

37. OTDK Biológia Szekció

***Rhizomucor pusillus* gomba β -galaktozidázok vizsgálata: rekombináns enzimfehérje termeltetés, tisztítás és jellemzés**

Készítette:

Kovács Dániel

Környezetmérnök MSc képzés

I. évfolyam

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR

BIOTECHNOLÓGIAI ÉS MIKROBIOLÓGIAI TANSZÉK

Témavezetők:

Dr. Takó Miklós

Egyetemi adjunktus

Dr. Nagy Gábor

Tudományos munkatárs

2025

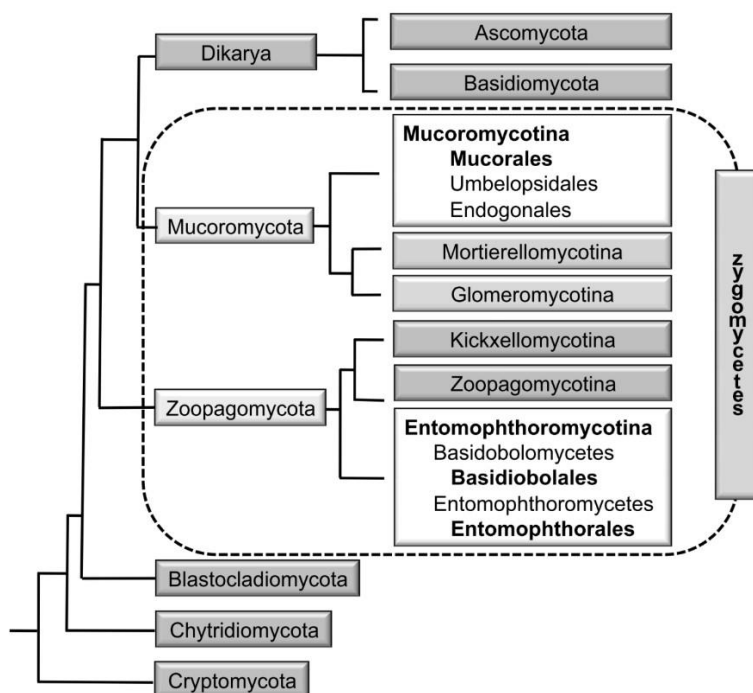
TARTALOMJEGYZÉK

1.	BEVEZETŐ	3
1.1.	Járomspórás gombák általános bemutatása	3
1.1.1.	A Mucorales rend	5
1.1.2.	A <i>Rhizomucor</i> nemzetség	5
1.2.	A galaktozidáz enzimek	6
1.2.1.	α -Galaktozidáz	6
1.2.2.	β -Galaktozidáz	6
1.2.3.	Tisztított mikrobiális β -galaktozidázok	9
1.2.4.	Mikroorganizmusokban azonosított és termeltetett β -galaktozidáz enzimek	10
1.2.5.	Járomspórás gombák β -galaktozidáz termelése	12
2.	CÉLKITŰZÉS	14
3.	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	15
3.1.	Alkalmazott törzsek	15
3.2.	Alkalmazott táptalajok és tápoldatok	15
3.3.	Felhasznált oldatok, pufferek és reagensek	16
3.4.	PCR reakciókhoz alkalmazott indítószekvenciák	17
3.5.	β -Galaktozidáz kódoló gének izolálása és klónozása során alkalmazott módszerek	18
3.5.1.	RNS tisztítás	18
3.5.2.	Reverz transzkripció, cDNS szintézis	18
3.5.3.	Alkalmazott PCR technikák és reakciókörülmények	19
3.5.4.	Agaróz gélelektroforézis	19
3.5.5.	DNS visszaizolálása agaróz gélből	19
3.5.6.	Restrikciós emésztések, ligálások, plazmid DNS tisztítása	20
3.5.7.	Baktérium transzformáció	20
3.6.	Vektorkonstrukciók létrehozása heterológ fehérjetermeltetéshez	20
3.7.	Élesztő transzformáció elektroporációval	21
3.8.	Rekombináns β -galaktozidáz termeltetés élesztőben	22
3.9.	Triklórecetsavas fehérje kicsapás	22
3.10.	Denaturáló gélelektroforézis (SDS-PAGE)	23
3.11.	Coomassie festés, ezüstoffestés	23
3.12.	β -Galaktozidáz fehérje tisztítása	23
3.13.	Fehérjekoncentráció meghatározás	24
3.14.	β -Galaktozidáz aktivitás meghatározás	24
3.15.	β -Galaktozidáz aktivitás biokémiai jellemzőinek vizsgálata	25
3.16.	<i>In silico</i> elemzések	25
4.	EREDMÉNYEK	26
4.1.	A <i>Rhizomucor pusillus</i> β -galaktozidázt kódoló gének azonosítása	26
4.2.	RNS kivonása és cDNS átírása a <i>R. pusillus</i> β -galaktozidázt kódoló génjeiből	26
4.3.	Vektorkonstrukciók létrehozása és <i>R. pusillus</i> β -galaktozidáz termeltetés	27
4.4.	A rekombináns β -galaktozidáz tisztítása	29
4.5.	A tisztított β -galaktozidáz aktivitás jellemzése	30
5.	DISZKUSSZIÓ	32
6.	IRODALOMJEGYZÉK	35
7.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	40

1. BEVEZETŐ

1.1. Járomspórás gombák általános bemutatása

A járomspórás gombák (zygomycetes) a korábbi csoportosítás szerint a Zygomycota törzsbe tartoztak, azonban ez az elnevezés napjainkban már nem helytálló. Ezen csoportosítás egységes, polifiletikus törzsbe sorolta a járomspórás gombák közé tartozó fajokat (Barr 1992; Benny és mtsai. 2001). A járomspórások a fonalas gombák egyik legsokszínűbb és legjelentősebb csoportja. Túlnyomó többségük talajban, komposztban, korhadékban rothadó gyümölcsökön, zöldségeken élő, szaprotróf szervezet, azonban fonálférgek és egyéb gerinctelenek, rovarok patogénjeit vagy parazitáit, gazdanövények gyökérszövetében arbuszkulumokat képző endomikorrhiza-gombákat is találunk közöttük. Újabban a csoportba tartozó gombákat Mucoromycota és Zoopagomycota törzsekre osztották fel. Az új felosztást az utóbbi évtizedekben zajló részletesebb morfológiai és molekuláris vizsgálatok követelték meg (Spatafora és mtsai. 2016) (1. ábra).



1. ábra: A járomspórás gombák felosztása (Spatafora és mtsai. 2016; Walther és mtsai. 2019).

A Zoopagomycota törzs magába foglalja az Entomophthoromycotina, a Kickxellomycotina és a Zoopagomycotina altörzseket, melyek között fellelhetünk állatparazita, valamint kommenzalista fajokat is. Ugyancsak ide tartoznak a régebbi Zygomycota-hoz külön Trichomycetes osztályként besorolt gombák is (Benny és mtsai. 2014; Spatafora és mtsai. 2016;

Lee és Idnurm 2017). A Mucoromycoták (Mucormycotina, a Mortierellomycotina és Glomeromycotina altörzsek) között találhatóak meg a mai értelemben klasszikusnak tekinthető járomspórás gombák. Közös jellemzőjük többek között a gyorsan nöövő, dúsan elágazó micélium, a válaszfal nélküli cönocitikus szerveződésű hifák, a sporangiumokban ivartalanul képződő sporangiospórák, valamint a kitin-kitozán sejtfal. Vízhöz nem kötődő ivaros szaporodásuk eredménye a két gametangium fúziójával létrejövő zigospóra, avagy járomspóra, melyről a csoport a nevét is kapta. Az utóbbi vastag falú, jellegzetes alakú képletet gyakran rövid hifákból álló csomó alkotja (Alexopoulos és mtsai. 1996; Richardson 2009; Spatafora és mtsai. 2016). Általában széles szubsztrát spektrumú kozmopoliták, melyek egyaránt képesek számos szénforrás asszimilálására és különféle metabolitok előállítására (Benny és mtsai. 2001; Taherzadeh és Edebo 2009). Egyes fajokra jellemző a morfológiai dimorfizmus, melynek során, főként a magas hexóztartalmú és/vagy oxigénhiányos környezetben, a gombák képesek a fonális növekedés mellett élesztőszerűen is növekedni.

A járomspórás gombák ipari és biotechnológiai jelentősége is említésre méltó. Számos képviselőjüket alkalmazzák a gyógyszer- és élelmiszeriparban, extracelluláris enzimek (például lipáz, proteázok, amilázok, cellulázok, renin), alkoholok, telítetlen zsírsavak, karotinoidok termeltetésére, illetve szteroidvázak vegyületek sztereospecifikus hidroxilálására (Carter 1988; Madyastha és Srivatsan 1987; Outtrup és Boyce 1990; Godtfredsen 1990; Yamada 1992; Ward 1995; Iturriaga és mtsai. 2000, 2001; Mehta és mtsai. 2003; Dufossé 2006; Iturriaga és mtsai. 2008). Egyes törzseket szerves savak (például fumársav, tejsav) előállítására használnak (Skory és Ibrahim 2007; Zhang és mtsai. 2007; Huang és mtsai. 2010; Liaud és mtsai. 2015). Előfordulnak köztük olyan fajok is, amelyeket szteroidok, terpenoidok és más fontos kémiai vegyület biotranszformációjánál alkalmaznak (Hüttel és Hoffmeister 2011; Benny és mtsai. 2014; Morin-Sardin és mtsai. 2017). Ugyanakkor bioüzemanyagok (például bioetanol, biodízel) ipari szintű előállításában is jelentős szerepet tölt be számos faj (Ferreira és mtsai. 2013; Papp és mtsai. 2016). A járomspórás gombák között akadnak olyanok is, amelyeket már évszázadok óta használnak starterkultúráként hagyományos, távol-keleti, erjesztett szójabab- és rizsalapú ételek (tempeh, tofu, ragi), valamint italok (sofu) elkészítéséhez (Nout és Kiers 2005; Tamang és Thapa 2006; Nout és Aidoo 2011). Egyes európai országokban tejtermékek (sajtok, egyéb) előállítására alkalmazzák őket (Morin-Sardin és mtsai. 2017). Akadnak közöttük élelmiszeripari és mezőgazdasági termények raktári kártevői is. Ezen fajok jelentős része a Mucorales rendből kerül ki (Michailides és Ogawa 1985; Devoyod 1988; Csernetics és mtsai. 2005). Számos fajt opportunistá humánpatogénként is leírtak már. Ezek súlyos fertőzéseket okozhatnak a legyengült immunrendszerű betegekben (Ribes és mtsai. 2000;

Walsh és mtsai. 2004; Chayakulkeeree és mtsai. 2006; Papp és mtsai. 2008). Az entomophthoromikózisosokat a Zoopagomycota törzs Entomophthorales rendjének fajai, míg a mucormikózisosokat a Mucoromycota törzs Mucorales rend képviselői okozzák (Kwon-Chung 2012).

1.1.1. A Mucorales rend

A járomspórás gombák legváltozatosabb csoportja a Mucorales rend, amely 13 családot, 55 nemzetséget és megközelítőleg 300 fajt foglal magába (Lee és Idnurm 2017; Walther és mtsai. 2019; Tahiri és mtsai. 2023) Gyakorlati és kutatási szempontból egyaránt fontos nemzetségek sorolhatók ezen rendbe. Ilyenek például a *Lichtheimia*, *Gilbertella*, *Micromucor*, *Mucor*, *Phycomyces*, *Rhizomucor* és *Rhizopus* nemzetségek. Nem szeptált micélium, nagy tömegű hifaképzés és intenzív növekedés mellett, magas só- és cukorkoncentráció tűrő képesség jellemzi a rend törzseit. Köztük optimális növekedési hőmérséklet szempontjából találunk pszichrofil és termofil fajokat is. Legtöbbjük szaprotróf, főként talajban, korhadó növényi részekben, szerves komposzt maradványokon előforduló szervezet. Igen nagy károkat tudnak okozni például élelmiszer feldolgozó üzemekben, mivel számos törzs a raktározott gyümölcsök és zöldségek kártevője (Ray és Ravi 2005). A korábban már említett mucormikózist okozó humán patogén törzsek mellett a Mucorales gombák között fellelhetünk néhány növényi kórokozó fajt is (Srivastava és Walker 1959; Cruz-Lachica és mtsai. 2016). Ipari felhasználhatóságuk sokrétű, a keményítő hidrolízise mellett például oxálsav, fumársav, tejsav, ecetsav és vajsav előállítására is alkalmazzák egyes képviselőiket (Outtrup és Boyce 1990; Ferreira és mtsai. 2013).

1.1.2. A *Rhizomucor* nemzetség

A nemzetség két fajt foglal magába, a *Rhizomucor pusillus*-t és a *Rhizomucor miehei*-t. Termofil természetük és jellegzetes morfológiai tulajdonságaik, mint például a sztolonok, rhizoidok és a többszörösen elágazó sporangioforok jelenléte egyértelműen megkülönbözteti őket a Mucorales rend többi tagjától (Lukács és mtsai. 2004). Jellemző tagjai a komposztálásban részt vevő mikrobaközösségeknek. Mindezt a 37-40 °C-os optimális fejlődési hőmérséklet, valamint extracelluláris enzimmészletük teszi lehetővé, melynek köszönhetően a szerves maradványokat képesek hatékonyan lebontani (Van Heerden és mtsai. 2002; Langarica-Fuentes és mtsai. 2014; Hüttner és mtsai. 2018). A nemzetségbe tartozó egyes törzseket lipáz és proteáz termelő képességük miatt előszeretettel alkalmazzák biotechnológiai és élelmiszeripari célokra. A *Rhizomucor* lipázokat a vegyiparban hasznosítják elsősorban,

különbéle szintetikus és hidrolitikus reakciók katalizálásában (Rodrigues és Fernandez-Lafuente 2010). A *R. miehei* savas proteáza kiemelkedő jelentőségű a tejet koagulálni képes mikrobiális proteázok között. Ezen proteázok használata során, nagyobb specifitásuk és hatékonyságuk (a borjú oltóenziméhez képest) miatt, jobb minőségű sajt nyerhető (Alves és mtsai. 2005).

1.2. A galaktozidáz enzimek

A szubsztrátumuk kovalens kötéseit víz jelenlétében bontó enzimeket hidrolázoknak nevezzük. Oligo- és poliszacharidázokat különböztetünk meg szubsztrátumuk monoszacharid számától függően. Az oligoszacharidázok csoportjába tartozó galaktozidázok 2-10 egyszerű cukormolekulából álló és terminális galaktózt tartalmazó szénhidrátokat, avagy galaktoszacharidokat bontanak. Megkülönböztetünk α - és β -galaktozidáz enzimeket, aszerint, hogy a galaktóz kötésben részt vevő glikozidos hidroxilcsoportja α vagy β térállású (Havas 2015).

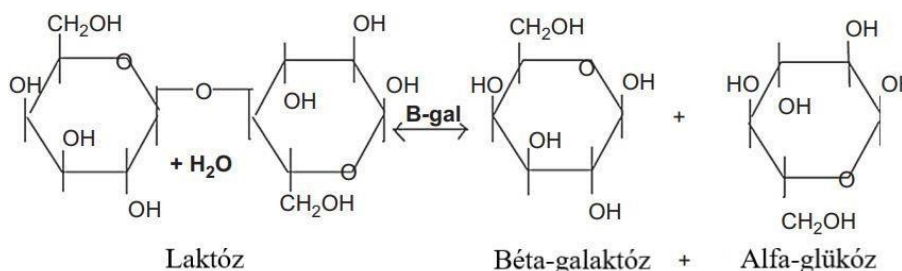
1.2.1. α -Galaktozidáz

A hidrolázok csoportjába tartozó α -galaktozidáz (melibiáz, α -D-galaktozid-galaktohidroláz, EC 3.2.1.22), az oligo- és poliszacharidok terminális α -galaktozil-részeinek hidrolízisét katalizáló enzim. Számos mikroorganizmus szintetizálja, emellett növényekben (főként hüvelyesekben és zöldségfélékben) és az emberi szervezetben is megtalálhatóak (Marraccini és mtsai. 2005). Ipari előállításuk is lehetséges, melyre *Aspergillus niger* törzseket használnak. Ipari felhasználását tekintve ezen enzimeket a cukoripar, pép és papíripar, élelmiszer-, takarmányfeldolgozás, szója alapú élelmiszerek és állateledel gyártásánál, valamint étrend-kiegészítőkben használják (Ju és mtsai. 2019).

