

***THERMOBIFIDA CELLULOSITYTICA-BÓL SZÁRMAZÓ
GH5-ÖS ENDOMANNANÁZ VIZSGÁLATA***

Szerző:

Hermán Boglárka

Szent István Egyetem
Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar
Genetika és Biotechnológiai Intézet
Mezőgazdasági biotechnológus

Témavezető:

Tóth Ákos

Szent István Egyetem
Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar
Környezet- és Tájgazdálkodási Intézet

SZEGED

2013. ÁPRILIS

TARTALOMJEGYZÉK

1.	BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK	3
2.	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	5
2.1.	A LIGNOCELLULÓZ FELÉPÍTÉSE	5
2.2.	A LIGNOCELLULÓZ BONTÁSÁNAK NEHÉZSÉGEI, LIGNOCELLULÓZ ALAPÚ BIOTECHNOLÓGIÁK.....	6
2.3.	A LIGNOCELLULÓZ HASÍTÓ ENZIMEI	8
2.4.	A GH5-ÖS ENZIMCSALÁD ÉS A B-MANNANÁZOK.....	9
2.5.	A <i>THERMOBIFIDA</i> NEMZETSÉG JELLEMZÉSE	10
2.5.1.	A <i>Thermobifida</i> nemzetség rendszertana és élettani tulajdonságai	10
2.5.2.	A <i>Thermobifidák</i> lignocellulóz bontó enzimrendszere	11
3.	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	12
3.1.	<i>T. CELLULOSILYTICA</i> TB100 ÉS <i>E. COLI</i> TENYÉSZTÉS (DNS ÉS PLAZMID IZOLÁLÁSHOZ)	13
3.2.	<i>T. CELLULOSILYTICA</i> GENOMI ÉS <i>E. COLI</i> PLAZMID DNS IZOLÁLÁSA	13
3.2.1.	Agaróz-gélelektroforézis.....	14
3.3.	A <i>T. CELLULOSILYTICA</i> TB100-BÓL SZÁRMAZÓ ENDOMANNANÁZ (MAN5A) GÉN KLÓNOZÁSA EXPRESSZIÓS RENDSZERBE	14
3.3.1.	Polimeráz-láncreakció (PCR).....	14
	Primertervezés.....	14
	Hőmérséklet optimalizálás.....	15
	PCR termék tisztítása.....	16
3.3.2.	Restriktációs emésztés	16
3.3.3.	Ligálás.....	17
3.3.4.	Transzformálás	18
3.4.	A FÚZIÓS PROTEIN TÚLTERMELTETÉSE ÉS TISZTÍTÁSA.....	19
3.4.1.	Fehérje termeltetés <i>E. coli</i> BL21 sejtekben	19
3.4.2.	A sejtek feltárása és a fúziós fehérje tisztítása.....	20
3.5.	<i>IN SILICO</i> DOMÉNSZERKEZET MEGHATÁROZÁS	20
3.6.	A <i>T. CELLULOSILYTICA</i> TB100 ENDOMANNANÁZ (MAN5A) ENZIMÉNEK RÉSZLEGES BIOKÉMIAI JELLEMZÉSE.....	21
3.6.1.	Molekulatömeg meghatározás SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel	21
3.6.2.	Hőmérséklet optimum meghatározása	22
3.6.3.	Hőmérséklet stabilitási vizsgálatok	22
3.6.4.	pH optimum meghatározása.....	22
3.6.5.	B-mannozidáz aktivitás kimutatása	22
4.	EREDMÉNYEK	23
4.1.	AZ ENDOMANNANÁZ GÉN AMPLIFIKÁCIÓJA.....	23
4.2.	TRANSZFORMÁLÁS EREDMÉNYE.....	24
4.3.	A FEHÉRJE TERMELÉS ÉS TISZTÍTÁS EREDMÉNYE	25
4.4.	<i>IN SILICO</i> DOMÉNSZERKEZET MEGHATÁROZÁS	26
4.5.	A RÉSZLEGES BIOKÉMIAI VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI.....	26
4.5.1.	Molekulatömeg meghatározás SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE)	27
4.5.2.	Hőmérséklet optimum meghatározása	27
4.5.1.	Hőmérséklet stabilitási vizsgálat	28
4.5.2.	pH optimum vizsgálat.....	29
4.5.3.	B-mannozidáz aktivitás kimutatása	30
4.6.	<i>T. FUSCA</i> ILLETVE <i>T. CELLULOSILYTICA</i> SZERVEZETBŐL SZÁRMAZÓ GH5-ÖS ENDOMANNANÁZ ENZIMEK ÖSSZEVETÉSE	30
5.	ÉRTÉKELÉS ÉS KÖVETKEZTETÉSEK.....	33
6.	ÖSSZEFOGLALÁS.....	35
7.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	36
8.	IRODALOMJEGYZÉK.....	37
9.	MELLÉKLETEK	41
	NYILATKOZAT.....	44

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

Környezetünket a fenntartható fejlődés elősegítésével kell a magunk és a jövő embere számára minél inkább eredeti formájában megőrizni, élhetőbbé tenni. Ma már elsődleges feladatunk a természeti- és a mesterséges környezet megóvása oly módon, hogy ez összhangban legyen az ember gazdasági tevékenységeivel. Az emberiség környezetre gyakorolt hatása az emberi igények növekedésével és a modern technológiák bővülésével egyre nagyobb jelentőséggel bír. Mindezek miatt egyre nagyobb az igény a hatalmas tömegben keletkező, és megújuló növényi biomassa hasznosítására, amellyel a mezőgazdasági termelés során is jelentős mennyiségben keletkező (több tízezer tonna), és a további felhasználásból kieső hulladék frakció problémája is megoldódna.

A mikroorganizmusok anyagcseréjük során szerves anyagok átalakítását is véghezviszik, ezeket a folyamatokat, és a folyamatokban részt vevő enzimeket biotechnológiai módszerekkel a hasznunkra fordíthatjuk. A biotechnológia segítségével előállított biológiai rendszerek az emberiség javát szolgálhatják az erőforrásokban egyre szűkülő világunkban. A különböző mikroszervezetek hatalmas metabolikus potenciállal rendelkeznek, így az általuk termelt enzimek ipari, és biotechnológiai jelentősége már ma is rendkívül nagy, és az újabb kutatások hatására szerepük tovább nőhet.

A több ezer éves múlttal rendelkező növénytermesztés során az emberiség leginkább a termés, vagy a növény bizonyos gazdaságilag fontos részeit használta fel, igyekeztünk minél kevesebb mennyiségű biomassa mellett minél több hasznos részt előállítani. A mezőgazdaságban termesztett haszonnövények többségénél, a lignocellulózt nagy mennyiségben tartalmazó részek (szalma, gabonaszár, rostok) csak melléktermékként jelentkeznek, hasznosításuk nehézségekbe ütközik, valamint drága a felmerülő járulékos költségek miatt (például az összegyűjtés, a szállítás, és a tárolás).

A növényi sejtfal fő alkotója a lignocellulóz, amely cellulózból, hemicellulózból és ligninből felépülő összetett biopolimer. A Földön megtalálható növényi biomassa tömegének körülbelül 60%-át teszi ki, így rendkívül bőséges, és fenntartható alapanyagként kínálkozik, elsősorban a folyékony tüzelőanyagok előállításához. A biológiai úton történő lebontásában részt vevő enzimeknek komoly gyakorlati jelentősége van, hiszen a különböző kémiai tulajdonsággal rendelkező, és eltérő szerkezetű összetevők felhasználására számos iparágban támaszkodnak már ma is.

A lignocellulóz komplex szerkezete kémiai és biológiai szempontból is rendkívül ellenálló, biológiai lebontása csak több enzim közreműködésével képzelhető el. A szakirodalom beszámol olyan szervezetekről, amelyek összetett enzimrendszerüknek köszönhetően önmagukban képesek hatékonyan degradálni a lignocellulózt. A természetben a legaktívabb lignocellulóz hasznosítás a komposztok meleg régióiban zajlik, főként aktinomicéta baktériumok, többek között a *thermobifidák* közreműködésével. A *Thermobifida* nemzetség tagjai komplett celluláz és hemicelluláz enzimrendszerrel rendelkeznek, ezért az általuk termelt termotabil hidrolázokat tanulmányozva közelebb juthatunk a lebontó folyamatok részletesebb megismeréséhez, valamint pontosabban meg tudjuk határozni, milyen tulajdonságokkal kell rendelkeznie egy magas hatásfokkal működő cellulóz vagy hemicellulóz bontó enzimnek.

A genus modellszerkezete a *Thermobifida fusca* YX törzs, amelynek számos hidroláz enzimét leírták már, az eddig elkészült tanulmányok azonban elsősorban a cellulolitikus enzimrendszerükre koncentráltak, a hemicelluláz enzimeik kevésbé kutatottak. A *T. fusca*-hoz hasonlóan jó bontási potenciállal rendelkező *T. cellulosilytica* nemrég elkészült *de-novo* genom szekvenálása lehetőséget nyithat a két szervezet hidrolitikus rendszerének összehasonlítására, és újabb, gyakorlati szempontból is jelentős enzimfehérjék vizsgálatára.

A lignocellulózt bontó enzimeknek, így a különböző mannanázoknak is, tehát jelentős ipari hasznosítása lehetséges többek között a bioüzemanyag gyártás során, illetve alkalmazhatóak a takarmányozásban vagy a papíriparban is. A mannánokat hasító katalitikus fehérjék közreműködésével létrejövő manno-oligoszacharidokat az élelmiszeriparban, és a gyógyszeriparban is felhasználhatják.

Munkám elsődleges célja volt a *T. cellulosilytica* TB100-as törzs GH5-ös enzimcsaládba tartozó endomannanáz enzimének (Man5A) vizsgálata, amely során a kiválasztott gént (*man5A*) klónoztam, majd a gén által kódolt fehérjét *E. coli*-ban sikeresen túltermeltettem, és az enzimfehérje részleges biokémiai vizsgálatát is elvégeztem. A *T. fusca* TM51-ből származó endomannanáz enzimet a Debreceni Egyetem Genetikai és Alkalmazott Mikrobiológiai Tanszékén korábban vizsgálták, így a *T. cellulosilytica* TB100-ból származó endomannanáz enzim részleges biokémiai jellemzése után lehetőségem nyílt a két homológ enzim összehasonlítására. Dolgozatomban a téma aktuális irodalmi hátterének bemutatása után ismertetem a vizsgálataim során alkalmazott módszereket, valamint ezek eredményét.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A LIGNOCELLULÓZ FELÉPÍTÉSE

A növényi sejtfal a növények sejtjeit körülvevő, védő funkcióval rendelkező, szilárdító rétege. Szerkezete a vizes oldatok számára átjárható, így biztosítva az oldott anyagok felvételét és leadását. Amint az a Melléklet című fejezetben, az 1. számú képen is látható, a növényi sejtfal lignocellulóz tartalmú makromolekulákból épül fel, a lignocellulóz pedig ligninből, cellulózból és hemicellulózból álló, megújítható szerves anyag (RITTER, 2008).

A lignocellulózt felépítő molekulák közül a lignin nagy molekulású, oldhatatlan polimer, amelyben a fenilpropán alegységek szabálytalanul kapcsolódnak egymáshoz. Ezek a fenilpropán alegységek vázat alkotva kovalens kötésekkel kapcsolódnak a hemicellulózhoz is, ebbe a mátrixba ágyazódnak bele a cellulóz szálak (2. számú melléklet). A lignin felelős a növényi sejtfal rigiditásáért, fokozza a növény ellenálló képességét a mikrobiológiai behatásokkal szemben, valamint áthatolhatatlanná téve a szerkezetet, gátolja a hidrolízist végző enzimek működését (DWIVEDI, 2009).

A növényi sejtfal legnagyobb mennyiségben előforduló, vízben oldhatatlan komponense a cellulóz, legfőbb feladata a sejtfal szerkezetének stabilizálása. A cellulóz a legelterjedtebb biopolimer molekula a bioszférában, illetve a legegyszerűbb komponens a lignocellulózban. Kémiai szempontból a legegységesebb sejtfalalkotó, amelynek hosszú lánc a glükóz egységek β -1,4-glikozidos kötések kapcsolataiból áll, így képes a növényekben támasztó, és szerkezeti molekulaként funkcionálni. Az így összekapcsolódott szalagszerű szerkezetet hidrogén-híd kötések és van der Waals erők stabilizálják. A cellulózban elhelyezkedő glükóz láncok kialakítása kristályszerű szerkezetet hoz létre, amely vízhatlan, oldhatatlan, és jól ellenáll a hidrolízisnek. A növényi sejtfalban található cellulóz egymás mellett párhuzamosan elhelyezkedő láncokból felépülő mikrofibrillumokat alkot, amelyekben a polimer lánc hossza növényfajonként változó, általában 2000-2500 glükóz egységből áll (KUGA & BROWN, 1991).

A hemicellulóz a cellulóz után a növényi sejtfalban, és egyben a természetben a második leggyakrabban előforduló természetes polimer, amelynek összetétele növényfajonként és sejttípusonként is változó lehet. A hemicellulózok mintegy kapocsként működnek a sejtfalban a lignin és a cellulóz között. A hemicellulóz rövid láncú, elágazásokat is tartalmazó, heterogén poliszacharid, amely hexózat (pl. glükóz, mannóz, galaktóz), és pentózat (xilóz, arabinóz) tartalmaz. Három fő csoportja a xilánok, mannánok, valamint arabinogalaktánok (DWIVEDI, 2009).

A xilán a növényi szárazanyag tartalom 30-35 százalékát teszi ki, felépítése növényfajtól függően változatos, gerincét β -1,4 kötésekkel kapcsolódó xilóz monomerek alkotják. A xilóz

monomerek gyakran acetiláltak lehetnek, és növénytípustól függően eltérő arányban glükoronsav, vagy L-arabinofuranóz oldalláncokat tartalmazhatnak. A mannán mannóz, vagy mannóz és glükóz monomerekből felépülő, β -1,4-glikozidos kötésekkel kapcsolódó heteropolimer frakció. Főleg puhafák esetében jellemző lehet a mannán lánc acetiláltsága és az α -1,6 glikozidos kötéssel kapcsolódó galaktóz csoportok kapcsolódása. A mannán leginkább tápanyag raktározó szerepet tölt be a növényi vázszerkezet kialakítása során. Az arabinóz és galaktóz egységekből felépülő arabinogalaktán, a másik két hemicellulóz alkotóhoz képest sokkal kisebb mennyiségben van jelen a növényi sejtfalban (PULS & SCHUSEIL, 1996). A cellulóz szerkezeti felépítése és a degradálásban részt vevő enzimek, valamint hasítóhelyeik a Melléklet című fejezet 3. számú ábráján, a xilán és a galakto-glükomannán a 4. a). és b). ábráin láthatóak.

