtsai. 2010). Azonban, a gomba D-galaktóz felszabadító képessége nem szükségszerűen határozza meg azt a sebességet, amellyel a cukor katabolizálódik. Ez például igaz az *A. nidulans* laktóz hasznosítására, ahol a diszacharid felvétele helyett a hidrolízis sebessége a meghatározó (Fekete és mtsai. 2012b). A legtöbb fekete *Aspergillus* – az *Aspergillus*-ok *Nigri* szekciója - nem képesek csírázni D-galaktózon (Fekete és mtsai. 2012a). Azonban vizsgálatunk egyértelműen bizonyítja, hogy a *P. chrysogenum* képes a D-galaktóz felhasználására, mind energia, mind szénforrásként a növekedés bármely szakaszában, beleértve a spórák csírázásának kritikus fázisát is.

Míg a Leloir-útvonal szerepe a D-galaktóz tekintetében katabolikus - D-glükózzá epimerizálódik mielőtt, mint glükóz-6-foszfát belépne az anyagcsere főáramába - egy fontos anabolikus út részeként is működik, ami az intracelluláris szénhidrát-anyagcsere létfontosságú területein vesz részt, mint például a sejtfal komponensek bioszintézise. Ilyenek az exopoliszacharidok és lipopoliszacharidok, amelyekhez uridilil-aktivált glükóz és D-galaktóz a szükséges prekursor (Free és mtsai. 2013). Külsőleg

adagolt D-galaktóz hiányában, a glükóz/D-galaktóz Leloir-út az egyetlen lehetőség arra, hogy a sejt felépítő célra aktiválja ezeket a monoszacharid építőelemeket, kezdve a kulcsfontosságú glikolitikus intermedierrel, a glükóz-6-foszfáttal. Az *A. nidulans*-ban a klasszikus *pgmA* lókuszon allélikus mutációt hordozó törzsekben a foszfooglukomutáz aktivitás teljes vagy részleges elvesztése figyelhető meg. Ismeretes, hogy a mutánsok vad típusú törzsnek megfelelő szintű UDP-glükóz-pirofoszforilázt termelnek, továbbá az is valószínűsíthető is, hogy ezek csak egyetlen strukturális gént befolyásolnak (Boschloo és mtsai. 1979). Ezek a feltételesen letális mutánsok csak külsőleg adagolt D-galaktóz plusz egy független (nem-galaktóz) szénforrás jelenlétében képesek nőni. Ez közvetve azt bizonyítja, hogy az esszenciális uridilált monoszacharid sejtfal prekursorokat ezek a törzsek kizárólag D-galaktózból állítják elő.

Az öt *uge* génből, amelyek feltételezett nukleozid-difoszfát cukor 4-epimerázokat kódolnak, két olyat találtunk, amelyek kifejeződtek a vizsgált körülmények között. Az *A. nidulans* orthológ *ugeA* génje (*P. chrysogenum*, lókuszt: Pc21g10370) D-galaktóz és laktóz jelenlétében is mindig erőteljesen kifejeződött. Az *ugeC* (Pc18g01080; megfelel az *A. nidulans* AN3199 lókuszában lévő génnek) transzkripciója is megfigyelhető volt, függetlenül a szénforrástól vagy a tenyészet életkorától, bár lényegesen alacsonyabb szinten. Habár az *ugeC* gén úgy tűnik, hogy reagál L-arabinózra, valamint D-glükózra is a gyors növekedési fázisban (12 h), az expressziós profilja alapján vélhetően nem tölt be kiemelkedő szerepet a D-galaktóz katabolizmusában, bár nem zárhatjuk ki annak a lehetőségét, hogy a meglévő *ugeC* fehérje az *ugeA* társa a D-galaktóz lebontásában.

Az eddig vizsgált aszkomikóta fonalas gombákban a Leloir-útvonal öt definiált génje mindig kifejeződött, amikor Northern-analízissel vizsgálták. Alapszintű expresszió szintén megfigyelhető volt a galaktokinázt és a D-

galaktóz-1-P-uridililtranszferázt kódoló géneknél az adott szénforrásokon, függetlenül a D-galaktóz anyagcserétől, bár úgy tűnt, hogy transzkripció szintjük tovább növelhető a katabolikus Leloir-útvonal közvetlen vagy közvetett szubsztrátjainak jelenlétében (Seiboth és mtsai. 2002, 2004; Christensen és mtsai. 2011, Fekete és mtsai. 2012a).

Megállapítottuk, hogy a galaktokinázt és a D-galaktóz-1-P-uridililtranszferázt kódoló gének kifejeződése szelektíven indukálható D-galaktózzal és laktózzal *P. chrysogenum*-ban a konstitutív alapexpressziós szintek közreműködése nélkül. Ez ellentétes két másik, a fermentációs iparban általánosan alkalmazott gombához, az *A. niger*-hez és a *T. reesei*-hez képest, és így eddig nem ismert szabályozási mechanizmusok felé mutat. A Leloir-útvonal fennmaradó három struktur génje - *pgmA*, *galF* és az *ugeA* -a munkánk során konstitutívan fejeződött ki, amint az várható is azon génektől, amelyek szükségesek a gomba sejtfal esszenciális prekursorainak -az UDP-glükóznak és az UDP-galaktóznak - a szintéziséhez.

Végül megjegyezzük, hogy a Leloir-útvonalon kívül, a gombák D-galaktóz katabolizmusa egy másik módon, az úgynevezett alternatív vagy -oxido-reduktív útvonalon is végbemehet. Amíg a Leloir-útvonal a gombákban és a katabolikus folyamatokban lényegében mindenütt jelen van és specifikus D-galaktózra, addig az alternatív útvonal enzimei az L-arabinóz katabolizmusában vesznek részt egészen a D-xilulóz foszforilációjáig (Chiang és mtsai. 1960.). Ezen enzimek részvételét a gombák D-galaktóz hasznosításában először De Vries és mtsai. (1994) vetették fel. Ezt követően D-galaktokináz hiánymutánsok révén Fekete és mtsai. (2004) igazolták a hipotézist *A. nidulans*-ban, akik azt is kimutatták, hogy az oxido-reduktív út használata függ a nitrogénforrás minőségétől. A D-galaktóz oxido-reduktív katabolizmusa előfordul a *T. reesei*-ben (Seiboth és mtsai. 2004) és az *A. niger*-ben is (Mojzita és mtsai. 2012). Az *Aspergillus* nemzetség két eddig

vizsgált fajában azonban az útvonal enzimei és intermedierei az L-arabitol-dehidrogenázon és a D-galaktitolon kívül eltérőek (Mojzita és mtsai. 2012). Jelenleg is folynak kutatások, hogyan és milyen módon vesz részt az oxidoreduktív útvonal a *P. chrysogenum* D-galaktóz hasznosításában.

