

37. OTDK BIOLÓGIA SZEKCIÓ

Egy *Lichtheimia ramosa* glikozid hidroláz 31 fehérje termeltetése heterológ rendszerben

Készítette:

Reznyák Brigitta

Biológus MSc I. évfolyam

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar

Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék

Témavezetők:

Dr. Nagy Gábor, tudományos munkatárs

Dr. Takó Miklós, egyetemi adjunktus

2025

1. Tartalomjegyzék

1. Tartalomjegyzék.....	2
2. Bevezető.....	4
2.1. A Járomspórás gombák jellemzése.....	4
2.2. A Mucorales rend jellemzése	4
2.2.1. A <i>Lichtheimia</i> nemzetség	5
2.3. Glikozidázok.....	5
2.3.1. α -Glükózidáz	6
2.3.2. GH31 fehérjecsalád általános jellemzése	7
2.4. Heterológ fehérje termeltetés.....	7
2.4.1. <i>Escherichia coli</i>	7
2.4.2. <i>Komagataella phaffii</i>	8
3. Célkitűzés.....	11
4. Anyagok és módszerek	12
4.1. Alkalmazott mikroorganizmusok	12
4.2. Alkalmazott táptalajok és tápoldatok	12
4.3. Alkalmazott oldatok, pufferek és reagensek.....	13
4.3.1. Gélelektroforézishez használt anyagok	13
4.3.2. Fehérjetisztításhoz használt oldatok:.....	13
4.3.3. Poliakrilamid gél festéséhez használt oldatok.....	14
4.3.4. Fehérje biokémiai vizsgálatához használt pufferek.....	14
4.4. Indítószekvenciák	14
4.5. Gének izolálásához és kifejeződésének vizsgálatához alkalmazott módszerek	15
4.5.1. DNS és RNS kivonás	15
4.5.2. Agaróz gélelektroforézis	15
4.5.3. Plazmid DNS izolálás.....	15
4.5.4. DNS visszaizolálása agaróz gélből.....	15
4.5.5. cDNS szintézis (reverz transzkripció).....	16
4.5.6. Alkalmazott PCR technikák és reakciókörülmények.....	16
4.5.6.1 A <i>gh31</i> gének felszaporításához használt reakciókörülmények	16
4.5.6.2 Valós idejű PCR reakciók a transzkripciós szintek meghatározásához	17
4.6. Génklónozás során alkalmazott módszerek, plazmidkonstrukciók létrehozása.....	17
4.6.1. Restrikciós emésztések, ligálás	17
4.6.2. Szekvenálás ellenőrzése	18

4.6.3.	Plazmid DNS tisztítása	18
4.6.4.	Baktérium transzformáció	18
4.7.	<i>Komagataella phaffii</i> transzformálása elektroporációval	18
4.8.	<i>Komagataella</i> fermentáció folyadékkultúrában	19
4.9.	A fehérjék tisztítása	20
4.10.	Tisztított enzim vizsgálata	20
4.10.1.	Enzimaktivitás meghatározása, szubsztrátspecifitás	20
4.10.2.	Fehérjekoncentráció meghatározása	21
4.10.3.	Denaturáló gélelektroforézis	21
4.10.4.	A hőmérséklet optimum és stabilitás vizsgálata	21
4.10.5.	A pH optimum és stabilitás vizsgálata	22
5.	Eredmények	23
5.1.	A <i>Lichtheimia ramosa gh31a</i> és <i>gh31b</i> gének kifejeződésének vizsgálata	23
5.2.	A GH31 fehérje termeltetése heterológ rendszerben	24
5.2.1.	Vektorkonstrukciók szerkesztése heterológ termeltetéshez	24
5.2.2.	A transzformánsok ellenőrzése	25
5.2.3.	<i>Komagataella</i> fermentáció	25
5.3.	A megtermeltetett enzimfehérje tisztítása és vizsgálata	26
5.3.1.	A termeltetett enzimfehérje tisztítása	26
5.3.2.	Enzimaktivitás és szubsztrátspecifitás meghatározás	28
5.3.3.	A hőmérséklet optimum vizsgálata	29
5.3.4.	A pH optimum és stabilitás vizsgálata	29
6.	Diszkusszió	31
7.	Irodalomjegyzék	33
8.	Köszönetnyilvánítás	38

2. Bevezető

2.1. A Járomspórás gombák jellemzése

A járomspórás gombákat korábban egységesen a Zygomycota törzsbe sorolták, melyet az új molekuláris vizsgálatokat követően felosztották Mucoromycota és Zoopagomycota törzsekre (Spatafora és mtsai., 2016). Ivaros szaporodásuk a két gametangium fúziójával létrejött zigospórákkal, ivartalan szaporodásuk pedig a sporangiumokban képződő sporangiospórákkal történik (Spatafora és mtsai., 2016; Walther és mtsai., 2019). Közös jellemzőik a sejtfalukban található kitin és kitozán, valamint a cönocitikus, anasztomózisos hifa-rendszer (Naranjo-Ortiz és Gabaldón, 2019).

A Mucoromycota gombák a sokoldalú anyagcseréjüknek köszönhetően rendkívül változatos helyeken fordulnak elő, más-más életmódhoz alkalmazkodva a megfelelő működésükhöz szükséges enzimeket és anyagokat nagy mennyiségben termelik; legyen szó hidrolitikus enzimekről vagy védelmi fehérjékről (Lübeck és Lübeck, 2022). Ebből kifolyólag ezen fajok izolálása talajból, növényi törmelékekből vagy trágyából is történt már (Spatafora és mtsai., 2016).

2.2. A Mucorales rend jellemzése

A Mucorales rend a Mucoromycota törzs legnagyobb fajsámú csoportja (Spatafora és mtsai., 2016). Legtöbb fajuk szaprotróf életmódot folytat, de akadnak közöttük állatok, növények és gombák parazitái is (Naranjo-Ortiz és Gabaldón, 2019; Spatafora és mtsai., 2017; Walther és mtsai., 2019). Jelentős károkat tudnak okozni a gyümölcsfák megbetegítésével, valamint főleg immunszupprimált betegek szervezetét megfertőzve mikózisok kialakulásához vezetnek (Spatafora és mtsai., 2017).

Ennek ellenére rengeteg pozitív és hasznos tulajdonsággal rendelkeznek az ipar számára. Rendkívül hatékony sejtgyárak: lipidek, szerves savak (pl. citromsav), fehérjék, pigmentek, alkoholok, extracelluláris enzimek, köztük amilázok és cellulázok előállítására is használják őket. Élelmiszeriparban sajtfélék készítésénél, valamint különböző ázsiai élelmiszerek erjesztésénél használják őket (Lübeck és Lübeck, 2022; Naranjo-Ortiz és Gabaldón, 2019).

A baktériumokkal és élesztőkkel szembeni előnye a célfehérjék termeltetésére az erőteljes szekréciós útvonalaikban vannak, valamint az, hogy az eukarióta fehérjék poszttranszlációs módosításait is el tudják végezni, mint például a glikozilálást (Lübeck és Lübeck, 2022).

2.2.1. A *Lichtheimia* nemzetség

A *Lichtheimia* nemzetség tagjai szaprotróf életmódot folytatnak, tehát főleg talajból és növényi korhadékokból izolálható gombák. Többségük termotoleráns, 20 °C és 53 °C között képesek növekedni, de legintenzívebben 37 °C-on nőnek. Jelenleg hat fajt tartanak számon ezen nemzetségen belül: *Lichtheimia corymbifera*, *Lichtheimia ramosa*, *Lichtheimia hyalospora*, *Lichtheimia ornata*, *Lichtheimia sphaerocystis* valamint a *Lichtheimia brasiliensis* (de A. Santiago és mtsai., 2014; Schwartze és mtsai., 2014).

A *L. ramosa* többféle enzim termelésére is képes: β -mannozidáz (Xie és mtsai., 2019), α -galaktozidáz (Xie és mtsai., 2020), amiláz (De Oliveira és mtsai., 2016), β -glükózidáz (Garcia és mtsai., 2015), xilanáz (Alvarez-Zúñiga és mtsai., 2017) és karboximetil-celluláz (CMCáz) (Silva és mtsai., 2013).

2.3. Glikozidázok

A glikozidázok, vagy glikozid hidrolázok (EC (Enzyme Commission) 3.2.1.x) egy rendkívül széles körben elterjedt, a glükóz-anyagcserében jelentős szerepet játszó enzimcsoport, melyek O-glikozidos kötéseket bontanak, miközben monoszacharidokat szabadítanak fel (Lu és mtsai., 2023; Naumoff, 2011). A glikozidázokat kódoló gének néhány archea és eukarióta sejten kívül valamennyi élőlényben megtalálhatóak (Naumoff, 2011). Prokariótákban extra- és intracellulárisan is megtalálhatóak; az extracelluláris enzimek a biopolimerekből való tápanyagszerzésben fontosak. A magasabb rendű szervezetekben a Golgi-apparátusban és az endoplazmatikus retikulumban helyezkednek el egyes intracelluláris formák. Részt vehetnek vírusos valamint bakteriális fertőzési folyamatokban, áttétképződésben (Brás és mtsai., 2014), és glikoproteinek lebontásában és bioszintézisében, valamint sejtfal átalakításában (Arumapperuma és mtsai., 2023).

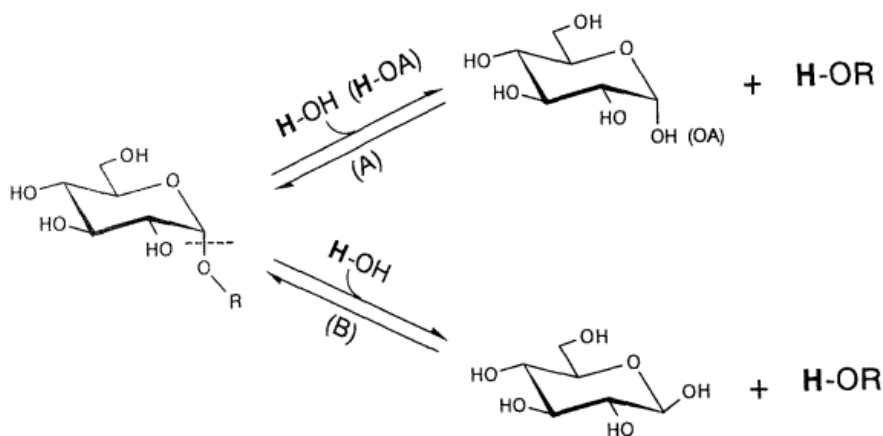
Megfelelő körülmények között az általuk katalizált hidrolitikus reakció megfordítható és glikozidos kötések kialakítására is képesek. Ehhez szükség van a szubsztrát magas

koncentrációjára, szerves oldószer hozzáadására és magas hőmérsékletre. Mivel ezek az enzimek olcsók és könnyen hozzáférhetőek, ezért a fordított hidrolízis gazdaságilag igen kedvelt eljárás (Plou és mtsai., 2007).

Osztályozásuk történhet aszerint, hogy hol képesek hasítani az oligo-, illetve poliszacharidokat. Így megkülönböztetünk exo- és endoglikozidázokat. Az exoglikozidázok az oligo-, vagy poliszacharidok terminális végén (általában a nem redukáló vég), míg az endoglikozidázok a lánc közepén lévő glikozidos kötéseket hasítják. Az osztályozásuk emellett történhet még az enzimek sztereokémiai aktivitása alapján, vagyis aszerint, hogy a szubsztrát anomer konfigurációja fordított vagy megtartott marad (Brás és mtsai., 2014; Naumoff, 2011).