2.2. A LIGNOCELLULÓZ BONTÁSÁNAK NEHÉZSÉGEI, LIGNOCELLULÓZ ALAPÚ BIOTECHNOLÓGIÁK

A növényi biomassa, mint megújuló erőforrás kiaknázási lehetősége egyre kutatottabb terület, amely lendületet ad a mikrobális lignocellulóz bontás vizsgálatának. Néhány évtizede a kutatások elsősorban a gombák általi lebontás fontosságára összpontosítottak, azóta azonban egyre nagyobb figyelmet kapnak a lignocellulóz bontó prokarióták. A növényi sejtfal komplex szerkezetének degradálása összetett sejtfal bontó enzimrendszer működését teszi szükségessé, mivel az alkotóegységek közül a legtöbb nehezen oldódó, hidrofób tulajdonsággal rendelkezik, illetve szerkezetüket felépítő molekulák változatos kombinációi nehezítik az egyszerű enzimes lebontást (LYNCH & WOOD, 1992). A mikroorganizmusok azonban úgynevezett multi-enzimrendszer, vagy celluláz komplex működtetésével képesek eleget tenni a kihívásnak (HOWARD, 2003).

A technológiák bővülésével a növények vázanyaga jelentős mennyiségben hasznosítható megújuló biológiai nyersanyagot szolgáltat ipari felhasználásra. A növényi biomassa előkezelését követően kémiai vagy biológiai átalakítás során különböző termékek előállítására és további felhasználási módokra nyílik lehetőség (FERREIRA, 2008). A mezőgazdasági termelésből kieső, újrahasznosítani kívánt növények elsőként az élelmiszer- és takarmány iparágban, vagy a papírgyártás területén kerültek felhasználásra, azonban a legtöbb esetben még ma is csak elégetik a főlöslegessé vált maradványokat. A melléktermékként keletkező lignocellulóz ipari alkalmazásának legfőbb gazdasági akadálya a bontásához szükséges magas enzimköltség, azonban a mezőgazdasági hulladékokból fakadó alacsony tőke beruházási, és működési költségek vonzóvá tehetik a különböző alternatív felhasználási területeket (MALINGREAU, 1996).

Az elmúlt évtizedben számos kutatócsoport intenzíven vizsgálta a lignocellulóz enzimes átalakítására alapuló technológiai lehetőségeket. A lignocellulóz biomassza legjelentősebb hasznosítási területei a papírgyártás, valamint egyre nagyobb jelentősége lehet a második generációs bioalkoholok előállításának is, hiszen a szénhidrát polimerek fermentálható cukrokká történő gazdaságos átalakításával rentábilissé válhat a bioetanol, vagy a biobutanol gyártás.

A papíriparban jellemző fehérítési eljárás az első biotechnológiai felhasználása a hemicellulázoknak, amelyek használhatók a xilán és glükomannán szerkezetének módosítására a fa pépesítésének folyamán azzal a céllal, hogy fokozzák a lignin elvonásának hatékonyságát. Ez a technológia kombinálható különböző típusú papírok pépesítési, és fehérítési folyamataival. Az enzimatikus kezeléssel csökkenthető a felhasznált vegyszerek mennyisége, így egy környezetbarátabb technológia válthatja ki a hagyományos, klórvegyületeket vagy klórgázt használó technikákat, valamint javítható a termékek minősége is, hiszen a specifikus hemicellulázos kezelés hatására a cellulóz rostok nem degradálódnak.

A lignocellulóz szénhidrát tartalma alapvetően három úton alakítható át fermentálható cukorrá: egylépcsős tömény savas, kétlépcsős híg savas, valamint enzimes hidrolízissel. Mindhárom technológia lényege a lignocellulóz biomassza előkezelése, a cellulóz hozzáférhetőségének növelése a celluláz enzimek számára, céljuk a nagyobb a fermentálható cukormennyiség kihozatala (TUCKER et al., 2003). A folyamatban a hemicellulóz hidrolizálódik, a cellulóz pedig hozzáférhetőbbé válik a további enzimatikus folyamatok során. A következő lépésben megy végbe a cellulóz hidrolízise celluláz enzimek hatására, amelyeket cellulózbontó mikroorganizmusok, vagy az általuk kódolt gének felhasználásával állítanak elő. A fermentáció során a hidrolízis termékeként kapott cukrok átalakítása történik, amelyek további technológiák számára jelenthet kiinduló szubsztrátot, felhasználásuk sokrétű lehet (TAMÁS & BLASKÓ, 2008).

Az állattenyésztésben, elsősorban a baromfi takarmányozás során szintén használnak olyan enzimek készítményeket, amelyek a cellulóz és hemicellulóz frakciók bontásával segítik az állatok emésztését, így növelve a takarmányozás hatékonyságát (SUURNÄKKI et al., 1997).

Sachslehner és munkatársai arról számoltak be, hogy a kávé mannán tartalmát egy fonalas gombából (*Sclerotium rolfii*) származó mannanáz enzim segítségével hidrolizálták, ezzel jelentősen csökkenteni lehet a kávékivonatok viszkozitását, amely az instant kávé gyártás során jelenthet nagy előnyt (SACHSLEHNER et al., 2000). További élelmiszeripari és gyógyszeripari felhasználása lehet a különböző poliszacharid bontó enzimeknek a probiotikus hatású oligoszacharid gyártás. Ilyen készítmények előállítása nem csak a hidrolitikus aktivitású enzimek segítségével képzelhető el, hanem olyan mutáns fehérjék biotechnológiai módszerekkel történő előállításával, amelyek szintetizáló funkcióval bírnak, hidrolizáló funkciójukat viszont elveszítették (SUURNÄKKI et al., 1997).

2.3. A LIGNOCELLULÓZ HASÍTÓ ENZIMEI

Az evolúció során a különböző élőlények más-más stratégiát dolgoztak ki a lignocellulóz hasznosítása érdekében. A természetben csak mikroorganizmusok képesek a lignocellulóz közvetlen hasznosítására, összetett enzimszisztémáik segítségével. A magasabb rendű állatok, így a különböző növényevő rovarok, hüllők, madarak és emlősök, mind valamilyen baktérium vagy gomba partner segítségével szorúlnak (DEHORITY, 1991). Az aerob baktériumok számos egyedi extracelluláris „enzim-modult” termelnek, míg az anaerob baktériumok egy egyedülálló enzimszisztémával rendelkeznek a cellulóz és hemicellulóz degradálásához (SCHWARZ, 2001). Annak ellenére, hogy a növényi vázanyag összetevői egységenként az enzimek számára könnyebben hozzáférhetőek, egymásra épülő, komplex struktúrájában a lignocellulóz mégis nehezen bontható polimer (LYNCH & WOOD, 1992).

A lignin enzimes lebontása elsősorban aerob folyamat, anaerob körülmények között a lignin hosszú ideig fennmarad, és mivel a legnehezebben bontható komponens a növényi sejtfalban, így mennyiségével arányosan csökkenti a szubsztrát biológiai hozzáférhetőségét. A ligninbontásban elsősorban a lakkáz enzimmel rendelkező gombák jeleskednek, a prokarióta szervezetek ezen a téren alul maradnak.

A szakirodalom által celluláz komplexnek nevezett, a cellulóz bontásához szükséges enzimszisztéma három fő alkotóból áll: endoglükánáz, cellobiohidroláz vagy exoglükánáz, illetve cellobiáz vagy β -glükózidáz. A cellulóz enzimatis bontása során az enzimszisztéma tagjai kiegészítik egymást, első lépésben az endoglükánázok véletlenszerűen hasítják a cellulóz amorf régióit, amelynek következtében rövidebb celluló-oligoszacharidok jönnek létre. Ezt követően az exoglükánázok a szabad láncvégekről hasítanak le két glükózt tartalmazó cellobióz egységeket, amelyeket végül a cellobiáz (β -glükózidáz) enzimek bontanak le glükóz molekulákká (WILSON, 2004). A cellulóz enzimatis bontását és a hasító helyeket a 3. számú melléklet szemlélteti.

A különböző összetételű hemicellulózok komplexitása és változatossága miatt, az ezeket degradáló enzimszisztéma is sok különböző specifikus katalitikus fehérjéből áll. A hemicellulázok leginkább glikozid-hidrolázok vagy szénhidrát-észterázok lehetnek, szerkezetük és funkciójuk összefüggéseinek, illetve számos kombinációs lehetőségeinek megértése napjainkban még nem teljesen feltárt terület (ASPEBORG et al., 2012).

A hemicellulóz frakció bontásában jelentős szerepet töltenek be a különböző xilanáz és mannanáz enzimek. Az endoxilanázok és endomannanázok véletlenszerűen hasítanak a xilán illetve a mannán láncban belül, míg a bontási folyamat végén β -xilozidáz és β -mannozidáz enzimek hasítják tovább a xilo- és manno-oligoszacharidokat xilóz és mannóz végtermékekké (a Melléklet

fejezet 4. számú ábráján látható a xilán a). és galakto-glükomannán b). szerkezeti felépítése valamint a bontásukban részt vevő enzimek). A különböző oldalláncok hasításában további számos észteráz és egyéb hidroláz enzim vesz részt (HAKI & RAKSHIT, 2003).

A szakirodalom alapján számos kutatás igazolta a lignocellulóz degradáló enzimek közötti nagyfokú szinergizmust. Ennek alapja a hasonló funkciójú enzimek között, a részben eltérő specifitás és hatásmechanizmus lehet, de a lignocellulóz lízise során a hemicellulázok és cellulázok is kölcsönösen növelhetik egymás hatékonyságát, a másik enzimcsoport szubsztráthoz való hozzáféréseinek könnyítésével (WILSON, 2004).

2.4. A GH5-ÖS ENZIMCSALÁD ÉS A B-MANNANÁZOK

Az endomannanázok a lignocellulóz bontásában közreműködő legtöbb enzimfehérjéhez hasonlóan a glikozid hidrolázok csoportjába tartoznak. A glikozid hidrolázok (GH enzimsalád) széles körben elterjedt csoportja az enzimeknek. Működésük során a glikozidos kötéseket hidrolizálják két vagy több szénhidrát között, vagy egy szénhidrát és nem szénhidrát molekula között. Legtöbb esetben a glikozidos kötés hidrolízisét egy proton donorként jelen lévő savas, és egy nukleofilként fellépő bázikus aminosav katalizálja az aktív centrumban. Katalitikus mechanizmusukat tekintve kétféleképpen lehetnek, a retenció során a szubsztrát anomer szénatomjának térállása nem változik, az inverzióval történő hidrolízis az anomer szénatom helyzetét megfordítja (VUONG & WILSON, 2010).

A glikozid hidroláz enzimsaládon belül a GH5 csoport a glikozid hidrolázok kiterjedt skáláját foglalja magába, fellelhetők baktériumok, különböző eukarióták, mint például egyes növények, de különösen gombák szervezetében. A szekvencia és biokémiai vizsgálatok alapján összesen 51 alcsaládba történt meg a besorolásuk, ezek egyharmada monospecifikus (egyetlen szubsztrát specifitással rendelkező), bár az újabb kutatásoknak és biokémiai vizsgálatoknak köszönhetően új funkciók is folyamatosan felfedezésre kerülnek. Jellemzés alatt áll továbbá körülbelül 20 alcsalád, közülük sokról csak korlátozott strukturális, és biokémiai elemzések adatai állnak rendelkezésre. Ezen enzimek funkcióinak vizsgálata, illetve filogenetikai fájuk elemzésének alapján is arra következtethetünk, hogy iparilag jelentős enzimek csoportját képezik (ASPEBORG et al., 2012).

A család máig besorolt tagjai közé endoglukanáz, endomannanáz (mannán endo- β -1,4-mannozidáz vagy β -mannanáz), exoglukanáz, exomannanáz és β -glükozidáz enzimek tartoznak. Magába foglalja továbbá az 1,6-galaktanáz, 1,3-mannanáz, 1,4-xilanáz, endoglikoceramidáz, valamint a nagy specifitással rendelkező xiloglukanáz enzimeket is (HTTP2).

A β -mannanázok (5. számú melléklet) mannán alapú hemicellulózokat hidrolizálnak és rövidebb β -1,4-manno-oligomereket szabadítanak fel a mannánban található glikozidos kötések bontásával, amelyek β -mannozidázok által tovább hidrolizálhatóak mannózzá.

Jelenleg mintegy 50 β -mannanáz génszekvenciát (GH család 5 és 26) és 15 β -mannozidáz szekvenciát (GH család 1, 2 és 5) írtak már le (SHALLOM & SHOHAM, 2003). A mannanázok képesek a legkülönbözőbb pH tartományban hatékonyan működni, attól függően, hogy milyen szervezetből származnak, de a savas és semleges tartományban aktív mannanázok a leggyakoribbak (DHAWAN & KAUR, 2007). Mivel a termotabil β -mannanázok magas hőmérsékleti optimummal, illetve gyakran széles pH toleranciával is rendelkeznek, felhasználásuk ebből a szempontból is előnyökkel jár (HILGE et al., 1998).

2.5. A *THERMOBIFIDA* NEMZETSÉG JELLEMZÉSE

2.5.1. A *THERMOBIFIDA* NEMZETSÉG RENDSZERTANA ÉS ÉLETTANI TULAJDONSÁGAI

A *Thermobifida* nemzetség elsőként identifikált két tagját (*T. alba* és *T. fusca*) először a *Thermospora* nemzetséghez sorolta a szakirodalom. 1998-ban a filogenetikai vizsgálatok, és a 16 rDNS szekvencia analízisek elvégzése után javasolták a *Nocardiopsaceae* családba tartozó új nemzetség, a *Thermobifid* genusba közé való átsorolásukat. A *Thermobifida*, *Nocardiopsis*, valamint *Streptomonospora* 16S rDNS szekvenciái alapján megállapítható, hogy a három nemzetség filogenetikailag közel áll egymáshoz (6. számú melléklet) (ZHANG et al., 1998).