## 7. ÖSSZEFOGLALÁS

A penicillin ipari előállítására *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-epimerázt 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 lókuszt (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-pirofoszforilázt (Pc21g12790-*galF*) és foszfo-glükomutázt (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.

## 8. 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.

## 9. 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.

## 10. IRODALOMJEGYZÉK

1. Alam K, Kaminskyj SGW (2013) *Aspergillus* galactose metabolism in more complex than that of *Saccharomyces*: the story of GalDGAL7 and GalEGAL1. *Botany* 91:467–477
2. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389–3402
3. Anderson MJ, Viars CS, Czekay S, Cavenee WK, Arden KC (1998) Cloning and characterization of three human forkhead genes that comprise an FKHR-like gene subfamily. *Genomics* 47:187–199
4. Anumukonda P, Tadimalla P (2010) Screening of  $\beta$ -galactosidase producing fungi from marine samples. *Biomed Pharmacol J* 3:81-86
5. Balasubramaniam S, Lee HC, Lazan H, Othman R, Ali ZM (2005) Purification and properties of a  $\beta$ -galactosidase from carambola fruit with significant activity towards cell wall polysaccharides. *Phytochemistry* 66:153-163
6. 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
7. 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.
8. Bates WK, Woodward DO (1964) *Neurospora*  $\beta$ -galactosidase: evidence for a second enzyme. *Science* 146:777–778
9. Beerens K, Soetaert W, Desmet T (2015) UDP-hexose 4-epimerases: a view on structure, mechanism and substrate specificity. *Carbohydrate Res* 414:8-14
10. Bennett JW (1998) *Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology*. *J Biotech* 66:101-107
11. Biswas S, Kayastha AM, Seckler R (2003) Purification and characterization of a thermostable beta-galactosidase from kidney beans (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. PDR14. *J Plant Phys* 160:327-337
12. Bhat MK (2000) Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechn Adv* 18:355-383

13. Boschloo JG, Roberts CF (1979) D-Galactose requiring mutants in *Aspergillus nidulans* lacking phosphoglucomutase. FEBS Lett 104:17-20
14. Brakhage AA (1998) Molecular regulation of  $\beta$ -lactam biosynthesis in filamentous fungi. Microbiol Mol Biol Rev 62:547–585
15. Brüssow H (2013) Nutrition, population growth and disease: A short history of lactose. Environ Microbiol 15:2154-2161
16. Caputto R, Leloir LF, Trucco RE, Cardini CE (1949) The enzymatic transformation of galactose into glucose derivatives. J Biol Chem 179:497- 498
17. Cardini CE, Paladini AC, Caputto R, Leloir LF (1950) Uridine Diphosphate Glucose: the Coenzyme of the Galactose-Glucose Phosphate Isomerization. Nature 165:191-192
18. Chang YD, Dickson RC (1988) Primary structure of the lactose permease gene from the yeast *Kluyveromyces lactis*. Presence of an unusual transcript structure. J Biol Chem 263:16696-703
19. Chiang C, Knight SG (1960) A new pathway of pentose metabolism. Biochem Biophys Res Commun 3:554-359
20. Christensen U, Gruben BS, Madrid S, Mulder H, Nikolaev I, de Vries RP (2011) Unique regulatory mechanism for D-galactose utilization in *Aspergillus nidulans*. Appl Environm Microbiol 77:7084–7087
21. Chulkin AM, Vavilova EA, Benevolenskii SV (2011) Mutational analysis of carbon catabolite repression in filamentous fungus *Penicillium canescens*. Mol Biol 45:804-810
22. Comp PC, Lester G (1971) Properties of an extracellular beta-galactosidase secreted by *Neurospora crassa*. J Bacteriol 107:162-167
23. 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
24. Cruz R, D'Arcadia Cruz V, Belote JG, de Oliveira Khenayfes M, Dorta C, dos Santos Oliveira LH, Ardiles E, Galli A (1999) Production of transgalactosylated oligosaccharides (TOS) by galactosyltransferase activity from *Penicillium simplicissimum*. Bioresour Technol 70:165–171

25. Dalrymple SA1, Ko J, Sheoran I, Kaminskyj SG, Sanders DA (2013) Elucidation of substrate specificity in *Aspergillus nidulans* UDP-galactose-4-epimerase. PLoS One
26. 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
27. De Vries RP, van den Broek HC, Dekkers E, Manzanares P, de Graaff LH, Visser J (1999) Differential expression of three  $\alpha$ -galactosidase genes and a single  $\beta$ -galactosidase gene from *Aspergillus niger*. Appl Environ Microbiol 65:2453–2460
28. De Vries RP, Visser J (2001) *Aspergillus* enzymes involved degradation of plant cell wall polysaccharides. Microbiol Mol Biol Rev 65:497-522
29. Díez B, Rodríguez-Sáiz M, de la Fuente JL, Moreno MÁ, Barredo JL (2005) The *nagA* gene of *Penicillium chrysogenum* encoding  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase. FEMS Microbiol Letts 242:257-264
30. Du Y, Kong F (1995) Synthesis, conformation and glycosylation reaction of substituted 2,6-dioxabicyclo[3.1.1]heptanes:1,3-anhydro-2,4-di-O-benzyl- $\alpha$ -L-arabinopyrano-se. Carbohydr Res 275:259-273
31. Edson CM, Brody S (1976) Biochemical and genetic studies on galactosamine metabolism in *Neurospora crassa*. J Bacteriol 126:799-805
32. El-Ganiny AM, Sheoran I, Sanders DAR, Kaminskyj SGW (2010) *Aspergillus nidulans* UDP-glucose-4-epimerase UgeA has multiple roles in wall architecture, hyphal morphogenesis, and asexual development. Fungal Genet Biol 47:629-635
33. Espeso EA, Peñalva MA (1994) In vitro binding of the two-finger repressor CreA to several consensus and non-consensus sites at the *ipnA* upstream region is context dependent. FEBS Lett 342:43-48
34. Fekete E, Karaffa L, Sándor E, Seiboth B, Biró S, Szentirmai A, Kubicek CP (2002) Regulation of formation of the intracellular  $\beta$ -galactosidase activity of *Aspergillus nidulans*. Arch Microbiol 179:7–14
35. Fekete E, Karaffa L, Sándor E, Bányai I, Seiboth B, Gyémánt GY, Sepsi A, Szentirmai A, Kubicek CP (2004) The alternative D-galactose degrading pathway of *Aspergillus nidulans* proceeds via L-sorbose. Arch Microbiol 181:35–44