1.2.2. β -Galaktozidáz

A szacharid bontó hidrolázok családjába tartozó β -galaktozidáz (laktáz, β -D-galaktozid-galaktohidroláz, EC 3.2.1.23) enzim a β -galaktozidokban a glikozidos kötések hidrolízisét katalizálja (Nath és mtsai. 2014). Ilyen hidrolízis megy végbe például a laktózban, ahol az enzim glükóz és galaktóz monoszacharidokká alakítja át a diszacharidot (Anisha 2017; Gomes és mtsai. 2018; De Jesus és Guimarães 2021) (2. ábra). A β -galaktozidázokat glikozid hidroláz (GH) csoportokba (1; 2; 35; 42) sorolták az aminosav szekvenciájuk hasonlósága alapján (Nath és mtsai. 2014). Ezen négy családba tartozó β -galaktozidáz enzimek, mechanizmusukat tekintve, a megtartó glikozid hidrolázok közé tartoznak. Mind a négy esetben a glutaminsav

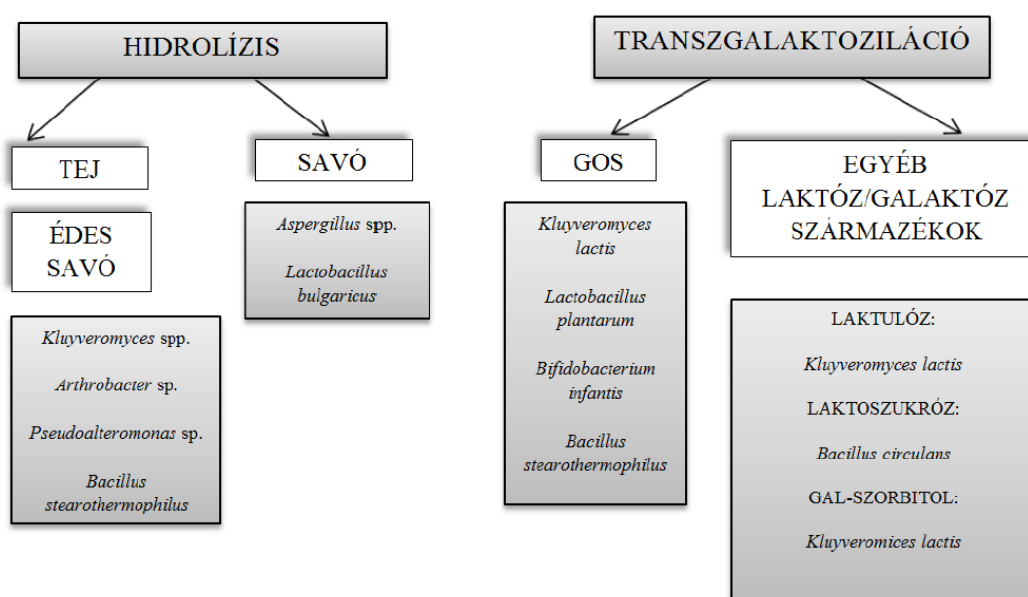
tölti be a katalitikus nukleofil és proton donorok szerepét, valamint (β/α)-s hengerrel jellemezhető 3D szerkezetük (Havas 2015).



2. ábra: A laktóz β -galaktozidáz általi hidrolízise galaktóz és glükóz monoszacharidokká (Anisha 2017).

A β -galaktozidázok számos forrásból származhatnak (Taniguchi és Takano 2004; Kishore és Kayastha 2012). Egy részük növényi eredetű, melyek oldott formában a növényi citoplazmában vagy sejtfalhoz kötött állapotban fordulnak elő. Gyümölcsfélék mellett magvakban is kimutattak β -galaktozidáz aktivitást, bár elsősorban az előbbiben jellemző. Gyümölcsökben az éréskor, magvakban a csírázásnál detektálható a legnagyobb aktivitás (Kestwal és Bhide 2007). Az érési folyamatnál a pektin degradációját elősegítve, a sejtfal galaktozil koncentrációját csökkenti az enzim, amely így a gyümölcs éréséhez vezet (Husain 2010). A β -galaktozidáz megtalálható állatokban is (Taniguchi és Takano 2004; Thoma és mtsai. 2022), valamint számos mikroorganizmus is szintetizálja. A kereskedelembe kapható β -galaktozidázok többsége baktériumokból, élesztő- vagy fonalas gombákból származik (3. ábra). A bakteriális eredetű (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium* törzsek) laktázt a laktóz hidrolízisére használják számos előnye miatt. Ilyen előnyei például a magas enzimaktivitás, könnyű fermentálhatóság (jól optimalizálható fermentációs körülmények, nagy-léptékű tenyésztetőség) és az enzisstabilitás. Az élesztők közül egyes *Kluyveromyces* (*Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*) törzsek jelentős forrásai a galaktozidáz enzimnek (Saqib és mtsai. 2017). Egyes fonalas gombák is képesek a laktóz hasznosítására, bár ezt kisebb mértékben teszik, mint például a *Penicillium chrysogenum* törzs az ipari penicillin termelés során (Nagy és mtsai. 2001). Napjainkban β -galaktozidáz termeltetésére legelterjedtebben használt gomba eredetű források a *K. lactis*, *K. fragilis*, valamint az *A. niger* és *Aspergillus oryzae* törzsek (Saqib és mtsai. 2017). Élesztők és baktériumok esetében elsősorban intracelluláris, míg a fonalas gombáknál általában extracelluláris úton termelődik az enzim (Shaikh és mtsai. 1999; Gomes és mtsai. 2018). A β -

galaktozidáz gombák általi termeltetésére szilárd fázisú fermentáció (SSF; Solid-State Fermentation) jól alkalmazható. Ezen rendszerekben hatékony enzimtermelést írtak le olyan mezőgazdasági melléktermékeket használva szubsztrátforrásként, mint például a cukornádbagasz, gránátalma héj, búzakorpa és szár, valamint rizskorpa és szár. Az SSF rendszer mellett gyakran alkalmazott módszer a folyadék fázisú/ szubmerz fermentáció (SmF; Submerged Fermentation) is. SmF módszereknél az enzimtermelés szubsztrátjaként minden olyan alapanyag hatékonyan alkalmazható, melynek egyes molekulái β -galaktozil kötéseket tartalmaznak (például sovány tej és a laktóz) (Raol és mtsai. 2015; Kazemi és mtsai. 2016; Panesar és mtsai. 2016; Kaur és mtsai. 2018).



3. ábra: A különböző mikrobiológiai forrásból származó β -galaktozidázok biotechnológiai felhasználása (Oliveira és mtsai. 2011; Vincze 2013).

A β -galaktozidáz azon iparilag jelentős enzimek közé tartozik, melyek a táplálkozási, élelmiszerfeldolgozási és környezetvédelmi alkalmazások széles körét szolgálják. Hidrolitikus aktivitásának köszönhetően alkalmazható például a fagyasztott élelmiszerekben és sűrített tejben előforduló kristályosodás megelőzésére, illetve tejsavóból történő etanol és édes szirup előállítására (Saqib és mtsai. 2017). A sokoldalú alkalmazhatósága miatt a tejipar és a gyógyszeripar fő enzime (Singh és Sambyal 2023). Alkalmazásának az iparban számos előnye van. A tejben található laktóz bontásával enyhíthetők a laktóz-intolerancia tünetei, valamint a tejcukrot tartalmazó termékek technológiai és érzékszervi tulajdonságai javíthatók. A sajtgyártás során a keletkező savó laktóztartalmának csökkentésével megelőzhetővé válik ezen

tejipari hulladékkal való környezetszennyezés (Santos és mtsai. 1998; Mlichová és Rosenberg 2006; Vera és mtsai. 2016; Chanalia és mtsai. 2018; Lu és mtsai. 2020). Transzgalaktozidáz aktivitásának kihasználásával prebiotikus galakto-oligoszacharidok (GOS) és laktulóz-eredetű galakto-oligoszacharidok (OsLu) előállítása lehetséges. Ezen szénhidrát molekulák az egészséges bélflóra számára fermentálható szubsztrátként szolgálnak. Prebiotikumnak a normál mikroflóra növekedését, aktivitását szelektíven stimuláló, ezáltal a fogyasztó egészségére kedvező hatást gyakorló, nem emészthető élelmiszer összetevőket nevezzük (Vera és mtsai. 2016; Chanalia és mtsai. 2018).

1.2.3. Tisztított mikrobiális β -galaktozidázok

A mikroorganizmusok jelentős forrásai a β -galaktozidáznak, ugyanakkor az egyes alkalmazási körülmények nagyban eltérhetnek egymástól. Ilyen eltérő paraméterek lehetnek például az optimális pH tartomány és hőmérséklet. Alapvetően az enzim előállítási költsége a termelési hozamtól és a tisztítás kívánt szintjétől függ. Ezzel magyarázható az is, hogy napjainkban növekvő érdeklődés mutatkozik a megfelelő tulajdonságokkal rendelkező mikroorganizmusok felkutatására, amelyek nagyobb termelési kapacitású és kevésbé költséges tisztítási módszereket tesznek lehetővé (Panesar és mtsai. 2010). Különböző elválasztási technológiát, valamint azok kombinációit alkalmaztak már a mikrobiális β -galaktozidázok tisztítására nyers kivonatokból. Ilyenek például a frakcionálás kisózással, cink-kloridos, protamin-szulfátos és ammónium-szulfátos kicsapás, gélszűrés, ioncserélő kromatográfia, membránalapú elválasztások, hidroxipatit alkalmazása és a hidrofób kölcsönhatásokon alapuló kromatográfiás eljárások (Nath és mtsai. 2014). A kinyerést követően meghatározzák az enzim alapvető biokémiai tulajdonságait. Ezen jellemzők (mint például a β -galaktozidáz molekulatömege, működésének pH és hőmérséklet optimuma) megállapítása a potenciális alkalmazási lehetőségek kialakításához is fontos. β -Galaktozidázokat gombákból és baktériumokból is izoláltak és jellemeztek (Zhou és mtsai. 2024). Az enzimfehérjék molekulatömege általában 60 és 130 kDa között található. A legtöbb vizsgált enzim aktivitása inkább enyhén savas kémhatáson, és termofil hőmérséklet tartományban optimális. Tisztított mikrobiális β -galaktozidázok néhány jellemző biokémiai tulajdonságát az 1. táblázat foglalja össze.

1. táblázat: Tisztított mikrobiális β -galaktozidázok és biokémiai jellemzőik.

Mikroorganizmus és vonatkozó szakirodalom	Molekulatömeg [kDa]	pH optimum	Hőmérséklet optimum [°C]
<i>Aspergillus aculeatus</i> (Nath és mtsai. 2014)	120	5,4	55-60
<i>Aspergillus awamori</i> (Vidya és mtsai. 2020)	118-125	5	60
<i>Aspergillus niger</i> (Mahoney 2002)	124	2,5-4,0	55-60
<i>Aspergillus oryzae</i> (Mahoney 2002)	96	4,5-6,0	50
<i>Aspergillus uvarum</i> (Silvério és mtsai. 2018)	-	3,0-4,5	45-60
<i>Bifidobacterium infantis</i> HL96 (Hung és Lee 2002)	470	5-8	50
<i>Kluyveromyces lactis</i> (Zhou és Chen 2001)	118	6,6-7,0	40
<i>Kluyveromyces lactis</i> (Silva és Franco 1999)	-	7	37
<i>Mucor pusillus</i> (Ismail és mtsai. 1997)	129	4	65
<i>Marine Bacillus</i> sp. (Zhou és mtsai. 2021)	74	7,44	40
<i>Pediococcus pentosaceus</i> ID-7 (Lee és mtsai. 2017)	72,2	7-7,5	50
<i>Penicillium chrysogenum</i> (Nagy és mtsai. 2001)	66	4	30
<i>Penicillium simplicissimum</i> (Cruz és mtsai. 1999)	-	4,0-4,6	55-60
<i>Rhizomucor pusillus</i> (Kaur és mtsai. 2018)	-	5,5	50
<i>Rhizomucor</i> sp. (Shaikh és mtsai. 1999)	120	4,5	60
<i>Teratosphaeria acidotherma</i> (Yamada és mtsai. 2017)	120	8	60

1.2.4. Mikroorganizmusokban azonosított és termeltetett β -galaktozidáz enzimek

Homológ és heterológ rendszerekben egyaránt termeltettek már β -galaktozidázt számos mikroorganizmus esetén. A heterológ expressziós rendszerek hatékonyságának növelése érdekében jelentős erőfeszítések történtek az elmúlt évtizedekben. Élesztőkön kívül *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* és *Lactococcus lactis* baktériumokban fejlesztettek ki főként ilyen rendszereket (Movahedpour és mtsai. 2022). Részlegesen átfedő, 72,2 kDa és 35,4 kDa méretű fehérjéket (LacL és LacM) kódoló géneket írtak le *Pediococcus* tejsavbaktériumból származó, heterodimer LacLM-típusú β -galaktozidáz esetén; ebben a munkában *E. coli* MM294-alapú heterológ rendszert alkalmaztak az enzimfehérjék termeltetésére (Lee és mtsai. 2017). *Lactobacillus reuteri* LacL és LacM fehérjéket kódoló géneket fejeztettek már ki *L. plantarum* WCFS1 izolátumban is (Halbmayer és mtsai. 2008). *Bifidobacterium longum* RD47 β -galaktozidázt kódoló gént is leírtak már bifidobaktérium

tejsavbaktériumoknál, melyet *Bifidobacterium bifidum* rendszerben, különféle szabályozó szakaszokkal való kombinációt követően fejeztettek ki (Park és mtsai. 2019). Korábban azonosítottak egy termofil β -galaktozidázt kódoló 2097 bp génszakaszt genomi DNS szűrés útján. Az azonosítás egy acido- és termofil *Alicyclobacillus acidocaldarius* baktériumban, a kódoló gén termeltetése pedig *Pichia pastoris* (újabb elnevezésben *Komagataella phaffii*) alapú heterológ rendszerben, ráztatott tenyésztésben történt (Yuan és mtsai. 2008). Újabban *Pediococcus pentosaceus*-ból származó, magas transzgalaktozilációs aktivitással rendelkező, heterodimer β -galaktozidázt (PpenLac2) írtak le, melyet 64 tejsavbaktériumból szűrtek ki és heterológ módon expresszálták *E. coli*-ban (Luo és mtsai. 2024a). Legnagyobb sikerrel élesztőkben fejeztettek ki gomba β -galaktozidázt kódoló géneket. Élesztő rendszerekben eddig többek között *A. niger*, *Penicillium expansum* és *K. lactis* gombákból származó enzimeket termeltettek nagy hatékonysággal. Néhány termeltetett gomba rekombináns β -galaktozidáz szintézisére vonatkozó adatot a 2. táblázat tartalmaz.

2. táblázat: Példák gombából származó rekombináns β -galaktozidázokra (Saqib és mtsai. 2017; Movahedpour és mtsai. 2022).