A nemzetséghez ma négy faj sorolható a *T. alba*, a *T. fusca*, a *T. halotolerans*, és a *T. cellulosilytica*. A thermobifidákat morfológiájuk, és mikroszkópikus vonásaik miatt régebben a sugárgombák csoportjába sorolták. Jellemző rájuk a hifás felépítés, amelyek ha közvetlen kontaktusba kerülnek a lignocellulózzal, számos hidrolitikus fehérjét választanak ki. A Melléklet című fejezet 7. számú ábráján jól látható a hifás felépítés, valamint a spóráképződés a hifák elágazó csúcsi részein (KUKOLYA et al., 2002).

A komposztálás során az első pár nap után, amikor a könnyen metabolizálható szerves anyagok elfogynak, és az ammónia felszabadulása miatt a pH lúgos tartományba (pH 7-9) emelkedik, a komposztálás termofil szakaszába érkezve kezdenek elszaporodni a *Thermobifida* nemzetséggel együtt más *Actinobacteria* fajok is. Ennek megfelelően a *T. alba* és a *T. halotolerans* típus törzseinek hőmérsékleti optima 40-45 °C között van, míg a magasabb hőmérsékletet kedvelő *T. fusca* és *T. cellulosilytica* típus törzseinek 55-60 °C között.

Összességében elmondható, hogy a thermobifidák aerob, Gram-pozitív, spóráképző és termofil tulajdonságú baktériumok, amelyek olyan közegben fordulnak elő leginkább, ahol

hőfejlődés jellemző a szerves anyag degradációja során (például a trágyahalom, komposztok különböző régiói, nyirkos közegben tárolt széna, vagy gombakomposzt) (ZHANG et al., 1998, YANG et al., 2008).

2.5.2. A *THERMOBIFIDA* LIGNOCELLULÓZ BONTÓ ENZIMRENDSZERE

A *T. alba*, a *T. fusca*, illetve a *T. cellulosilytica* izolátumok trágyából, nedves szénából, vagy komposztból származnak, amely alátámasztja a nemzetség lignocellulóz bontó képességét (YANG et al., 2008). A *Thermobifida* nemzetség modellszervezete, és egyben legszélesebb körben tanulmányozott faja a *T. fusca*, amelynek extracelluláris enzimeit már részletesen vizsgálták a magas aktivitásuk, hőstabilitásuk és széles pH toleranciájuk miatt (pH = 4 és 10 között) (DENG & FONG, 2010).

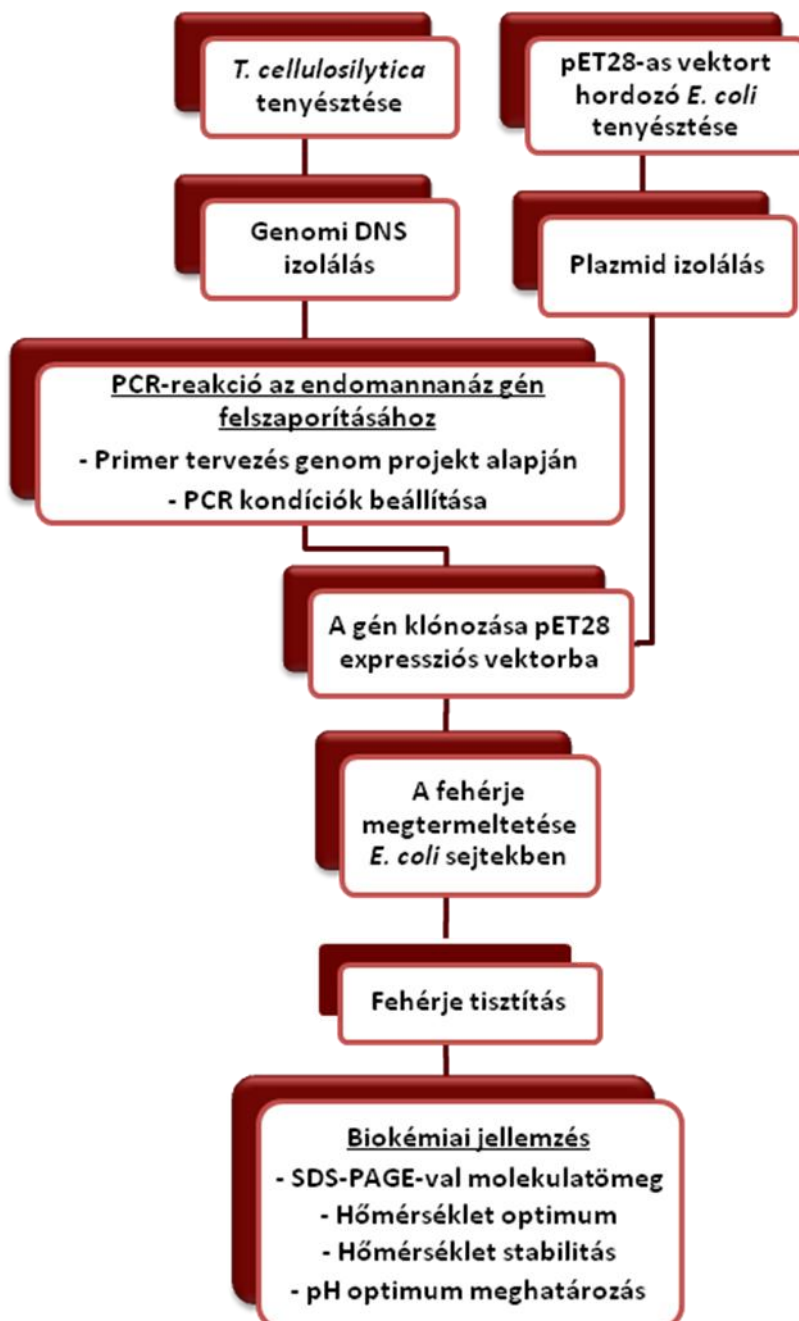
A *T. fusca* teljes genomja 45 hidrolitikus enzimet tartalmaz, ezek többnyire oligo- illetve poliszacharidok degradálásában játszanak szerepet, amelyek közül 36 glikozid hidrolázt találunk, ezen túlmenően szénhidrát-észterázok, és poliszacharid-liáz gének azonosíthatóak.

A szakirodalom alapján eddig tizennégy enzimét izolálták és vizsgálták, amelyek szerepet játszanak a lignocellulóz bontásban. A *T. fusca* cellulolitikus enzimrendszere két exocelluláz, négy endocelluláz, és egy endo és exo aktivitással is rendelkező celluláz enzimből, valamint egy β -glükózidázból áll. A hemicellulázok hidrolízisében közreműködő glikozid hidrolázok közül idáig leírtak és jellemeztek egy β -mannozidázt, valamint három endoxilanázt, egy β -xilozidázt és egy xiloglukanázt (WILSON, 2004). A *T. fusca* tehát komplett lignocellulóz bontó enzimrendszerrel rendelkezik, és az új genom projekt alapján úgy tűnik, hogy ez a *T. cellulosilytica*-ról is elmondható.

A legtöbb glikozid hidroláz enzimhez hasonlóan az eddig vizsgált GH családba tartozó thermobifida enzimek is moduláris szerkezetűek, és az extracelluláris enzimek esetében a katalitikus domén mellett mindig megtalálhatóak különböző szénhidrát kötő modulok (CBM- Carbohydrate Binding Module) is. A glikozid hidrolázok térszerkezetére jellemző, hogy a hosszabb poliszacharid láncokon belül hasító endo aktivitású enzimek katalitikus doménje nyitott árok szerű struktúrát alakít ki, míg a láncok végeiről monomereket vagy dimereket hidrolizáló exo aktivitású enzimek aktív centruma csatorna alakú. A katalitikus és CBM egységeket változatos hosszúságú kapocs régió köti össze. A *T. fusca* cellulázain és hemicellulázain legtöbb esetben CBM2-es típusú szénhidrát kötő domént találunk, de előfordulnak a CBM3-as és a CBM6-os modulok is. Ezeknek a doméneknek a segítségével kötődik a cellulóz vagy hemicellulóz szálakhoz az enzim, így a CBM régiók nagyban hozzájárulnak ezen glikozid hidrolázok hatékonyságához (BÉKI et al., 2003; LYKIDIS et al., 2007).

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Munkám elsősorban molekuláris biológiai vizsgálatokra alapult, amelyek elvégzésére a Szent István Egyetem Regionális Egyetemi Tudásközpont, valamint a Környezetvédelmi és Környezetbiztonsági Tanszék laboratóriumaiban volt lehetőségem. A munkafolyamat egymásra épülő lépéseit sematikus az alábbi (1. számú) ábra szemlélteti.



1. ábra – Gyakorlati munkám összefoglaló vázlata

3.1. *T. CELLULOSILYTICA* TB100 ÉS *E. COLI* TENYÉSZTÉS (DNS ÉS PLAZMID IZOLÁLÁSHOZ)

Az általam vizsgált *T. cellulosilytica* TB100 jelű törzs felszaporítását – 80 °C-on glicerol oldatban tárolt sejtszuszpenzió *thermobifida* táptalajra (1. táblázat (a) oszlop) történő szélesztésével kezdtem. Ezután a szilárd táptalajon kinőtt tenyészetet tisztító szélesztéssel egy újabb szilárd táptalajra oltottam, majd egy telepet oltókacsra felvéve 50 ml LB tápoldatot (1. táblázat (b) oszlop) inokuláltam. Ezt követően a tenyészetet rázótermosztátban 55 °C-on 190 rpm fordulatszámú rázatás mellett 72 órán keresztül inkubáltam. Ezzel párhuzamosan kanamicin rezisztencia gént hordozó pET28-as expressziós vektorral transzformált *E. coli*-t szélesztettem tisztító szélesztéssel, kanamicint 50 µg/ml végkoncentrációban tartalmazó LB szilárd táptalajra a későbbi pET28 plazmid izolálás céljából. Másnap egy telepet oltottam 2 ml, 50 µg/ml kanamicint tartalmazó LB tápoldatba, majd 16 órán keresztül 37 °C-on, 190 rpm-en rázatva inkubáltam.

1. táblázat – A kísérletek során alkalmazott tápoldatok összetevői

ÖSSZETEVŐK			
Thermobifida táptalaj (a)		LB táptalaj (b)	Megjegyzés
NaNO ₃	1 g	NaCl	9 g
K ₂ HPO ₄	1 g	élesztőkivonat	5 g
NaCl	3 g	tripton	10 g
MgCl ₂ x 6H ₂ O	1,06 g		
Medium A (mikroelem oldat)	1 ml		
élesztőkivonat	0,5 g		
pepton	0,5 g		
szacharóz	3 g		
Desztillált víz 1000 cm ³			
Bakteriológiai agar (amennyiben szükséges) 24 g			

3.2. *T. CELLULOSILYTICA* GENOMI ÉS *E. COLI* PLAZMID DNS IZOLÁLÁSA

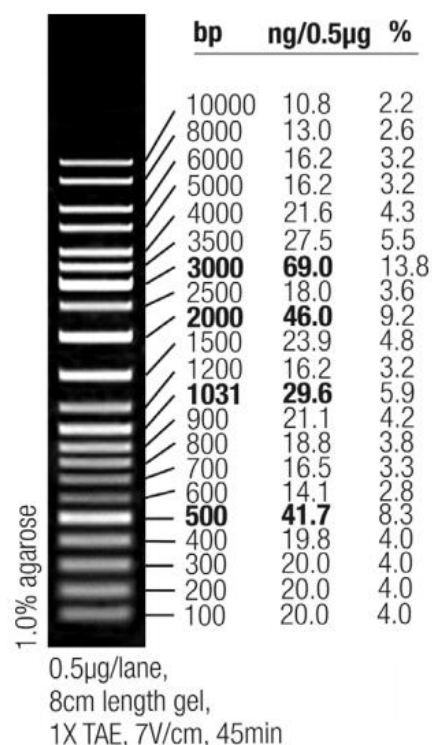
A *T. cellulosilytica* TB100 baktériumtörzsből Mobio UltraClean Microbial DNA Isolation Kit felhasználásával DNS izolálást végeztem a gyártó által megadott protokoll alapján. Plazmid izoláláshoz pET28 plazmidot tartalmazó *E. coli* baktérium tenyészetet használtam, majd a Geneaid High-Speed Plasmid Mini Kit felhasználásával izoláltam a szükséges anyagmennyiségű plazmidot.

3.2.1. AGARÓZ-GÉLELEKTROFORÉZIS

Mindkét eljárás után, a genomi DNS és plazmid minták meglétét, valamint a későbbiekben a PCR fragmentek ellenőrzését agaróz gélelektroforézissel végeztem, ehhez 1 %-os agaróz gélét készítettem [1g nagytisztaságú agaróz feloldása magas hőmérsékleten 100 ml 1xTBE pufferben (10X TRIS-Bórsav-EDTA: 107,81 g/l Tris; 55,03 g/l Bórsav; EDTA 7,44 g/l), amely ethidium-bromidot 50 µg/ml koncentrációban tartalmazott]. Az ethidium-bromid egy interkaláló DNS festék, amelynek segítségével a DNS fragmentek UV fény alatt láthatóvá válnak.

Mintafelvitelkor 5 µl DNS minta és 3 µl töltőpuffer (18,6 g EDTA; 20 g sarcosyl; 600 ml glicerín; 0,5 g brómfenolkék; 1000 ml desztillált víz) elegyét pipettáztam a zsebekbe. A sorok elejére és végére 4 µl DNS Marker (Gene Ruler Mix DNA Ladder, koncentráció: 0,5 µg/µl, Fermentas) létrát pipettáztam, így a kapott fragmentek mérete az ismert hosszúságú DNS szakaszokat tartalmazó létrával (2. ábra) összehasonlítva határozható meg. A gél futtatását 30 percig 120 mV feszültségen végeztem.