36. Fekete E, Seiboth B, Kubicek CP, Szentirmai A, Karaffa L (2008) Lack of aldose 1-epimerase in *Hypocrea jecorina* (anamorph *Trichoderma reesei*): A key to cellulase gene expression on lactose. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:7141-7146
37. 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
38. 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
39. Flipphi M, Van de Vondervoort PJI, Ruijter GJG, Visser J, Arst JrHN, Felenbok B (2003) Onset of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*: Parallel involvement of hexokinase and glucokinase in sugar signaling. *J Biol Chem* 278:11849-11857
40. Flipphi M, Sun J, Robellet X, Karaffa L, Fekete E, Zeng AP, Kubicek CP (2009) Biodiversity and evolution of primary carbon metabolism in *Aspergillus nidulans* and other *Aspergillus spp.* *Fungal Genet Biol* 46: S19-S44
41. Foglietti MJ, Percheron F, Percheron F (1976). Purification and mechanism of action of a plant galactokinase. *Biochimie* 58:499–504
42. Free SJ (2013) Fungal cell wall organization and biosynthesis. *Adv Genet* 81:33-82
43. 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
44. Galazka JM, Tian C, Beeson WT, Martinez B, Glass NL, Cate JH (2010) Cellodextrin transport in yeast for improved biofuel production. *Science* 330:84-6
45. 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
46. 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

47. Hartley A, Glynn SE, Barynin V, Baker PJ (2004) Substrate specificity and mechanism from the structure of *Pyrococcus furiosus* galactokinase. *J Mol Biol* 337:387–98
48. Hasan N, Durr IF (1974) Induction of beta-galactosidase in *Lactobacillus plantarum*. *J Bacteriol* 120:66-73
49. Holden HM, Rayment I, Thoden JB (2003) Structure and function of enzymes of the Leloir pathway for galactose metabolism. *J Biol Chem* 278:43885–8
50. Holden HM, Thoden JB, Timson DJ, Reece RJ, Thoden JB, Timson DJ, Reece RJ (2004) Galactokinase: structure, function and role in type II galactosemia. *Cell Mol Life Sci* 61:2471–84
51. Houbraken J, Frisvad JC, Samson RA (2011a) Fleming’s penicillin producing strain is not *Penicillium chrysogenum* but *P. rubens*. *IMA Fungus* 2:87–95
52. Houbraken J, Samson RA (2011b) Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of *Trichocomaceae* into three families. *Stud Mycol* 70:1-51
53. Hu X, Robin S, O’Connell S, Walsh G, Wall JG (2010) Engineering of a fungal  $\beta$ -galactosidase to remove product inhibition by galactose. *Appl Microbiol Biotechnol* 87:1773-1782
54. Hugget AS, Nixon DA (1957) Use of glucose oxidase, peroxidase, and O-dianisidine in determination of blood and urinary glucose. *Lancet* 273:368-370
55. Ike M, Isami K, Tanabe Y, Nogawa M, Ogasawara W, Okada H, Morikawa H (2006) Cloning and heterologous expression of the exo- $\beta$ -D-glucosaminidase-encoding gene (*gls93*) from a filamentous fungus, *Trichoderma reesei* PC-3-7. *Appl Microbiol Biotechnol* 72:687–695
56. Ilyés H, Fekete E, Karaffa L, Fekete É, Sándor E, Szentirmai A, Kubicek CP (2004) CreA-mediated carbon catabolite repression of beta-galactosidase formation in *Aspergillus nidulans* is growth rate dependent. *FEMS Microbiol Lett* 235:147-151
57. 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 galactooligosaccharide production. *J Biosci Bioeng* 99:331–339

58. Isobe K, Takahashi N, Chiba S, Yamashita M, Koyama T (2013) Acidophilic fungus, *Teratosphaeria acidotherma* AIU BGA-1, produces multiple forms of intracellular  $\beta$ -galactosidase. *J Biosci Bioeng* 116:171-174
59. Ivanova C, Baath JA, Seiboth B, Kubicek CP (2013) Systems analysis of lactose metabolism in *Trichoderma reesei* identifies a lactose permease that is essential for cellulase induction. *PLoS ONE* 8, e62631
60. Iqbal S, Nguyen TH, Nguyen TT, Maischberger T, Haltrich D (2010)  $\beta$ -galactosidase from *Lactobacillus plantarum* WCFS1: biochemical characterization and formation of prebiotic galacto-oligosaccharides. *Carbohydrate Res* 345:1408-1416
61. Jakucs E (2009) A mikológia alapjai. ELTE Eötvös Kiadó
62. Jónás Á, Fekete E, Flippi M, Sándor E, Jäger S, Molnár ÁP, Szentirmai A, Karaffa L (2014) Extra-and intracellular lactose catabolism in *Penicillium chrysogenum*: Phylogenetic and expression analysis of the putative permease and hydrolase genes. *J Antibiotics* 67:489-497
63. Jørgensen H, Mørkeberg A, Krogh KB, Olsson L (2004) Growth and enzyme production by three *Penicillium* species on monosaccharides. *J Biotechnol* 109:295-299
64. Karaffa L, Coulier L, Fekete E, Overkamp KM, Druzhinina IS, Mikus M, Seiboth B, Novák L, Punt PJ, Kubicek CP (2013) The intracellular galactoglycome in *Trichoderma reesei* during growth on lactose. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:5447-5456
65. Kavanagh KL, Jörnvall H, Persson B, Oppermann U (2008) Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families : the SDR superfamily: functional and structural diversity within a family of metabolic and regulatory enzymes. *Cell Mol Life Sci* 65: 3895–906
66. Kestwal RM, Bhide SV (2007) Purification of  $\beta$ -galactosidase from *Erythrina indica*: Involvement if tryptophan in active site. *Bioch et Bophys Act* 1770:1506-1512
67. Kishore D, Kayastha AM (2012) Optimisation of immobilisation for chick pea  $\beta$ -galactosidase (CpGAL) to alkylamine glass using response surface methodology and its application in lactose hydrolysis. *Food Chem* 3:1650-1657