β -Galaktozidáz forrása	Expressziós gazda	β -Galaktozidáz hozam
<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>	25000 U/ml kád fermentáció, 150000 U/ml folyamatos fermentáció
<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20440 U/ml ráztatott tenyészetben
<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17000 U/ml ráztatott tenyészetben
<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40000 U/ml
<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	500 U/ml ráztatott tenyészetben
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5096 U/ml
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7350 U/ml 10 L-es bioreaktorban
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2754 U/ml 6 L-es bioreaktorban
<i>Paecilomyces aeruginus</i>	<i>Pichia pastoris</i> (<i>Komagataella phaffii</i>)	9500 U/ml

A termeltetési rendszerek kidolgozása azonban számos akadályba ütközhet. Ilyen probléma lehet például az alacsony expressziós hatékonyság, plazmid instabilitás, a toxikus hatású metanol használata a termeltetéshez vagy a gazda genomban jelen levő antibiotikum rezisztencia markerek (Ren és mtsai. 2016). *Komagataella* alapú heterológ rendszerben *Aspergillus nidulans* és *A. niger* β -galaktozidázt is termeltettek sikerrel. A termeltetett gomba rekombináns enzimek katalizálták a tri- és tetragalaktooligoszacharid molekulák szintézisét is, valamint széles hőmérsékleti tartományokon és többféle szerves oldószerben stabilnak bizonyultak (Dragosits és mtsai. 2014).

1.2.5. Járomspórás gombák β -galaktozidáz termelése

A járomspórás gombák β -galaktozidáz aktivitása egy viszonylag kevésbé kutatott terület. Ezek a gombák potenciálisan gazdag forrást jelenthetnek olyan fontos ipari enzimeknek, mint például lipázok, hidroxilázok, fitázok és különféle szénhidrát-bontó biokatalizátorok (Papp és mtsai. 2016). Korábban főként a termofil *Rhizomucor* izolátumokból származó β -galaktozidázokat vizsgálták (Shaikh és mtsai. 1997, 1999; Panesar és mtsai. 2016; Kaur és mtsai. 2018) (3. táblázat).

3. táblázat: Járomspórás gombák β -galaktozidáz termelése, a fermentáció paraméterei, elért enzimaktivitások.

Járomspórás gomba és vonatkozó szakirodalom	Fermentációs körülmény	Szubsztrát	Enzimaktivitás
<i>Mucor</i> sp. (Silvério és mtsai. 2018)	SmF	laktóz	228 U/l
<i>Rhizomucor</i> sp. (Shaikh és mtsai. 1997)	SmF SSF	laktóz búzakorpa	0,55 U/ml (0,21 U/mg) 5,5 U/ml (2,04 U/mg)
<i>Rhizomucor pusillus</i> (Panesar és mtsai. 2016)	SmF	laktóz	2,14 IU/ml
<i>Rhizomucor pusillus</i> (Kaur és mtsai. 2018)	SSF	búzakorpa	101,89 U/g szubsztrát
<i>Rhizopus</i> sp. (Seyis és Aksoz 2004)	SmF	laktóz	<10 U/ml
<i>Rhizopus stolonifer</i> (Vishwanataha és mtsai. 2012)	SmF	laktóz	2250 IU

Silvério és mtsai. (2018) vizsgálatai alapján *Mucor* sp. izolátum is jó termelőnek bizonyult. Ipari alkalmazás szempontjából a termofil fajokból származó enzimek előtérbe kerültek nagyobb hőstabilitásuk és egyéb kedvező tulajdonságaik miatt (Shaikh és mtsai. 1997). Az 1990-es évek végén SSF módszert alkalmazva, *Rhizomucor* sp. extracelluláris β -galaktozidáz termeléséről számoltak be, majd nem sokkal később az enzim tisztítását és jellemzését is véghez vitték (Shaikh és mtsai. 1997, 1999). Szintén ugyanezen évtizedben az *A. niger* β -galaktozidázához hasonló szerkezeti és kinetikai tulajdonságú *Mucor pusillus* törzs által termeltetett enzimet írtak le. Mindezek mellett megállapították, hogy ezen β -galaktozidáz a tejsavóban levő laktóz hidrolízisére potenciálisan alkalmazható (Ismail és mtsai. 1997). Vishwanataha és mtsai. (2012) vizsgálataikban talajmintákból izolált törzsek enzimaktivitásait tanulmányozták. A vizsgált gombák közül a *Rhizopus stolonifer* mutatta a legnagyobb β -galaktozidáz aktivitást (Vishwanataha és mtsai. 2012). Egy 2016. évi tanulmányban mezőgazdasági- és élelmiszeri hulladékokból próbáltak β -galaktozidázt termelő gombatörzseket izolálni. Összesen több mint 100 gomba izolátumot vizsgáltak enzimtermelési potenciáljuk szempontjából (Panesar és mtsai. 2016). A vizsgált izolátumok közül egy rothadó

banánhéjból izolált, későbbi fenotípusos és genotípusos jellemzés után *R. pusillus*-ként azonosított törzs mutatta a legnagyobb enzimaktivitást. Ezen kívül megállapították azt is, hogy a gombatörzs alkalmazható lehet prebiotikumok előállításához különféle ipari folyamatok során (Panesar és mtsai. 2016). Potenciálisan GOS és laktulóz szintézishez felhasználható *Mucor* sp. törzset is leírtak már hatékony β -galaktozidáz termelőként (Silvério és mtsai. 2018; Volford és mtsai. 2021).

2. CÉLKITŰZÉS

A járomspórás gombák kiemelkedő forrásai lehetnek biotechnológiai és élelmiszeripari szempontból jelentős β -galaktozidázoknak. Ennek ellenére a Mucoromycota gombacsoport tagjainak galaktozidáz termelése, az enzimek tulajdonságainak, illetve az azokat kódoló gének molekuláris és funkcionális jellemzőinek vizsgálata korábban kevésbé kutatott terület volt. Előzetes munkák során laborunkban számos járomspórás gombatörzs β -galaktozidáz termelését megvizsgálták, mely kutatásokban több termelő törzset is azonosítottak (Volford és mtsai. 2021), valamint egyes törzsek esetén az enzimeket kódoló géneket is leírták. A kutatásban a *Rhizomucor pusillus* SZMC 11025 törzs jó hozamú β -galaktozidáz termelőnek bizonyult SSF és SmF tenyésztési körülményeken. Az enzimaktivitás gyakorlati szempontból is fontos biokémiai jellemzőinek megfelelő vizsgálata szükséges, ugyanakkor az elvárt tisztulási minőségű natív enzim előállítása e fermentációs rendszerekből nehézkes. Az alkalmazott szubsztrátból származó fehérjék, szénhidrátok jelenléte, valamint a termelő gombák egyéb fehérjeinek megjelenése az enzimfehérje tisztasági paramétereit befolyásolhatja. Az enzim erre alkalmas heterológ rendszerekben való célzott termeltetésével ugyanakkor már biztosított a megfelelő aktivitás pontos elemzése és jellemzése. Munkánkban ezért fő célunk a *R. pusillus* SZMC 11025 β -galaktozidázt kódoló gén(ek) azonosítása, rekombináns fehérjék heterológ rendszerben való előállítása, és a megtermelt fehérje jellemzése volt. Ezek alapján a következő konkrét feladatok elvégzését tűztük ki:

1. A β -galaktozidázt kódoló gén(ek) és levezethető feltételezett fehérjék *in silico* jellemzése.
2. RNS kivonás, és komplementer DNS (cDNS) átírása *R. pusillus* SZMC 11025 β -galaktozidázt kódoló gén(ek)ből.
3. *R. pusillus* rekombináns β -galaktozidáz(ok) heterológ expressziójához szükséges vektorkonstrukciók kialakítása.
4. *R. pusillus* rekombináns β -galaktozidáz enzimfehérje *Komagataella phaffii* élesztővel történő termeltetése, a fermentációs rendszer optimalizálása.
5. Heterológ rendszerben termeltetett rekombináns β -galaktozidáz fehérje tisztítása, majd a tisztított β -galaktozidáz aktivitás(ok) biokémiai jellemzése.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Alkalmazott törzsek

A kutatás során felhasznált gombák és baktériumok a Szeged Mikrobiológiai Gyűjtemény (SZMC, Szeged, Magyarország, <http://szmc.hu/>) elhelyezett törzsei között találhatók meg. A β -galaktozidáz kódoló génnek jellemzését és a cDNS előállítását *Rhizomucor pusillus* SZMC 11025 gombatörzsből végeztük; a törzset malátás táptalajon tartottuk fenn. A vektorkonstrukciók szerkesztéséhez szükséges génklónozási munkákhoz *Escherichia coli* DH5 α baktériumtörzset alkalmaztunk a gyártó utasításainak megfelelően (Mix & Go, Zymo Research). A rekombináns fehérje termeltetését *Komagataella phaffii* KM71H élesztővel végeztük (Invitrogen). A heterológ fehérje termeltetés kísérletekben negatív kontrollként *K. phaffii* X-33 törzset használtunk (Invitrogen).

3.2. Alkalmazott táptalajok és tápoldatok

A felhasznált anyagok a VWR International Kft.-től származtak, ettől eltérő esetben a gyártó/forgalmazó külön feltüntetésre került.

Malátás táptalaj: 5% (v/v) maláta kivonat; 0,5% (m/v) élesztő kivonat; 0,5% (m/v) glükóz; 2% (m/v) agar

Búzakorpás táptalaj: 5% (m/v) búzakorpa (kereskedelmi forgalomban kapható); 1% (m/v) élesztő kivonat; 2% (m/v) agar

YPD: 2% (m/v) glükóz; 2% (m/v) pepton; 1% (m/v) élesztő kivonat. Táptalaj esetén 2% (m/v) agart adtunk a tápoldathoz. A transzformált élesztő törzsek szelekciója érdekében Zeocin antibiotikumot (Invitrogen) adtunk a tápoldathoz/táptalajhoz, melynek a végső koncentrációja 100 μ g/ml volt.

YPDS: 2% (m/v) glükóz; 2% (m/v) pepton; 1% (m/v) élesztő kivonat; 1 M szorbitol. Táptalaj esetén 2% (m/v) agart adtunk a tápoldathoz. A transzformált élesztő törzsek szelekciója érdekében Zeocin antibiotikumot (Invitrogen) adtunk a tápoldathoz/táptalajhoz (100 μ g/ml).

BMGH tápleves: 10% (m/v) KH₂PO₄; 10% (m/v) YNB (Sigma-Aldrich); 0,2% (m/v) biotin; 10% (m/v) 10X glicerín; 1% (m/v) hisztidin

BMMH tápleves: 10% (m/v) KH₂PO₄; 10% (m/v) YNB (Sigma-Aldrich); 0,2% (m/v) biotin; 10% (m/v) metanol 1% (m/v) hisztidin

Luria-féle tápoldat és táptalaj: 1% (m/v) NaCl; 1% (m/v) tripton; 0,5% (m/v) élesztőkivonat. Táptalaj esetén 2% (m/v) agart adtunk a tápoldathoz. A transzformált baktérium törzsek szelekciója érdekében Ampicillin antibiotikumot (Sigma Aldrich) adtunk a tápoldathoz/táptalajhoz, melynek a végső koncentrációja 100 µg/ml volt.

Lenox tápoldat: 0,5% (m/v) NaCl; 1% (m/v) tripton; 0,5% (m/v) élesztőkivonat. Táptalaj esetén 2% (m/v) agart adtunk a tápoldathoz. A transzformált baktérium törzsek szelekciója érdekében Zeocin antibiotikumot (Invitrogen) adtunk a tápoldathoz/táptalajhoz 25 µg/ml végkoncentrációban.

3.3. Felhasznált oldatok, pufferek és reagensek

A felhasznált anyagok a VWR International Kft.-től származtak, ettől eltérő esetben a gyártó/forgalmazó külön feltüntetésre került.

Enzimaktivitás mérésekhez használt oldatok:

- Nátrium-acetát puffer (50 mM, pH 6,0). A pH beállításához 96%-os töménységű ecetsavat alkalmaztuk.
- Nátrium-karbonát puffer (100 mM)
- 2 mg/ml koncentrációjú *p*-nitrofenil-β-D-galaktopiranozid (Sigma-Aldrich) szubsztrát oldat.

McIlvaine pufferoldat:

- 200 mM Na₂HPO₄
- 100 mM citromsav

A pH optimum és stabilitás mérések során a 4. táblázatban található pH értékű oldatokat használtuk.

4. táblázat: A McIlvaine pufferoldat összetétele.

pH	200 mM Na ₂ HPO ₄	100 mM citromsav
3,0	21% (v/v)	79% (v/v)
3,8	36% (v/v)	64% (v/v)
4,6	47% (v/v)	53% (v/v)
5,0	52% (v/v)	48% (v/v)
5,4	56% (v/v)	44% (v/v)
5,8	61% (v/v)	39% (v/v)
6,2	66% (v/v)	34% (v/v)
6,6	73% (v/v)	27% (v/v)
7,0	82% (v/v)	18% (v/v)
8,0	97% (v/v)	3% (v/v)

Fehérje tisztításához használt oldatok:

- Mosópuffer 1 (pH 8,0): 2,237% (m/v) KCl, 0,68% (m/v) KH_2PO_4 , 0,034% Imidazol (5 mM). A pH beállítását KOH (50%, m/v) oldattal végeztük.
- Mosópuffer 2 (pH 8,0): 2,237% (m/v) KCl, 0,68% (m/v) KH_2PO_4 , 0,066% Imidazol (20 mM). A pH beállítását KOH (50%, m/v) oldattal végeztük.
- Natív elúciós puffer (pH 8,0): 2,237% (m/v) KCl, 0,68% (m/v) KH_2PO_4 , 1,702% Imidazol (250 mM). A pH beállítását KOH (50%, m/v) oldattal végeztük.
- Nátrium-acetát puffer (50 mM, pH 6,0); A pH beállításához 96%-os töménységű ecetsavat alkalmaztunk.

Poliakrilamid gél festéséhez használt oldatok:Coomassie-kék festés

- Festőoldat: 0,0025% (m/v) Coomassie Brilliant Blue R-250;
- 45% (v/v) metanol;
- 10% (v/v) ecetsav (96%-os töménységű).

1. festékmentesítő oldat: 40% (v/v) metanol, 7% (v/v) 96%-os töménységű ecetsav

2. festékmentesítő oldat: 5% (v/v) metanol, 3% (v/v) 96%-os töménységű ecetsav

Ezüstfestés

- Fixáló oldat: 50% (v/v) metanol, 12% (v/v) ecetsav, 0,05% (v/v) formaldehid
- Mosó oldat: 20% (v/v) etanol
- Érzékenyítő oldat: 0,02% (m/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$
- Festő oldat: 0,2% (v/v) AgNO_3
- Előhívó oldat: 0,0004% (m/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 6% (m/v) NaCO_3 , 0,05% (v/v) formaldehid

Agaróz gélelektroforézishez felhasznált oldatok:

- Tris-ecetsav-dinátrium EDTA (TAE): 40 mM Tris-ecetsav (pH 7,6) 1 mM Na_2EDTA oldatban
- Etídium-bromid (Sigma-Aldrich) törzsoldat (10 mg/ml) desztillált vízben elkészítve

3.4. PCR reakciókhoz alkalmazott indítószekvenciák

A PCR reakciókhoz indítószekvenciákat terveztünk, melyeket a 5. táblázat szemléltet.

5. táblázat: A kísérletek során alkalmazott indítószekvenciák.