GeneRuler™ DNA Ladder Mix



2. ábra – Az agaróz gélelektroforézishez alkalmazott DNS marker

3.3. A *T. CELLULOSILYTICA* TB100-BÓL SZÁRMAZÓ ENDOMANNANÁZ (MAN5A)

GÉN KLÓNOZÁSA EXPRESSZIÓS RENDSZERBE

3.3.1. POLIMERÁZ-LÁNCREAKCIÓ (PCR)

Primertervezés

A PCR reakció kulcsfontosságú lépése a vizsgálni kívánt génre történő primertervezés, ahol a sikeres amplifikáció érdekében számos tényező figyelembe vétele célszerű. Munkám során a megfelelő PCR primer-pár tervezéséhez a genom projekt alapján meghatározásra került endomannanáz gén nukleotid szekvenciájára támaszkodhattam.

Első lépésként az erre alkalmas szoftver segítségével detektáltam az extracelluláris transzportot eredményező szignálszekvenciát (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), hogy ez ne kerüljön rá az expresszált fehérjére, a forward primert az ez utáni szakaszra, a reverse primert a gén

legvégére terveztem, amely a stop kodont is tartalmazta, így a fúziós fehérjén a hisztidin farok az N terminálisra kerül. A következő lépésben a pET28 plazmid restrikciós felismerőhelyei alapján meghatároztam, hogy milyen hasítóhelyekkel érdemes tovább dolgozni, amelyeket természetesen a klónozni kívánt génszakasz nem tartalmaz. A választás forward primer esetén az NdeI, reverse primer esetén az XhoI restrikciós endonukleázokra esett. A hasítóhelyek elé 7-8 bázisos véletlenszerű szakaszt is beillesztésre került a restrikciós enzimek hatékonyságának növelése érdekében.

Hőmérséklet optimalizálás

Az optimális hőmérsékleti beállítások valamint a reakcióelegy összetevőinek megfelelő koncentrációja a PCR reakció egyik kulcseleme, amelyek a templát szekvencia ismeretében elméleti és kísérleti úton határozhatóak meg.

A későbbi PCR reakciók optimális anellációs hőmérséklet kialakítása érdekében gradiens PCR reakciót állítottam össze, ahol eltérő hőfokok beállításával szabályoztam az anellációs folyamatot (50 – 55 – 60 °C). A PCR reakció végeztével agaróz gélelektroforézis segítségével állapítottam meg az optimális anellációs hőmérsékletet. A PCR során az alábbi beállításokkal (2. táblázat) dolgoztam, a reagensek leírása a gyártó (Fermentas) honlapján elérhetőek (<http://www.thermoscientificbio.com/molecular-biology/pcr-qpcr-and-reverse-transcription>).

2. táblázat – A felhasznált PCR program és reakció összetétel

GRADIENS PCR REAKCIÓ				
ciklusszám	PCR hőprofil	időtartam	Reakcióelegy összetétel	
1	95 °C	5 min	5 µl	10X Taq puffer
PFU (72 °C-on 10 nmol nukleotid / 30 perc) polimeráz bemérése			10 µl	dNTP (1 mM)
32	95 °C	30 sec	3 µl	MgCl ₂ (25 mM)
	50°C/55°C/60°C	30 sec	0,5-0,5 µl	primer (325 µM)
	72 °C	1 min 50 sec	1 U	PFU polimeráz
1	72 °C	10 min	4 µl	DMSO
			25,5 µl	MQ
			1 µl	templát DNS
			50 µl	VÉGTÉRFOGAT

PCR termék tisztítása

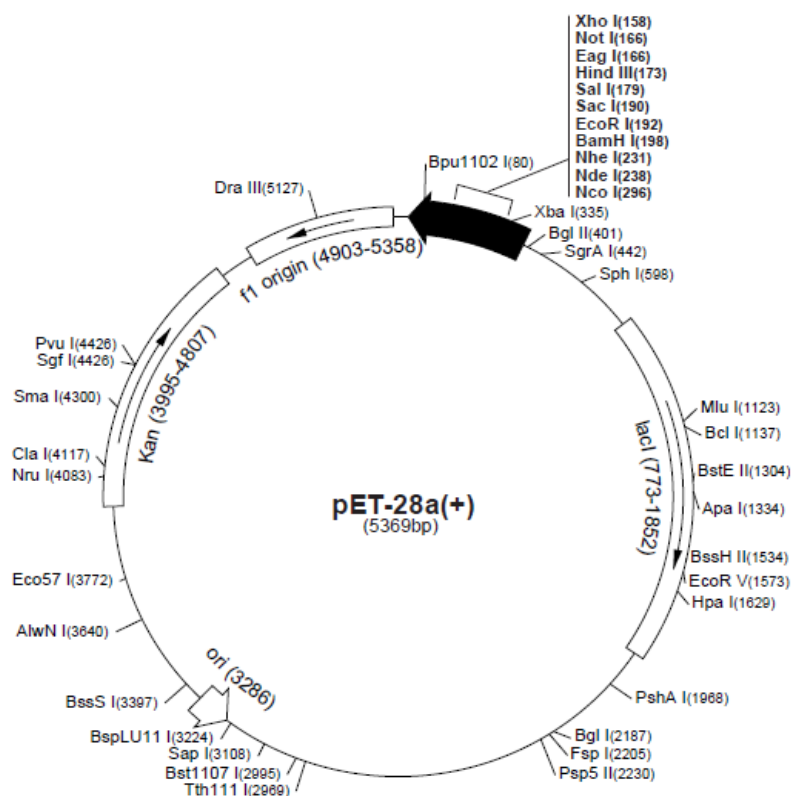
A PCR termékek tisztítását NucleoSpin Extract II. (Macherey-Nagel, Düren) kittel végeztem a gyártó utasításai szerint. Erre a lépésre a további reakciókat esetlegesen zavaró összetevők (dNTP, primerek, felesleges sók) eltávolítása miatt volt szükség. A tisztítás eredményét újabb agaróz gélelektroforézissel ellenőriztem.

3.3.2. RESTRIKCIÓS EMÉSZTÉS

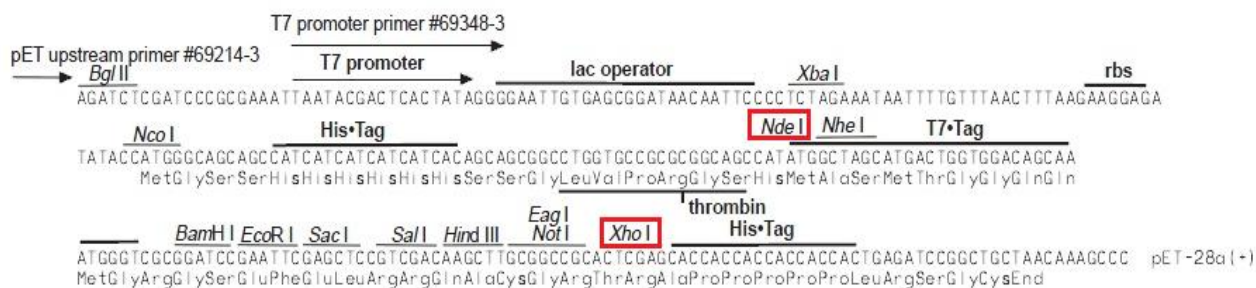
A kívánt gén megfelelő irányultságú beépítése a plazmid vektorba úgy érhető el, ha a folyamat során szekvencia felismerő DNS hasító, azaz restrikciós endonukleáz enzimmel kezeljük a PCR terméket valamint a plazmidot is. A hasítás történhet a két szálon néhány bázis távolságra, ekkor ragadós vég jön létre, amely megkönnyíti a két szakasz összekapcsolódását rekombináns DNS-sé. A tisztított PCR termékből 10 µl mennyiséget emésztettem. A plazmid izolálásból származó, 95 ng/µl koncentrációjú (spektrofotometriás mérés alapján) pET28 plazmid vektorból (3-4. ábra) szintén 10 µl-t használtam, majd a következő enzimek felhasználásával hasítottam:

XhoI – hasítóhely: 5' C' TCGAG 3'

NdeI – hasítóhely: 5' CA' TATG 3'



3. ábra – Az általam használt pET28 plazmid



4. ábra - A pET28 vektor poliklónozó és expressziós helye a szekvenciákkal

3. táblázat – Az alkalmazott kettős restrikciós emésztés (duble digest) körülményei

	PLAZMID VEKTOR (10 µl)	PCR TERMÉK (10 µl)	Hőmérséklet
Puffer (Orange)		3 µl	37 °C
NdeI enzim (Orange)		1 U (1 µl)	
XhoI enzim (Red)		2 U (2 µl)	
MQ víz		15-16 µl	
VÉGTÉRFOGAT		30 µl	

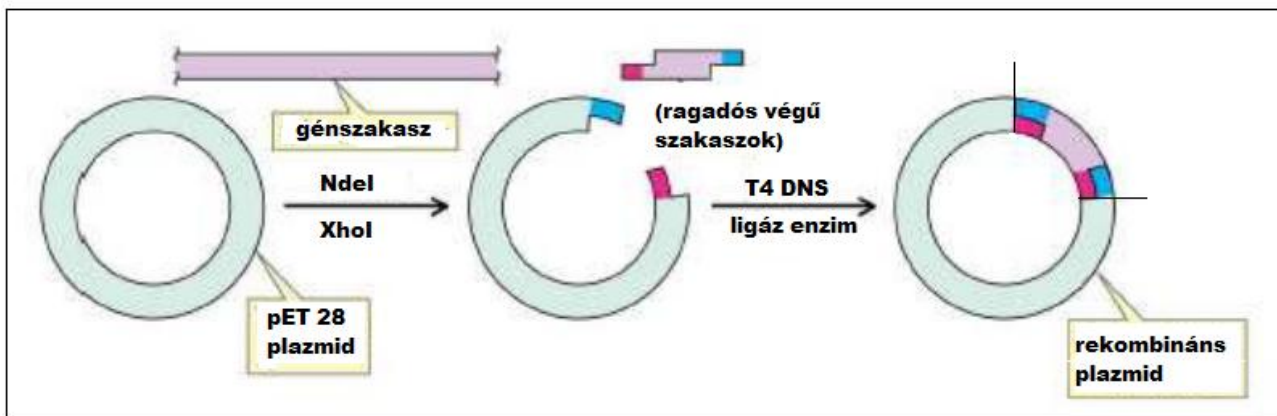
A restrikciós emésztés során alkalmazott reagensek leírása a gyártó (Fermentas) honlapján elérhetőek:

(<http://www.thermoscientificbio.com/molecular-biology/pcr-qpcr-and-reverse-transcription>).

Ez után a restrikciós endonukleáz enzimmel hasított termékeket tisztítottam (NucleoSpin Extract II, - Macherey-Nagel, Düren), amivel eltávolítottam a leemésztett végeket és az esetlegesen zavaró vegyületeket.

3.3.3. LIGÁLÁS

Az emésztett termék valamint plazmid vektor egyesítéséhez a reakcióelegyet 3:1 termék:plazmid arányban a gyártó (Fermentas) ajánlásával állítottam össze. Az emésztett ragadós végek összekapcsolása T4 DNS ligáz enzim felhasználásával történt, amint az alábbi, 5. számú ábrán is látható.



5. ábra – A restrikciós emésztés valamint a ligálás sematikus folyamata a rekombináns plazmid kialakításáig

A 4. számú táblázatban feltüntetett összetevők felhasználásával összeállítottam a reakció elegyet, majd 16 °C-os hőmérsékleten egy éjszakán át inkubáltam azt a gyártó (Fermentas) által biztosított pufferben.

4. táblázat - Az alkalmazott ligálási reakció körülményei

ÖSSZETEVŐK	Mennyiség
10x T4 DNS Ligase	2 µl
Reaction Buffer (Fermentas)	
T4 DNS ligáz enzim	1,5 U
pET28 vektor	1 µl
Inzert	3 µl
MQ víz	12,5 µl
VÉGTÉRTFOGAT	20 µL

3.3.4. TRANSZFORMÁLÁS

A transzformálás során az inzertet tartalmazó plazmidot *E. coli* BL21 kémiai kompetens sejtekbe juttattam. Az *E. coli* BL21 sejtekhez (Invitrogen) 5 µl rekombináns plazmidot adtam, majd az elegyet fél órán keresztül jégen tartottam, majd 45 másodpercre 42 °C-ra helyeztem (hősokk), ezután 2 perc időtartamra ismét jégre tettem. Utána hozzáadtam 250 µl SOC médium regenerálást segítő tápoldatot (Invitrogen), ezzel rázattam 37 °C-on 190 rpm-en egy órán keresztül. A regeneráltatás után a transzformált sejtekből 100 µl-t LB táptalaj felszínére szélesztettem, amely szelektáló ágensként 50 µg/ml végkoncentrációban tartalmazott kanamicint, majd 37 °C-on egész éjjel inkubáltam. Másnap a transzformált sejtek ellenőrzéséhez PCR reakciót állítottam össze, amelyhez templátként egy fogpiszkáló hegynyi transzformált sejtet használtam, majd agaróz

gélelektroforézis segítségével állapítottam meg, melyik telepek tartalmazzák ténylegesen az inzertet. A PCR reakcióhoz szükséges elegyet az alábbi, 5. számú táblázatban feltüntetett összetevőkkel készítettem. A reagensek leírása a gyártó (Fermentas) honlapján található meg: (<http://www.thermoscientificbio.com/pcr-qpcr-and-reverse-transcription/pcr-enzymes-master-mixes-and-reagents/standard-pcr>).