2.3.1. α -Glükózidáz

Az α -glükózidázok (EC 3.2.1.20.) az oligoszacharidok nem redukáló végéről a glikozid kötés felbontásával α -glükózt szabadítanak fel (Lu és mtsai., 2023). A hidrolitikus reakció a glükózil-maradék anomer szénatomja és a glükozidos oxigén (C_1-O) közötti kötés hasadásával megy végbe, majd a vízből (vagy akceptorból) származó proton és a glükózil-maradék közötti csere zajlik le, melyet a 1. ábra szemléltet (Chiba, 1997).



1. ábra. Az α -glükózidáz hidrolitikus reakció sémája (Chiba, 1997).

A különböző α -glükózidáz típusok mikroorganizmusokban, növényi és állati szövetekben, gombákban, baktériumokban és archeákban is széles körben elterjedtek. Szubsztrátspecifitásuk alapján három fő csoportba sorolható az enzim. Az I. típusúak heterogén kötéseket (pl. szacharóz) bontanak első sorban, míg a II. és III. típusúak a homogén kötések (pl. maltóz, keményítő) felbontását részesítik előnyben (Chiba, 1997; Yi és mtsai., 2023).

Az emberi szervezetben is fontos szerepet tölt be az enzim, ugyanis a lizoszómákban található glikogén metabolizmusban vesz részt. Aktivitásának hiányában glikogén-raktározási betegség alakul ki (II. típusú glikogén-raktározási betegség; Pompe-kór) (Chiba, 1997).

Az iparban a termotabil α -glükózidázokat a keményítő glükózszirupká történő átalakítására használják. A transzglikozidációs reakciókat katalizáló enzimeket pedig a biotechnológiában használják előszeretettel élelmiszer-oligoszacharidok előállítására, illetve biológiailag hasznos anyagok cukorral való konjugációjára (Zhou és mtsai., 2009).

2.3.2. GH31 fehérjecsalád általános jellemzése

A glikozid hidroláz 31 (GH31) család rendkívül változatos hidrolitikus aktivitással rendelkező enzimekkel rendelkezik: 3- α -izomaltoziltranszferázok, α -glükózidázok, α -xilozidázok, α -mannozidázok, 6- α -glükóziltranszferázok, α -galaktozidázok, α -1,3-glükózidázok, szulfokinovozidáz (Sul), szukráz-izomaltáz (SI) és maltáz glükoamiláz (MGAM) (da Costa-Latgé és mtsai., 2021; Yi és mtsai., 2023).

2.4. Heterológ fehérje termeltetés

2.4.1. *Escherichia coli*

Az *Escherichia coli* egészségügyi, élelmiszer mikrobiológiai és laboratóriumi szempontból egyaránt fontos Gram-negatív baktérium. Heterológ fehérjetermeltetésre előszeretettel alkalmazott mikroorganizmus. Előnye a gyors szaporodási képesség, tápanyagigénye egyszerű összetételű és olcsó, fehérje expressziója pedig kiemelkedő (Karbalaie és mtsai., 2020). Hátrányai, hogy nem képes poszttranszlációs módosítások végrehajtására, diszulfidhidakat csak korlátozottan képesek kialakítani. A heterológ fehérjék termeltetése során azok intracelluláris aggregációja történhet, valamint a szekréciós mechanizmus hiánya miatt nem képes a fehérjéket a környezetbe szekretálni (Karbalaie és mtsai., 2020; Makrides, 1996). Néhány példa rekombináns fehérjék *E. coli* baktériumban való heterológ termeltetésére a 1. táblázatban van feltüntetve.

1. táblázat. Néhány példa *Escherichia coli* baktériummal történő heterológ fehérje termeltetésre.

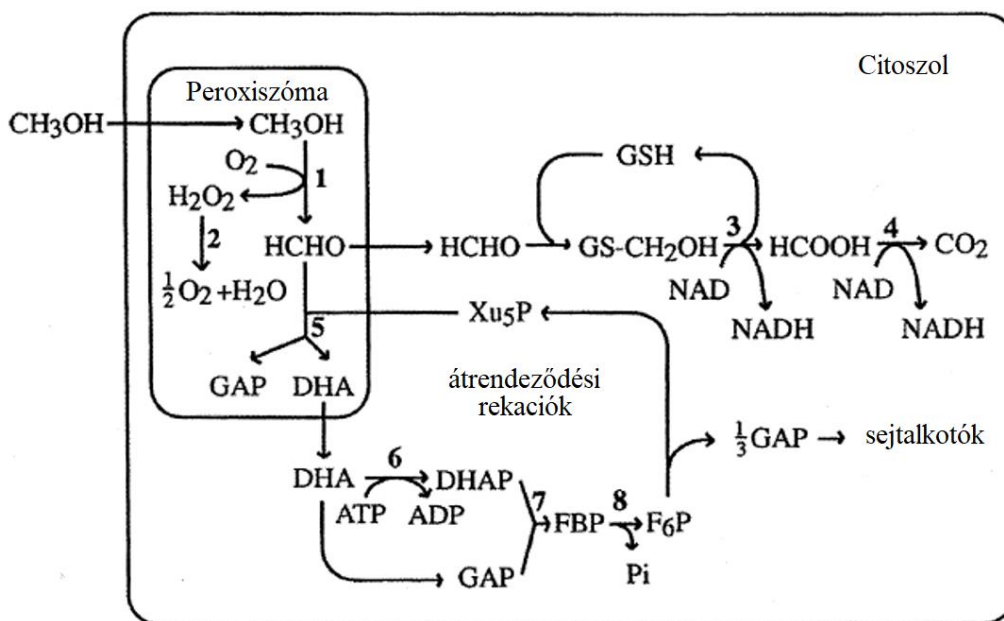
Rekombináns fehérje	Kiinduló organizmus	Forrás
mersacidin	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	(Viel és mtsai., 2021)
Sup35 fehérje	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(Wang és mtsai., 2022)
CaCYP707A fehérje	Chili paprika	(Kim és Joung, 2023)
CARD TX	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	(Cheng és mtsai., 2017)
VEGFR2 (vaszkuláris endoteliális növekedési faktor receptor 2)	<i>Homo sapiens</i>	(Cheng és mtsai., 2017)
RVs (Rubella vírus strukturális poliprotein)	Rubella vírus	(Cheng és mtsai., 2017)
Omp85 (külső membránfehérje)	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	(Cheng és mtsai., 2017)
HV3	<i>Hirudo orientalis</i>	(Cheng és mtsai., 2017)
hER-E/F (humán ösztrogén receptor ligandkötő domain)	<i>Homo sapiens</i>	(Nygaard és Harlow, 2001)
CD44	<i>Homo sapiens</i>	(Dyson és mtsai., 2004)
Epha2 (Eph receptor A2)	<i>Mus musculus</i>	(Dyson és mtsai., 2004)
Trp53	<i>Mus musculus</i>	(Dyson és mtsai., 2004)

2.4.2. *Komagataella phaffii*

A *Komagataella phaffii* egy metilotróf élesztő, mely alkalmas, mind intra-, mind pedig extracelluláris enzimtermelésre. Maga az élesztő csak kis mennyiségben választ ki endogén fehérjéket, így az általunk megkívánt szekretált heterológ fehérje fogja alkotni a közegben lévő fehérjék többségét. Ennek rendkívül nagy előnye van a tisztításban (Cereghino és Cregg, 2000).

A *K. phaffii* előnye a gyors és nagy sejtszámú növekedés. Fehérjéket nagy mennyiségben képes termelni (Ergün és mtsai., 2021), poszttranszlációs módosításokat végre tud hajtani, például N- és O-glikozidos kötések kialakítását, valamint diszulfidhidak képzésére is képes. Ezen utóbbiak azért is fontosak, mert számos fehérje csak ezen módosítások következtében lesz biológiailag aktív (Karbalaie és mtsai., 2020; Krainer és mtsai., 2012).

Fontos jellemzője, hogy a metanolt egyedüli szénforrásként képes hasznosítani (Krainer és mtsai., 2012). A metanol hasznosulásának útvonalát a 2. ábra szemlélteti.



2. ábra. A metanol hasznosulási útvonal *K. phaffii*-ban (Cereghino és Cregg, 2000).
 GAP: glicerinaldehid-3-foszfát; DHA: dihidroxi-aceton; DHAP: dihidroxi-aceton-foszfát;
 FBP: fruktóz-1,6-biszfoszfát; GSH: glutation; Xu5P: xilulóz-5-foszfát; F6P: fruktóz-6-foszfát;
 Enzimek: 1: alkohol oxidáz; 2: kataláz; 3: formaldehid-dehidrogenáz; 4: formiát-dehidrogenáz;
 5: dihidroxi-aceton-szintáz; 6: dihidroxi-aceton-kináz; 7: fruktóz-1,6-biszfoszfát-aldoláz; 8: fruktóz-1,6-biszfoszfátáz

Genomjában két gén is kódol alkohol-oxidáz (AOX) aktivitással rendelkező enzimeket, az AOX1-et és az AOX2-t. Különbség a promóterük erősségében van, melyet kihasználva különböző expressziós törzsek kialakítása lehetséges. A metanol hasznosítás tekintetében tehát három fenotípust különböztetünk meg: Mut⁺, ahol mindkettő AOX gén ép és aktív, Mut^S esetén az AOX1 gén ki van kapcsolva; és a Mut⁻, ahol pedig mindkét gén kiütésre kerül, ebből kifolyólag a *K. phaffii* nem képes metanolon, mint egyedüli szénforráson növekedni. Azok a törzsek, ahol mindkét gén aktív, általában nagyobb növekedésre képesek (Krainer és mtsai., 2012). A *K. phaffii*-t, mint expressziós rendszert évtizedek óta használják fehérjék termeltetésére, melyekre néhány példát a 2. táblázat mutat.

2. táblázat. *K. phaffii* által termeltetett fehérjék.

Rekombináns fehérje	Kiinduló organizmus	Forrás
β -galaktozidáz	<i>Escherichia coli</i>	(Tschopp és mtsai., 1987)
Staphylokinase	<i>Staphylococcus aureus</i>	(Miele és mtsai., 1999)
lizozim	házi tyúk	(Mine és mtsai., 1999)
felszíni antigén (HBsAg)	Hepatitis B vírus	(Chiou és mtsai., 1997)
lipáz B	<i>Candida antarctica</i>	(Valero, 2018)
kitináz I.	homokibab	(Landim és mtsai., 2017)
fitokróm A (phA)	zab	(Kneip és mtsai., 1997)
LL37	fehérvérsejtek (neutrofil); epithel sejtek	(Zhan és mtsai., 2021)
azurin	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(Unver és mtsai., 2021)
urikáz	<i>Aspergillus flavus</i>	(Khaleghi és Asad, 2021)

3. Célkitűzés

Csoportunk korábban vizsgálta a *Lichtheimia ramosa* SZMC (SZMC=Szeged Mikrobiológiai Gyűjtemény) 11360 gombatörzs glikozidáz termelését búzakorpát tartalmazó szilárd fázisú fermentációban (Volford és mtsai., 2021). Natív-PAGE-en történő elválasztást követő tömegspektrometriai elemzés során olyan, a GH31 családba tartozó fehérjét azonosítottak, mely vélhetően α -glükózid kötést hasít. *In silico* elemzéssel a *L. ramosa* genomban azonosítottak kettő feltételezett GH31, vélhetően α -glükózidáz enzimet kódoló gént is. A *Lichtheimia* gombák glikozidáz aktivitásairól kevés információ áll rendelkezésünkre. Munkánkban ezért célul tűztük ki a *L. ramosa* SZMC 11360 gombatörzs GH31 α -glükózidáz enzimjét kódoló gének kifejeződésének vizsgálatát, az enzim heterológ rendszerben történő termeltetését, valamint az enzim gyakorlati felhasználás szempontjából jelentős biokémiai tulajdonságainak vizsgálatát.