68. Kumar V, Ramakrishnan S, Teeri TT, Knowles JKC, Hartley BS (1992) *Saccharomyces cerevisiae* cells secreting an *Aspergillus niger* beta-galactosidase grow on whey permeate. *Bio/Technology* 10:82–85
69. Lai K, Elsas LJ, Wierenga KJ (2009) Galactose toxicity in animals. *IUBMB Life* 61:1063–74
70. Lee MJ, Gravelat FN, Cerone RP, Baptista SD, Campoli PV, Choe SI, Kravtsov I, Vinogradov E, Creuzenet C, Liu H, Berghuis AM, Latgé JP, Filler SG, Fontaine T, Sheppard DC (2014) Overlapping and distinct roles of *Aspergillus fumigatus* UDP-glucose 4-epimerases in galactose metabolism and the synthesis of galactose-containing cell wall polysaccharides. *J Biol Chem* 289:1243–56
71. Leloir LF (1951) The enzymatic transformation of uridine diphosphate glucose into a galactose derivative. *Arch Biochem Biophys* 33: 186–190
72. 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
73. Liu Y, Vanhooke JL, Frey PA (1996) UDP-galactose 4-epimerase: NAD<sup>+</sup> content and a charge-transfer band associated with the substrate-induced conformational transition. *Biochemistry* 35:7615–20
74. Lodi T, Donnini C (2005) Lactose-induced cell death of  $\beta$ -galactosidase mutants in *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Res* 5:727–734
75. MacCabe AP, Miro P, Ventura L, Ramon D (2003) Glucose uptake in germinating *Aspergillus nidulans* conidia: involvement of the *creA* and *sorA* genes. *Microbiology* 149:2129–2136
76. Majumdar S, Ghatak J, Mukherji S, Bhattacharjee H, Bhaduri A (2004) UDPgalactose 4-epimerase from *Saccharomyces cerevisiae*: A bifunctional enzyme with aldose 1-epimerase activity. *Eur J Biochem* 271:753–759
77. Megarity CF, Huang M, Warnock C, Timson DJ, Clare F (2011) The role of the active site residues in human galactokinase: Implications for the mechanisms of GHMP kinases. *Cell Mol Life Sci* 39:120–126
78. Milchová Z, Rosenberg M (2006) Current trends of  $\beta$ -galactosidase application in food technology. *J Food and Nutrit Res* 2:47–54

79. Milewski S, Gabriel I, Olchoway J (2006) Enzymes of UDP-GlcNAc biosynthesis in yeast. *Yeast* 23:1-14
80. Misselwitz B, Pohl D, Frühauf H, Fried M, Vavricka SR, Fox M. (2013) Lactose malabsorption and intolerance: pathogenesis, diagnosis and treatment. *United European Gastroenterol J.* 1:151-159
81. Mojzita D, Koivistoinen OM, Maaheimo H, Penttilä M, Ruohonen L, Richard P (2012) Identification of the galactitol dehydrogenase, LadB, that is part of the oxido-reductive D-galactose catabolic pathway in *Aspergillus niger*. *Fungal Genet Biol* 49:152-159
82. Nagy Z, Keresztessy Z, Szentirmai A, Biró S (2001a) Carbon source regulation of  $\beta$ -galactosidase biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *J Basic Microbiol* 41: 351-362
83. Nagy Z, Kiss T, Szentirmai A, Biró S (2001b)  $\beta$ -Galactosidase of *Penicillium chrysogenum*: Production, purification, and characterization of the enzyme. *Protein Expr Purif* 21:24-29
84. 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
85. Nevalainen KMH (1981) Induction, isolation, and characterization of *Aspergillus niger* mutant strains producing elevated levels of  $\beta$ -galactosidase. *Appl Environ Microbiol* 41:593-596
86. 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
87. Nicholas KB, Nicholas HB (2007) GeneDock: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. [www.psc.edu/biomed/genedoc](http://www.psc.edu/biomed/genedoc)
88. Nikolaev IV, Vinetski YP (1998) L-Arabinose induces synthesis of secreted  $\beta$ -galactosidase in the filamentous fungus *Penicillium canescens*. *Biochemistry (Moscow)* 63:1294-1298
89. 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

90. O'Connell S, Walsh G (2010) A novel acid-stable, acid-active  $\beta$ -galactosidase potentially suited to the alleviation of lactose intolerance. *Appl Microbiol Biotechnol* 86:517–524
91. Ozcengiz G, Demain AL (2013) Recent advances in the biosynthesis of penicillins, cephalosporins and clavams and its regulation. *Biotechnol Adv* 31:287-311
92. Pao SS, Paulsen IT, Saier HM (1998) Major Facilitator Superfamily. *Microbiol Mol Biol Rev* 62
93. Paul BC, El-Ganiny AM, Abbas M, Kaminskyj SG, Dahms TE (2011) Quantifying the importance of galactofuranose in *Aspergillus nidulans* hyphal wall surface organization by atomic force microscopy. *Eukaryot Cell* 10:646-653
94. Pauly M, Keegstra K (2010): Plant cell wall polymers as precursors for biofuels. *Curr Opin Plant Biol* 13:305-312
95. Pel HJ, de Winde JH, Archer DB, Dyer PS, Hofmann G, Schaap PJ, Turner G, de Vries RP, Albang R, Albermann K, Andersen MR, Bendtsen JD, Benen JAE, van den Berg M, Breestraat S, Caddick MX, Contreras R, Cornell M, Coutinho PM, Danchin EGJ, Debets AJM, Dekker P, van Dijk PWM, van Dijk A, Dijkhuizen L, Driessen AJM, d'Enfert C, Geysens S, Goosen C, Groot GSP, de Groot PWJ, Guillemette T, Henrissat B, Herweijer M, van den Hombergh JPTW, van den Hondel CAMJJ, van der Heijden RTJM, van der Kaaij RM, Klis FM, Kools HJ, Kubicek CP, van Kuyk PA, Lauber J, Lu X, van der Maarel MJEC, Meulenberg R, Menke H, Mortimer MA, Nielsen J, Oliver SG, Olsthoorn M, Pal K, van Peij NN ME, Ram AFJ, Rinas U, Roubos JA, Sagt CMJ, Schmoll M, Sun J, Ussery D, Varga J, Vervecken W, van de Vondervoort PJJ, Wedler H, Wösten HAB, Zeng A-P, van Ooyen AJJ, Visser J, Stam H (2007) Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nat Biotechnol* 25:221–231
96. 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).
97. Persson I, Tjerneld F, Hahn-Hägerdal B (1991) Fungal cellulolytic enzyme production: A review. *Process Biochem* 26:65–74
98. Pesti M (2001) Általános mikrobiológia. *Dialóg Campus Kiadó*