5. táblázat – A transzformálás ellenőrzéséhez összeállított PCR reakció

ÖSSZETEVŐK	
10x Dream Taq Buffer	5 µl
dNTP (1mM)	10 µl
primerek (325 µM)	1-1 µl
Dream Taq DNA Polymerase (5U/µl)	0,2 µl
DMSO	4 µl
MQ víz	28,8 µl
VÉGTÉRFOGAT	50 µl

3.4. A FÚZIÓS PROTEIN TÚLTERMELTETÉSE ÉS TISZTÍTÁSA

3.4.1. FEHÉRJE TERMELTETÉS *E. COLI* BL21 SEJTEKBEN

A szilárd táplemezen kinőtt telepek közül négyet 2 ml LB tápoldatba tettem, ami 50 µg/ml koncentrációban kanamicint tartalmazott. Ezt a kezdő kultúrát 37 °C-on 190-es rpm fordulatszámú rázatás mellett „overnight” növesztettem. Másnap ezzel a kezdő kultúrával inokuláltam 50 ml LB tápoldatot, amely szintén 50 µg/ml koncentrációban tartalmazott kanamicint. Az így elkészített kultúrákat 190 rpm-en 37 °C-on inkubáltam, ügyelve közben az optikai denzitás értékére, vagyis hogy a tenyészet log fázisban legyen az indukciókor. OD₆₀₀=0,6-1 érték között 0,5 mM IPTG (iso-propil-β-D-1 tiogalaktopiranozid) végkoncentráció beállításával indukáltam a fehérjetermelést, amely 20 °C-on 190 rpm rázatás mellett 16 órán keresztül történt. Ezt követően centrifugálással összegyűjtöttem a biomasszát, majd a leülepedett réteget előkészítettem a sejtfeltáráshoz.

3.4.2. A SEJTEK FELTÁRÁSA ÉS A FÚZIÓS FEHÉRJE TISZTÍTÁSA

A sejt pelletet 2 ml lízis pufferben (NaCl_2 , imidazol, NaH_2PO_4 , lizozim - 1 mg/ml végkoncentrációban) szuszpendáltam, majd ultrahangos feltárásnak (szonikálás) vettem alá, amely mintánként 40 másodpercig jégben hűtve történt, a fehérje kicsapódásának elkerülése érdekében. Ezt követően 4 °C-on 15 percig 4600 rpm fordulatszámon centrifugáltam, így a fehérjéket a felülúszó tartalmazta. A lizált sejteket ezután 50 °C-on 10 percig inkubáltam, majd újból centrifugáltam, hogy a kicsapódott *E. coli* eredetű fehérjétől megtisztítsam. A Ni-NTA (Invitrogen – His Tag Purification System) agarból 200 μl -t pipettáztam a mintákhoz, majd 10 °C hőmérsékleten 16 órán keresztül 190 rpm-en rázattam. Másnap a Ni-NTA agarózt tartalmazó mintát 3 percen keresztül 5000 rpm-en centrifugáltam, majd eltávolítottam a lízispuffert. A felülúszó eldobása után 1 ml mosópuffert mértem a Ni-NTA agarózra, amelyhez a His farkakon keresztül az endomannanáz fehérje ki volt kötve, majd 3 percig 5000 rpm-en újra centrifugáltam. Ezt három alkalommal megismételtem, majd a harmadik mosási lépés után 200 μl eluáló puffert adtam a mintákhoz. Az újabb centrifugálást követően (3 perc, 5000 rpm) a felülúszót új Eppendorf csövekbe helyeztem, amely így már a tisztított endomannanáz enzimet tartalmazta. A folyamat során alkalmazott pufferek az alábbi (6. számú) táblázatban feltüntetett összetevőket tartalmazták.

6. táblázat – A lízispuffer, valamint a mosó és eluáló pufferek összetevőinek aránya

ÖSSZETEVŐK	Lízispuffer (1000 ml)	Mosópuffer (250 ml)	Eluáló puffer (100 ml)
NaH_2PO_4	6,9 g	1,95 g	0,78 g
NaCl_2	17,54 g	4,39 g	1,75 g
imidazol	0,68 g	0,34 g	1,7 g

3.5. IN SILICO DOMÉNSZERKEZET MEGHATÁROZÁS

A számítógép-analízisen alapuló, adatbázisokra támaszkodó kutatásokkal meghatározhatóak az enzim szerkezeti és funkcionális működési egységei. A *T. cellulosilytica* TB100 genom projektje szerinti endomannanáz enzim aminosav szekvenciája alapján a fehérje doménszerkezetének meghatározását az InterProScan program segítségével végeztem: (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>).

A program többféle számítógépes adatbázisban keresve határozza meg az aminosav szekvencia alapján valószínűsíthető domén szerkezetet.

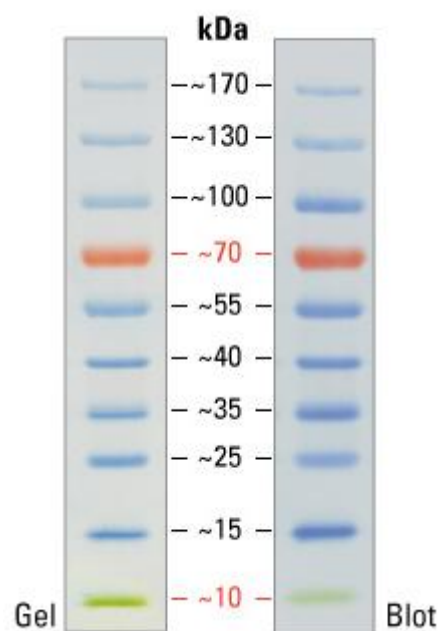
3.6. A *T. CELLULOSITYTICA* TB100 ENDOMANNANÁZ (MAN5A) ENZIMÉNEK

RÉSZLEGES BIOKÉMIAI JELLEMZÉSE

3.6.1. MOLEKULATÖMEG MEGHATÁROZÁS SDS-POLIAKRILAMID GÉLELEKTROFORÉZISSEL

Az enzimdát tisztaságának ellenőrzése és az enzim molekulatömegének meghatározása SDS-PAGE módszerrel történt. A tisztított enzimből 20 µl mennyiséget 20 µl töltő pufferben (SAMBROOK et al., 1989) szuszpendáltam, majd a mintákat 5 percig forraltam. A gélelektroforézist 10 %-os SDS-poliakrilamid gélét használva végeztem, amely összetételét az alábbi (7. számú) táblázat tartalmazza.

A szükséges elegyek elkészítése után a gélfuttató berendezés üveglapjai közé öntöttem a gélét. Az alsó gél megszilárdulását követően a gyűjtőgél oldatot rétegeztem felülre, amelybe belehelyeztem a mintafelviteli helyek kialakítására szolgáló fésűt. Miután megszilárdult a gél, futtató puffert (SAMBROOK et al., 1989) töltöttem rá, a zsebekbe 35 µl mintát, illetve a sor elejére markert (Fermentas, 6. ábra) töltöttem, majd a futtatást 80 V egyenfeszültség alkalmazásával végeztem, amíg a minták a gyűjtőgél aljára nem értek (kb. 30 perc), majd 130 V feszültséget használva a mintákat a gél aljáig futtattam. A gélét PAGE-Blue (Fermentas) fehérje festékkel festettem a gyártó utasítása szerint.



6. ábra – Az SDS-PAGE-hoz használt fehérje marker

7. táblázat – Az SDS-PAGE-hoz használt gél összetétele

ÖSSZETEVŐK	Elválasztógél (10 ml)	Gyűjtőgél (4 ml)
30 %-os akril-amid	3,3 ml	0,67 ml
TRIS (1,5 M és 1M)	2,5 ml (1,5 M)	0,5 ml (1 M)
10 %-os SDS	0,1 ml	0,04 ml
ammónium-perszulfát (APS 1 %)	0,1 ml	0,04 ml
TEMED	0,004 ml	0,004 ml
desztillált víz	4ml	2,7 ml

A hőmérséklet optimum, hőstabilitás és pH optimum meghatározását 3 párhuzamos beállításban, redukáló cukor próba alapján végeztem, amely a szabad glikozidos -OH csoport (redukáló cukrok) koncentrációjának kimutatására alapszik.

3.6.2. HŐMÉRSÉKLET OPTIMUM MEGHATÁROZÁSA

A hőmérséklet optimum meghatározásánál 10-90 °C hőmérséklet tartományban vizsgáltam az enzimaktivitást LBG (=Locust bean gum, guargumi vagy galaktomannán) szubsztrát felhasználásával. Ennek elvégzéséhez 0,5%-os LBG szubsztrát oldatot készítettem, amelyből 350 µl mennyiséget pipettáztam 140 µl 200 mM-os foszfát pufferhez (pH 7). A vizsgálatot 10 °C-os hőmérsékleten kezdtem, majd 10 °C-onként haladtam felfelé. A reakcióelegy 2 perces inkubációja után 10 µl enzimet adtam az elegyhez, majd 10 perc elteltével 500 µl hozzáadott Miller reagenssel együtt (5 g dinitro szalicilsav; 1 g fenol; 0,25 g Na₂SO₃; 5 g NaOH; 500 ml desztillált víz) 10 percig forraltam. A forralás után 170 µl 40%-os K-Na-tartarát hozzáadásával stabilizáltam az oldat színét, majd a reakcióelegyet 1 percen keresztül 11 000 rpm-en centrifugáltam. A felülúszó fényelnyelését 575 nm-en spektrofotométer készüléken mértem.

3.6.3. HŐMÉRSÉKLET STABILITÁSI VIZSGÁLATOK

A biokémiai jellemzés következő lépéseként megvizsgáltam, hogy 60 °C-on, illetve 70 °C-on mennyi ideig marad stabil a tisztított endomannanáz enzim. Az enzim stabilitást 60 °C-on 180 percen keresztül, 70 °C-on 30 percen keresztül követtem. Az enzimaktivitást a 3.6.2. fejezet leírásának megfelelően mértem.

3.6.4. PH OPTIMUM MEGHATÁROZÁSA

A pH optimum megállapítása a 3.6.2. fejezetben leírt redukáló cukor próbára alapozva történt. A reakcióelegyek összeállításához 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 pH értékű puffer oldatokat használtam, a reakcióidő 10 perc volt, az enzimreakció hőmérséklete pedig 60 °C. A reakcióhoz használt pufferek pH értékét az összetevők megfelelő arányú keverékével állítottam be a 8. számú táblázat alapján.

8. táblázat – A pH optimum vizsgálatához alkalmazott pufferek összetevői

3-6 pH citrát-foszfát puffer	7-8 pH foszfát puffer	9-11 pH karbonát puffer
Na ₂ PO ₄ (0,2 M)	Na ₂ PO ₄ (0,2 M)	Na ₂ CO ₃ (0,1 M)
citromsav (0,1 M)	NaHPO ₄ (0,2 M)	NaHCO ₃ (0,1 M)

3.6.5. B-MANNOZIDÁZ AKTIVITÁS KIMUTATÁSA

A β-mannozidáz aktivitás kimutatására 200 µl végtérfogatú reakcióelegyet állítottam össze. Foszfát puffer (pH 7) hozzáadásával 1 mM-os 4-metilumbelliferol-mannopiranozid szubsztrát oldatot készítettem, amelyhez 10 µl enzimet mértem be, majd UV fényben detektáltam az aktivitást a géldokumentációs (Syngene, InGenius) rendszerben.

4. EREDMÉNYEK

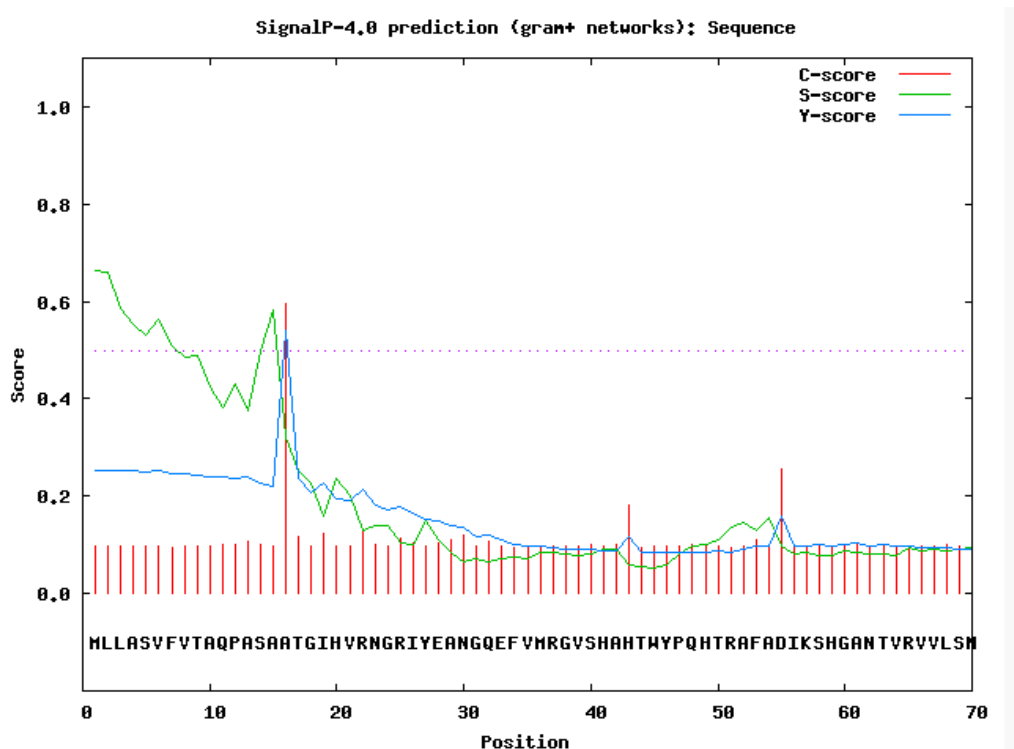
Ebben a fejezetben bemutatom a *T. cellulosilytica* TB100 eredetű endomannanáz enzim heterológ expressziója, és vizsgálata során elért eredményeket, amelyek a gén amplifikációjára, a klónozás és a transzformálás folyamatára, a részleges biokémiai paraméterek meghatározására, valamint a *T. fusca* eredetű endomannanáz fehérjével történő összehasonlítására irányultak.

4.1. AZ ENDOMANNANÁZ GÉN AMPLIFIKÁCIÓJA

A *man5A* gén amplifikálásához szükséges forward primert a fehérje N terminálisán elhelyezkedő szignál peptidet kódoló DNS szekvencia után terveztem, hogy a szignálpeptid ne okozzon problémát a későbbi fehérjetisztítási lépésnél, és a fúziós fehérje az expresszióhoz használt *E. coli* sejteken belül halmozódjon fel.

A szignál szekvencia az aminosav szekvencia adott motívumaihoz kapcsolódik, a SignalP – 4.0 program ezeket ismeri föl, így ennek segítségével detektáltam a szignál szekvenciát.