Ennek érdekében az alábbi konkrét célokat fogalmaztuk meg:

1. A *L. ramosa* SZMC 11360 GH31 α -glükózidáz enzimet kódoló gének kifejeződésének vizsgálata valós idejű-kvantitatív PCR segítségével.

Célul tűztük ki feltételezett GH31 α -glükózidáz enzimfehérjét kódoló gének kifejeződésének vizsgálatát búzaborpa alapú tápközegen.

2. A GH31 α -glükózidáz enzimfehérje termeltetése heterológ rendszerben.

A fehérje heterológ rendszerben történő termeltetéséhez *Komagataella phaffii*-t használunk, mely igen gyakran alkalmazott élesztő különböző fehérjék termeltetéséhez.

3. A megtermeltetett enzimfehérje tisztítása és biokémiai vizsgálata.

Célul tűztük ki, hogy jellemezzük a termeltetett fehérje enzimaktivitását affinitás kromatográfiával történő tisztítást követően, valamint egyes biokémiai tulajdonságait (pl. hőmérséklet, pH optimum) is meghatározzuk.

4. Anyagok és módszerek

4.1. Alkalmazott mikroorganizmusok

A kísérleteink során a *Lichtheimia ramosa* SZMC 11360 törzsét használtuk a GH31 enzim tanulmányozására. A gombatörzs a Szegedi Mikrobiológiai Gyűjteményből (<http://szmc.hu>) származott, fenntartása malátás táptalajon történt. A baktérium transzformációhoz „Fast and Go” *Escherichia coli* DH5α (Zymo Research) sejteket használtunk a gyártó utasításai szerint. A fehérje heterológ termeléséhez a *Komagataella phaffii* KM71H és X-33 jelű törzseket (Invitrogen) alkalmaztuk a gyártó utasításai szerint.

4.2. Alkalmazott táptalajok és tápoldatok

Malátás táptalaj (MEA): 1% (m/V) D-glükóz; 0,5% (m/V) élesztőkivonat; 1% (V/V) malátakivonat; 2% (m/V) agar

Búzakorpát tartalmazó táptalaj: 5% (m/V) búzakorpa; 1% (m/V) szójaliszt; 2% (m/V) agar

Luria-Bertani (LB) táptalaj és tápoldat: 1% (m/V) tripton; 0,5% (m/V) élesztőkivonat; 1% (m/V) NaCl; táptalaj esetén még 2% (m/V) agar. Ampicillint is tartalmazó táptalaj esetén 100 µg/ml koncentrációban adtunk hozzá ampicillint (Sigma-Aldrich).

Lenox tápoldat: 1% (m/V) tripton; 0,5% (m/V) élesztőkivonat; 0,5% (m/V) NaCl; táptalaj esetén még 2% (m/V) agar. Zeocint is tartalmazó táptalaj esetén 25 µg/ml koncentrációban adtunk hozzá zeocint (Thermo Fisher Scientific).

YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose Medium): 1% (m/V) élesztőkivonat; 2% (m/V) pepton; 2% (m/V) dextróz (glükóz); táptalaj esetén 2% (m/V) agar.

YPDS (Yeast Extract Peptone Dextrose Medium - sorbitol): 1% (m/V) élesztőkivonat; 2% (m/V) pepton; 2% (m/V) dextróz (glükóz); 15% (m/V) szorbitol; táptalaj esetén még 2% (m/V) agar.

BMGH (Buffered Minimal Glycerol): 10% (V/V) 1 M kálium-foszfát (pH 6,0); 10% 10x (V/V) YNB (élesztő nitrogén forrás); 0,2% (m/V) biotin; 10% (V/V) 10x glicerol

BMMH (Buffered Minimal Methanol): 10% (V/V) 1 M kálium-foszfát (pH 6,0); 10% (V/V) 10x YNB (minimál táptalaj); 0,2% (m/V) biotin; 10% (V/V) 10x metanol

4.3. Alkalmazott oldatok, pufferek és reagensek

4.3.1. Gélelektroforézishez használt anyagok

TAE puffer: 40 mM Tris-ecetsav (pH 7,6); 1 mM Na₂EDTA

Agaróz gél: fragmentum méretétől függően 0,8-2% agaróz TAE-pufferben oldva

Etídium-bromid törzsoldat (Sigma-Aldrich): 10 mg/ml desztillált vízben oldva

Mintapuffer: 6x DNS mintapuffer (Thermo Fisher Scientific)

Molekulasúly marker: 1 kb DNS marker (Thermo Fisher Scientific); steril desztillált víz – molekulasúly marker – 6x DNS mintapuffer 4:1:1 arányú keveréke

4.3.2. Fehérjetisztításhoz használt oldatok:

Sóalanításhoz:

Mosópuffer 1 (500 ml): 11,185 g KCl, 3,4 g KH₂PO₄, 0,17 g imidazol (Sigma-Aldrich); 500 ml desztillált víz; pH 8,0

Affinitás kromatográfiához:

Mosópuffer 1 (200 ml): 4,474 g KCl, 1,36 g KH₂PO₄, 0,068 g imidazol (Sigma-Aldrich), 200 ml desztillált víz; pH 8,0

Mosópuffer 2 (200 ml): 4,474 g KCl, 1,36 g KH₂PO₄, 0,132 g imidazol (Sigma-Aldrich), 200 ml desztillált víz; pH 8,0

Natív elúciós puffer (300 ml): 6,711 g KCl, 2,04 g KH₂PO₄, 5,106 g imidazol (Sigma-Aldrich), 300 ml desztillált víz; pH 8,0

Acetát puffer (50 mM, 1000 ml): 4,1 g nátrium-acetát, 450 µl ecetsav, 1000 ml végtérfogatig desztillált víz; pH 6,0

4.3.3. Poliakrilamid gél festéséhez használt oldatok

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) Na₂S₂O₃

Festő oldat: 0,2% (V/V) AgNO₃

Előhívó oldat: 0,0004% (V/V) Na₂S₂O₃, 6% (m/V) NaCO₃, 0,05% (V/V) formaldehid

4.3.4. Fehérje biokémiai vizsgálatához használt pufferek

McIlvaine-féle pufferoldat (50 mM): 200 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O és 100 mM citromsav x H₂O

Acetát puffer (100 mM; pH 5,0)

Nátrium-karbonát puffer (100 mM)

4.4. Indítószekvenciák

A PCR kísérletek során alkalmazott indítószekvenciákat és azok nukleotid sorrendjét a 3. táblázatban foglaltuk össze.

3. táblázat. A qPCR reakciókhoz és a heterológ túltermeltetéshez használt indítószekvenciák.

Indítószekvencia kódja	Nukleotid sorrend, 5'-3'	Termék
A kvantitatív valós-idejű PCR reakciókhoz használt indítószekvenciák		
GH31artP1	TCCATTGACCCATATTCCTATCC	gh31a gén
GH31artP2	ATATACAAACGACCAGAAGCAC	
GH31brtP1	CTGAAGCATTACGCAAAGCAC	gh31b gén
GH31brtP2	AAGCACTTGTGTTGCATGATCC	
Lracin1rtfw	GACTGAAGCACCTTTGAACC	aktin
Lracin1rtrev	CCAGAGTCAAGCACAATACC	
A Gh31a fehérje heterológ termeltetéséhez használt indítószekvenciák		
GH31acDNSfw	ATGAGGAAACTTTCTCCTATTCTC	gh31a gén cDNS szekvenciája
GH31acDNSrev	CTAATGGAAAGTGATGGTAAACTTG	
GH31aPhefw/XhoI	TTACTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCT GATGTGCAGTTCAATGTTCTG	gh31a gén heterológ expressziójához
GH31aPherevHIS/NotI	TTAGCGGCCGCCTAATGATGATGATGATG ATGGAAAGTGATGGTAAACTTG	
Szekvenáláshoz használt indítószekvenciák		
AOX5	GACTGGTTCCAATTGACAAGC	
AOX3	CGAATAATTAGTTGTTTTTT	

* az aláhúzott nukleotidok az endonukleázok felimerési helyét jelölik.

4.5. Gének izolálásához és kifejeződésének vizsgálatához alkalmazott módszerek

4.5.1. DNS és RNS kivonás

A DNS kivonást Quick DNA Fungal/Bacterial miniprep kit (Zymo Research) segítségével végeztük a gyártó utasítását követve.

Az *L. ramosa* gombából való RNS kivonáshoz a Quick-RNA MiniPrep Kitet (Zymo Research) használtuk a gyártó utasításainak megfelelően. A kinyert RNS mennyiségét NanoDrop spektrofotométerrel (ND-1000 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific) határoztuk meg.

4.5.2. Agaróz gélelektroforézis

A kinyert mintákhoz (DNS, RNS, PCR) mintafelvivő puffert (6x Loading puffert, Thermo Fisher Scientific) adtunk, majd 0,8%-os agaróz gélben (RNS esetén 1,5-2%), 80-110 V feszültséggel, 40-50 percen keresztül futtattuk a mintákat. Az agaróz gél elkészítéséhez és a futtatópufferhez is TAE puffert használtunk, továbbá a gél 0,5 µg/ml etídium-bromidot tartalmazott. Az RNS fragmentumokat a hozzájuk adott etídium-bromidnak köszönhetően UV fény alatt detektálhatjuk. A fragmentumok méretének meghatározásához 1 kb DNS létra (Thermo Fisher Scientific) molekulasúly markereket használtunk.

4.5.3. Plazmid DNS izolálás

A plazmidok izolálása Zyppy Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research) segítségével történt a gyártó utasításainak megfelelően.

4.5.4. DNS visszaizolálása agaróz gélből

A visszaizolálni kívánt fragmentumokat tartalmazó gélrészletet steril szikével UV lámpa alatt kivágtuk a gélből, majd a Zymoclean Large fragment DNA Recovery Kit (Zymo Research) segítségével nyertük ki a gyártó utasításainak megfelelően.

4.5.5. cDNS szintézis (reverz transzkripció)

A DNáz kezelt RNS mintákból a reverz transzkripciót Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific) segítségével végeztük el. A reakcióhoz oligo(dT)18 és random hexamer primereket használtunk a gyártó utasításainak megfelelően.

4.5.6. Alkalmazott PCR technikák és reakciókörülmények

Kísérleteink során különböző PCR technikákat alkalmaztunk. A PCR reakciókat ProFlex PCR rendszerben (Thermo Fisher Scientific) végeztük, a real-time PCR esetében C1000 Thermal Cycler készüléket és CFX96 Real-Time System (Bio-Rad) detektáló rendszert használtunk.