99. Peterson GL (1983) Determination of total protein. *Methods Enzymol* 91:86–105
100. Pirt SJ Principles of microbe and cell cultivation. Blackwell Scientific Publications 156–170 (Oxford, U.K. 1975)
101. Pribila BA (2000) Improved lactose digestion and intolerance among African-American adolescent girls fed a dairy-rich diet. *J Americ Diet Associat*
102. 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
103. 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
104. Roberts CF (1970) Enzyme lesions in galactose non-utilising mutants of *Aspergillus nidulans*. *Biochim Biophys Acta* 201:267–283
105. Rodicio R, Heinisch JJ (2013) Yeast on the milky way: Genetics, physiology and biotechnology of *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* 30:165-177
106. Roelfsema WA, Kuster BFM, Heslinga MC, Plum 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)
107. Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method – a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406–425
108. 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
109. Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, New York)
110. Schell MA, Wilson DB, MA, Wilson DB (1979) Purification of galactokinase mRNA from *Saccharomyces cerevisiae* by indirect immunoprecipitation. *J Biol Chem* 254:3531–6
111. Seiboth B, Hofmann G, Kubicek CP (2002) Lactose metabolism and cellulase production in *Hypocrea jecorina*: the *gal7* gene, encoding galactose-1-phosphate uridylyltransferase, is essential for growth on galactose but not for cellulase induction. *Mol Genet Genomics* 26:124–132

112. Seiboth B, Hartl L, Pail M, Fekete E, Karaffa L, Kubicek CP (2004) The galactokinase of *Hypocrea jecorina* is essential for cellulose induction by lactose but dispensable for growth on D-galactose. *Mol Microbiol* 51:1015-1025
113. Seiboth B, Hartl L, Salovuori N, Lanthaler K, Robson GD, Vehmaanperä J, Penttilä ME, Kubicek CP (2005) Role of the *bgal*-encoded extracellular  $\beta$ -galactosidase of *Hypocrea jecorina* in cellulase induction by lactose. *Appl Environ Microbiol* 71:851–857
114. 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
115. Sellick CA, Reece RJ, Reece RJ (2006). Contribution of Amino Acid Side Chains to Sugar Binding Specificity in a Galactokinase, Gal1p, and a Transcriptional Inducer, Gal3p. *J Biol Chem* 281:17150–5
116. Sheetz RM, Dickson RC (1981) *LAC4* is the structural gene for  $\beta$ -galactosidase in *Kluyveromyces lactis*. *Genetics* 98:729–745
117. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) Mega 5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28:2731-2739
118. Tang M, Wierenga K, Elsas LJ, Lai KM, Wierenga K, Elsas LJ, Lai K (2010). Molecular and biochemical characterization of human galactokinase and its small molecule inhibitors. *Chem Biol Interact* 188:376–85
119. Taniguchi AY, Takano K (2004) Purification and properties of  $\beta$ -galactosidases from *Tilapia intestine*: Digestive enzyme of Tilapia-X. *Fisheries Science* 70:688-694
120. Thoden JB, Frey PA, Holden HM (1996) Molecular structure of the NADH/UDP-glucose abortive complex of UDP-galactose 4-epimerase from *Escherichia coli*: implications for the catalytic mechanism. *Biochemistry* 35:5137–44
121. Thoden JB, Wohlers TM, Fridovich-Keil JL, Holden HM (2000) Crystallographic evidence for Tyr 157 functioning as the active site base in human UDP-galactose 4-epimerase. *Biochemistry* 39:5691–701

122. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL-W – improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673–4680
123. Timson DJ, Reece RJ, David J, Richard J (2003) Functional analysis of disease-causing mutations in human galactokinase. *Eur J Biochem* 270:1767–74
124. Trucco RE, Caputto R, Leloir LF, Mittelman N (1948) Galactokinase. *Journal Arch Biochem* 18:137-146
125. Van Den Berg MA, Albang R, Albermann K, Badger JH, Daran J-M, Driessen AJ, Garcia-Estrada C, Fedorova ND, Harris DM, Heijne WHM, Joarder V, Kiel JAKW, Kovalchuk A, Martín JF, Nierman WC, Nijland JG, Pronk JT, Roubos J A, van der Klei IJ, van Peij NNME, Veenhuis M, von Döhren H, Wagner C, Wortman J, Bovenberg RAL (2008) Genome sequencing and analysis of the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum*. *Nat Biotechnol* 26:1161–1168
126. Van Den Berg MA (2011) Impact of the *Penicillium chrysogenum* genome on industrial production of metabolites. *Appl Microbiol Biotechnol* 92:45-53
127. Walker DG, Khan HH (1968) Some properties of galactokinase in developing rat liver. *Biochem J* 108:169–75
128. Weber SS, Bovenberg RA, Driessen AJ (2012) Biosynthetic concepts for the production of beta-lactam antibiotics in *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol J* 7: 225-236
129. Wedekind JE, Frey PA, Rayment I (1995) Three-dimensional structure of galactose-1-phosphate uridylyltransferase from *Escherichia coli* at 1.8 Å resolution. *Biochemistry* 34:11049–61
130. Wilson CJ, Zhan H, Swint-Kruse L, Matthews KS (2007) The lactose repressor system: Paradigms for regulation, allosteric behavior and protein folding. *Cell Mol Life Sci* 64:3-16

131. Wortman JR, Gilsenan JM, Joardar V, Deegan J, Clutterbuck J, Andersen MR, Archer D, Bencina M, Braus G, Coutinho P, von Döhren H, Doonan J, Driessen AJ, Durek P, Espeso E, Fekete E, Flipphi M, Estrada CG, Geysens S, Goldman G, de Groot PW, Hansen K, Harris SD, Heinekamp T, Helmstaedt K, Henrissat B, Hofmann G, Homan T, Horio T, Horiuchi, H., James, S., Jones, M., Karaffa, L., Karányi, Z., Kato, M., Keller N, Kelly DE, Kiel JA, Kim, JM, van der Klei IJ, Klis FM., Kovalchuk A, Krasevec N, Kubicek CP, Liu B, Maccabe A, Meyer V, Mirabito P, Miskei M, Mos M, Mullins J, Nelson DR, Nielsen J, Oakley BR, Osmani SA, Pakula T, Paszewski A, Paulsen I, Pilsyk S, Pócsi I, Punt PJ, Ram AF, Ren Q, Robellet X, Robson G, Seiboth B, van Solingen P, Specht T, Sun J, Taheri-Talesh N, Takeshita N, Ussery D, van Kuyk PA, Visser H, van de Vondervoort PJ, de Vries RP, Walton J, Xiang X, Xiong Y, Zeng AP, Brandt BW, Cornell MJ, van den Hondel CA, Visser J, Oliver SG, Turner G (2009) The 2008 update of the *Aspergillus nidulans* genome annotation: a community effort. *Fungal Genet Biol* 46:S2-S13
132. Yang J, Fu X, Jia Q, Shen J (2003) Studies on the substrate specificity of *Escherichia coli* galactokinase. *Org Lett* 5:2223–6