Amint az alábbi képen is látható (7. számú ábra), a szignál szekvencia a *T. cellulosilytica* Man5A fehérjén a 15. aminosavig tart.



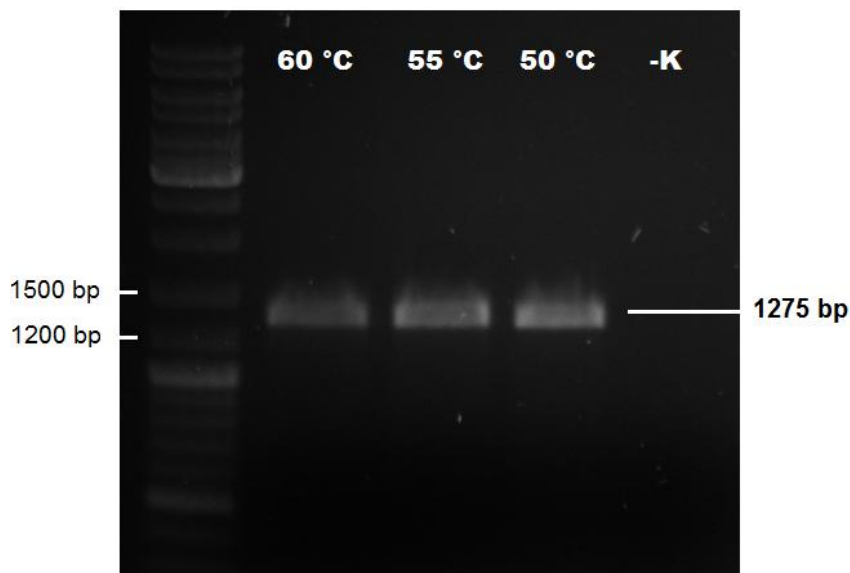
7. ábra – A *T. cellulosilytica* Man5A fehérje szekvencia elején található szignál peptid szakasz

Az általam használt primer-pár a *T. cellulosilytica* TB100 endomannanáz génre (*man5A*):

5'-GGTGCCATCATATGGCGACCGGGATCCAC-3' forward (NdeI hasítóhelyet tartalmaz)

5'-GTGCCATCTCGAGTCAGTCGACGGAGCAGGTC-3' reverse (XhoI hasítóhelyet tartalmaz)

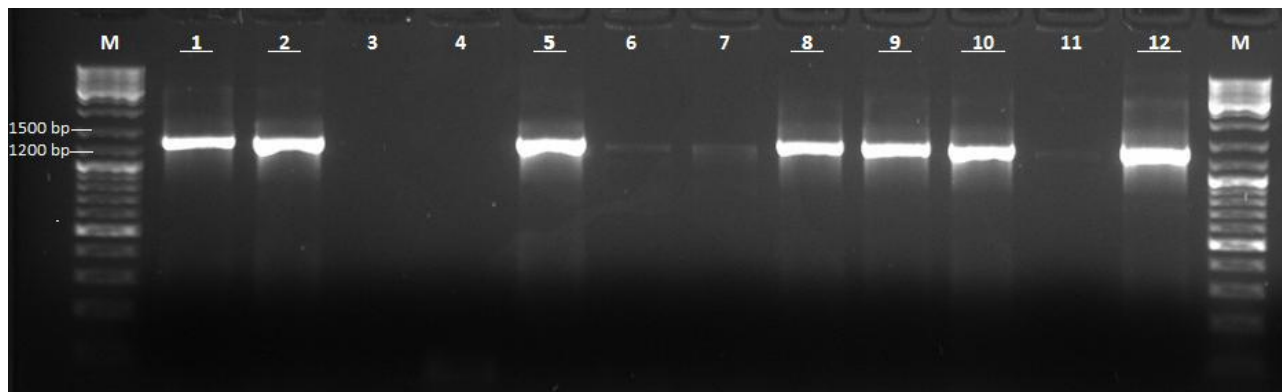
A primertervezés után PCR segítségével amplifikáltam a kívánt génszakaszt, majd a PCR reakció végeztével agaróz gélelektroforézis segítségével megállapítottam, hogy a reakció sikeres volt és mindhárom anellációs hőmérsékleten egy terméket eredményezett. A legtöbb terméket az 50 °C-os anellációval kaptam, amely az alábbi gélképen (8. számú ábra) látható.



8. ábra - Az agaróz gélre felvitt minták a gradiens PCR reakciót követően

4.2. TRANSZFORMÁLÁS EREDMÉNYE

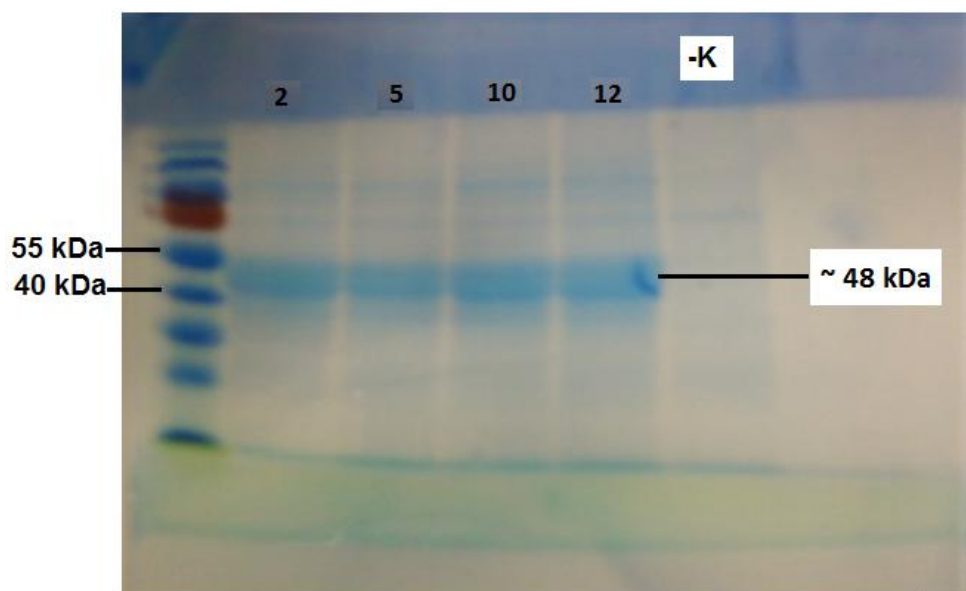
A pET28-as vektorba történő ligálás, és az azt követő *E. coli* BL21 sejtekbe való transzformálás sikerességét a kanamicint tartalmazó LB táplemezen kinőtt *E. coli* BL21 telepekkel végzett PCR reakcióval, majd az utána elvégzett agaróz-gélelektroforézis elvégzésével ellenőriztem (9. ábra). A tizenkét vizsgált klón közül tíz esetben sikerült az inzertet amplifikálni, ezek közül hét klónnál nagyon erős terméket kaptam (1; 2; 5; 8; 9; 10; 12 számú klónok), a későbbiekben ezekből kiválasztottam négy klónt a fehérje expresszióhoz (2; 5; 10; 12 számú klónok). Az inzertet nem tartalmazó klónok esetében nem sikerült a pET28-as vektorba történő ligálás, ezekben a klónokban csak az üres vektor biztosította a kanamicin rezisztenciát.



9. ábra – A transzformált klónokkal végzett PCR reakció utáni gélelektroforézis képe

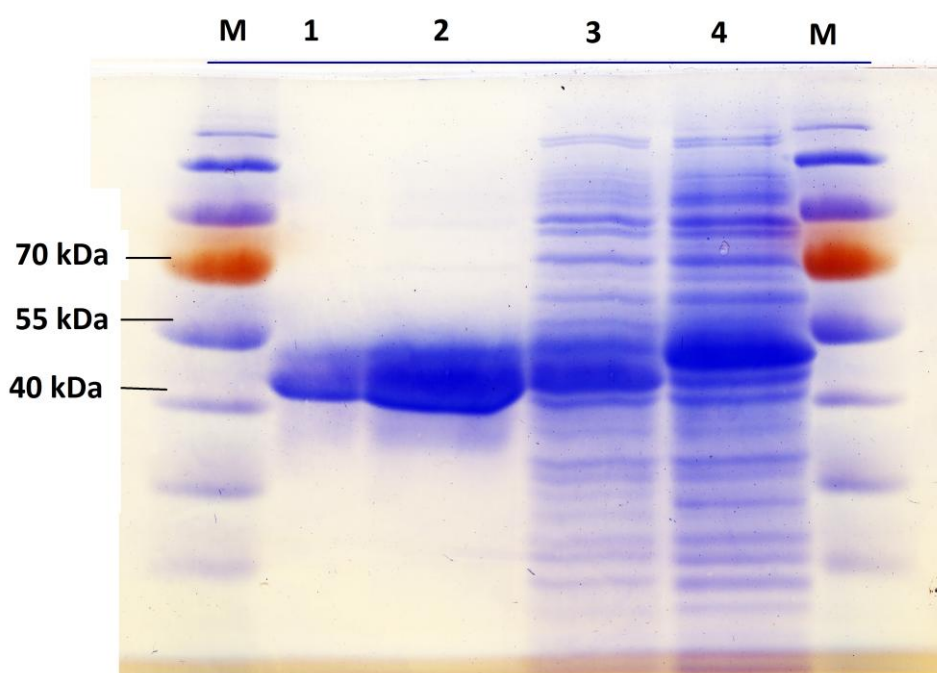
4.3. A FEHÉRJE TERMELÉS ÉS TISZTÍTÁS EREDMÉNYE

A gélelektroforézis alapján kiválasztott négy klónnal megtermeltetem a fehérjét majd az eredményt a fehérje tisztítás után SDS-PAGE-val ellenőriztem. A 10. számú ábrán látszik, hogy az expresszió sikeres volt mind a négy klón esetében, a tisztítási lépés során a többi fehérjét nagyrészt sikerült eltávolítanom a mintákból.



10. ábra – Az SDS-PAGE után kapott gélkép fehérjetisztítást követően

Ahhoz, hogy még tisztább Man5A fehérjét kapjak, egy kiegészítő lépést iktattam a tisztítási folyamatba, ehhez egy klónnal (2-es) újra termeltetem a fúziós proteint. A hőkezeléssel kiegészített tisztítással még homogénebb lett a megtermelt fehérje, ami az alábbi, 11. számú ábrán is látszik.



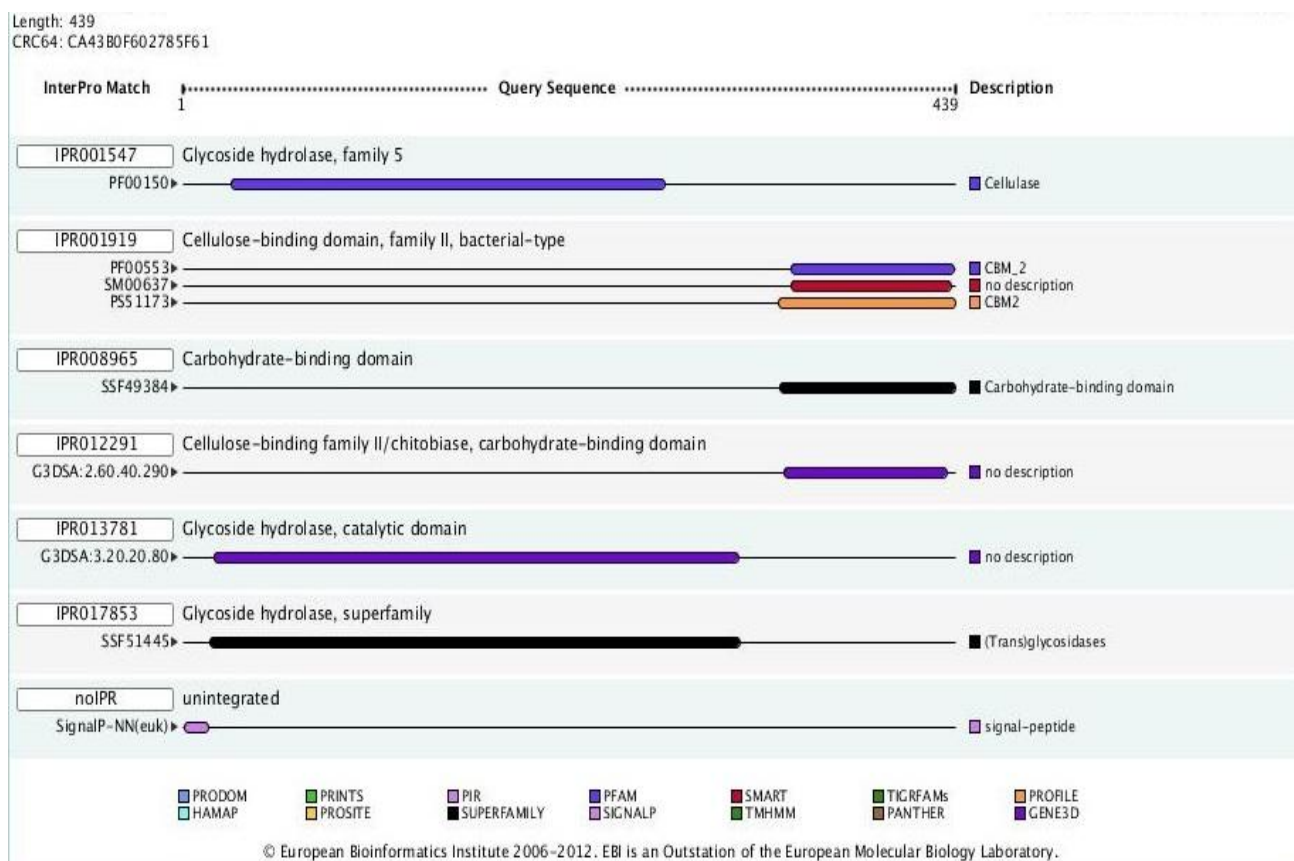
11. ábra

A. T. cellulolytica TB100
Man5A enzim tisztítása

- 1 – Ni-NTA agarózzal történő tisztítás után (10 µl)
- 2 – Ni-NTA agarózzal történő tisztítás után (20 µl)
- 3 – hőkezelt minta
- 4- feltárás utáni felülúszó
- M – fehérjemarker

4.4. IN SILICO DOMÉNSZERKEZET MEGHATÁROZÁS

A fehérje doménszerkezetének meghatározását számítógépes elemzéssel végeztem (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>). A program többféle számítógépes adatbázisban keresve határozza meg az aminosav szekvencia alapján valószínűsíthető domén szerkezetet. Az InterProScan program szerint a fehérjén a szignálszekvencia után a katalitikus domén helyezkedik el, majd egy kapocs régiót követően a CBM2-es poliszacharid kötő domén található. A program alapján valószínűsíthető doménszerkezet a következő, 12. számú ábrán látható.