4.5.6.1 A *gh31* gének felszaporításához használt reakciókörülmények

A *gh31* gének cDNS-ének *L. ramosa* genomi DNS-ből történő felszaporításához, valamint a *Komagataella* transzformációt követően a *gh31* gének jelenlétének az igazolásához a Phusion Flash High-Fidelity PCR Enzim Mix-et (Thermo Fisher Scientific) használtuk a gyártó ajánlásai szerint. A reakciókat 20 µl végtérfogatban mértük össze a következők szerint:

150-200 ng cDNS

0,4-0,4 µM specifikus indítószekvencia (3. táblázat)

1x Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix

A felszaporítás körülményei:

98 °C	1 perc	1 ciklus	elődenaturálás
98 °C	10 mp	30 ciklus	denaturálás
60 °C	1 mp		primer kötődés
72 °C	45 mp		láncszintézis
72 °C	1 perc	1 ciklus	végző láncszintézis

4.5.6.2 Valós idejű PCR reakciók a transzkripció szintek meghatározásához

A méréseket RNS-ből reverz transzkripcióval előállított cDNS felhasználásával végeztük el. A reakciókat Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Scientific) segítségével mértük össze. A nyert eredményeket a $2^{-\Delta\Delta C_t}$ módszer segítségével értékeltük ki (Livak és Schmittgen, 2001). A reakciók összemérése 20 μ l végtérfogatban történt 96 lyukú lemezeken:

20-50 ng DNS vagy cDNS

0,4 μ M - 0,4 μ M specifikus indítószekvencia (3. táblázat)

1x Maxima SYBR Green qPCR Master Mix

95 °C	3 perc	1 ciklus	kezdeti denaturáció
95 °C	1 perc	40 ciklus	denaturáció
60 °C	0,5 perc		primerkötődés
72 °C	0,5 perc		láncszintézis

Olvadási görbe analízis:

55 °C -95 °C 10 másodperc 0,5 °C -onként emelkedő hőmérséklet

4.6. Génklónozás során alkalmazott módszerek, plazmidkonstrukciók létrehozása

4.6.1. Restriktációs emésztések, ligálás

A restriktációs emésztéseket, ligálásokat az általánosan használt módszerek szerint végeztük (Sambrook és mtsai., 1989) követve a gyártók utasításait, valamint optimalizálva az adott kísérleti körülményekhez. A DNS fragmentumokat a CloneJet PCR cloning Kit-ben található pJET1.2 (Thermo Scientific) klónozó vektorba építettük a gyártó utasításait követve.

A heterológ termeltetéshez szükséges vektorkonstrukciók első lépéseként felszaporítottuk a *L. ramosa* α -glükózidázt kódoló gén (*gh31a*) cDNS-ét, melyet egy ligálási lépéssel pJet 1.2 klónozó vektorba raktuk be. Ezt a plazmidot ezután PCR technika segítségével felszaporítottuk olyan indítószekvenciákkal, melyeket tudunk majd használni a heterológ kifejeződéshez (3. táblázat). Ezt a végső expressziós kazettát, mely tartalmazza az *Komagataella* α -szignál szekvenciáját és a rátervezett hisztidin (His) címkét egy újabb pJet 1.2 klónozó vektorba ligáltuk. A hat hisztidint tartalmazó címke a fermentációt követő gyorsabb és egyszerűbb tisztítást teszi lehetővé. A létrehozott pJet 1.2 konstrukciót *Xho*I és *Not*I endonukleázokkal hasítottuk, majd az így kapott DNS fragmentet a végső heterológ expressziót

lehetővé tevő pPiczaA vektorba ligáltuk, így megkapva a pPicza_gh31a vektort. A pPicza_gh31a vektort *PmeI* endonukleázzal linearizáltuk és ezt a linearizált vektort használtuk a transzformációs kísérletekhez.

4.6.2. Szekvenálás ellenőrzése

A létrehozott expressziós vektor szekvenálással történő ellenőrzését az LGC Genomics (Berlin) végezte az AOX5 és AOX3 indítószekvenciák (3. táblázat) felhasználásával.

4.6.3. Plazmid DNS tisztítása

Plazmid DNS tisztításához a ZymoPURE Plasmid Miniprep Kit-et (Zymo Research) használtuk a gyártó utasításait követve.

4.6.4. Baktérium transzformáció

Száz µl fagyasztva tárolt „Fast and Go” *E. coli* DH5α (Zymo Research) kompetens sejtet jégen felolvasztottunk, majd 15-25 µl ligátumot adtunk hozzá és a baktériumokat 5 percig jégen inkubáltuk. Ezt követően 37 °C-on előmelegített ampicillin (100 µg/ml) vagy zeocin tartalmú (25 µg/ml) LB táptalajra szélesztettük. A Petri-csészéket 16 órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk.

4.7. *Komagataella phaffii* transzformálása elektroporációval

A *K. phaffii* (korábban: *Pichia pastoris*) transzformációjához az EasySelect Pichia Expression Kit-et (Invitrogen) alkalmaztuk a gyártó utasításainak megfelelően. Öt ml YPD tápoldatba 30 °C-on egy éjszakán át növesztettük a *K. phaffii* sejteket. Másnap 500 ml tápoldatba beoltottunk 0,1-0,5 ml-nyit, az előző este növesztett kultúrából. Az élesztőket ismét egy éjszakát hagytuk növekedni, amíg az OD₆₀₀ el nem érte az 1,3-1,5-öt. Ezután a sejteket 5 percig, 4 °C-on 1500×*g*-n centrifugáltuk. A pelletet 500 ml steril, jéghideg vízben felvettük, majd ismét centrifugálás következett. A fugálás után a pelletet 250 ml steril, jéghideg vízben felvettük és ismét egy centrifugálás következett, végül 20 ml jéghideg 1 M-os szorbitolba vettük fel a sejteket. Ezután egy végső centrifugálási lépést követően a pelletet 1 ml jéghideg 1 M-os szorbitolban felvettük. Ezt követően ebből 80 µl mennyiséghez hozzáadtunk 5-10 µg linearizált DNS-t majd az elektroporációs küvettába pipettázzuk. Kontrollként az üres pPiczaA vektort használtuk. A jégen történő 5 perces inkubációt követően az elektroporációt MicroPulser

Electroporator (Bio-Rad) készülékkel hajtottuk végre a gyárilag beprogramozott *Pichia* programmal. Elektroporációt követően a sejtekhez azonnal 1 ml jéghideg 1 M-os szorbitolt adtunk. A kűvetta tartalmát ezután egy 15 ml-es csőbe helyezve 30 °C-on 1-2 órán át inkubáltuk. Az inkubációs idő lejártá után a sejteket zeocin (100 µg/ml) tartalmú YPDS csészékre szélesszűnk szét 10, 15, 50, 100 és 200 µl mennyiségben. A csészéket 30 °C-on inkubáltuk 3-10 napon keresztül a kolóniák megjelenéséig, majd a megjelenő kolóniákat egy újabb zeocin (100 µg/ml) tartalmú YPDS csészére átolítottuk.

4.8. Komagataella fermentáció folyadékkultúrában

A rekombináns, *L. ramosa* GH31a fehérje, *K. phaffii* alapú rendszerben való termeltetésére kisléptékű (termelés ellenőrzése) és nagyléptékű (fehérje tisztítása) sülylesztett fermentációs rendszereket alkalmaztunk. A *K. phaffii* sejteket 5 ml (kisléptékű fermentáció), vagy 10 ml (nagyléptékű fermentáció) zeocint tartalmazó YPD-be leoltottuk, majd 16 órán keresztül 30 °C-on 260 rpm-en ráztuk. Másnap a tenyészetet kisléptékű fermentáció esetén 100 ml, nagyléptékű fermentáció esetén 500 ml BMGH tápoldattal reszuszpendáltuk és a következő napig 30 °C hőmérsékleten 200 rpm rázatás mellett inkubáltuk ($OD_{600}=2-6$). Az inkubálást követően a sejteket centrifugálással ($4000\times g$, 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 ($16200\times g$, 20 perc), majd a sejtmentes felülúszót α -glükózidáz aktivitás és fehérjekoncentráció mérésekig -20 °C hőmérsékleten tároltuk. A fehérje tisztításához készített nagyléptékű fermentációból centrifugálással ($16200\times g$, 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.

4.9. A fehérjék tisztítása

A gélszűréssel kapcsolt puffercserélő lépések elvégzéséhez a Bio-Scale Mini Bio-Gel P-6 (50 ml vagy 5 ml, Bio-Rad) oszlopokat használtuk. Affinitás kromatográfiához az EconoFit Profinity IMAC (Bio-Rad) oszlopot használtuk. Az egyes tisztítási lépéseket Bio-Rad Duo-Flow alacsony nyomású folyadékkromatográfiás (FPLC) rendszer (Bio-Rad) használatával végeztük.

A tisztítás első lépéseként a termeltetett fermentléből 10 ml mennyiséget gélszűrtünk Bio-Gel P6 oszlopon (50 ml). A szűrés során a felvitt mintához 9 ml/perc-es átfolyási sebességgel adtuk a mosópuffer 1 oldatot, így az előtisztított fehérje minta kis mennyiségű imidazolt is tartalmazott az ezt követő affinitás kromatográfiai tisztítás hatékonyságának javítása érdekében. Az affinitás kromatográfiához először mosópuffer 1 oldattal ekvibráltuk az oszlopot, majd a következő lépésben felvittük a sómentesített (10 ml) mintánkat. Ezt követően egy újabb mosópuffer 1 oldattal (30 ml) történő mosás következett, majd 30 ml térfogat mosópuffer 2 oldattal (nagyobb imidazol koncentráció) történő mosás. Végző lépésként izokratikusan 50 ml térfogat 250 mM imidazol tartalmú elúciós puffert vittünk fel a rendszerre. Mindegyik lépésnél 5 ml/perc-es átfolyási sebességet alkalmaztunk. Az affinitás kromatográfiát követően a fehérjét tartalmazó frakciót (2 ml) Bio-Gel P6 oszlopra (5 ml) vittük, melyet előzőleg acetát pufferrel (50 mM, pH 6,0) ekvibráltunk. A fehérjét az oszlopról acetát pufferrel (50 mM, pH 6,0), 1 ml/perc átfolyási sebesség alkalmazásával eluáltuk. Az így kapott fehérjetartalmú frakciót ezután -20 °C hőmérsékleten tároltuk további felhasználásig.

4.10. Tisztított enzim vizsgálata

4.10.1. Enzimaktivitás meghatározása, szubsztrátspecifitás

A tisztítás előtt és után enzimaktivitást és szubsztrátspecifitást vizsgáltunk a következő szubsztrátokkal: *p*-nitrofenil-N-acetil- β -D-glükózaminid, *o*-nitrofenil β -D-galaktopiranozid, *p*-nitrofenil β -D-galaktopiranozid, *p*-nitrofenil α -D-galaktopiranozid, *p*-nitrofenil β -D-glükopiranozid és *p*-nitrofenil α -D-glükopiranozid 7 mM koncentrációjú oldat formájában, nátrium-acetát pufferben (50 mM, pH 6,0) feloldva.

A méréshez 90 μ l enzimkivonatot és 10 μ l szubsztrátoldatot vittünk fel a mikrotiterlemez (Sarstedt) mintahelyeire. Az inkubáció 40 °C-on 1 órán keresztül történt, majd

a reakciót 25 µl nátrium-karbonát (100 mM) oldattal állítottuk le. A *p*-nitrofenol felszabadulását 405 nm hullámhosszon végzett spektrofotometriai méréssel követtük (SPECTROstar Nano mikrotiterlemez olvasó, BMG Labtech).