Indítószekvencia kódja	Nukleotid sorrend, 5'-3'	Termék
A reverz transzkripcióhoz használt indítószekvenciák		
Rp5214fw	ATGATTGTAAAAGGTGCTTTGACAAG	β -gal1 gén cDNS szekvenciája
Rp5214rev	TTAGTTACGTGCCTCGTAAGCGGG	
Rp5125fw	ATGCTGGTGAAAAGTAGTGCAAGTG	β -gal2 gén cDNS szekvenciája
Rp5215rev	TTATCGAGAGTGTCTCAAGTCATAG	
Rp7578fw	ATGACCGAAATGACACCGCTCTTTAC	β -gal3 gén cDNS szekvenciája
Rp7578rev	CTAAATTCTGATCTCCTCCTTCCAC	
A β -galaktozidázt kódoló gének túltermeltetéséhez használt indítószekvenciák		
Rhp5214pciiafw	TTAGGTACCGCAACGGTGCCCCTACAGAGATTC	β -gal1 gén cDNS szekvenciája
Rhp5214pciiarev	TTAGCGGCCGCCTAATGATGATGATGATGA TGATGGTTACGTGCCTCGTAAGCGGGAG	
Rhp5215pichiafw	TTACACGTGTGCCGCCATAACGCCGCTGCAGCG	β -gal2 gén cDNS szekvenciája
Rhp5215pichiarev	TTAGCGGCCGCCTAATGATGATGATGATGATG ATGTCGAGAGTGTCTCAAGTCATAGTC	
Rhp7578pichiafw	TTACTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTG GCATCATAATATATGCTCATAAC	β -gal3 gén cDNS szekvenciája
Rhp7578pichiarev	TTAGCGGCCGCCTAATGATGATGATGATGAT GATGAATTCTGATCTCCTCCTTCCACACC	
A pozitív klónokból izolált plazmidok szekvenálásához használt indítószekvenciák		
AOX'5	GACTGGTTCCAATTGACAAGC	AOX1 terminális szekvenciája
AOX'3	GCAAATGGCATTCTGACATCC	AOX1 promóter szekvenciája

*Az aláhúzott nukleotid szekvenciák jelölik az endonukleázok hasító helyeit.

3.5. β -Galaktozidáz kódoló gének izolálása és klónozása során alkalmazott módszerek

3.5.1. RNS tisztítás

A β -galaktozidázt kódoló génekről való cDNS előállításához RNS kivonást végeztünk, melyhez a *R. pusillus* SZMC 11025 törzset búzakorpás táptalajon 12-14 órán át 37 °C hőmérsékleten tenyésztettük. A felnőtt *R. pusillus* SZMC 11025 tenyészetet steril csipesz segítségével eltávolítottuk, majd alufóliába csomagoltuk. Az alufóliába csomagolt mintákat folyékony nitrogénbe helyeztük. Ezután a megfagyott micéliumot dörzsmozsárban, folyékony nitrogén segítségével porrá törtük és nukleáz mentes csőbe juttattuk. A továbbiakban a gombasejtekből történő RNS tisztításhoz Quick-RNA MiniPrep Kit-et (Zymo Research) használtunk a gyártó utasításainak megfelelően. Az izolált RNS mennyiségét NanoDrop spektrofotométer (ND-1000 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific) segítségével határoztuk meg. Felhasználásig az RNS mintákat -80 °C-on tároltuk.

3.5.2. Reverz transzkripció, cDNS szintézis

A DNáz kezelt RNS mintákból a reverz transzkripciót a Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific) segítségével végeztük el a gyártó utasításainak

megfelelően. A reakciókhoz egyenként 0,25 µl oligo(dT)18 és 0,25 µl random hexamer (10 µM) indítószekvenciákat használtunk fel.

3.5.3. Alkalmazott PCR technikák és reakciókörülmények

A kísérleteink során alkalmazott PCR technikák reakcióit ProFlex™ PCR System készülékben (Thermo Fisher Scientific) végeztük. A gének teljes cDNS-ből történő felszaporításához a reverz transzkripciót követően Phusion Flash High-Fidelity Master Mixet (Thermo Fisher Scientific) használtunk a gyártó utasításai szerint.

A reakciókat 20 µl végtérfogatban mértük össze:

- 1 µl cDNS (a reverz transzkripciót követően)
- 0,8-0,8 µl specifikus indítószekvencia
- 10 µl 1X Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix
- 7,4 µl molekuláris tisztaságú víz

A felszaporítás körülményei:

Elődenaturálás:	98 °C	10 másodperc
Denaturálás:	98 °C	1 másodperc
Indítószekvencia kötődés:	58 °C	5 másodperc
Láncszintézis:	72 °C	60 másodperc
Végső láncszintézis:	72 °C	60 másodperc

A kolónia PCR esetében a láncszintézisnél 55 másodperces elongációs időt alkalmaztunk.

3.5.4. Agaróz gélelektroforézis

Agaróz gélelektroforézis segítségével a kivont RNS és a felszaporított DNS molekulák ellenőrzését és szeparálását végeztük. A mintánkhoz mintafelvívő puffert (6x LD puffer, Thermo Fisher Scientific) adtunk, majd 0,8%, vagy 2% (m/v) töménységű agaróz (Lonza) gélen, 80-85 V feszültségen kb. 0,5-1,5 órán keresztül futtattuk. Az agaróz gél elkészítéséhez, valamint futtató pufferként is TAE puffert használtunk. A fragmentumok láthatóvá tételéhez etídium-bromidos (0,5 µg/ml, Sigma-Aldrich) festést, méretük meghatározásához 1 kb-os molekulasúly markert (Thermo Fisher Scientific) alkalmaztunk.

3.5.5. DNS visszaizolálása agaróz gélből

A gélelektroforézis után a 0,8% (m/v) agarózt (Lonza) tartalmazó gélen levő DNS-t hordozó sávokat UV fény megvilágítása mellett tettük láthatóvá és vágtuk ki steril szike

segítségével. Majd ezt követően a DNS fragmentumokat 1,5 ml-es Eppendorf csőbe helyeztük és megkezdtük a DNS visszaizolálását Zymoclean Large Fragment DNA Recovery Kit (Zymo Research) segítségével, a gyártó utasításainak megfelelően.

3.5.6. Restriktációs emésztések, ligálások, plazmid DNS tisztítása

A restriktációs emésztéseket és ligálásokat általánosan alkalmazott módszerek (Sambrook és mtsai. 1989) szerint végeztük, követve a használt reagensek és enzimek gyártóinak utasításait. A DNS fragmentumokat a CloneJet PCR Cloning Kit csomaghoz tartozó pJET1.2 (Thermo Fisher Scientific) klónozó vektorba építettük a gyártó utasításai szerint. A plazmid DNS tisztítási műveletekhez a ZymoPURE Plasmid Miniprep Kitet (Zymo Research) használtunk a gyártó utasításainak megfelelően.

3.5.7. Baktérium transzformáció

A baktérium transzformációnál az *E. coli* DH5 α baktérium törzset ampicillin (100 μ g/ml) tartalmú Luria-féle vagy zeocin (25 μ g/ml) tartalmú Lenox táptalajokra szélesztettük, majd a Petri-csészéket 16 órán keresztül 37 °C hőmérsékleten inkubáltuk.

3.6. Vektorkonstrukciók létrehozása heterológ fehérjetermelítéshez

A reverz transzkripció és PCR után a visszaizolált β -gal cDNS fragmentumokat egyenként pJET1.2 klónozó vektorba ligáltuk, baktériumba transzformáltuk (pJet-bgal1, pJet-bgal2 és pJet-bgal3). A transzformálás után a Luria-féle táptalajon megjelenő telepek közül 10-10 telepet választottunk ki a további elemzés céljából. A baktériumokat egyenként Luria-féle tápoldatba oltottuk és 16 órán keresztül növesztettük, majd plazmid tisztítást végeztünk. A tisztítás után a plazmidokat PCR segítségével ellenőriztük, melyhez az indítószekvenciákat az 5. táblázat tartalmazza. Mindegyik vizsgált gén esetében kiválasztottunk egy-egy pozitív klónt és azzal dolgoztunk tovább. A plazmidokból 20X-os hígításokat készítettünk, amelyeket a továbbiakban egy újabb PCR reakció alkalmával használtunk.

A következő PCR reakció során a *Komagataella* heterológ expressziós kazettához megfelelő indítószekvenciákat használtunk, melyeket a 5. táblázatban tüntettünk fel. Ezen indítószekvenciák hordozzák a pPic α heterológ expresszós vektorba történő ligáláshoz szükséges endonukleáz hasító helyeket, valamint a DNS fragmentum 3' végén egy hisztidin (HIS) címkét, ami biztosítja a fehérje affinitás kromatográfiával való specifikus tisztíthatóságát. Az indítószekvenciák a β -gal1 gén esetében a *KpnI-NotI*, a β -gal2 esetében *PmiI-NotI*, míg a β -gal3 esetében *XhoI-NotI* hasító helyeket hordozták. A PCR reakciót követően a DNS

fragmentumokat ismét pJet1.2 klónozó vektorba ligáltuk, így létrehozva a pJet-bgal1Pichia, pJet-bgal2Pichia és pJet-bgal3Pichia vektorokat. A ligálás után a plazmidokat ismételtelen *E. coli* baktériumba transzformáltuk. A transzformáns telepek közül ismét 10-10 telepet megvizsgáltunk és minden egyes gén esetében 1-1 pozitív klónnal dolgoztunk tovább. Mivel a pJet1.2 vektor mérete közel megegyezik a plazmidba ligált fragmentumok méretével, ezért a plazmidból történő emésztés nem volt lehetséges. Ahhoz, hogy az expressziós kazettákat ligálni tudjuk a végső, heterológ expresszióhoz használni kívánt pPic α vektorba, a pJet-bgal1Pichia, pJet-bgal2Pichia, valamint a pJet-bgal3Pichia vektorokból a megfelelő indítószekvenciák (5. táblázat) segítségével felszaporítottuk az expressziós kazettákat. A klónozó vektorba történő ligálás segítségével könnyebben tudtuk a plazmidokból PCR segítségével az expressziós kazettákat felszaporítani. A PCR reakciót követően a PCR termékeket a megfelelő enzimekkel emésztettük és a pPic α vektorba ligáltuk. A β -gal1 esetén *KpnI-NotI*, a β -gal2 esetén *PmlI-NotI*, míg a β -gal3 esetén *XhoI-NotI* enzimpárokat használtunk. A megfelelő pPic α vektort is emésztettük ugyanezen enzimekkel, majd az egyes β -galaktozidáz géneket és HIS címkét tartalmazó DNS fragmentumokat ligálással beillesztve létrehoztuk a heterológ fehérjetermelteshez alkalmazni kívánt expressziós vektorokat.

3.7. Élesztő transzformáció elektroporációval

A *K. phaffii* élesztő elektroporációhoz az EasySelect Pichia Expression Kit (Invitrogen) csomagot használtuk a gyártó utasításait követve. Ennek megfelelően 5 ml YPD tápoldatban 30 °C-on előnövesztettük a szükséges törzsünket. Majd a sejteket 500 ml YPD tápoldatot tartalmazó 2 l-es lombikba oltottuk tovább és addig növesztetük amíg azok OD₆₀₀- szintje el nem érte az 1.3-1.5-ös értéket. Ezután négy centrifugálást végeztünk azonos paraméterekkel (1500×g, 5 perc) melyek során a leülepedett pelletet sorra 500 ml, majd 250 ml jéghideg steril vízben, továbbá 20 ml, majd 1 ml jéghideg 1M szorbitolban szuszpendáltuk fel. Az 1 ml 1M szorbitolban való szuszpendálást követően a szuszpenzót 1,5 ml térfogatúra egészítettük ki, jégen tartva azokat. Majd 80 μ l sejthez 5-10 μ g (15 μ l) linearizált DNS-t mértünk, melyeket egy jéggel hűtött elektroporációs küvettába (0,4 cm) vittünk át. Öt perc jégen történő inkubáció után az elektroporációt a MicroPulser Electroporator (Bio-Rad) készülékkel végeztük el a megfelelő gyári *Pichia* programmal. Az elektroporáció után azonnal 1 ml 1 M jéghideg szorbitolt adagoltunk a küvettába, majd a mintánkat egy 15 ml-es centrifuga csőbe pipettáztuk át, melyet ezután 1-2 óráig inkubáltunk 30 °C hőmérsékleten. Ezt követően a sejtekből 10, 25, 50, 100, 150, 200 és 250 μ l mennyiséget oltottunk le 100 μ g/ml zeocin tartalmú YPDS

táptalajra, melyeket 3-10 napig 30 °C-on a telepek megjelenéséig inkubáltunk. Az izolált törzseket 100 µg/ml zeocin tartalmú YPD/YPDS táptalajra oltottuk át.

3.8. Rekombináns β -galaktozidáz termeltetés élesztőben

A rekombináns β -galaktozidáz *K. phaffii* alapú rendszerben való termeltetésére kisléptékű (termelés ellenőrzése) és nagyléptékű (fehérje tisztítása) süllyesztett fermentációs rendszereket alkalmaztunk. Az ehhez szükséges *Komagataella* törzseket leoltottuk YPD táptalajra. A törzsek 30 °C-on kerültek inkubálásra a következő napig, majd starter kultúráként 5 ml YPD tápoldatot tartalmazó 50 ml térfogatú Erlenmeyer-lombikba oltottuk őket és ismételten inkubálásra kerültek a következő napig. Ezután a tenyészetet centrifugáltuk (4000×g, 10 perc), majd a felülúszó leöntését követően a sejteket kisléptékű fermentáció esetén 100 ml, nagyléptékű fermentáció esetén 500 ml BMGH tápoldattal reszuszpéndáltuk és a következő napig 30 °C hőmérsékleten 200 rpm rázatás mellett inkubáltuk. Az inkubálást követően a sejteket centrifugálással (4000×g, 10 perc) összegyűjtöttük, majd a sejteket kisléptékű fermentációban 20 ml, nagyléptékű esetén 100 ml BMMH tápoldatba felvettük. Ezután a tenyészeteket 30 °C-on 7, illetve 4 napig rázatva (200 rpm) növesztettük. A tenyészetekhez naponta 1/10 térfogat arányban metanolt adagoltunk. A tenyészetekből közvetlenül a leoltást követően, majd a tenyésztés minden napján 1 ml térfogatú mintát vettünk a fehérjetermelődés ellenőrzése céljából. A levett mintákat centrifugáltuk (16200×g, 20 perc), majd a sejtmentes felülúszót a β -galaktozidáz aktivitás és fehérjekoncentráció mérésekig -20 °C hőmérsékleten tároltuk. A fehérje tisztításához készített nagyléptékű fermentációból centrifugálással (16200×g, 20 perc) sejtmentes felülúszót állítottunk elő, melyet ezt követően fagyasztva szárítással koncentráltunk (Christ Alpha 1–4 freeze dryer). A mintaként vett és koncentrált sejtmentes fermentleveket felhasználásig -20 °C hőmérsékleten tároltuk.

3.9. Triklórecetsavas fehérje kicsapás

A fermentációk egyes napjain vételezett 1 ml fermentlé minták fehérjetartalmának kivonására triklórecetsavas (TCA) kicsapást alkalmaztunk. A mintákhoz 1:4 arányban TCA-t mértük, majd a mintákat alaposan vortexeltük és 30 percig jégen inkubáltuk. Az inkubációt követően centrifugáltuk (16000×g, 20 perc) a mintákat. A felülúszó leöntése után 500 µl acetont adagoltunk a csövekbe és vortexeltünk, majd centrifugáltunk (16000×g, 5 perc). Ezután a felülúszó részt leöntöttük és az acetonos lépést a centrifugálással (16000×g, 5 perc) megismételtük. Majd 20 µl steril desztillált vizet, 20 µl nátrium-lauril-szulfát (SDS) minta

puffert (Novex Tris-Glycine SDS minta puffer, Invitrogen) adtunk hozzá. Ezután vortexeltünk, majd centrifuga ($16000\times g$, 5 perc) segítségével ülepítettük a mintáinkat, illetve asztali inkubátorba helyeztük azokat (5 perc, $85\text{ }^{\circ}\text{C}$). A mintákat jégre tettük a nátrium-lauril-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) megkezdéséig.

3.10. Denaturáló gélelektroforézis (SDS-PAGE)

A fehérjék elválasztását vertikális futtató kádban (Mini-PROTEAN Tetra System, Bio-Rad) elhelyezett 12%-os poliakrilamid gélen (Mini-PROTEAN TGX, Bio-Rad) végeztük TGS futtató pufferrel (10x Tris-Glycine SDS Running Buffer, Novex), méretük meghatározásához PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) fehérje létra alkalmazásával, nátrium-lauril-szulfát poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE).