12. ábra – Az InterProScan alapján valószínűsíthető doménszerkezet

4.5. A RÉSZLEGES BIOKÉMIAI VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI

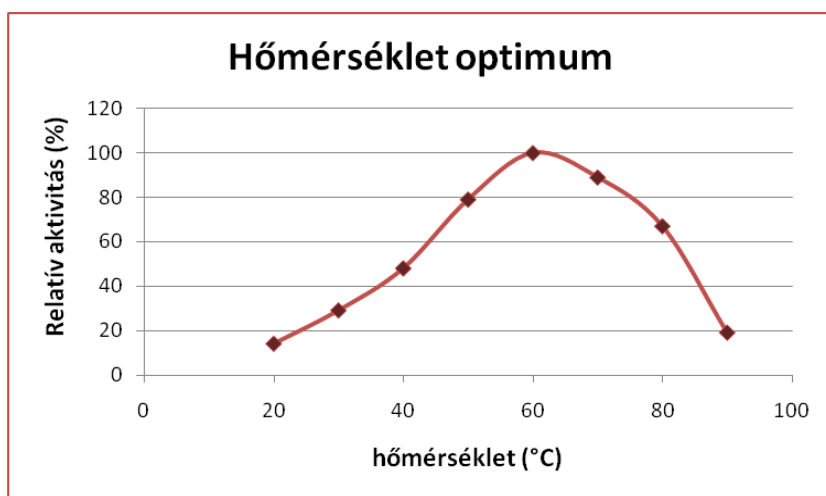
A biokémiai paraméterek vizsgálata során elsősorban azon körülményeket határoztam meg, amelyek mellett a *T. cellulosilytica* TB100 Man5A enzim maximális aktivitással működik. A *T. cellulosilytica* TB100 törzs endomannanáz enzimének hőmérsékleti optimumát, hőstabilitási jellemzőit és pH optimumát LBG szubsztrát jelenlétében vizsgáltam.

4.5.1. MOLEKULATÖMEG MEGHATÁROZÁS SDS-POLIAKRILAMID GÉLELEKTROFORÉZISSEL (SDS-PAGE)

A klónozást követő fehérje termeltetés után beiktatott hőkezelési lépés eredményeként a 4.3. fejezet 17. számú ábráján látható fokozatos fehérje tisztulást sikerült elérni. Az SDS-PAGE során meghatározásra került az enzim molekulatömege, értéke a viszonyításként alkalmazott fehérje markerhez (Fermentas) képest állapítható meg. A tiszta fehérje molekulatömege 48 kDa, amely összhangban van az aminosav szekvencia alapján számított értékkel.

4.5.2. HŐMÉRSÉKLET OPTIMUM MEGHATÁROZÁSA

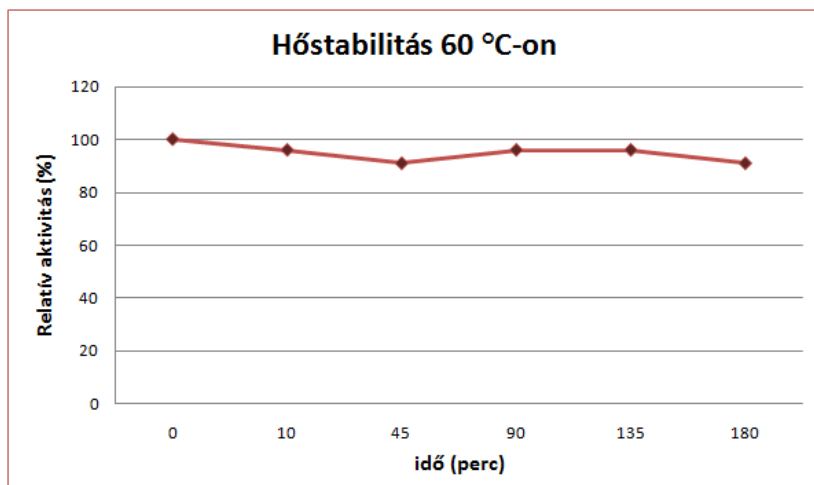
A hőmérséklet optimum meghatározása 20-90 °C közötti tartományban történt, amelynek eredményét az alábbi (13. ábra) diagramon ábrázoltam. A maximális mannanáz aktivitást 60 °C-on mértem. A 80 °C-on mért aktivitás még mindig a maximális aktivitás 65 %-a, azonban az általam vizsgált legmagasabb hőmérsékleten (90 °C) már csak 19 % mérhető. 50-70 °C között 80% feletti az enzim aktivitása. Ezzel egyben igazoltam, hogy sikerült a Man5A enzimet aktív formában megtermeltetni és tisztítani, valamint hogy az enzimnek endomannanáz aktivitása van.



2. ábra – A *T. cellulosilytica* TB100 törzs Man5A enzimének hőmérséklet optimuma

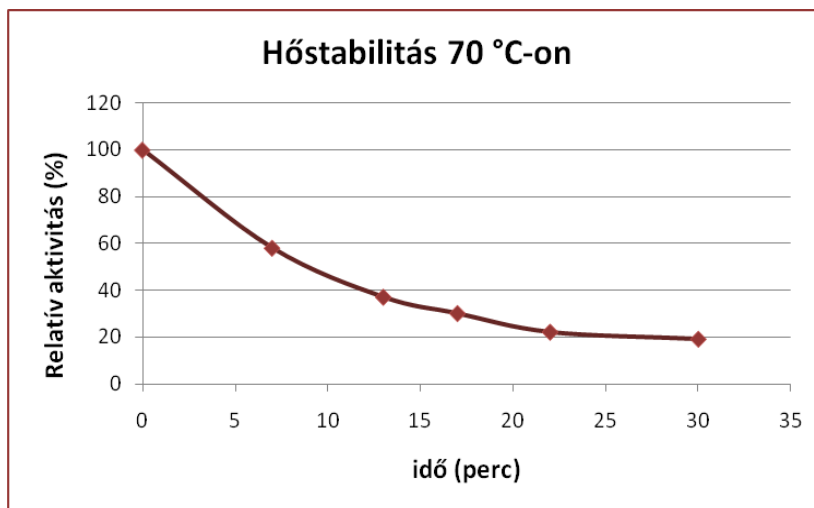
4.5.1. HŐMÉRSÉKLET STABILITÁSI VIZSGÁLAT

Az alábbi diagramon (14. számú ábra) a 60 °C-on mért hőstabilitási vizsgálatok eredménye látható. A kapott eredmények alapján megállapítható, hogy a *T. cellulosilytica* endomannanáz enzime 3 óra 60 °C-os inkubációt követően aktivitásának nagy részét (több mint 90%) megtartotta.



3. ábra - A *T. cellulosilytica* TB100 törzs Man5A enzimének hőstabilitás mérése 60 °C-on

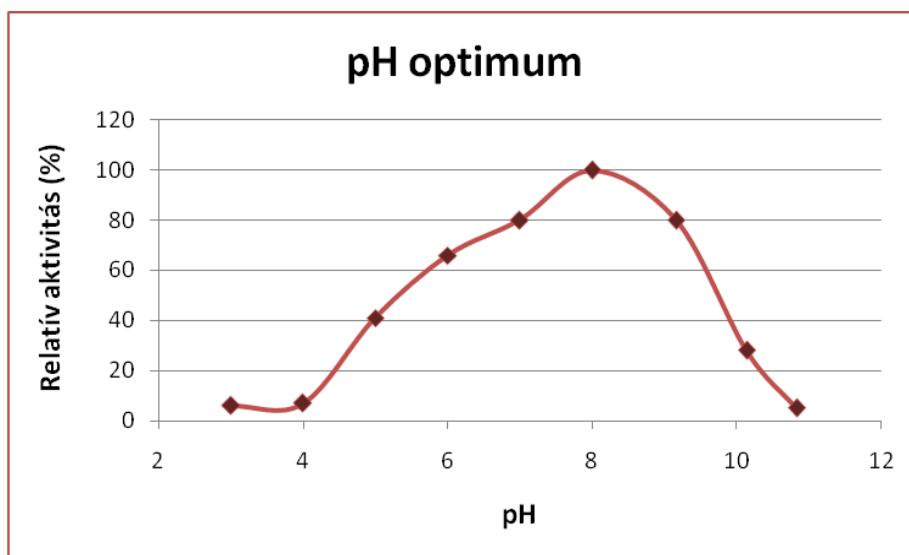
A 70 °C-on mért hőstabilitási vizsgálat eredményeként megállapítható, hogy a *T. cellulosilytica* endomannanáz enzime 70 °C-on hamar elveszti aktivitását. 10 perc inkubálást követően az aktivitás csaknem a felére csökkent, 30 perc elteltével a kiinduló aktivitás 13 %-a mérhető (15. ábra).



45. ábra - A *T. cellulosilytica* TB100 törzs Man5A enzimének hőstabilitás mérése 70 °C-on

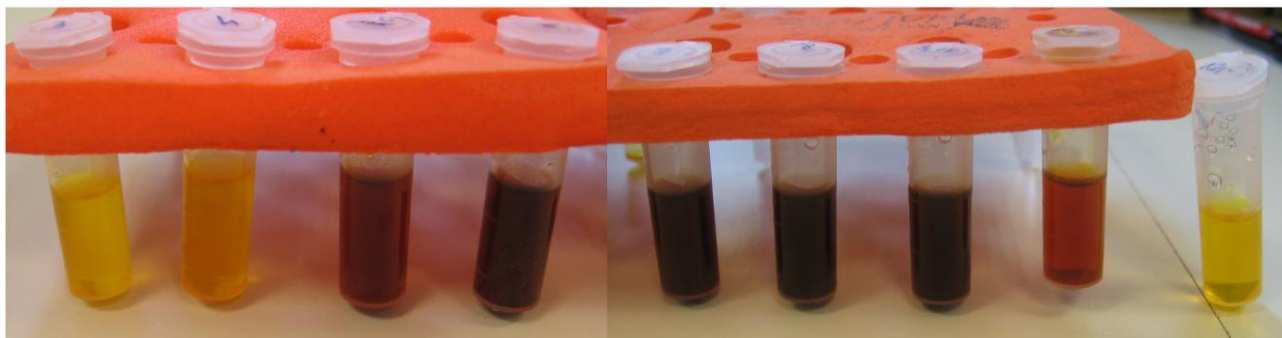
4.5.2. pH OPTIMUM VIZSGÁLAT

Az enzimaktivitás szempontjából optimális pH érték meghatározását pH 3-11 tartományban végeztem el. A különböző pH-jú környezetben, és 60 °C-on mért aktivitás eredményeit az alábbi (16. számú ábra) diagram szemlélteti. Az enzimaktivitás 80% feletti értéket mutat a 7-9 pH tartományban, az optimum pH 8 értékre esett. A görbe alapján a Man5A enzim pH optimuma viszonylag szűk tartományban van.



16. ábra - A *T. cellulosilytica* TB100 törzs Man5A enzimének pH optimuma

Az alábbi kép (17. számú ábra) a pH optimum mérése közben bekövetkezett színreakciókat szemlélteti a Miller féle redukáló cukor próba során.



17. ábra - A pH optimum vizsgálata Miller reakcióval

4.5.3. *B-MANNOZIDÁZ AKTIVITÁS KIMUTATÁSA*

Szerettük volna megtudni, hogy az enzim rendelkezik-e az endomannanáz aktivitás mellett β -mannozidáz aktivitással is (18. ábra). A kísérlet során kimutatható volt a β -mannozidáz aktivitás, de mivel pontos enzimkinetikai méréseket sem itt, sem az endo aktivitás igazolásánál nem végeztem, ezért az egyenlőre nem állapítható meg, hogy a β -mannozidáz aktivitás hányad része lehet az endomannanáz aktivitásnak.



18. ábra – Az izolált fehérje aktivitása (1-4: 2, 5, 10, 12 klónokkal termeltetett fehérjék), illetve a negatív kontroll

4.6. *T. FUSCA* ILLETVE *T. CELLULOSITYICA* SZERVEZETBŐL SZÁRMAZÓ GH5-ÖS ENDOMANNANÁZ ENZIMEK ÖSSZEVETÉSE

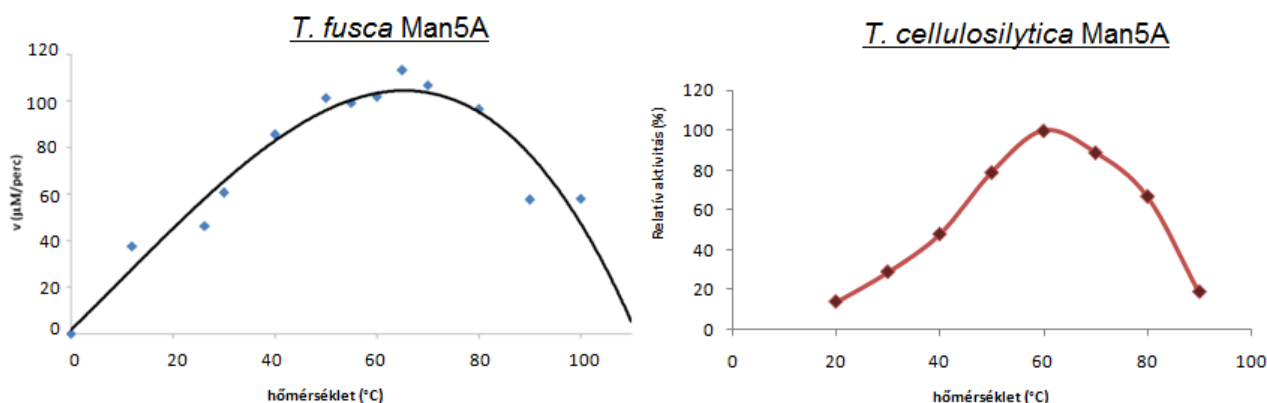
A *T. fusca* TM51endomannanáz enzimére vonatkozó adatokat Rácz Orsolya szakdolgozata (Debreceni Egyetem Genetikai és Alkalmazott Mikrobiológiai Tanszék, témavezető Dr. Barna Teréz, 2009) alapján ismertetem.