4.10.2. Fehérjekoncentráció meghatározása

A liofilizált izolátum és a tisztítási lépések után kapott frakciók fehérjekoncentráció meghatározása Qubit fluorometer (Invitrogen) és Quant-iT™ Protein Assay Kit (Invitrogen) segítségével történt a gyártó utasításainak megfelelően. A műszer kalibrálása 0 ng/µl, 200 ng/µl és 400 ng/µl koncentrációjú fehérje standard felhasználásával történt.

4.10.3. Denaturáló gélelektroforézis

A fehérjék nátrium-lauril-szulfát poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) történő elválasztását vertikális futtató kádban (Mini-PROTEAN Tetra System, Bio-Rad) elhelyezett 12%-os poliakrilamid gélen (Mini-PROTEAN TGX, Bio-Rad) végeztük, NuPAGE 2-N-morfolin-etánszulfonsav (MES) nátrium-lauril-szulfát (SDS) futtató puffer (20x, Life Technologies) felhasználásával.

A fehérjék láthatóvá tételére ezüstfestést alkalmaztuk. A gél fixáló oldatban inkubáltuk két órán át, majd a fixáló oldat eltávolítása céljából háromszor 20 percig 20%-os etanolos mosást végeztünk. Ezt követően érzékenyítő oldatban (0,02% nátrium-tiosulfát) inkubáltuk a gél két percig, majd kétszer 1 perces desztillált vizes öblítést végeztünk. Ezután ezüst-nitrát oldatban (0,2% AgNO₃) 20 percig festettük a gél, majd ismét 1 perces desztillált vizes mosást végeztünk. Végül a gél előhívó oldattal mostuk a megfelelő festődés eléréséig. Az előhívást 96%-os ecetsavval állítottuk le.

4.10.4. A hőmérséklet optimum és stabilitás vizsgálata

A hőmérséklet optimum vizsgálatához alkalmazott reakcióelegy: 0,1 U ml⁻¹ enzim, 0,7 mM *p*-nitrofenil α-D-glükopiranozid, 0,1 M acetát puffer (pH 5,0). Az elegyeket 20, 30, 40, 50, 60, 70 és 80 °C hőmérsékleten inkubáltuk 30 percig. Ezt követően az abszorbancia mérés 405 nm hullámhosszon történt (SPECTROstar Nano mikrotiterlemez olvasó, BMG Labtech).

4.10.5. A pH optimum és stabilitás vizsgálata

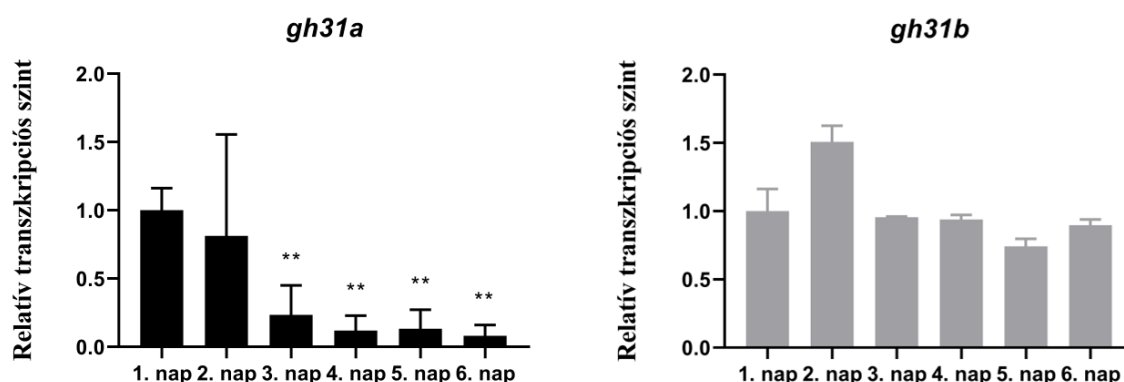
A pH optimum vizsgálatához alkalmazott reakcióelegy: 0,1 U ml⁻¹ enzim, 0,7 mM *p*-nitrofenil α -glükopiranozid, 50 mM McIlvaine-féle pufferoldat (pH 3,0 - 7,4; McIlvaine, 1921). Az elegyeket 30 percig inkubáltuk 50 °C-on. A pH stabilitás vizsgálatához alkalmazott reakcióelegy: 0,1 U ml⁻¹ enzim, 50 mM McIlvaine-féle pufferoldat (pH 3,0 - 7,4). A reakcióelegyeket 24 órán át 4 °C-on tartottuk, majd 0,7 mM *p*-nitrofenil α -glükopiranozid szubsztrát hozzáadását követően 30 percig inkubáltunk 50 °C-on. Mindkét esetben az abszorbanciamérés 405 nm hullámhosszon történt (SPECTROstar Nano mikrotiterlemez olvasó, BMG Labtech).

5. Eredmények

5.1. A *Lichtheimia ramosa* *gh31a* és *gh31b* gének kifejeződésének vizsgálata

Munkánkat megelőző kutatások az *L. ramosa* SZMC 11360 törzs kiváló glikozidáz termelő képességét azonosították (Volford és mtsai., 2021). A gombából tisztított fehérjék tömegspektrometriai elemzése feltételezhetően α -glükozid kötések bontására képes GH31 enzim jelenlétét mutatta ki. Emellett *in silico* elemzések kimutatták, hogy a *L. ramosa* genomjában kettő feltételezett, GH31 családba tartozó, vélhetően α -glükozidáz aktivitást mutató fehérjét kódoló gén található (*gh31a* és *gh31b*). Jelen munkában így megkezdjük vizsgálni az *L. ramosa* SZMC 11360 *gh31a* és *gh31b* gének relatív transzkripció szintjét. A kísérlethez a gombát búzakorpa tartalmú táptalajon tenyésztettük, a transzkripció szintet valósidejű kvantitatív PCR segítségével vizsgáltuk. A búzakorpa szénhidrátokban, fehérjékben, lipidekben, vitaminokban és ásványi anyagokban gazdag szubsztrátokból áll (De Oliveira és mtsai., 2016). Ennek használatával kívántuk indukálni az enzimtermelést. Referencia génként a *L. ramosa* aktin génjét választottuk. Az RNS kivonáshoz a gombát 6 napon keresztül 37 °C hőmérsékleten tenyésztettük a búzakorpát tartalmazó táptalajon. A gének kifejeződésének vizsgálatát mindegyik inkubációs napra vonatkozóan elvégeztük.

A 3. ábrán látható, hogy a két gén különböző expressziót mutatott. A *gh31a* esetében az első és a második napon magas expressziós szint volt megfigyelhető, majd a harmadik naptól szignifikánsan csökkent, míg a *gh31b* esetében viszonylag állandó szintet mutatott.

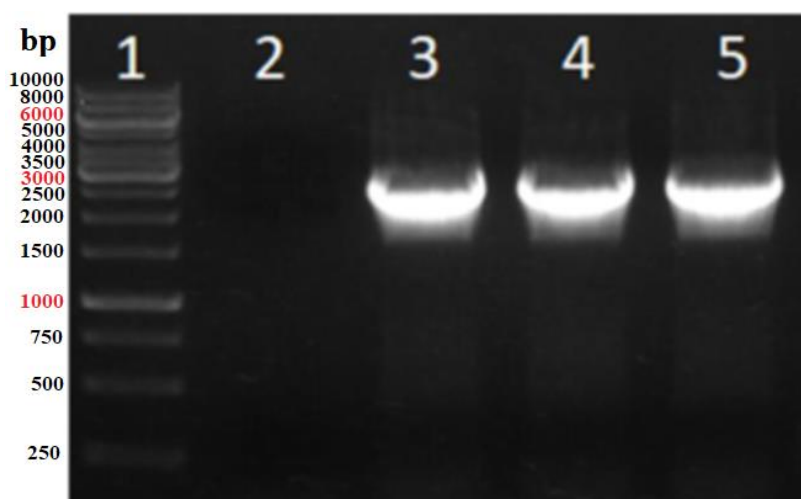


3. ábra. *L. ramosa* *gh31a* és *gh31b* génjeinek relatív transzkripció szintjei búzakorpán történő tenyésztés esetén. Kontrollként az 1. napon mért értéket vettük 1-nek. A digrammon 3 egymástól független mérés eredményeinek átlagát ábrázoltuk. A szignifikancia értéke:

****** $p < 0.01$.

5.2.2. A transzformánsok ellenőrzése

A transzformáció sikerességének ellenőrzésére a *Komagataella*-ból genomi DNS-t vontunk ki, majd PCR segítségével ellenőriztük a *Lichtheimia gh31a* gén integrálódását az élesztő genomjába. Az 5. ábrán látható, hogy a specifikus indítószekvenciákkal felszaporított, GH31a fehérje kódoló gén jelen van a mintánkban (lásd 3-4-5. mintahelyek). A 2. mintahelyre kontrollként az üres plazmidot tartalmazó *K. phaffii* KM71H törzset vittük fel (5. ábra).



5. ábra. *Komagataella phaffii* transzformánsok ellenőrzése

1. Molekulaméret marker, 2. *K. phaffii* KM71H az üres plazmiddal, 3-4-5. *K. phaffii* a *pPICZα + LrGH31a*-val

5.2.3. *Komagataella* fermentáció

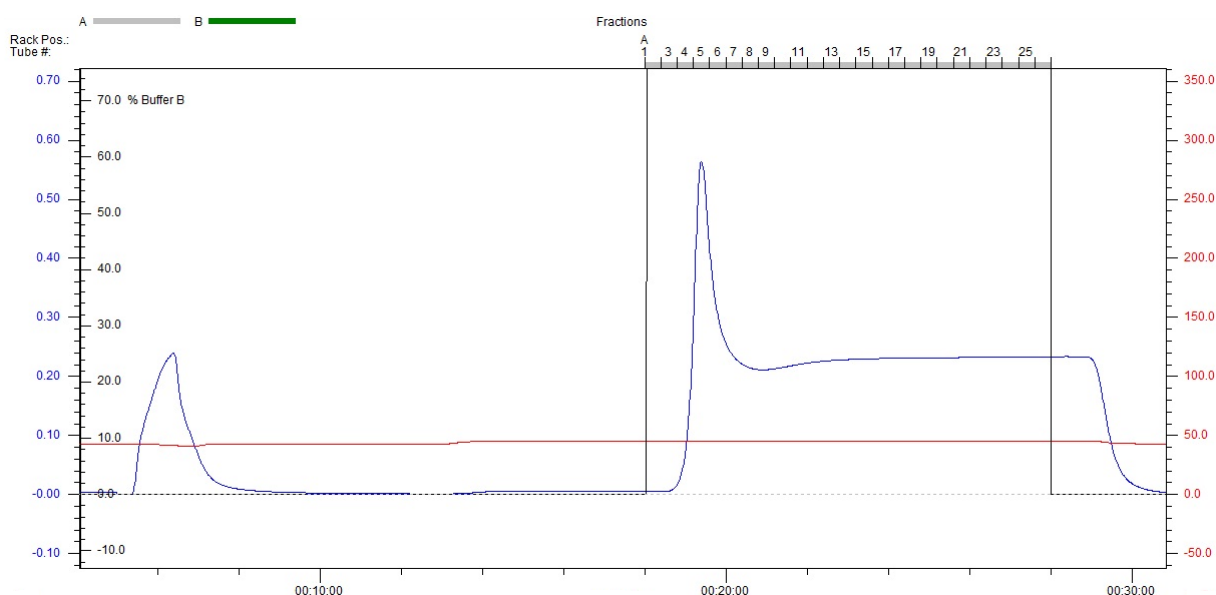
Miután megbizonyosodtunk a transzformáció sikerességéről, megkezdhattuk a GH31a fehérje *K. phaffii* élesztővel való heterológ termeltetését. Először kis-, majd nagyléptékű fermentációt alkalmaztunk. A kisléptékű fermentációra azért volt szükség, hogy optimalizáljuk a termelés idejét. A leoltástól számított 4. napon értük el a fehérjetermelés maximumát, ezért a nagyléptű fermentációt már csak 4 napig végeztük.