## 11. PUBLIKÁCIÓS LISTA

### Referált, angol nyelvű közlemények:

1. **Jónás Á**, Fekete E, Flipphi M, Sándor E, Jäger Sz, Molnár ÁP, Szentirmai A, Karaffa L (2014) Extra- and intracellular lactose catabolism in *Penicillium chrysogenum*: phylogenetic and expression analysis of the putative permease and hydrolase genes. The Journal of Antibiotics 67: 489–497. Impakt faktor: 1.730
2. **Jónás Á**, Fekete E, Németh Z, Flipphi M, Karaffa L (2016) D-Galactose catabolism in *Penicillium chrysogenum*: Expression analysis of the structural genes of the Leloir pathway. Acta Biologica Hungarica, közlésre elfogadva Impakt faktor: 0,589

### Idegennyelvű előadás:

Carbon source profiling the expression of the Leloir-pathway genes in *Penicillium chrysogenum*. (4th Central European Forum for Microbiology [CEFARM], Keszthely, 2013).

### Idegennyelvű poszterek:

1. **Jónás Á**, Fekete E, Flipphi M, Sándor E, Jäger Sz, Molnár ÁP, Karaffa L: Lactose catabolism in *Penicillium chrysogenum*: phylogenetic and expression analysis of the putative permease and hydrolase genes. (12th European Conference of Fungal Genetics, Sevilla, Spanyolország 2014)
2. **Jónás Á**, Orosz A, Bíró E, Fekete E, Karaffa L: Carbon source profiling the expression of the Leloir-pathway genes in *Penicillium chrysogenum*. (4th Central European Forum for Microbiology [CEFARM], Keszthely, 2013).

3. Kulcsár L, Kun R, Fekete E, **Vasas Á**, Seiboth B, Karaffa L: Isolation, overexpression and purification of the major intracellular beta-galactosidase (BGAD) 37 from *Penicillium chrysogenum* (4th Central European Forum for Microbiology [CEFOM], Keszthely, 2013).
4. Jäger Sz, Fekete E, Flippi M, Kondás A, Ág N, **Jónás Á**, Karaffa L: Expression profile of beta-galactosidases in *Penicillium chrysogenum* (11th European Conference of Fungal Genetics, Marburg, Németország, 2012).

## 12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

PhD dolgozatomat mindenekelőtt **Prof. Dr. Szentirmai Attilának** ajánlom. Az ő szellemisége nélkül nem készülhetett volna el ez a dolgozat.

Őszinte hálával tartozom az egyetemi évek után befogadó új közösség, a Debreceni Egyetem Biomérnöki Tanszék tagjainak, akik egy számomra új tudományterület megismerése során türelemmel támogattak.

Köszönöm témavezetőmnek, **Dr. Karaffa Leventének** és **Dr. Fekete Erzsébetnek**, akik kezdetben irányt mutattak tudományos érdeklődésemnek, majd doktori kutatásaim illetve a disszertáció elkészítése során szakértelmükkel mindvégig mederben tartották gondolaimat és biztosították a feltételeket a zavartalan munkához.

Köszönettel tartozom egykori munkatársaimnak: **Fekete Évának**, aki megtanította a munkám során elsődlegesen alkalmazott molekuláris biológiai módszert, a Northern blot hibridizációs technikát, és az ezzel együttjáró pontos munkavégzést, továbbá **Csákiné Dr. Jäger Szilviának** és **Kertiné Somosi Ritának** a gyakorlati munkában és a technikai asszisztenciában nyújtott segítségükért és azóta sem múló baráti támogatásukért.

Köszönettel tartozom továbbá minden doktorandusz társamnak: **Kovácsné Orosz Anitának**, **Ág Norbertnek**, és **Kulcsár Lászlónak** valamint társszerző kollégáimnak: **Németh Zoltánnak** és **Molnár Ákos Péternek**, illetve szakdolgozóimnak, akik időt nem sajnálva az évek során közreműködtek doktori disszertációm megírásában.

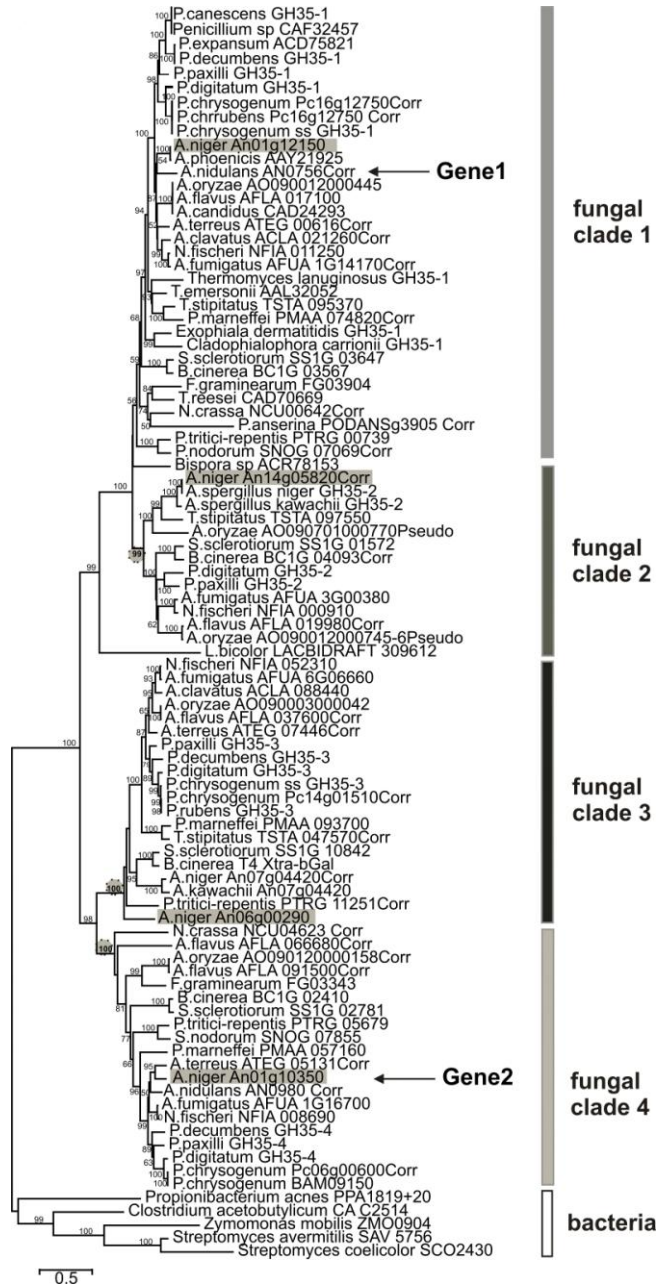
A bonyolult és precíz bioinformatikai és törzsfaelemzési vizsgálatok **Michel Flippi** és **Dr. Karaffa Erzsébet Mónika** nevét fémjelzik.