3.11. Coomassie festés, ezüsfestés

Coomassie festés esetén a fehérjemintázat láthatóvá tételéhez *Coomassie Brilliant Blue R-250* festő oldatban egy órán át rázattuk (65 rpm) a gél, majd egy desztillált vizes öblítést követően az 1. festékmentesítő oldatban, valamint a 2. festékmentesítő oldatban mostuk 2×30 percig. A megfestett gél $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, a 2. festékmentesítő oldatban került tárolásra.

Ezüsfestést is alkalmaztunk a fehérjemintázat megjelenítésére. A gél fixáló oldatban inkubáltuk két órán át az elválasztást követően. Ezután a fixáló oldat eltávolításának érdekében háromszor 20 percig 20%-os etanollal öblítettük, majd érzékenyítő oldatban (0,02% nátrium-tioszulfát) két percig inkubáltuk a gél. Az inkubáció után többszöri desztillált vizes mosást végeztünk. Ezt követően a gél 20 percig festettük ezüst-nitrát oldatban (0,2% AgNO_3), majd a desztillált vizes mosást megismételtük. A megfelelő festődés eléréséig a gél előhívó oldattal mostuk. Amint ezt elértük, az előhívást 96%-os ecetsavval állítottuk le.

3.12. β -Galaktozidáz fehérje tisztítása

A nagyléptékű fermentációban termeltetett rekombináns β -galaktozidáz tisztítását affinitás kromatográfiával végeztük, melyhez a megfelelő oszlopokkal felszerelt BioLogic DuoFlow (Bio-Rad) alacsony nyomású folyadékkromatográfiás rendszert (FPLC) alkalmaztunk. Az eljárás első lépéseként a megtermelt és liofilizálással koncentrált fermentlé 2 ml térfogatát Bio-Gel P6 oszlop (5 ml, Bio-Rad) alkalmazásával mosópuffer 1 oldatba szűrtük (5 ml/perc átfolyási sebesség). A gyűjtött 4 ml térfogatú frakciót EconoFit Nuvia IMAC (5 ml, Bio-Rad) affinitás kromatográfiai oszlopon tovább tisztítottuk. Az oszlopot mosópuffer 1 oldattal

ekvilibráltuk, majd a mintafelvitelt követően mosópuffer 2 oldattal (30 ml) végeztünk mosást. Ezt követően 50 ml 250 mM imidazol tartalmú natív elúciós puffert adagoltunk a rendszerhez. Az átfolyási sebességet végig 5 ml/perc értéken tartottuk. A magas imidazol tartalmú IMAC-pufferek a nagyobb stabilitás érdekében káliumsókkal készültek. A kálium jelenléte a denaturáló gélelektroforézisnél fejthet ki zavaró hatást, míg az imidazol az enzimaktivitás méréseknél kompetitív gátlást okozhat (Chagas és mtsai. 2023). Az előbbieket elkerülése érdekében az affinitás kromatográfia során vett fehérjetartalmú frakciókat 50 mM töménységű nátrium-acetát pufferbe (pH 6,0) szűrtük egy puffercserélő géliszűrő alkalmazásával (Bio-Gel P6, 5 ml, Bio-Rad), 1 ml/perc átfolyási sebesség mellett. Az így kapott frakciókban ezután β -galaktozidáz aktivitást mértünk, majd a fehérjéket denaturáló gélelektroforézisnek vetettük alá.

3.13. Fehérjekoncentráció meghatározás

A tisztítási lépések után kapott frakciók összfehérje-koncentrációjának meghatározását Qubit Fluorometer (Invitrogen) és Quant-iT Protein Assay Kit (Invitrogen) segítségével végeztünk a gyártó utasításainak megfelelően. A műszer kalibrálása 0 ng/ μ l, 200 ng/ μ l és 400 ng/ μ l koncentrációjú fehérje standard oldatok felhasználásával történt.

3.14. β -Galaktozidáz aktivitás meghatározás

Az enzim aktivitásának méréséhez *p*-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid kromogén szubsztrátot alkalmaztunk. Mikrotiter lemez (96 mintahelyes) egyes mintahelyeibe nátrium-acetát pufferrel (50 mM, pH 6,0) megfelelően hígított mintáinkból 180 μ l mennyiséget vittünk fel, majd 20 μ l nátrium-acetát pufferben (50 mM, pH 6,0) előkészített 2 mg/ml koncentrációjú *p*-nitrofenil- β -D-galaktopiranozidot mértünk hozzá. A reakcióelegyek háttér optikai denzitásának lemerése (405 nm) után 30 percig 50 °C hőmérsékleten inkubáltuk a mintákat, majd a reakciót 50 μ l (100 mM) nátrium-karbonát oldat hozzáadásával állítottuk le. A felszabaduló *p*-nitrofenol mennyiségét SPECTROstar Nano (BMG Labtech) mikrotiterlemez olvasó használatával 405 nm hullámhosszon mértük. A β -galaktozidáz aktivitás megadásához *p*-nitrofenol kalibrációs görbét használtuk, amelyet nátrium-acetát pufferben (50 mM, pH 6,0) elkészített 0-0,2 mM koncentrációjú *p*-nitrofenol oldatok optikai denzitás adatainak felhasználásával vettünk fel. Egy unit (U) az az enzimmennyiség, amely adott reakciókörülmények között percenként 1 μ M *p*-nitrofenolt szabadít fel. Az alábbi képletet használtuk az enzimaktivitás kiszámításához:

$$\beta - \text{galaktozidáz hidrolitikus aktivitás (U)} = \frac{x * \text{hígítás} * 1000}{\text{inkubációs idő}},$$

ahol x az adott fényelnyelési-értékhez tartozó p -nitrofenol koncentrációt jelöli. Az alábbi kalibrációs egyenes egyenletből ($R^2 = 0,9995$) a p -nitrofenol (x) koncentrációt számítottuk:

$$x = \frac{y - 0,0124}{10,057},$$

ahol y az oldat optikai denzitása 405 nm hullámhosszon.

3.15. β -Galaktozidáz aktivitás biokémiai jellemzőinek vizsgálata

Hőmérséklet optimum meghatározása

A β -galaktozidáz aktivitás hőmérsékleti optimumának meghatározásához az aktivitás méréseket az előzőekben ismertetett módon (3.14. fejezet) 20 °C, 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C és 80 °C-os inkubációs hőmérsékleteken is elvégeztük.

A pH optimum és stabilitás meghatározása

A tisztított enzimaktivitás pH optimumának meghatározásához különböző pH-értékekre (3,0; 3,8; 4,6; 5,0; 5,4; 5,8; 6,2; 6,6; 7,0; 8,0) beállított McIlvaine pufferoldatokat (4. táblázat) alkalmaztunk. A reakciókban 360 μ l pufferhez 40 μ l tisztított, megfelelően hígított enzimkivonatot mértünk, melyet ezután vortexeltünk. A mintaelegyből 180 μ l mennyiséget vittünk fel a mikrotiter lemezre, a maradék 220 μ l mennyiséget a pH stabilitás méréséhez 24 óráig 4 °C-on inkubáltuk. A lemezen levő mintánkhoz 20 μ l nátrium-acetát pufferben (50 mM, pH 6,0) előkészített 2 mg/ml koncentrációjú p -nitrofenil- β -D-galaktopiranozidot mértünk hozzá, majd a mérést az 3.14. fejezetben ismertetettek alapján folytattuk. Az előzőekben leírt módon megismételve a pH stabilitás vizsgálatához a 24 óráig inkubált mintákkal is elvégeztük a mérést.

3.16. *In silico* elemzések

Kísérleteink során a vizsgált DNS fragmentumok szekvenálását az LGC Genomics vállalat végezte (AOX5' és AOX3' szekvenáló indítószekvenciák alkalmazásával, 5. táblázat). BioEdit (7.2.5 verzió) program segítségével (Hall 1999) a DNS szekvenciák ellenőrzését, a Nemzeti Biotechnológiai Információs Központ (NCBI) adatbázis (NCBI) szekvencia-hasonlóság kereső programcsomag (BLAST) használatával pedig a nukleotid szekvenciák analízisét végeztük (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A fehérjékben található motívumok és domének kereséséhez a Motif Scan (MyHits) programot (Pagni és mtsai. 2004) használtuk. A feltételezett β -galaktozidáz fehérjék hosszát a Peptide Properties Calculator (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/proteincalc.html>) és szignál szekvenciáinak jelenlétét a SignalP 4.1 Server (Nielsen 2017) segítségével határoztuk meg.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A *Rhizomucor pusillus* β -galaktozidázt kódoló gének azonosítása

A *Rhizomucor pusillus* fonalas gomba teljes genom adatbázis online elérhetősége biztosított (<https://mycocosm.jgi.doe.gov/Rhipu1/Rhipu1.home.html>), ami nagymértékben elősegítette az egyes gének keresését és azonosítását. Munkánk kezdetekor a már előzetesen azonosított *Trichoderma atroviride* β -galaktozidáz (XP_013945605.1, Kubicek és mtsai. 2011) aminosav szekvenciájával homológ szekvencia keresést hajtottunk végre a *R. pusillus* genom adatbázisban. Három olyan feltételezett β -galaktozidázt kódoló gént azonosítottunk (β -gal1, β -gal2 és β -gal3), melyek nagyfokú hasonlóságot mutattak a *Trichoderma* β -galaktozidáz aminosav szekvenciával. A génekről levezethető β -galaktozidáz fehérjék legfontosabb jellemzőit a 6. táblázat tartalmazza.

6. táblázat: A *R. pusillus* genom adatbázisban azonosított β -galaktozidázok néhány jellemzői.

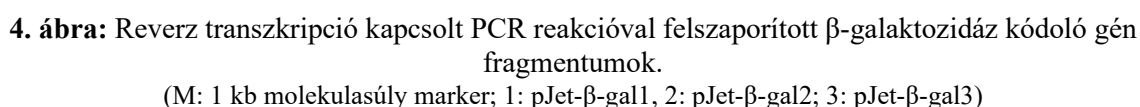
Jellemzők	β -Gal1	β -Gal2	β -Gal3
Fehérje azonosító	5214	5215	7578
Aminosav hossz	970 as	908 as	1048 as
Számolt molekulatömeg	107,36 kDa	101,49 kDa	120,8 kDa
Számolt izoelektromos pont	pH 4,96	pH 4,78	pH 6,14
Szignál szekvencia	20-21 as között	21-22 as között	19-20 as között

A feltételezett β -galaktozidáz fehérjék (β -Gal1, β -Gal2, β -Gal3) méretükben, aminosav hosszúságukban és izoelektromos pontjukban is különböznek (6. táblázat). Mindegyik fehérjében azonosítottuk a glikozid hidroláz 35 családra jellemző domént (PF01301).

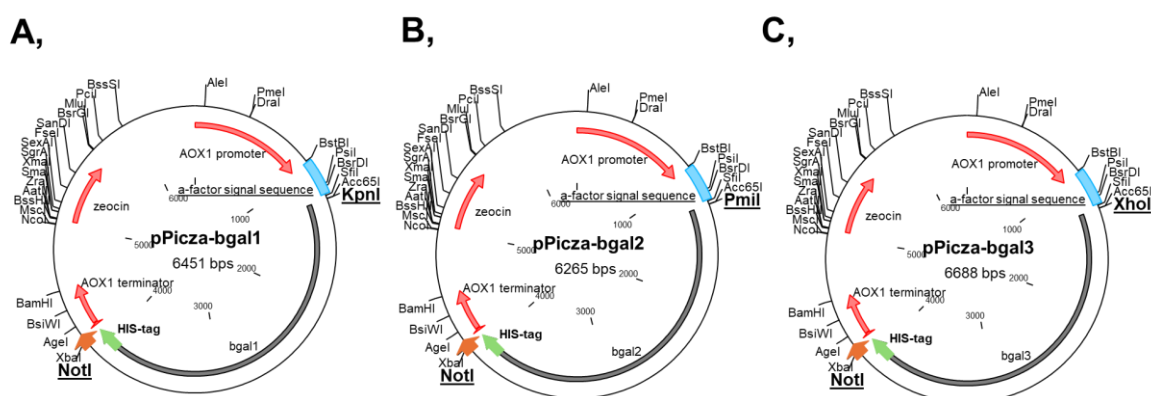
4.2. RNS kivonása és cDNS átírása a *R. pusillus* β -galaktozidázt kódoló génjeiből

A *R. pusillus* SZMC 11025 törzset búzaborpát tartalmazó táptalajon két napon keresztül tenyésztettük 37 °C-on. A tenyésztést követően a tenyészetből RNS izoláltunk. Az izolált, majd DNáz kezelt RNS-ből cDNS szintézist végeztük. A gének reverz transzkripció kapcsolt PCR eredményét, azaz a három gén sikeres felszaporítását a 4. ábra mutatja.

A sikeres reverz transzkripció és PCR után a kapott β -gal DNS fragmentumokat (4. ábra) egyenként pJET1.2 klónozó vektorba ligáltuk. Az így létrehozott pJet-bgal1, pJet-bgal2 és pJet-bgal3 plazmidokat használtuk fel a heterológ fehérjetermeltetéshez szükséges expressziós kazetták szerkesztésénél.



Többszöri emésztést, ligálást és baktériumtranszformációt követően sikeresen létrehoztuk a tervezett expressziós vektorokat. A heterológ fehérje expresszióhoz a bakteriális szelekcióhoz szükséges zeocin rezisztenciát biztosító gént, az AOX1 (alkohol oxidáz 1) gén promóter és terminális szekvenciáját, illetve a fehérje szekréciónak nélkülözhetetlen élesztő α -faktor szignál szekvenciát is tartalmazó pPicza vektort választottuk. A rezisztencia gén lehetővé teszi, hogy a bakteriális és a *Komagataella* transzformáció során is zeocint alkalmazhassunk szelekciós markerként. Az AOX1 promóter metanollal indukálható, így nagymértékű fehérjetermelés elérése lehetséges az élesztővel. A létrehozott expressziós vektorokat az 5. ábra szemlélteti.



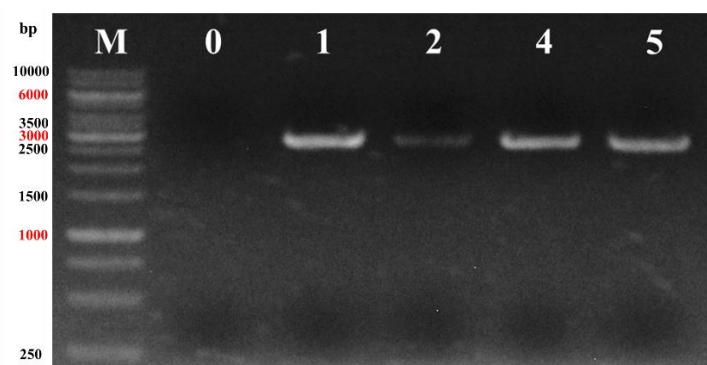
5. ábra: A *R. pusillus* β -galaktozidáz génjeinek heterológ expresszióját lehetővé tevő vektorkonstrukciók (A: pPicza-bgal1; B: pPicza-bgal2; C: pPicza-bgal3).

A létrehozott plazmidokat *Escherichia coli* baktériumba transzformáltuk. Transzformálás után megvizsgáltunk több transzformáns telepet, hogy hordozzák-e a megfelelő

vektorokat. A pPicza-bgal1 és pPicza-bgal3 plazmid esetében sikerült pozitív klónokat izolálni. PCR segítségével megvizsgáltuk, hogy a plazmidok valóban hordozzák-e a *R. pusillus* β -gal1 és β -gal3 génjét. A PCR-rel történő ellenőrzést követően, egy-egy kiválasztott pozitív klónból tisztított plazmid szekvencia ellenőrzésével, megbizonyosodtunk a nukleotid sorrend hibamentességéről. A β -gal2 és β -gal3 génekkel jelenleg folyamatban van a termeltetési rendszerek kidolgozása, a továbbiakban bemutatott munkafolyamatok és eredmények a β -gal1 génnel végzett vizsgálatokra vonatkoznak.