A tisztítás megkezdése előtt végeztünk egy enzimaktivitás és szubsztrátspecifitás vizsgálatot, ahol kimutatható volt az α -glükozidáz aktivitás, így megkezdhattuk a minta tisztítását.

5.3. A megtermeltetett enzimfehérje tisztítása és vizsgálata

5.3.1. A termeltetett enzimfehérje tisztítása

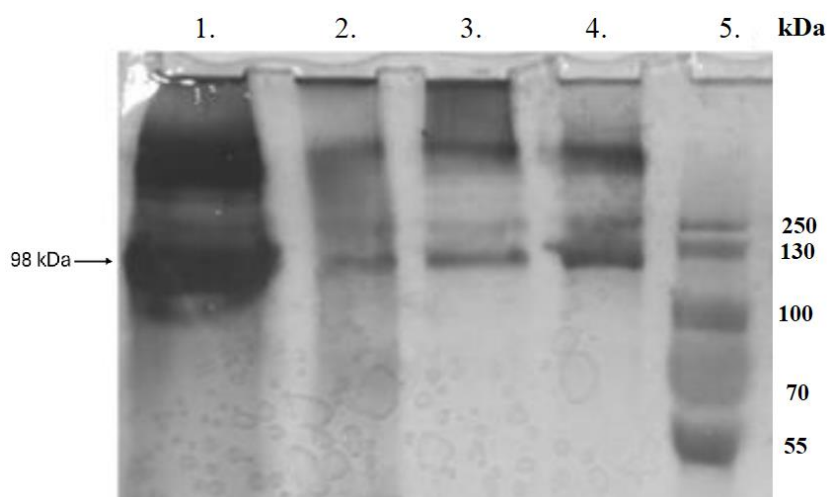
A *K. phaffii* alapú rendszerben termeltetett His címkét tartalmazó GH31a fehérje tisztításához a BioLogic DuoFlow™ FPLC rendszert (Bio-Rad) használtuk, az egyes tisztítási lépéseknek megfelelő oszlopok csatlakoztatásával. A His címkézett fehérjék általában nagyobb affinitással rendelkeznek, mint a gyantához nem specifikusan kötődő fehérjék, ennek köszönhetően a rendelkezésre álló kötőhelyek többségét ezen fehérjék teszik ki (Bornhorst és Falke, 2000). Az első gélszűrést (Bio-Gel P-6, 50 ml) követő affinitás kromatográfiával (IMAC) végzett tisztítás kromatogramját a 6. ábra mutatja. Az izokratikus mosással végzett elúció során a 4. és 5. frakcióknál egy nagy méretű fehérjecsúcsot kaptunk (6. ábra).



6. ábra. A *L. ramosa* SZMC 11360 GH31a fehérje affinitás kromatográfiával való tisztításának kromatogramja. A sorszámozott frakciók az izokratikus mosás alatt vett mintákat jelölik.

Az IMAC oszlop gyártója (Bio-Rad) által az affinitás kromatográfiához javasolt pufferek kálium-sókkal készültek a nagyobb stabilitás érdekében, illetve magas imidazol tartalom is jellemzi azokat. A kálium jelenlét a denaturáló gélelektroforézist zavarhatja, míg az imidazol az enzimaktivitás méréseknél okozhat gátló hatást. Ennek elkerülésére a gélen történő futtatást megelőzően a mintánkat 50 mM-os acetát pufferbe (pH 6,0) helyeztük egy második gélszűrés (Bio-Gel P-6, 5 ml) tisztítási lépés beiktatásával.

A tisztítási lépéseket követően a fehérjék elválasztását SDS poliakrilamid gélen végeztük. A minta fehérjeit ezüsfestéssel tettük láthatóvá, melyet a 7. ábra szemléltet. A denaturáló gélen nem csak egy határozott fehérjesávot kaptunk (7. ábra). Ugyan a termeltetett fehérjénk egyértelműen jelen van, az affinitás kromatográfiával történő tisztítás még további polírozó lépéseket igényel. A tisztítás optimalizálása jelenleg is folyamatban van.



7. ábra. A *L. ramosa* SZMC 11360 GH31a fehérje tisztulásának ellenőrzése SDS-PAGE analízissel követve.

1. Liofilizált minta; 2. Első géliszűrés (Bio-Gel P-6, 50 ml) utáni minta; 3. IMAC affinitás kromatográfia utáni minta (5. frakció); 4. Második géliszűrés (Bio-Gel P-6, 5 ml) utáni minta; 5. Molekulaméret marker; A nyíl a megtermeltetett fehérjét jelöli.

A fermentlé töményítése céljából liofilizáltuk a kiindulási mintát. A kezdeti koncentrált fermentlében, valamint az egyes tisztítási lépések során kapott, termelt fehérjét tartalmazó frakciókban mért fehérje koncentrációkat a 4. táblázat szemlélteti. Az adatok alapján a tisztított enzimre 146,2 U/mg fehérje specifikus aktivitást kaptunk.

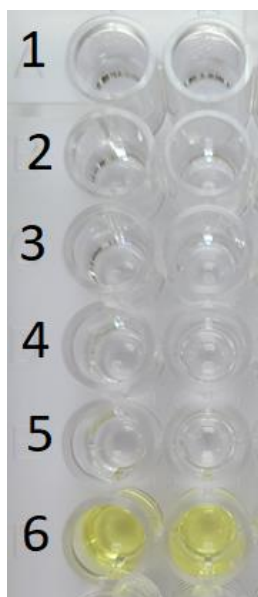
4. táblázat. A *L. ramosa* SZMC 11360 GH31a fehérje egyes tisztítási lépéseit követően kapott fehérje koncentrációk.

	Liofilizált izolátum	Puffercsere (P6 oszlop, 5 mM imidazol puffer)	IMAC	Puffercsere (P6 oszlop, acetát puffer)
Fehérje koncentráció	4040 µg/ml	143 µg/ml	76,2 µg/ml	117 µg/ml

5.3.2. Enzimaktivitás és szubsztrátspecifitás meghatározás

A tisztított fehérjefrakcióban enzimaktivitás mérést végeztünk *p*-nitrofenil-N-acetil- β -D-glükózaminid, *o*-nitrofenil β -D-galaktopiranozid, *p*-nitrofenil β -D-galaktopiranozid, *p*-nitrofenil α -D-galaktopiranozid, *p*-nitrofenil β -D-glükopiranozid és *p*-nitrofenil α -D-glükopiranozid kromogén szubsztrátok felhasználásával.

Az enzimaktivitás mérések során meggyőződhattünk, hogy sikeresen termeltettünk aktív GH31 enzimfehérjét, ami α -glükozidáz aktivitásának köszönhetően bontja a *p*-nitrofenil α -D-glükopiranozid szubsztrátot *p*-nitrofenolt eredményezve, melyet sárga színváltozás jelez (8. ábra). A többi szubsztrát esetében nem történt színváltozás, így kijelenthetjük, hogy az adott szubsztrátok hidrolízise nem történt meg. Azaz egy szűk szubsztrátspecifitású α -glükozidáz aktív GH31 fehérje heterológ termeltetését és izolálását végeztük el sikeresen. *Lichtheimia* gombákban ilyen jellegű vizsgálatokat eddig még nem végeztek, munkánkban izoláltunk előként GH31 fehérjét e mikroorganizmusból.



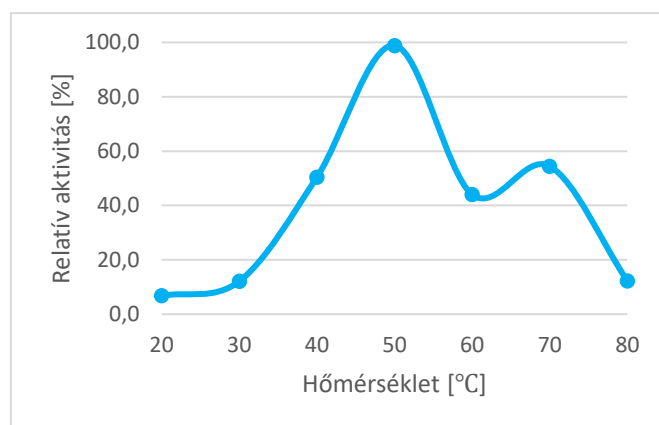
8. ábra. A tisztított *L. ramosa* SZMC 11360 GH31a enzimaktivitásának és szubsztrát specifitásának vizsgálata.

1. *p*-nitrofenil N-acetil- β -D-glükózaminid,
2. *p*-nitrofenil β -D-galaktopiranozid,
3. *o*-nitrofenil β -D-galaktopiranozid,
4. *p*-nitrofenil α -D-galaktopiranozid,
5. *p*-nitrofenil β -D-glükopiranozid,
6. *p*-nitrofenil α -D-glükopiranozid

5.3.3. A hőmérséklet optimum vizsgálata

A tisztított *L. ramosa* GH31 aktivitásának hőmérséklet optimumát 50 °C körül állapítottuk meg. Az enzimműködés relatív aktivitásának változását a 9. ábra szemlélteti, ahol látható, hogy az optimális hőmérséklet eléréseig meredek emelkedés figyelhető meg a relatív aktivitásban, majd meredek csökkenés. A 40, 60 és 70 °C inkubációs hőmérsékleteken aktivitásnak megközelítőleg a felét mutatta az enzim.

A *L. ramosa* GH31 α -glükózidáz működésének hőmérsékleti profilját eddig még nem vizsgálták. Más fonalas gomba fajokban eddig elemzett α -glükózidázok valamivel magasabb hőmérsékleti optimummal rendelkeztek. Például az *Aspergillus niveus*-ban 65 °C (Da Silva és mtsai., 2009), *Aspergillus niger*-ben pedig 60 °C (Yoshikawa és mtsai., 1994) körül azonosították az α -glükózidáz működésének optimumát. *L. ramosa* gombában glükózidázok közül eddig egy α -galaktozidázt vizsgáltak, ahol 65 °C hőmérséklet körül azonosították az enzimműködés optimumát (Xie és mtsai., 2020).