Köszönöm továbbá **Fekete Zoltánnak**, **Papp Benedeknek**, **Tegdesné Annának**, hogy doktori kutatásaim alatt formális és informális beszélgetéseink során visszajelzéseikkel hozzájárultak szemléletmódom alakulásához.

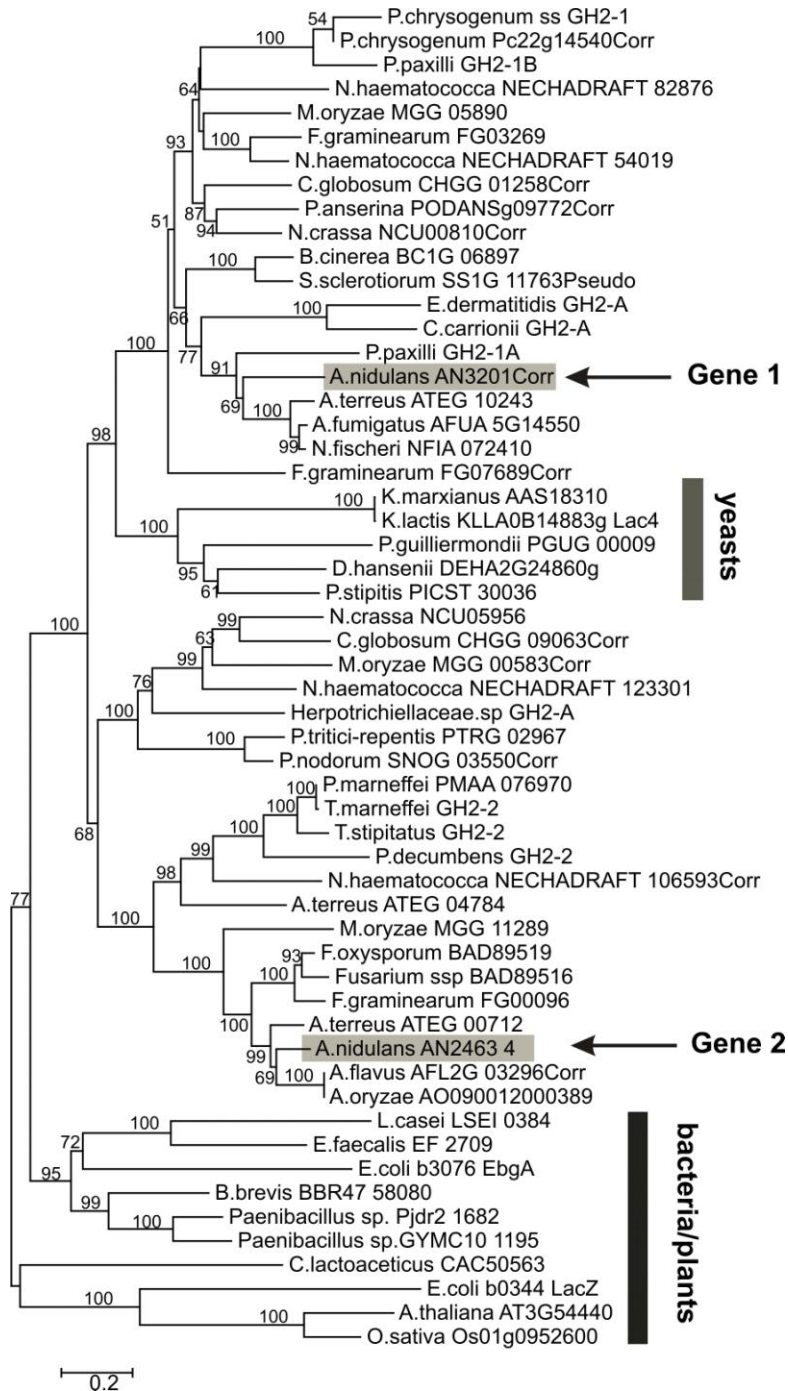
Végül szeretnék köszönetet mondani családomnak támogatásukért, megértésükért és türelmükért, amellyel elviselték a dolgozatírásom intenzívebb időszakait.

Köszönöm Mindenkinek!