A szekvencia ellenőrzést követően a β -gal1 gént tartalmazó pPicza-bgal1 vektort *PmiI* enzimmel linearizáltuk és élesztőbe transzformáltuk elektroporáció segítségével. A heterológ termeltetéséhez a *Komagataella phaffii* (régábbi nevén *Pichia pastoris*) KM71H metilotróf élesztőt választottuk.

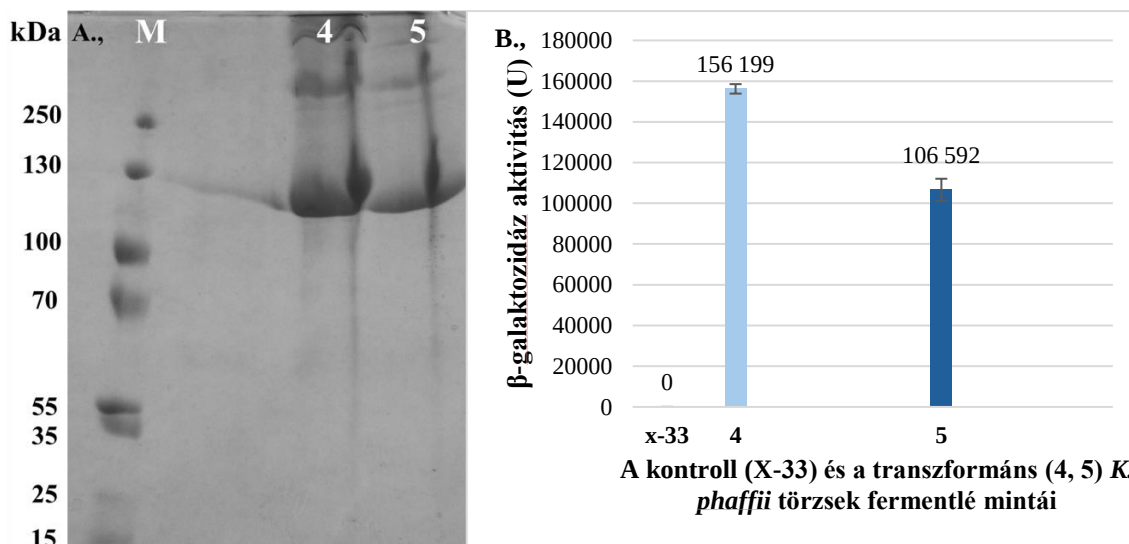
A sikeres elektroporációt követően öt transzformáns telepet izoláltunk. Átoltásuk után kolónia PCR segítségével ellenőriztük, hogy ezen élesztő telepek hordozzák-e a *R. pusillus* β -gal1 génjét. Az izolált kolóniák közül csak négy (1, 2, 4 és 5 mintahelyek) hordozta a *R. pusillus* β -gal1 génjét (6. ábra), azaz a várt 2800 bp körüli méretben e telepeknél kaptunk PCR terméket. Egy telep (3-as jelölésű) esetében nem mutattuk ki a keresett β -gal1 gént. Az ellenőrzéshez kontrollként *K. phaffii* X-33 törzset használtunk (6. ábra, 0. mintahely).



6. ábra: A *R. pusillus* β -gal1 gén jelenlétének kolónia PCR segítségével való ellenőrzése *K. phaffii* transzformáns telepekben.

(M: 1 kb molekulásúly marker; 0: kontroll X-33; 1.;2.; 4.; 5.: transzformáns telepek)

Az *R. pusillus* β -gal1 gént hordozó négy *K. phaffii* transzformáns törzset kisléptékű fermentációba vittük és 7 napig vizsgáltuk azok β -galaktozidáz termelését. A sejtmentes fermentlé mintákkal végzett mérés során a vizsgált négy transzformáns élesztő törzs közül a két legjobb termelőnek bizonyulót választottuk ki, melyek által termelt enzimek 156199 U (4-es transzformáns) és 106592 U (5-ös transzformáns) aktivitás értékeket mutattak (7. ábra).



7. ábra: A heterológ expresszió után kapott fermentlé SDS-PAGE analízise és β -galaktozidáz aktivitása.

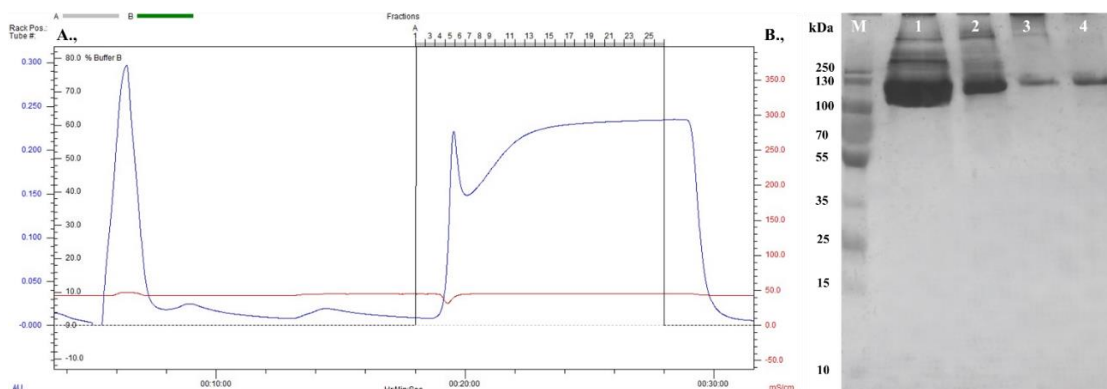
A., Fehérjék szétválasztása a 10^5 -szeresen hígított fermentlé mintákban Coomassie festést követően. (M: molekulásúly marker (PageRuler Plus, Thermo Scientific); 4-5: β -gal I 4-es, 5-ös fermentlé fehérjeminták)

B., Enzimaktivitás szintek a 10^5 -szeresen hígított nyers mintákban

4.4. A rekombináns β -galaktozidáz tisztítása

A rekombináns β -galaktozidáz fehérje nagyléptékű termeltetését a 4-es jelű transzformáns *K. phaffii* izolátummal végeztük. Eredményeink alapján ennél a transzformásnál nagy β -galaktozidáz aktivitás volt kimutatható. A négy napig termeltetett, HIS címkével jelölt *R. pusillus* rekombináns β -galaktozidáz tisztítását affinitás kromatográfiával végeztük. A fermentációt követően kapott sejtmentes fermentlevet liofilezéssel koncentráltuk, majd gélszűrést követően elvégeztük a HIS jelölt fehérjék affinitás kromatográfiai tisztítását. Az affinitás kromatográfia lépés kromatogramját a 8.A ábra szemlélteti. Az 5. frakciónál látható határozott csúcs feleltethető meg a termelt rekombináns β -galaktozidáznak (8.A ábra). Az imidazol eltávolítása érdekében a kapott mintával ezután egy második gélszűrést is végeztünk, melyben acetát pufferrel (50 mM, pH 6,0) eluáltuk a fehérjét az oszlopról.

A sejtmentes fermentlében és az egyes tisztítási lépések során nyert frakciókban található fehérjéket SDS-PAGE segítségével választottuk el, követve a rekombináns β -galaktozidáz fehérje tisztulását. A 8.B ábrán jól látható, hogy az egyes tisztítási lépések után vételezett mintákban egyre kevesebb fehérje sáv jelent meg. Az acetát pufferbe (50 mM, pH 6,0) szűrt minta egy erős, 120 kDa körüli méretben megjelenő fehérje sávot tartalmaz, melyet a keresett *R. pusillus* rekombináns β -galaktozidáznak feltételezünk (8.B ábra, 4-es mintahely).



8. ábra: Az affinitás kromatográfia kromatogramja és az egyes tisztított frakciók mintázata SDS-PAGE vizsgálattal követve.

A: Affinitás kromatográfia lépés (IMAC) után kapott kromatogram; B: A tisztítási lépések után nyert fehérjék SDS-PAGE analízise; a sávokat ezüst festéssel hívtuk elő. (M: PageRuler Plus molekulásúly marker, Thermo Scientific; 1: nyers enzimkivonat; 2: Első gélszűrés (P6 oszlop, foszfát puffer) utáni minta; 3: Affinitás kromatográfia (IMAC) utáni minta; 4: Második gélszűrés (P6 oszlop, acetát puffer) utáni minta)

Az egyes tisztítási lépések után összfehérje koncentrációt, valamint a felülúszókban β -galaktozidáz aktivitást is mértünk. A fehérjetisztítás részletes adatait a 7. táblázatban tüntettük fel. A tisztítási eljárás során a specifikus aktivitás több, mint 60-szeresére növekedett a kiindulási mintához képest, 30,78% kihozatal mellett. Végeredményül egy 1312518,6 U/mg specifikus aktivitással rendelkező rekombináns β -galaktozidáz fehérjét kaptunk (7. táblázat). A frakciók β -galaktozidáz aktivitásának meghatározásakor acetát pufferes közegben hígított mintákkal dolgoztunk, az imidazol enzimaktivitást gátló (Chagas és mtsai. 2023) hatását elkerülendő.

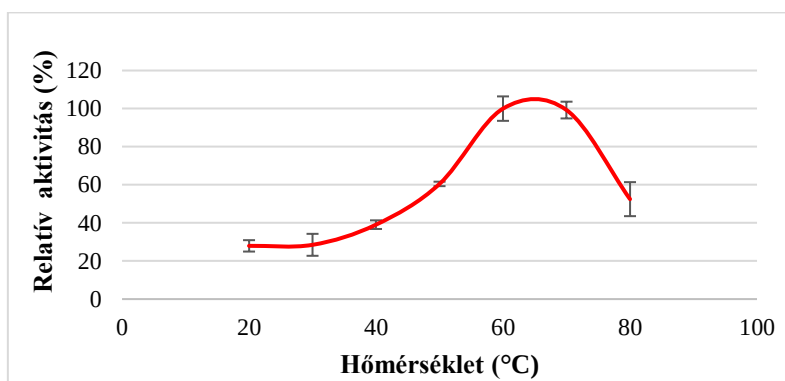
7. táblázat: Az egyes tisztítási lépések utáni frakciók tisztítási tulajdonságai, paraméterei.

	Összfehérje (mg)	Összaktivitás (U)	Specifikus aktivitás (U/mg)	Tisztulás	Kihozatal (%)
Liofilizált nyers kivonat	7,76	149238,2	19231,7	1	100
Bio-Gel P-6 (foszfát puffer + 5 mM imidazol)	0,314	67040,1	213231,9	11,09	44,92
IMAC (foszfát puffer + 250 mM imidazol)	0,123	45385,7	369590,8	19,22	30,41
Bio-Gel P-6 (50 mM acetát puffer)	0,035	45938,2	1312518,6	68,25	30,78

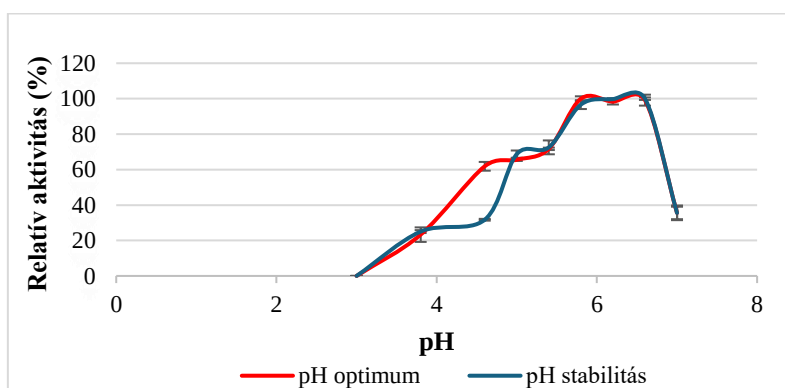
4.5. A tisztított β -galaktozidáz aktivitás jellemzése

Megkezdjük a tisztított *R. pusillus* rekombináns β -galaktozidáz aktivitásának biokémiai jellemzését, ahol eddig az enzimműködés hőmérséklet optimumát és pH toleranciáját vizsgáltuk. A tisztított enzim aktivitásának hőmérsékleti optimumát 60 °C körül állapítottuk

meg (9. ábra), míg pH tekintetében a pH 5,8-7,0 tartomány bizonyult optimálisnak és stabilnak (10. ábra).



9. ábra: A tisztított rekombináns *R. pusillus* β -galaktozidáz aktivitásának hőmérséklet optimuma.



10. ábra: A tisztított rekombináns *R. pusillus* β -galaktozidáz aktivitásának pH optimuma és stabilitása.

5. DISZKUSSZIÓ

A laktózérzékenység napjainkban már népbetegségnek számít, így egyes tejalapú élelmiszerek laktóz tartalmának csökkentése, ennek érdekében új típusú jellemzett β -galaktozidáz enzimek fejlesztése, hatékony, gazdaságos előállításának kidolgozása kiemelt egészségügyi és élelmiszeripari jelentőséggel bír. Előzetes kutatások a *Rhizomucor pusillus* SZMC 11025 járomspórás gomba törzset jó hozamú β -galaktozidáz termelőnek azonosították (Volford és mtsai. 2021). Jelen munka fő célja a *R. pusillus* SZMC 11025 β -galaktozidáz kódoló gének azonosítása, és rekombináns β -galaktozidáz enzimek heterológ expressziójához alkalmas vektorkonstrukciók létrehozása volt. Célul tűztük ki a heterológ fehérjetermeletés beállítását, majd rekombináns β -galaktozidáz tisztítását és jellemzését is.

In silico elemzések során három, a *Trichoderma atroviride* (Kubicek és mtsai. 2011) β -galaktozidáz aminosav-szekvenciájával nagyfokú hasonlóságot mutató feltételezett β -galaktozidáz kódoló gént azonosítottunk a *R. pusillus* genomban. A levezethető feltételezett β -galaktozidáz fehérjék méretükben, aminosav-szekvencia hosszukban és izoelektromos pontjukban is különböztek. Mindhárom fehérjében azonosítottunk glikozid-hidroláz 35 családra jellemző konzervált domént, ami kulcsfontosságú szerepet játszhat a β -galaktozidáz aktivitásban (Yang és mtsai. 2021).

A gének által kódolt enzimfehérjék aktivitásának és biokémiai paramétereinek elemzéséhez szükséges azok célzott izolálása is. Ennek érdekében a *R. pusillus* SZMC 11025 törzset búzakorpa tartalmú induktív körülményen tenyésztettük, majd az egyes génekből való cDNS szintézist követően létrehoztuk a *R. pusillus* SZMC 11025 törzsből azonosított β -galaktozidáz gének heterológ expresszióját lehetővé tevő vektorkonstrukciókat. A vektorokat *Komagataella phaffii* metilotróf élesztő heterológ termeltetési rendszerbe vittük, ahol célzottan a vizsgálni kívánt rekombináns enzimfehérjét kívántuk előállítani. A *K. phaffii* élesztőt széles körben alkalmazzák különféle fehérjék heterológ rendszerben történő termeltetéséhez (Juturu és Wu 2018). Korábban például a fonalas gomba *Paecilomyces aeruginus* rekombináns β -galaktozidáz termeltetését is *K. phaffii* heterológ rendszerben biztosították (Katrolia és mtsai. 2011; Movahedpour és mtsai. 2022). *Lichtheimia ramosa* járomspórás gombából származó α -galaktozidáz szintén termeltettek *K. phaffii* élesztő rendszerben (Xie és mtsai. 2020).