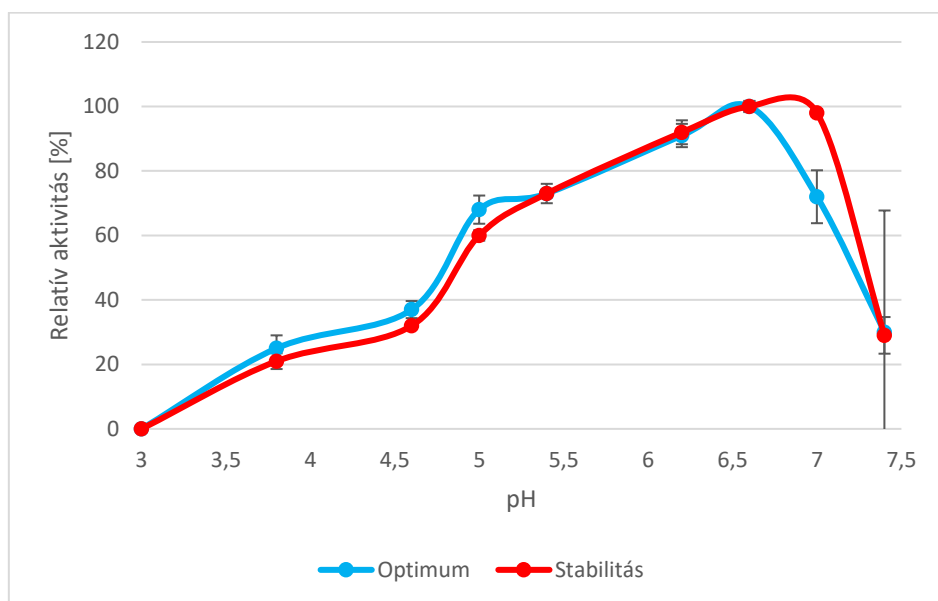


9. ábra. A *L. ramosa* GH31a enzim aktivitásának hőmérséklet függése.

5.3.4. A pH optimum és stabilitás vizsgálata

A tisztított *L. ramosa* GH31 enzimnek pH 6,6 körüli működési optimumot állapítottunk meg. Mind az aktivitás, mind a stabilitás savas kémhatáson alacsony, és lassú emelkedés figyelhető meg a 6,6-os értékig. Semleges pH-n az aktivitás csökken, de stabilitását még jól megőrzi. A relatív aktivitás pH 6,2 és 7,0 értékeknél még rendre 91% és 72% (10. ábra). Erős stabilitás figyelhető meg a pH 5,0-7,0 közötti tartományban, ahol a relatív aktivitás 60-90% között van. Más gombáknál az optimális pH-ra hasonló, enyhén savas pH értéket figyeltek meg korábban: *A. niger*-ben 5,5 pH (Yoshikawa és mtsai., 1994), *A. niveus* esetében 6,0 pH (Da

Silva és mtsai., 2009). *L. ramosa* esetében az eddig tisztított α -galaktozidázt vizsgálták, ahol a működés optimuma szintén pH 6,0 körül volt (Xie és mtsai., 2020).



10. ábra. A *L. ramosa* GH31a aktivitásának pH optimuma és stabilitása.

6. Diszkusszió

A járomspórás gombák Mucorales rendjébe tartozó fajok többsége talajban, növényi korhadékokon előforduló szaprotróf szervezet. Gazdag enzintermelésüknek köszönhetően potenciális mikroszervezetek az ipari és biotechnológiai alkalmazásokban. Ipari enzimek és szerves savak termelésére már számos járomspórás gombatörzset alkalmaznak (Naranjo-Ortiz és Gabaldón, 2019; Lübeck és Lübeck, 2022).

A glikozid hidrolázok a glükóz anyagcserében fontos szerepet játszó enzimsorozat, melyek az O-glikozidos kötéseket hidrolizálva monoszacharidokat szabadítanak fel (Naumoff, 2011; Lu és mtsai., 2023). Ezen enzimsorozat tagja az α -glükozidáz aktivitás is, mely széles körben elterjedt az élőlények között. Járomspórás gombákban, különösen a *Lichtheimia* nemzetségbe tartozó fajok esetén, a glikozidáz aktivitások ugyanakkor kevésbé vizsgáltak.

Előzetes kutatásokban csoportunk kiváló glikozidáz termelőnek azonosította a *Lichtheimia ramosa* SZMC 11360 gombatörzset. E kutatás α -glükozid kötések bontására képes GH31 enzim termelését is kimutatta. *In silico* genomelemzés pedig kettő, vélhetően α -glükozidáz aktivitást mutató glikozid hidroláz 31 (GH31) feltételezett fehérjét kódoló gént (*gh31a* és *gh31b*) is azonosított az *L. ramosa* járomspórás gombában. *Lichtheimia* gombák esetén eddig még nem vizsgálták a GH31 családba tartozó α -glükozidáz fehérjéket, azonban aszkomikóta gombák esetén már végeztek ilyen irányú kutatásokat. Fang és mtsai. (2023) például részletesen jellemezték a *Myceliophthora thermophila* fonalas aszkomikóta gomba α -glükozidázát. A filogenetikai elemzés kimutatta, hogy az aszkomikóta gombák genomjában is egynél több gén kódol a GH31 fehérjecsaládba tartozó α -glükozidázt. Jelen munkában célul tűztük ki a *L. ramosa* SZMC 11360 *gh31a* és *gh31b* gének kifejeződésének vizsgálatát, valamint a génekről levezethető feltételezett enzimfehérjék heterológ rendszerben való termeltetését.

A génkifejeződés vizsgálatához RT-qPCR technikát alkalmaztunk. A *gh31a* kifejeződése az első két napon volt jelentős mértékű, a harmadik naptól kezdve szintje szignifikánsan csökkent, ezzel szemben a *gh31b* a teljes időtartam alatt állandó szinten fejeződött ki.

Megkezdjük az azonosított *L. ramosa gh31* génekről levezethető fehérjék heterológ rendszerben történő termeltetését. A *Komagataella phaffii* élesztőt széles körben alkalmazzák különféle fehérjék heterológ rendszerben történő termeltetéséhez (Ergün és mtsai., 2021). A heterológ termeltetéshez az előkészített sejtekbe elektroporációval bejuttattuk a linearizált

DNS-t. Miután a transzformáció sikerességéről meggyőződünk, megkezdjük a nagyléptékű fermentációt, melynek során sikeresen megtermeltettük a *gh31a* gén által kódolt GH31a enzimfehérjét. Fang és mtsai. (2023) szintén sikeresen használták a *K. phaffii* GS115 jelű törzset a *M. thermophila* α -glükózidáz fehérjék (MT31 α 1 és MT31 α 2) termeltetéséhez. A *L. ramosa* SZMC 11360 GH31a fehérje tisztítását affinitás kromatográfiával végeztük, melynek lépéseit követően acetát pufferes közegbe oldottuk a már megtisztított fehérjét, majd a tisztítás ellenőrzésére SDS-gélen futtattuk meg a mintáinkat, melyeket ezüst festéssel tettünk láthatóvá. A His címkézett GH31a enzimfehérjén kívül látható volt más fehérje is a tisztított preparátumban, így további munkánkban a tisztítás optimalizálása is szükséges. A *L. ramosa* GH31a fehérje teoretikus molekulatömege 98 kDa, azonban a tisztítás során egy közel 130 kDa molekulatömegű fehérje sáv jelent meg a gélen. Hasonló eredményt kaptak *M. thermophila* gombával végzett heterológ termeltetés során is, ahol a MT31 α 1 fehérje teoretikus tömege 107 kDa, azonban a gélen egy 130 kDa tömegű fehérje jelent meg (Fang és mtsai., 2023).

A szubsztrátspecifitási vizsgálat során a felhasznált szubsztrátok közül csak az α -glükózid kötést tartalmazó *p*-nitrofenil α -D-glükopiranozid szintetikus szubsztrátot hidrolizálta a tisztított GH31a enzim. A tisztított α -glükózidáz aktivitásának hőmérsékleti és pH optimuma 50 °C és pH 6,6 körülinek bizonyult. Az enzim erős stabilitást mutatott a pH 5,0-7,0 közötti tartományokon. Egyes kutatásokban más gombafajokból származó α -glükózidáz aktivitású enzimfehérje vizsgálatokat folytattak, például *A. niger*-ben és *A. niveus*-ban, ahol az enzimaktivitás optimuma rendre 60 és 65 °C-on valamint 5,5 és 6,0 pH tartományokon volt (Yoshikawa és mtsai., 1994; Da Silva és mtsai., 2009). *M. thermophila* esetén a vizsgált α -glükózidáz fehérjék pH optimuma 4,5-5,0 (MT31 α 1), valamint 6,5-nek (MT31 α 2) bizonyult, míg hőmérsékleti optimumuk 60-65 °C-on volt (Fang és mtsai., 2023).

Munkánkban tudomásunk szerint elsőként vizsgáltuk GH31 glikozidázt kódoló gének kifejeződését *Lichtheimia* gombákban. Ezen kívül sikeresen termeltettük a *L. ramosa* SZMC 11360 törzs GH31a glikozidázát heterológ rendszerben. A termeltetett enzimre α -glükózidáz aktivitást azonosítottunk, és megkezdjük az enzim biokémiai jellemzőinek meghatározását is. Kutatásunkban elsőként írtunk le α -glükózidáz aktivitást *Lichtheimia* gombákban. További terveink között szerepel a megtermeltetett GH31 α -glükózidáz aktivitás vizsgálata különböző fémionok (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} stb.) és reagensek (EDTA, SDS, Triton-X100 stb.) jelenlétében, valamint szeretnénk a hidrolízis és transzglikozidáz aktivitás kinetikáját is vizsgálni. Folyamatban van a *gh31b* génről levezethető fehérje termeltetése és vizsgálata is.

7. Irodalomjegyzék

- Alvarez-Zúñiga, M. T., Santiago-Hernández, A., Rodríguez-Mendoza, J., Campos, J. E., Pavón-Orozco, P., Trejo-Estrada, S., & Hidalgo-Lara, M. E. (2017). Taxonomic identification of the thermotolerant and fast-growing fungus *Lichtheimia ramosa* H71D and biochemical characterization of the thermophilic xylanase LrXynA. *AMB Express*, 7(1), 194. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0494-y>
- Arumapperuma, T., Li, J., Hornung, B., Soler, N. M., Goddard-Borger, E. D., Terrapon, N., & Williams, S. J. (2023). A subfamily classification to choreograph the diverse activities within glycoside hydrolase family 31. *Journal of Biological Chemistry*, 299(4), 103038. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.103038>
- Bornhorst, J. A., & Falke, J. J. (2000). Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. In *Methods in Enzymology* (vol. 326, pp. 245–254). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(00\)26058-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(00)26058-8)
- Brás, N. F., Cerqueira, N. M., Ramos, M. J., & Fernandes, P. A. (2014). Glycosidase inhibitors: A patent review (2008 – 2013). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 24(8), 857–874. <https://doi.org/10.1517/13543776.2014.916280>
- Cereghino, J. L., & Cregg, J. M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(1), 45–66. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00532.x>
- Cheng, C., Wu, S., Cui, L., Wu, Y., Jiang, T., & He, B. (2017). A novel Ffu fusion system for secretory expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 16(1), 231. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0845-z>
- Chiba, S. (1997). Molecular Mechanism in α -Glucosidase and Glucoamylase. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 61(8), 1233–1239. <https://doi.org/10.1271/bbb.61.1233>
- Chiou, H.-L., Lee, T.-S., Kuo, J., Mau, Y.-C., & Ho, M.-S. (1997). Altered antigenicity of „a” determinant variants of hepatitis B virus. *Journal of General Virology*, 78(10), 2639–2645. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-10-2639>
- da Costa-Latgé, S. G., Bates, P., Dillon, R., & Genta, F. A. (2021). Characterization of glycoside hydrolase families 13 and 31 reveals expansion and diversification of α -amylase genes in the phlebotomine *Lutzomyia longipalpis* and modulation of sandfly glycosidase activities by *Leishmania* infection. *Frontiers in Physiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.635633>
- Da Silva, T. M., Michelin, M., De Lima Damásio, A. R., Maller, A., Almeida, F. B. D. R., Ruller, R., Ward, R. J., Rosa, J. C., Jorge, J. A., Terenzi, H. F., & De Lourdes Teixeira De Moraes Poliz, M. (2009). Purification and biochemical characterization of a novel α -glucosidase from *Aspergillus niveus*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 96(4), 569–578. <https://doi.org/10.1007/s10482-009-9372-1>
- de A. Santiago, A. L. C. M., Hoffmann, K., Lima, D. X., De Oliveira, R. J. V., Vieira, H. E. E., Malosso, E., Maia, L. C., & Da Silva, G. A. (2014). A new species of *Lichtheimia*