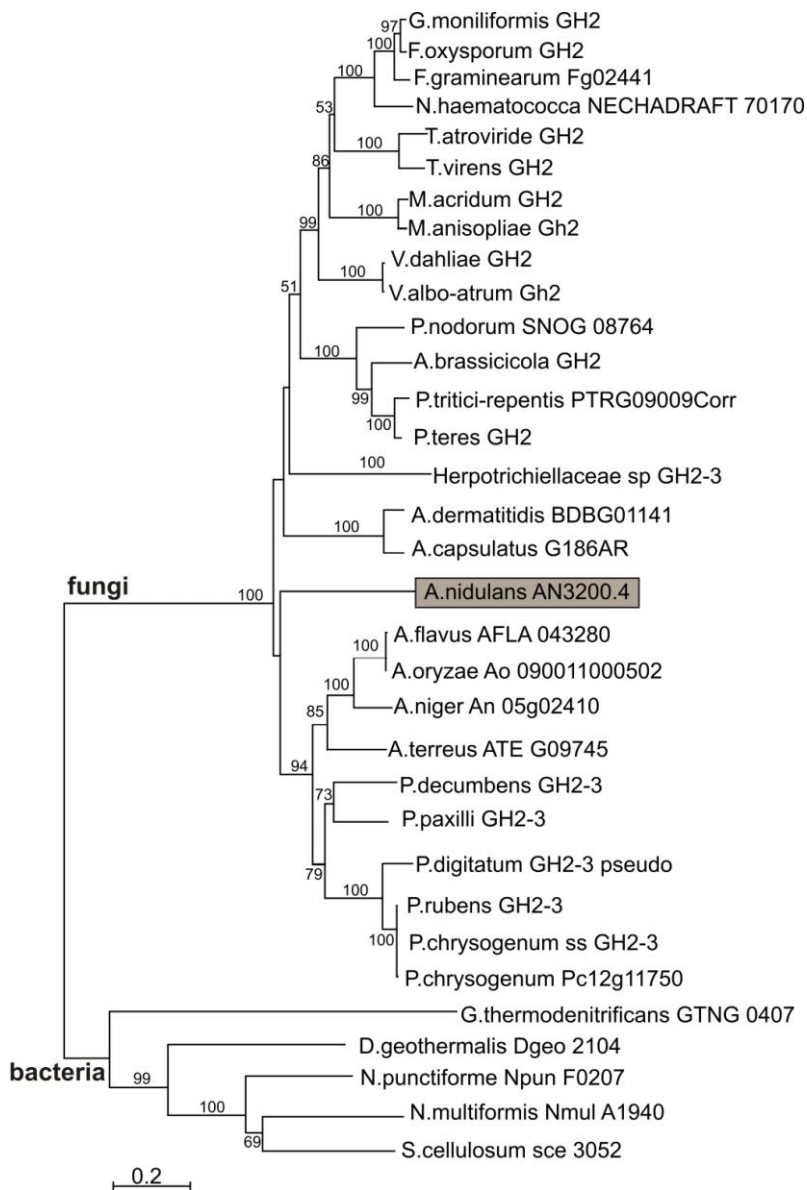
# 13. FÜGGELÉK



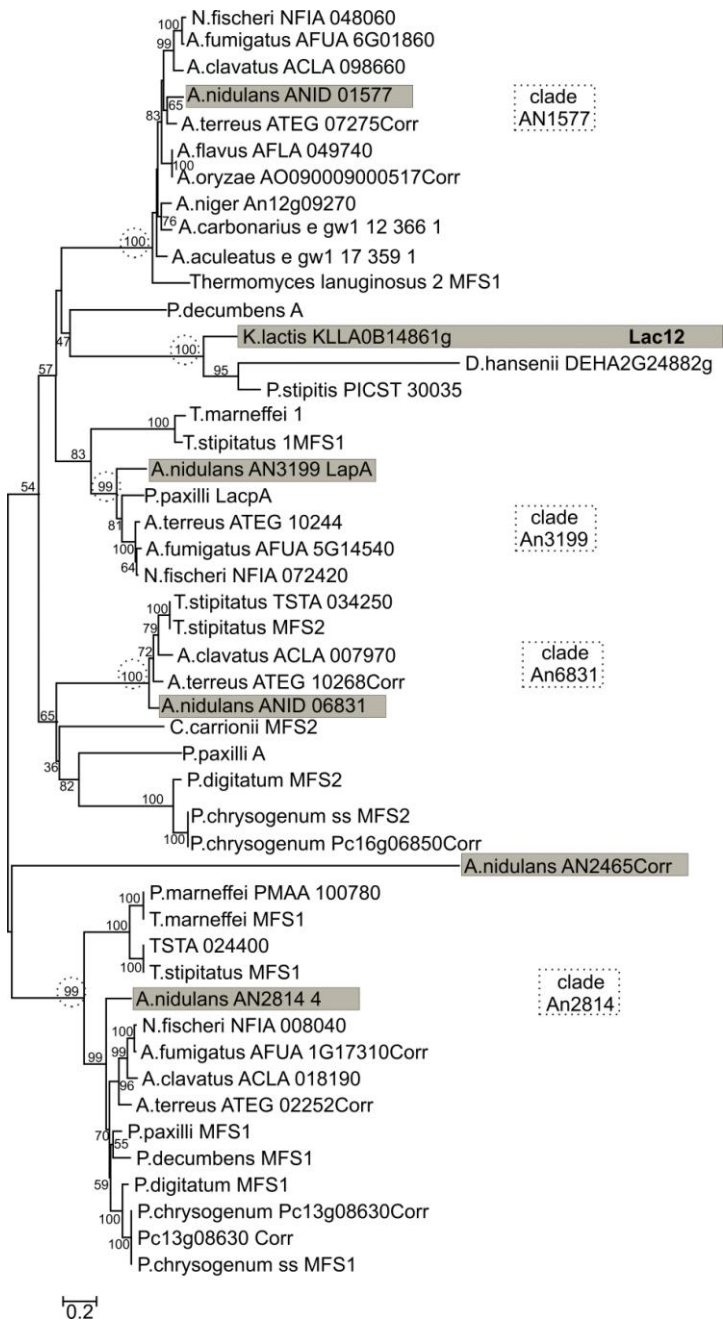
**1. ábra:** Az extracelluláris GH35 béta-galaktózidázok törzsfája, amelyek az *Aspergillus niger* *LacA* (lókusz: An01g12150) génjének orthológjai és paralógjai, a kiválasztott gombákban és baktériumokban.



**2. ábra:** Az intracelluláris GH2 béta-galaktozidázok törzsfája, amelyek az *A. nidulans BgaD* (locus AN3201) génjének orthológjai és paralógjai, a kiválasztott gombákban és baktériumokban.



**3. ábra:** Az intracelluláris glikozil hidrolázok 2 családjának törzsfája, amelyek az *A. nidulans* GH2 fehérjéjének ortológjai, amelyet az AN3200 lókuszon lévő gén kódol, a kiválasztott gombákban és baktériumokban. Megjegyzendő, hogy ez a GH2 protein az *Onygenales*-ben is előfordul, míg az *Eurotiomycetes* rendjébe tartozó fajok úgy tűnik nem határoznak meg ismert gomba eredetű extra- vagy intracelluláris bGal ortológokat (az adatokat nem mutatjuk).



**4. ábra:** A feltételezett laktóz permeázok gyökeres törzsfája, amelyek az *A. nidulans* *LacpA* (locus AN3199) génjének orthológjai és paralógjai, az *Eurotiales* fajokban és a kiválasztott élesztőkben. A nem rokon *A. nidulans* MFS AN2465 fehérje biztosítja a referenciát.