A *β -gal1* élesztő transzformánsokkal fermentációs kísérleteket folytattunk, majd az így heterológ módon termeltetett, HIS címkézett fehérjét affinitás kromatográfiával tisztítottuk. A HIS címkével jelölt fehérjék jellemzően nagyobb affinitással kötődnek a tisztítás során alkalmazott gyantához, a szabad kötőhelyek többségét elfoglalva, a jelöletlen nem

specifikusakkal szemben (Luo és mtsai. 2024b). Az enzimfehérje tisztítási eljárás 30,78% kihozatal mellett egy 1312518,6 U/mg specifikus aktivitással és 45938 U/ml térfogati aktivitással rendelkező rekombináns *R. pusillus* SZMC 11025 β -galaktozidázt eredményezett. A kapott β -galaktozidáz elegy összaktivitása és térfogati aktivitása jelentős, az eddig heterológ rendszerben termeltetett gomba β -galaktozidázokkal összehasonlítva, ahol többnyire 0,25-40000 U/ml aktivitásokat nyertek (Movahedpour és mtsai. 2022). A tisztított fehérje molekulatömegét 120 kDa körül állapítottuk meg. Előző munkákban tisztított *M. pusillus* β -galaktozidázra 129 kDa (Ismail és mtsai. 1997), míg a *Rhizomucor* sp. enzimre 120 kDa molekulatömeget írtak le. Az eddig tisztított mikrobiális β -galaktozidázok molekulatömege többnyire a 100-130 kDa tartományban található (1. táblázat). Gombáknál főként *Aspergillus*, *Penicillium* és *Kluyveromyces* izolátumokból tisztítottak és vizsgáltak β -galaktozidáz enzimeket (1. táblázat) (Zhou és mtsai. 2024). Járomspórás gombákból eddig egyes *Mucor pusillus* (Ismail és mtsai. 1997), *Rhizomucor* sp. (Shaikh és mtsai. 1999) és *R. pusillus* (Kaur és mtsai. 2018) törzsekből izoláltak β -galaktozidázt. Rekombináns enzimeket pedig főként *Kluyveromyces lactis* és *Aspergillus niger* gombákból termeltettek, leginkább *Saccharomyces cerevisiae* gazdában (Movahedpour és mtsai. 2022). Rekombináns járomspórás gomba β -galaktozidázt tudomásunk szerint eddig még nem állítottak elő és vizsgáltak.

Megkezdjük a tisztított rekombináns enzim biokémiai jellemzését is. Eddigi munkánkban az enzim hőmérséklet és pH függését tanulmányoztuk; e két faktor a β -galaktozidázok hatékonysága szempontjából meghatározó (Zhou és mtsai. 2024). Vizsgálataink alapján az enzimaktivitás optimuma 60 °C hőmérséklet körüli tehető, míg pH-tekintetében az 5,8-7,0 tartomány bizonyult optimálisnak és stabilnak. A mikrobiális β -galaktozidázok működése általában pH 6,0 és 7,0 között, illetve 40 °C és 70 °C között optimális (Zhou és mtsai. 2024). Korábbi kutatásokban már jellemezték néhány élesztő és fonalas gomba β -galaktozidáz aktivitásának hőmérséklet és pH függését. Élesztőknél többnyire pH 6,5-7,5 körül állapították meg az aktivitás optimumát, néhány fonalas gomba enzim pH 2,5-4,5 tartományon is aktívnek bizonyult (Nguyen és mtsai. 2019). Egy *A. niger* β -galaktozidáznál az enzim optimális működését pH 2,5-4,0 tartományban és 55-60 °C-on, míg *Aspergillus oryzae* enzimnél pH 4,5-6,0 tartományban és 50 °C-on állapították meg (Mahoney 2002). Járomspórás gombákkal végzett korábbi kutatásokban *Rhizomucor* β -galaktozidázokra 50-65 °C körüli hőmérséklet és 4-5,5 körüli pH optimumokat írtak le (Ismail és mtsai. 1997; Shaikh és mtsai. 1999; Kaur és mtsai. 2018).

Tudomásunk szerint elsőként termeltettünk járomspórás gomba β -galaktozidázt heterológ rendszerben. A célzott termeltetéssel biztosítottuk az enzimaktivitás biokémiai

jellemzéséhez elvárható megfelelő minőségű tisztaságot. Terveink között szerepel az expresszió mértékének növelése, azaz nagyobb enzimhozam elérése, melynek érdekében a heterológ fehérje termeltetési rendszer körülményeinek optimalizálása szükséges. Tervezzük a tisztított rekombináns β -galaktozidáz aktivitás biokémiai jellemzőinek további vizsgálatát is. Többek között a szubsztrát specificitást, releváns gátlószerekkel (pl. monoszacharidok, glikozidáz aktivitásokat gátló reagensek) és fém sókkal szembeni érzékenységet, valamint transzgalaktozilációs reakciók katalizálását elemezzük. Reményeink szerint a *R. pusillus* SZMC 11025 β -galaktozidáz ezim tulajdonságait tekintve alkalmas jelölt lehet élelmiszeripari gyakorlati folyamatok (pl. tejcukor mentesítés, GOS és OsLu előállítás) gazdaságos katalizálásához.

6. IRODALOMJEGYZÉK

- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., & Blackwell, M. (1996). *Introductory Mycology*. 4th ed., John Wiley and Sons, New York, pp. 127–171.
- Alves, M.H., de Campos-Takaki, G.M., Okada, K., Pessoa, I.H.F., & Milanez, A.I. (2005). Detection of extracellular protease in *Mucor* species. *Revista Iberoamericana de Micologia*, 22(2), 114–117.
- Anisha, G.S. (2017). β -Galactosidases, in: Pandey, A., Negi, S., & Soccol, C.R. (eds.), *Current developments in biotechnology and bioengineering: Production, isolation and purification of industrial products*, 1st ed. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 395–421.
- Barr, D.J.S. (1992). Evolution and kingdoms of organisms from the perspective of a mycologist. *Mycologia*, 84(1), 1–11.
- Benny, G.L., Humber, R.A., & Morton, J.B. (2001). Zygomycota: Zygomycetes, in: McLaughlin, D.J., McLaughlin, E.G., & Lemke, P.A. (eds.), *Systematics and Evolution*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 113–146.
- Benny, G.L., Humber, R.A., & Voigt, K. (2014). 8 Zygomycetous Fungi: Phylum Entomophthoromycota and Subphyla Kickxellomycotina, Mortierellomycotina, Mucoromycotina, and Zoopagomycotina, in: McLaughlin, D.J., & Spatafora, J.W. (eds.), *Systematics and Evolution*. The Mycota, vol 7A. Springer Berlin Heidelberg, pp. 209–250.
- Carter, J. (1988). Gamma-linolenic acid as a nutrient. *Food Technology (Chicago)*, 42(6), 72–82.
- Chagas, R.S., Otsuka, F.A., Pineda, M.A., Salinas, R.K., & Marana, S.R. (2023). Mechanism of imidazole inhibition of a GH1 β -glucosidase. *FEBS Open Bio*, 13(5), 912–925.
- Chanalia, P., Gandhi, D., Attri, P., & Dhanda, S. (2018). Purification and characterization of β -galactosidase from probiotic *Pediococcus acidilactici* and its use in milk lactose hydrolysis and galactooligosaccharide synthesis. *Bioorganic Chemistry*, 77, 176–189.
- Chayakulkeeree, M., Ghannoum, M., & Perfect, J. (2006). Zygomycosis: The re-emerging fungal infection. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 25, 215–229.
- Cruz-Lachica, I., Marquez-Zequera, I., Garcia-Estrada, R.S., Carrillo-Fasio, J.A., Leon-Felix, J., & Allende-Molar, R. (2016). First report of *Gilbertella persicaria* causing papaya fruit rot. *Plant Disease*, 100(1), 227–227.
- Cruz, R., Cruz, V.D., Belote, J.G., Khenayfes, M.D.O., Dorta, C., & Oliveira, L.H.D.S. (1999). Properties of a new fungal β -galactosidase with potential application in the dairy industry. *Revista de Microbiologia*, 30, 265–271.
- Csernetics, Á., Péteri, Z., Linka, B., & Takó, M. (2005). Physiological and genetic variability of Zygomycetes causing post-harvest decay. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 40(3–4), 267–277.
- De Jesus, L., & Guimarães, L.H.S. (2021). Production of β -galactosidase by *Trichoderma* sp. Through solid-state fermentation targeting the recovery of galactooligosaccharides from whey cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 130(3), 865–877.
- Devoyod, J.J. (1988). Microbial accidents in cheesemaking due to *Mucor*. *Microbiologie, Aliments, Nutrition*, 6, 25–29.
- Dragosits, M., Pflügl, S., Kurz, S., Razzazi-Fazeli, E., Wilson, I.B., & Rendic, D. (2014). Recombinant *Aspergillus* β -galactosidases as a robust glycomic and biotechnological tool. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 3553–3567.
- Dufossé, L. (2006). Microbial production of food grade pigments. *Food Technology and Biotechnology*, 44, 313–321.
- Ferreira, J.A., Lennartsson, P.R., Edebo, L., & Taherzadeh, M.J. (2013). Zygomycetes-based biorefinery: Present status and future prospects. *Bioresource Technology*, 135, 523–532.
- Godtfredsen, S.E. (1990). Microbial lipases, in: Fogarty, W.M. & Kelly, C.T. (eds.), *Microbial Enzymes and Biotechnology*. Springer Netherlands, pp. 255–274.
- Gomes, T.A., Santos, L.B., Nogueira, A., & Spier, M.R. (2018). Increase in an intracellular β -galactosidase biosynthesis using *L. reuteri* NRRL B-14171, inducers and alternative low-cost nitrogen sources under submerged cultivation. *International Journal of Food Engineering*, 14(3), 20170333.
- Halbmayer, E., Mathiesen, G., Nguyen, T.-H., Maischberger, T., Peterbauer, C.K., Eijssink, V.G., & Haltrich, D. (2008). High-level expression of recombinant β -galactosidases in *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus sakei* using a sakacin P-based expression system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(12), 4710–4719.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41(41), 95–98.
- Havas, P. (2015). Kereskedelmi forgalomban kapható probiotikus baktériumok galaktozidáz enzimeinek tanulmányozása. Doktori (PhD) értekezés. Budapesti Corvinus Egyetem.
- Huang, L., Wei, P., Zang, R., Xu, Z., & Cen, P. (2010). High-throughput screening of high-yield colonies of *Rhizopus oryzae* for enhanced production of fumaric acid. *Annals of Microbiology*, 60, 287–294.

- Hung, M.-N., & Lee, B. (2002). Purification and characterization of a recombinant β -galactosidase with transgalactosylation activity from *Bifidobacterium infantis* HL96. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58, 439–445.
- Husain, Q. (2010). β Galactosidases and their potential applications: A review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30(1), 41–62.
- Hüttel, W., & Hoffmeister, D. (2011). Fungal biotransformations in pharmaceutical sciences, in: Hoffrichter, M. (ed.), *Industrial Applications. The Mycota*, vol 10. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 293–317.
- Hüttner, S., Granchi, Z., Nguyen, T.T., van Pelt, S., Larsbrink, J., Thanh, V.N., & Olsson, L. (2018). Genome sequence of *Rhizomucor pusillus* FCH 5.7, a thermophilic zygomycete involved in plant biomass degradation harbouring putative GH9 endoglucanases. *Biotechnology Reports*, 20, e00279.
- Ismail, S., Mabrouk, S., & Mahoney, R. (1997). Purification and characterization of β -galactosidase from *Mucor pusillus*. *Journal of Food Biochemistry*, 21(5), 145–162.
- Iturriaga, E.A., Velayos, A., & Eslava, A.P. (2000). Structure and function of the genes involved in the biosynthesis of carotenoids in the mucorales. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 5(4), 263–274.
- Iturriaga, E.A., Velayos, A., Eslava, A.P., & Álvarez, M. (2001). The genetics and molecular biology of carotenoid biosynthesis in *Mucor*. *Recent Research Developments in Genetics*, 1, 79–92.
- Iturriaga, E., Papp, T., Breum, J., Arnau, J., & Arturo, P. (2008). Strain and culture conditions improvement for β -carotene production with *Mucor*, in: Barredo, J.L. (ed.), *Microbial processes and products. Methods in biotechnology*, vol 18. Humana Press, pp. 239–256.
- Juturu, V., & Wu, J.C. (2018). Heterologous protein expression in *Pichia pastoris*: Latest research progress and applications. *ChemBioChem*, 19(1), 7–21.
- Katrolia, P., Yan, Q., Jia, H., Li, Y., Jiang, Z., & Song, C. (2011). Molecular cloning and high-level expression of a β -galactosidase gene from *Paecilomyces aeruginus* in *Pichia pastoris*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 69(3-4), 112–119.
- Kaur, R., Panesar, P., & Singh, R. (2018). Utilization of agro-industrial residues for the production of β -galactosidase using fungal isolate under solid state fermentation conditions. *Acta Alimentaria*, 47(2), 162–170.
- Kazemi, S., Khayati, G., & Faezi-Ghasemi, M. (2016). β -Galactosidase production by *Aspergillus niger* ATCC 9142 using inexpensive substrates in solid-state fermentation: Optimization by orthogonal arrays design. *Iranian Biomedical Journal*, 20(5), 287–294.
- Kestwal, R.M., & Bhide, S.V. (2007). Purification of β -galactosidase from *Erythrina indica*: Involvement of tryptophan in active site. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1770(10), 1506–1512.
- Kishore, D., & Kayastha, A.M. (2012). Optimisation of immobilisation conditions for chick pea β -galactosidase (CpGAL) to alkylamine glass using response surface methodology and its applications in lactose hydrolysis. *Food Chemistry*, 134(3), 1650–1657.
- Kubicek, C.P., Herrera-Estrella, A., Seidl-Seiboth, V., Martinez, D.A., Druzhinina, I.S., Thon, M., Zeilinger, S., Casas-Flores, S., Horwitz, B.A., & Mukherjee, P.K. (2011). Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. *Genome Biology*, 12, R40.
- Kwon-Chung, K.J. (2012). Taxonomy of fungi causing mucormycosis and entomophthoromycosis (zygomycosis) and nomenclature of the disease: Molecular mycologic perspectives. *Clinical Infectious Diseases*, 54(suppl_1), S8–S15.
- Langarica-Fuentes, A., Handley, P.S., Houlden, A., Fox, G., & Robson, G.D. (2014). An investigation of the biodiversity of thermophilic and thermotolerant fungal species in composts using culture-based and molecular techniques. *Fungal Ecology*, 11, 132–144.
- Lee, J.-Y., Kwak, M.-S., Roh, J.-B., Kim, K., & Sung, M.-H. (2017). Microbial β -galactosidase of *Pediococcus pentosaceus* ID-7: Isolation, cloning, and molecular characterization. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(3), 598–609.
- Lee, S.C., & Idnurm, A. (2017). Fungal Sex: The Mucoromycota. *Microbiology Spectrum*, 5(2), FUNK-0041-2017.
- Liaud, N., Rosso, M.-N., Fabre, N., Crapart, S., Herpoël-Gimbert, I., Sigoillot, J.-C., Raouche, S., & Levasseur, A. (2015). L-lactic acid production by *Aspergillus brasiliensis* overexpressing the heterologous *ldha* gene from *Rhizopus oryzae*. *Microbial Cell Factories*, 14, 66.
- Lu, L., Guo, L., Wang, K., Liu, Y., & Xiao, M. (2020). β -Galactosidases: A great tool for synthesizing galactose-containing carbohydrates. *Biotechnology Advances*, 39, 107465.
- Lukács, G., Papp, T., Nyilasi, I., Nagy, E., & Vágvolgyi, C. (2004). Differentiation of *Rhizomucor* species on the basis of their different sensitivities to lovastatin. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(11), 5400–5402.
- Ju, L.-K., Loman, A.A., & Islam, S.M. (2019) α -Galactosidase and its applications in food processing. in: Melton, L., Shahidi, F., & Varelis, P. (eds.), *Encyclopedia of food chemistry*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 124–128.