(Mucoromycotina, Mucorales) isolated from Brazilian soil. *Mycological Progress*, 13(2), 343–352. <https://doi.org/10.1007/s11557-013-0920-8>

De Oliveira, A. P. A., Silvestre, M. A., Garcia, N. F. L., Alves-Prado, H. F., Rodrigues, A., Paz, M. F. D., Fonseca, G. G., & Leite, R. S. R. (2016). Production and catalytic properties of amylases from *Lichtheimia ramosa* and *Thermoascus aurantiacus* by solid-state fermentation. *The Scientific World Journal*, 2016, 7323875. <https://doi.org/10.1155/2016/7323875>

Dyson, M. R., Shadbolt, S. P., Vincent, K. J., Perera, R. L., & McCafferty, J. (2004). Production of soluble mammalian proteins in *Escherichia coli*: Identification of protein features that correlate with successful expression. *BMC Biotechnology*, 4(1), 32. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-4-32>

Ergün, B. G., Berrios, J., Binay, B., & Fickers, P. (2021). Recombinant protein production in *Pichia pastoris*: From transcriptionally redesigned strains to bioprocess optimization and metabolic modelling. *FEMS Yeast Research*, 21(7), foab057. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foab057>

Fang, Y., Dong, M., van Leeuwen, S. S., Dijkhuizen, L., Meng, X., & Liu, W. (2023). Biochemical characterization of glycoside hydrolase family 31 α -glucosidases from *Myceliophthora thermophila* for α -glucooligosaccharide synthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 252, 126452. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.126452>

Garcia, N. F. L., Da Silva Santos, F. R., Gonçalves, F. A., Da Paz, M. F., Fonseca, G. G., & Leite, R. S. R. (2015). Production of β -glucosidase on solid-state fermentation by *Lichtheimia ramosa* in agroindustrial residues: Characterization and catalytic properties of the enzymatic extract. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18(4), 314–319. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2015.05.007>

Karbalaee, M., Rezaee, S. A., & Farsiani, H. (2020). *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. *Journal of Cellular Physiology*, 235(9), 5867–5881. <https://doi.org/10.1002/jcp.29583>

Khaleghi, R., & Asad, S. (2021). Heterologous expression of recombinant urate oxidase using the intein-mediated protein purification in *Pichia pastoris*. *3 Biotech*, 11(3), 120. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02670-6>

Kim, H. M., & Joung, Y. H. (2023). Heterologous expression of the hot pepper ABA 8'-hydroxylase in *Escherichia coli* for phaseic acid production. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(3), 378–386. <https://doi.org/10.4014/jmb.2301.01014>

Kneip, C., Mozley, D., Hildebrandt, P., Gärtner, W., Braslavsky, S. E., & Schaffner, K. (1997). Effect of chromophore exchange on the resonance Raman spectra of recombinant phytochromes. *FEBS Letters*, 414(1), 23–26. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)00969-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00969-1)

Krainer, F. W., Dietzsch, C., Hajek, T., Herwig, C., Spadiut, O., & Glieder, A. (2012). Recombinant protein expression in *Pichia pastoris* strains with an engineered methanol utilization pathway. *Microbial Cell Factories*, 11(1), 22. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-22>

Landim, P. G. C., Correia, T. O., Silva, F. D. A., Nepomuceno, D. R., Costa, H. P. S., Pereira, H. M., Lobo, M. D. P., Moreno, F. B. M. B., Brandão-Neto, J., Medeiros, S. C., Vasconcelos,

- I. M., Oliveira, J. T. A., Sousa, B. L., Barroso-Neto, I. L., Freire, V. N., Carvalho, C. P. S., Monteiro-Moreira, A. C. O., & Grangeiro, T. B. (2017). Production in *Pichia pastoris*, antifungal activity and crystal structure of a class I chitinase from cowpea (*Vigna unguiculata*): Insights into sugar binding mode and hydrolytic action. *Biochimie*, 135, 89–103. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.01.014>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lu, H., Xie, T., Wu, Q., Hu, Z., Luo, Y., & Luo, F. (2023). Alpha-glucosidase inhibitory peptides: sources, preparations, identifications, and action mechanisms. *Nutrients*, 15(19), 4267. <https://doi.org/10.3390/nu15194267>
- Lübeck, M., & Lübeck, P. S. (2022). Fungal cell factories for efficient and sustainable production of proteins and peptides. *Microorganisms*, 10(4), 753. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040753>
- Makrides, S. C. (1996). Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 60(3), 512–538.
- Miele, R. G., Prorok, M., Costa, V. A., & Castellino, F. J. (1999). Glycosylation of asparagine-28 of recombinant staphylokinase with high-mannose-type oligosaccharides results in a protein with highly attenuated plasminogen activator activity. *Journal of Biological Chemistry*, 274(12), 7769–7776. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.12.7769>
- Mine, S., Ueda, T., Hashimoto, Y., Tanaka, Y., & Imoto, T. (1999). High-level expression of uniformly ^{15}N -labeled hen lysozyme in *Pichia pastoris* and identification of the site in hen lysozyme where phosphate ion binds using NMR measurements. *FEBS Letters*, 448(1), 33–37. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00332-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00332-4)
- Naranjo-Ortiz, M. A., & Gabaldón, T. (2019). Fungal evolution: Diversity, taxonomy and phylogeny of the Fungi. *Biological Reviews*, 94(6), 2101–2137. <https://doi.org/10.1111/brv.12550>
- Naumoff, D. G. (2011). Hierarchical classification of glycoside hydrolases. *Biochemistry (Moscow)*, 76(6), 622–635. <https://doi.org/10.1134/S0006297911060022>
- Nygaard, F. B., & Harlow, K. W. (2001). Heterologous expression of soluble, active proteins in *Escherichia coli*: the human estrogen receptor hormone-binding domain as paradigm. *Protein Expression and Purification*, 21(3), 500–509. <https://doi.org/10.1006/prep.2001.1403>
- Plou, F. J., Segura, A. G. D., & Ballesteros, A. (2007). Application of glycosidases and transglycosidases in the synthesis of oligosaccharides. In J. Polaina & A. P. MacCabe (eds.), *Industrial Enzymes* (pp. 141–157). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/1-4020-5377-0_9
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York.

- Schwartz, V. U., De A. Santiago, A. L. C. M., Jacobsen, I. D., & Voigt, K. (2014). The pathogenic potential of the *Lichtheimia* genus revisited: *Lichtheimia brasiliensis* is a novel, non-pathogenic species. *Mycoses*, 57(s3), 128–131. <https://doi.org/10.1111/myc.12230>
- Silva, C. A. D. A., Lacerda, M. P. F., Leite, R. S. R., & Fonseca, G. G. (2013). Production of enzymes from *Lichtheimia ramosa* using Brazilian savannah fruit wastes as substrate on solid state bioprocesses. *Electronic Journal of Biotechnology*, 16(5). <https://doi.org/10.2225/vol16-issue5-fulltext-7>
- Spatafora, J. W., Aime, M. C., Grigoriev, I. V., Martin, F., Stajich, J. E., & Blackwell, M. (2017). The fungal tree of life: from molecular systematics to genome-scale phylogenies. *Microbiology Spectrum*, 5(5), 5.5.03. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0053-2016>
- 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. <https://doi.org/10.3852/16-042>
- Tschopp, J. F., Brust, P. F., Cregg, J. M., Stillman, C. A., & Gingeras, T. R. (1987). Expression of the lacZ gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*. *Nucleic Acids Research*, 15(9), 3859–3876. <https://doi.org/10.1093/nar/15.9.3859>
- Unver, Y., Sensoy Gun, B., Acar, M., & Yildiz, S. (2021). Heterologous expression of azurin from *Pseudomonas aeruginosa* in the yeast *Pichia pastoris*. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 51(7), 723–730. <https://doi.org/10.1080/10826068.2020.1855444>
- Valero, F. (2018). Recent advances in *Pichia pastoris* as host for heterologous expression system for lipases: A review. In G. Sandoval (ed.), *Lipases and Phospholipases* (vol. 1835, pp. 205–216). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8672-9_11
- Viel, J. H., Jaarsma, A. H., & Kuipers, O. P. (2021). Heterologous expression of mersacidin in *Escherichia coli* elucidates the mode of leader processing. *ACS Synthetic Biology*, 10(3), 600–608. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.0c00601>
- Volford, B., Varga, M., Szekeres, A., Kotogán, A., Nagy, G., Vágvolgyi, 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. <https://doi.org/10.3390/jof7030229>
- 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. <https://doi.org/10.3390/jof5040106>
- Wang, M., Wang, X., & Cheng, Z. (2022). Heterologous overexpression of Sup35 in *E. coli* leads to both monomer and complex states. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 90(7), 1468–1473. <https://doi.org/10.22541/au.164091147.76128407/v1>
- Xie, J., He, Z., Wang, Z., Wang, B., & Pan, L. (2019). Efficient expression of a novel thermophilic fungal β -mannosidase from *Lichtheimia ramosa* with broad-range pH stability and its synergistic hydrolysis of locust bean gum. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 128(4), 416–423. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.04.007>

- 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. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2020.107911>
- Yi, Z., Chen, L., Jin, Y., Shen, Y., Liu, N., Fang, Y., Xiao, Y., Wang, X., Peng, K., He, K., & Zhao, H. (2023). Insight into broad substrate specificity and synergistic contribution of a fungal α -glucosidase in Chinese Nong-flavor daqu. *Microbial Cell Factories*, 22(1), 114. <https://doi.org/10.1186/s12934-023-02124-z>
- Yoshikawa, K., Yamamoto, K., & Okada, S. (1994). Classification of some α -glucosidases and α -xylosidases on the basis of substrate specificity. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 58(8), 1392–1398. <https://doi.org/10.1271/bbb.58.1392>
- Zhan, N., Zhang, L., Yang, H., Zheng, Y., Wei, X., Wang, J., & Shan, A. (2021). Design and heterologous expression of a novel dimeric LL37 variant in *Pichia pastoris*. *Microbial Cell Factories*, 20(1), 143. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01635-x>
- Zhou, C., Xue, Y., Zhang, Y., Zeng, Y., & Ma, Y. (2009). Recombinant expression and characterization of *Thermoanaerobacter tengcongensis* thermostable α -glucosidase with regioselectivity for high-yield isomaltooligosaccharides synthesis. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(12), 1547–1556. <https://doi.org/10.4014/jmb.0905.05006>

8. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani Prof. Dr. Papp Tamás tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy lehetővé tette, hogy munkámat az SZTE TTIK Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszéken végezhessem.

Különösen hálás vagyok témavezetőimnek, Dr. Nagy Gábornak és Dr. Takó Miklósnak, hogy munkámat folyamatosan irányították, támogatták, akik végtelen türelemmel és támogatással hozzásegítettek a dolgozatom elkészüléséhez.

Köszönettel tartozom a 309-es labor minden dolgozójának a sok segítségért és tanácsért, amit tőlük kaptam.

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.