- Luo, J., Gu, S., Zhu, J., Ro, K.-S., Zhao, L., Du, L., Xie, J., & Wei, D. (2024a). Screening, cloning and expression of β -galactosidase from lactic acid bacteria and semi-rational design for the improvement of transgalactosylation activity. *Process Biochemistry*, 140, 19–31.
- Luo, X., Pamidi, A.S., Gardner, Z., Alrashaidi, F.A., Raston, C.L., & Weiss, G.A. (2024b). Ultrafast His-tagged protein purification. *Current Protocols*, 4(9), e70006.
- Madyastha, M.K., & Srivatsan, J. (1987). Novel transformations of progesterone by a *Mucor* sp. *Canadian Journal of Microbiology*, 33(5), 361–365.
- Mahoney, R. (2002). Enzymes exogenous to milk in dairy technology. Beta-D-Galactosidase. in: Roginski, H. (ed.), *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Elsevier, pp. 907–914.
- Marraccini, P., Rogers, W.J., Caillet, V., Deshayes, A., Granato, D., Lechat, S., Pridmore, D., & Pétiard, V. (2005). Biochemical and molecular characterization of α -D-galactosidase from coffee beans. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43(10–11), 909–920.
- Mehta, B.J., Obraztsova, I.N., & Cerdá-Olmedo, E. (2003). Mutants and intersexual heterokaryons of *Blakeslea trispora* for production of β -carotene and lycopene. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(7), 4043–4048.
- Michailides, T., & Ogawa, J. (1985). A comparative study of growth characteristics and pathogenicity of *Mucor piriformis* isolates causing decay of peaches and nectarines. *Phytopathology*, 75, 1008.
- Morin-Sardin, S., Nodet, P., Coton, E., & Jany, J.-L. (2017). *Mucor*: A Janus-faced fungal genus with human health impact and industrial applications. *Fungal Biology Reviews*, 31(1), 12–32.
- Movahedpour, A., Ahmadi, N., Ghalamfarsa, F., Ghesmati, Z., Khalifeh, M., Maleksabet, A., Shabaninejad, Z., Taheri-Anganeh, M., & Savardashtaki, A. (2022). β -Galactosidase: From its source and applications to its recombinant form. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 69(2), 612–628.
- Nagy, Z., Kiss, T., Szentirmai, A., & Biró, S. (2001). β -Galactosidase of *Penicillium chrysogenum*: Production, purification, and characterization of the enzyme. *Protein Expression and Purification*, 21(1), 24–29.
- Nath, A., Mondal, S., Chakraborty, S., Bhattacharjee, C., & Chowdhury, R. (2014). Production, purification, characterization, immobilization, and application of β -galactosidase: A review. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering*, 9(3), 330–348.
- Nguyen, T.T.H., Seo, C., Kwak, S.-H., Kim, J., Kang, H.-K., Kim, S.-B., & Kim, D. (2019). Chapter 23 – Enzymatic production of steviol glucosides using β -glucosidase and their applications, in: Kuddus, M. (ed.), *Enzymes in food biotechnology*. Academic Press, London, UK, pp. 405–418.
- Nielsen, H. (2017). Predicting secretory proteins with SignalP, in: Kihara, D. (ed.), *Protein function prediction. Methods and protocols*. Humana Press, New York, NY, USA, pp. 59–73.
- Nout, M.J.R., & Aidoo, K.E. (2011). Asian fungal fermented food. in: Hofrichter, M. (eds) *Industrial applications. The Mycota*, vol 10. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 29–58.
- Nout, M.J.R., & Kiers, J.L. (2005). Tempe fermentation, innovation and functionality: Update into the third millenium. *Journal of Applied Microbiology*, 98(4), 789–805.
- Oliveira, C., Guimarães, P.M., & Domingues, L. (2011). Recombinant microbial systems for improved β -galactosidase production and biotechnological applications. *Biotechnology Advances*, 29(6), 600–609.
- Outtrup, H., & Boyce, C.O.L. (1990). Microbial proteinases and biotechnology, in: Fogarty, W.M., & Kelly, C.T. (eds.), *Microbial enzymes and biotechnology*. Springer, Dordrecht, Netherlands, pp. 227–254.
- Pagni, M., Ioannidis, V., Cerutti, L., Zahn-Zabal, M., Jongeneel, C.V., & Falquet, L. (2004). MyHits: A new interactive resource for protein annotation and domain identification. *Nucleic Acids Research*, 32(suppl_2), W332–W335.
- Panesar, P.S., Kaur, R., & Singh, R.S. (2016). Isolation and screening of fungal strains for β -galactosidase production. *International Journal of Nutrition and Food Engineering*, 10(7), 400–404.
- Panesar, P.S., Kumari, S., & Panesar, R. (2010). Potential applications of immobilized β -galactosidase in food processing industries. *Enzyme Research*, 2010, 473137.
- Papp, T., Nyilasi, I., Csernetics, Á., Galgóczy, L., & Vágvolgyi, C. (2008). Molecular studies on zygomycetes fungi causing opportunistic infections. *Reviews and Research in Medical Microbiology*, 19(2), 39–46.
- Papp, T., Nyilasi, I., Csernetics, Á., Nagy, G., Takó, M., & Vágvolgyi, Cs. (2016). Improvement of industrially relevant biological activities in Mucoromycotina fungi, in: Schmoll, M., & Dattenböck, C. (eds.), *Gene expression systems in fungi: Advancements and applications*. Fungal Biology. Springer, Cham, Switzerland, pp. 97–118.
- Park, M.J., Park, M.S., & Ji, G.E. (2019). Cloning and heterologous expression of the β -galactosidase gene from *Bifidobacterium longum* RD47 in *B. bifidum* BGN4. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29, 1717–1728.
- Raol, G.G., Raol, B., Prajapati, V.S., & Bhavsar, N.H. (2015). Utilization of agro-industrial waste for β -galactosidase production under solid state fermentation using halotolerant *Aspergillus tubingensis* GR1 isolate. *3 Biotech*, 5, 411–421.

- Ray, R., & Ravi, V. (2005). Post harvest spoilage of sweetpotato in tropics and control measures. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(7–8), 623–644.
- Ren, G., Cao, L., Kong, W., Wang, Z., & Liu, Y. (2016). Efficient secretion of the β -galactosidase Bgal1-3 via both Tat-dependent and Tat-independent pathways in *Bacillus subtilis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(28), 5708–5716.
- Ribes, J.A., Vanover-Sams, C.L., & Baker, D.J. (2000). Zygomycetes in human disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(2), 236–301.
- Richardson, M. (2009). The ecology of the Zygomycetes and its impact on environmental exposure. *Clinical Microbiology and Infection*, 15(s5), 2–9.
- Rodrigues, R.C., & Fernandez-Lafuente, R. (2010). Lipase from *Rhizomucor miehei* as an industrial biocatalyst in chemical process. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 64(1–2), 1–22.
- Mlichová, Z., & Rosenberg, M. (2006). Current trends of β -galactosidase application in food technology. *Journal of Food and Nutrition Research*, 45(2), 47–54.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York.
- Santos, A., Ladero, M., & García-Ochoa, F. (1998). Kinetic modeling of lactose hydrolysis by a β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 22(7), 558–567.
- Saqib, S., Akram, A., Halim, S.A., & Tassaduq, R. (2017). Sources of β -galactosidase and its applications in food industry. *3 Biotech*, 7, 79.
- Seyis, I., & Aksoz, N. (2004). Production of lactase by *Trichoderma* sp. *Food Technology and Biotechnology* 42, 121–124.
- Shaikh, S., Khire, J., & Khan, M. (1997). Production of β -galactosidase from thermophilic fungus *Rhizomucor* sp. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 19, 239–245.
- Shaikh, S., Khire, J., & Khan, M. (1999). Characterization of a thermostable extracellular β -galactosidase from a thermophilic fungus *Rhizomucor* sp. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1472(1–2), 314–322.
- Silva, M.E.D., & Franco, T.T. (1999). Purification of microbial β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis* by bioaffinity partitioning. *Revista de Microbiologia*, 30, 324–331.
- Silvério, S.C., Macedo, E.A., Teixeira, J.A., & Rodrigues, L.R. (2018). New β -galactosidase producers with potential for prebiotic synthesis. *Bioresource Technology*, 250, 131–139.
- Singh, R.V., & Sambyal, K. (2023). β -Galactosidase as an industrial enzyme: Production and potential. *Chemical Papers*, 77(1), 11–31.
- Skory, C.D., & Ibrahim, A.S. (2007). Native and modified lactate dehydrogenase expression in a fumaric acid producing isolate *Rhizopus oryzae* 99-880. *Current Genetics*, 52(1), 23–33.
- Spatafora, J.W., Chang, Y., Benny, G.L., Lazarus, K., Smith, M.E., Berbee, M.L., Bonito, G., Corradi, N., Grigoriev, I., Gryganskyi, A., James, T.Y., O'Donnell, K., Roberson, R.W., Taylor, T.N., Uehling, J., Vilgalys, R., White, M.M., & Stajich, J.E. (2016). A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia*, 108(5), 1028–1046.
- Srivastava, D., & Walker, J. (1959). Mechanisms of infection of sweet potato roots by *Rhizopus stolonifer*. *Phytopathology*, 49, 400–406.
- Taherzadeh, M.J., & Edebo, L. (2009). Exploring zygomycetes fungi for industrial applications. *New Biotechnology*, 25(Supplement), S83.
- Tahiri, G., Lax, C., Cánovas-Márquez, J.T., Carrillo-Marín, P., Sanchis, M., Navarro, E., Garre, V., & Nicolás, F.E. (2023). Mucorales and mucormycosis: Recent insights and future prospects. *Journal of Fungi*, 9(3), 335.
- Tamang, J.P., & Thapa, S. (2006). Fermentation dynamics during production of bhaati jaanr, a traditional fermented rice beverage of the Eastern Himalayas. *Food Biotechnology*, 20(3), 251–261.
- Taniguchi, A.Y., & Takano, K. (2004). Purification and properties of β -galactosidase from *Tilapia intestine*: Digestive enzyme of Tilapia-X. *Fisheries Science*, 70(4), 688–694.
- Thoma, J., Stenitzer, D., Grabherr, R., & Staudacher, E. (2022). Identification, characterization, and expression of a β -galactosidase from *Arion* species (Mollusca). *Biomolecules*, 12(11), 1578.
- Van Heerden, I., Cronjé, C., Swart, S., & Kotzé, J. (2002). Microbial, chemical and physical aspects of citrus waste composting. *Bioresource Technology*, 81(1), 71–76.
- Vera, C., Córdova, A., Aburto, C., Guerrero, C., Suárez, S., & Illanes, A. (2016). Synthesis and purification of galacto-oligosaccharides: State of the art. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32, 197.
- Vidya, C., Kumar, B.G., Chinmayee, C.V., & Singh, S.A. (2020). Purification, characterization and specificity of a new GH family 35 galactosidase from *Aspergillus awamori*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 156, 885–895.
- Vincze O. (2013). Elterő laktóz átalakítási módszerek továbbfejlesztése és optimalizálása, in: Tanulmányok az Eszterházy Károly Főiskola tudományos diákköreinek tudományos tevékenységéből (2011–2013). Eger, Eszterházy Károly Főiskola Líceum Kiadó, pp. 655-692.

- Vishwanataha, T., Sampath, A., Jain, S.N., Divyashree, B., Reena, V., Sowmya, G., MohanKumar, B., Venugopal, N., Patil, S.J., & Siddalingeshwara, K.G. (2012). A novel approach for screening and synthesis of β -galactosidase from microbial origin. *International Journal of Applied Biotechnology and Biochemistry*, 2, 285–290.
- Volford, B., Varga, M., Szekeres, A., Kotogán, A., Nagy, G., Vágvölgyi, C., Papp, T., & Takó, M. (2021). β -Galactosidase-producing isolates in Mucoromycota: Screening, enzyme production, and applications for functional oligosaccharide synthesis. *Journal of Fungi*, 7(3), 229.
- Walsh, T., Groll, A., Hiemenz, J., Fleming, R., Roilides, E., & Anaissie, E. (2004). Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. *Clinical Microbiology and Infection*, 10, 48–66.
- Walther, G., Wagner, L., & Kurzai, O. (2019). Updates on the taxonomy of Mucorales with an emphasis on clinically important taxa. *Journal of Fungi*, 5(4), 106.
- Ward, O. (1995). Microbial production of long-chain PUFAs. *Inform*, 6, 683–688.
- Xie, J., Wang, B., He, Z., & Pan, L. (2020). A thermophilic fungal GH36 α -galactosidase from *Lichtheimia ramosa* and its synergistic hydrolysis of locust bean gum. *Carbohydrate Research*, 491, 107911.
- Yamada, H. (1992). Production of dihomono- γ -linolenic acid, arachidonic acid and eicosapentaenoic acid by filamentous fungi, in: Kyle, D., & Ratledge, C. (eds.), Industrial applications of single cell oil. AOCS Publishing, New York, pp. 118–138.
- Yamada, M., Chiba, S., Endo, Y., & Isobe, K. (2017). New alkalophilic β -galactosidase with high activity in alkaline pH region from *Teratosphaeria acidotherma* AIU BGA-1. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 123(1), 15–19.
- Yang, J., Li, Q., Du, W., Yao, Y., Shen, G., Jiang, W., & Pang, Y. (2021). Genome-wide analysis of Glycoside Hydrolase Family 35 genes and their potential roles in cell wall development in *Medicago truncatula*. *Plants*, 10(8), 1639.
- Yuan, T., Yang, P., Wang, Y., Meng, K., Luo, H., Zhang, W., Wu, N., Fan, Y., & Yao, B. (2008). Heterologous expression of a gene encoding a thermostable β -galactosidase from *Alicyclobacillus acidocaldarius*. *Biotechnology Letters*, 30, 343–348.
- Zhang, Z., Jin, B., & Kelly, J. (2007). Production of lactic acid from renewable materials by *Rhizopus* fungi. *Biochemical Engineering Journal*, 35, 251–263.
- Zhou, Q.Z., & Chen, X.D. (2001). Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Biochemical Engineering Journal*, 9(1), 33–40.
- Zhou, Y., Liu, Y., Gao, F., Xia, Z., Zhang, Z., Addai, F.P., Zhu, Y., Chen, J., Lin, F., & Chen, D. (2024). β -Galactosidase: Insights into source variability, genetic engineering, immobilisation and diverse applications in food, industry and medicine. *International Journal of Dairy Technology*, 77(3), 651–679.
- Zhou, Z., He, N., Han, Q., Liu, S., Xue, R., Hao, J., & Li, S. (2021). Characterization and application of a new β -galactosidase Gal42 from marine bacterium *Bacillus* sp. BY02. *Frontiers in Microbiology*, 12, 742300.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban szeretnék köszönetet mondani volt és jelenkori Prof. Dr. Vágvölgyi Csaba és Prof. Dr. Papp Tamás tanszékvezetőknek, amiért lehetővé tették, hogy munkámat a Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszékén végezhessem.

Óriási köszönettel tartozom témavezetőimnek, Dr. Takó Miklósnak és Dr. Nagy Gábornak, hogy felajánlották nekem ezt a kutatási lehetőséget és munkám során szakmai segítségükkel, kitartó támogatásukkal hozzájárultak annak sikeres elvégzéséhez. Továbbá köszönetem szeretném kifejezni a végtelen türelemért, kedvességért, amit felém és hallgató társaim felé egyaránt tanúsítottak, valamint dolgozatom alapos átnézése végett.

Külön köszönettel tartozom Kovács Tamás PhD hallgatónak a dolgozatom végső részéhez szükséges mérések kivitelezéséhez, megvalósításához nyújtott segítsége és tanácsai miatt.

Szeretnék köszönetet mondani a SZTE TTIK Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék 309-es labor összes munkatársának, hallgatójának a tőlük kapott rengeteg segítségért, tanácsért, és a jó hangulatú munkanapokért.

Végül hatalmas hálával tartozom családomnak és barátaimnak a sok gondoskodástért, támogatásért, amit tőlük kaptam tanulmányaim során.

A kutatást a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal FK 134886 és a TKP2021-EGA-28 projektek támogatták. A dolgozattal kapcsolatos kutatásokhoz az infrastrukturális háttérrel a GINOP-2.3.3-15-2016-00006 számú, „Mikrobiális génbankhoz kapcsolódó integrált élettudományi és hatóanyag kutatás-fejlesztési centrum” című pályázat biztosította.