A két homológ enzim aminosav szekvenciáját összehasonlítva BLAST alkalmazás alapján 79 %-os hasonlóság mutatható ki (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome). Az alábbi, 19. számú ábrán piros keretben a katalitikus domént alkotó aminosavak, a zöld keretben a poliszacharid kötő domént alkotó aminosavak láthatóak (Query-*T. cellulosilytica*, Sbjct- *T. fusca*).

Score = 697 bits (1798), Expect = 0.0, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 345/434 (79%), Positives = 385/434 (89%), Gaps = 1/434 (0%)

Query	5	SVFVTAQPASAAATGIHVRNGRIYEANGQEFVMRGVSHAHTWYPQHTRAFADIKSHGANTV	64
Sbjct	18	SVF QPA+AATG+HV+NGR+YEANGQEF++RGVSH H WYPQHT+AFADIKSHGANTV	77
Query	65	RVVLSNGVRWSKNGPSDVADIISLCKQNRLICMLEVHDTTGYGEQSGAATLDQAVDYWIE	124
Sbjct	78	RVVLSNGVRWSKNGPSDVA++ISLCKQNRLICMLEVHDTTGYGEQSGA+TLDQAVDYWIE	137
Query	125	LKSVLQGQEDYVLINIGNEPYGNNAATVANWASDTSAAIRRLRAAGFEHAIVVDAPNWWQ	184
Sbjct	138	LKSVLQG+EDYVLINIGNEPYGN++ATVA WASDTSAAI+RLRAAGFEH +VVDAPNWWQ	197
Query	185	DWSHTMRINAADVYASDPTGNTIFSIMHYGVYSQGSTVTSYLEHFVNAGLPLVIGEFGHD	244
Sbjct	198	DW++TMR NA VYASDPTGNT+FSIMHYGVYSQ ST+TSYLEHFVNAGLPL+IGEFGHD	257
Query	245	HSDGNPDEDTIMAEAERLGLGYIGWSWSNGGGVEYLDMDNFDGDSLTSWGRRIIFYGPN	304
Sbjct	258	HSDGNPDEDTIMAEAERL LGYIGWSWSNGGGVEYLDMV NFDGD+L+ WG RIFYGPN	317
Query	305	GISGTAREATVYSG-DPGIDPGIDPGIDPGIDPGIDPGTGACSAAYTTVGDWGSQGFQGEV	363
Sbjct	318	GI+ TA+EAT++ G PG P P G C+A Y T+G WG GFQGEV	377
Query	364	TVTAGSSAISHWKVTWTFPGGQSVSHGWNAAFNGSSSVTATSLSYNGQLGAGQSTAFGFI	423
Sbjct	378	TVTAG SAIS W+V+WTFPGGQSV+HGWNA+F+G+S+VTA++LSYNGQLGAGQS FGF	437
Query	424	GSGSAPGALTILCS	437
Sbjct	438	GSG AP +LTL+C+ GSGDAPSSLTILSCT	451

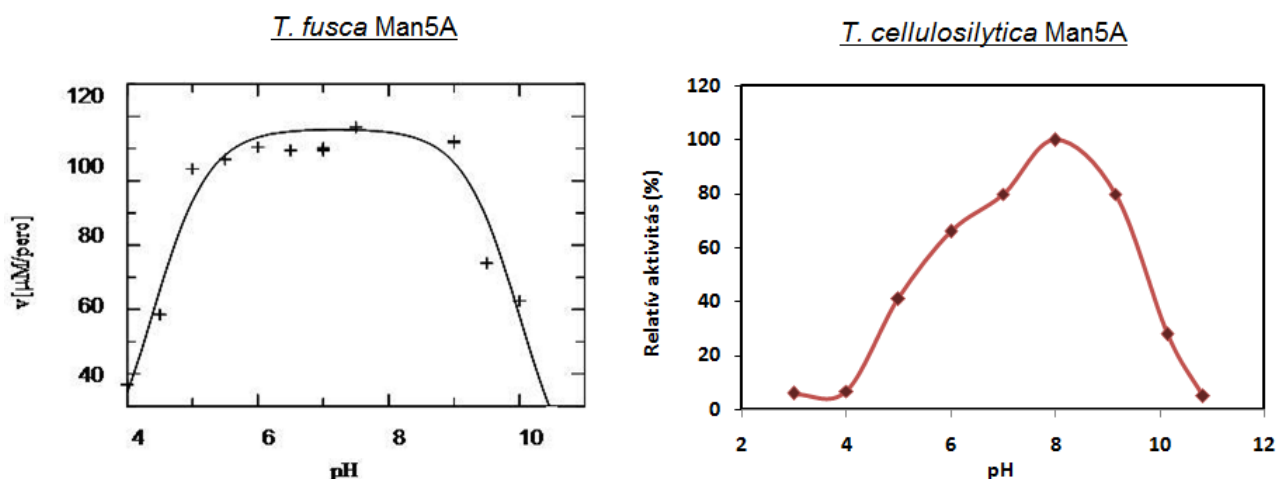
19. ábra – *A. T. fusca* valamint *T. cellulosilytica* Man5A enzimének aminosav szekvencia összehasonlítása BLAST program segítségével



20. ábra – *T. fusca* illetve a *T. cellulosilytica*-ból származó Man5A hőmérséklet optimumának összehasonlítása

A 20. számú ábrán a két homológ enzim hőmérsékleti optimum görbéje látszik, amely alapján a *T. fusca* endomannanáz enzimének 65 °C, míg a *T. cellulosilytica* endomannanázának 60 °C a hőmérsékleti optimuma.

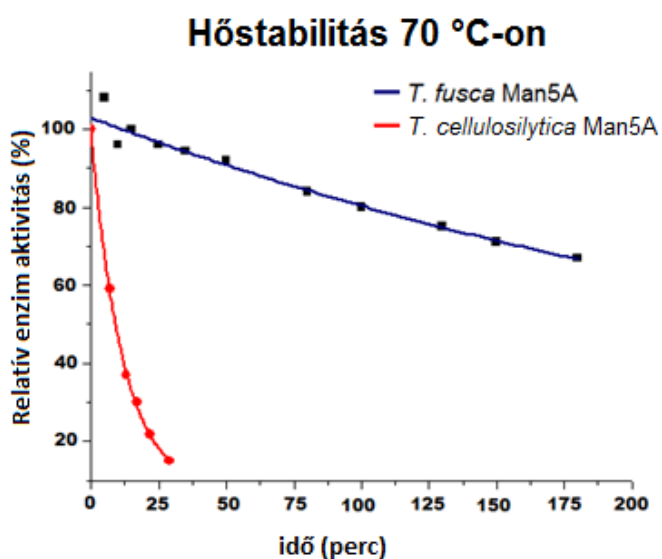
Következő lépésként a rendelkezésre álló adatok alapján összehasonlítottam a két Man5A enzim pH optimumát, amely szintén eltérést mutatott. Amíg a *T. fusca* Man5A enzim számára 7,5 pH optimális, addig a *T. cellulosilytica* számára a pH 8 bizonyult megfelelőnek (21. ábra). A legszembetűnőbb különbség, hogy a *T. fusca* eredetű enzim sokkal szélesebb pH tartományon belül mutat maximálisához közeli aktivitást.



51. ábra - A *T. fusca* illetve a *T. cellulosilytica*-ból származó Man5A pH optimumának összehasonlítása

A hőstabilitás vizsgálatára irányuló, korábban elvégzett kísérletek alapján a *T. fusca* endomannanáz Man5A enzime 3 óra 60 °C-os inkubációt követően is megtartotta hőstabilitásának 90 %-át (RÁCZ, 2009), mint az a 4.5.1. fejezet 14. ábráján is látszik, ez a megállapítás az általam vizsgált *T. cellulosilytica* endomannanáz enzimről is elmondható.

A *T. cellulosilytica* endomannanázának 70 °C-on mért hőstabilitása viszont jóval alul marad a *T. fusca*-ból származó endomannanáz enzim hőstabilitásához képest. Az eltérést az alábbi (22. számú ábra) diagram szemlélteti.



62. ábra – A két homológ enzim 70 °C-on mért hőstabilitása

5. ÉRTÉKELÉS ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

A lignocellulóz hatékony lebontására képes *Thermobifida cellulosilytica* celluláz és hemicelluláz enzimrendszere az előzetesen elvégzett genom analízis alapján tartalmazza ugyan azokat az enzim komponenseket, mint amelyeket a *Thermobifida nemzetség*, és általában a termofil lignocellulóz bontás egyik modellszervezete, a *T. fusca* is tartalmaz.

A *T. cellulosilytica* TB100 törzs Man5A enzim az általam vizsgált biokémiai jellemzői alapján sok szempontból hasonlít az eddig leírt thermobifida eredetű enzimekre (WILSON, 2004). Az *in silico* szerkezet elemzés megerősítette az enzim extracelluláris voltát, hiszen két különböző számítógépes analízis (SignalP és InterProScan) is azonosította az extracelluláris transzportért felelős szignál szekvenciát. Továbbá a Man5A enzimre is jellemző a glikozid hidrolázoknál gyakori moduláris felépítés. Az enzim katalitikus doménje a GH5-ös családba tartozik, illetve egy kapocs régiót követően csatlakozik hozzá egy CBM2-es poliszacharid kötő domén is.

Az általam vizsgált enzim az előzetes elvárásoknak megfelelően rendelkezik endomannanáz aktivitással, hiszen a galaktomannán (LBG) szubsztrátot hidrolizálja. A β -mannozidáz aktivitást ugyan nem vártuk, de meglepte nem annyira meglepő, hiszen itt is mannóz egységek közötti β -1,4 kötés hidrolizálásáról van szó, mint az endo aktivitás esetén, és az endo hatású enzimfehérjékre jellemző nagy árok szerű katalitikus doménben a kisebb biózok vagy triózok is elférnek.

A többi leírt, és komposztok meleg régióiból izolált *Thermobifida* nemzetséghez tartozó törzsből származó enzimhez hasonlóan a *T. cellulosilytica* TB100 törzs endomannanáz enzime is magas hőmérsékleti optimummal rendelkezik. Ez a tulajdonság az extracelluláris enzimekre különösen jellemző, hiszen ez a magas hőmérsékleti optimum szükséges a komposztok meleg régióiban történő hatékony lignocellulóz bontáshoz, ahol a hőmérséklet elérheti a 70 °C-ot is. Ugyancsak a komposztálás során történő biomassza lebomlásának körülményei teszik szükségessé, hogy az enzim a lúgos pH tartományban is mutasson aktivitást. A *Thermobifida* nemzetség tagjai a komposztálás során az első néhány nap után kezdenek elszaporodni, amikor a könnyen bontható szubsztrátok, mint például az egyszerű szerves savak elfogyását, illetve az ammónia megjelenését követően a pH lúgos tartományba kerül (LYNCH, 1992; KUKOLYA et al., 2002).

Az enzimekre gyakorolt hőhatásnak kettős szerepe van, egyrészt a reakció sebesség növekedését eredményezheti, másrészt a túlzottan magas hőmérséklet az enzimet denaturálja, amelynek következtében az enzimfehérje elveszti funkcióját. Az enzimek felhasználásának szempontjából ezért nagy jelentőséggel bír a hőmérséklet optimum valamint stabilitás meghatározása. Ezen tulajdonságok szoros összefüggésben vannak az enzimfehérje szerkezetével, a hőmérséklet és a pH, mint környezeti tényezők kölcsönhatása közvetlenül hat a konformációra illetve a katalizált reakció sebességére.

A hőstabilitás tekintetében is elmondható, hogy az általam vizsgált endomannanáz enzim hasonló tulajdonságokkal rendelkezik, mint a már leírt *Thermobifida* enzimek. A Man5A enzim 60 °C-on több órán keresztül megőrizte maximálisához közeli aktivitását, amelyet a *T. fusca*-ból eddig leírt extracelluláris enzimekre vonatkozó szakirodalommal, illetve a *T. cellulosilytica* természetes környezetével is alátámaszthatunk (KUKOLYA et al., 2002; WILSON, 2004).

A hőstabilitást 70 °C-on vizsgálva az enzim már sokkal rövidebb ideig őrizte meg aktivitását. A szakirodalomban találunk olyan *Thermobifida* eredetű enzimeket, amely hasonlóan rövid ideig őrzi meg aktivitását ilyen magas hőmérsékleten (YANG et al., 2007), de van példa olyan *T. fusca*-ból leírt katalitikus fehérjére is, amely még 70 °C-on is több óra inkubálás után is megőrzi aktivitásának jelentős részét (POSTA et al., 2004; RÁCZ, 2009).

A *T. fusca* eredetű, és a *T. cellulosilytica* eredetű endomannanáz több biokémiai paramétert tekintve nagyon hasonló. Hőmérséklet optimumuk közel van egymáshoz, és a pH optimum tekintetében elmondható, hogy mindkét esetben a lúgos tartományba esik az aktivitás maximuma, bár a *T. fusca* Man5A enzimnél sokkal szélesebb tartományban van közel 100 százalékos aktivitás. A két enzim hőstabilitását összehasonlítva 60 °C-on még nem tapasztaltunk különbséget, de 70 °C-on a *T. cellulosilytica* eredetű Man5A aktivitása már 10 perc alatt a felére csökken, míg a másik enzim esetében 3 óra elteltével is megőrzi aktivitásának 70 százalékát. A *T. fusca*-ból származó Man5A enzim, és a *T. cellulosilytica*-ból származó Man5A enzim összehasonlítása nagyon érdekes, hiszen a két homológ fehérje 79 százalékos hasonlóságot mutat, ennek ellenére nagy különbséget lehetett kimutatni a két fehérje stabilitása között. Ennek tükrében ipari hasznosításra a *T. fusca*-ból származó endomannanáz alkalmasabb lehet, de a jövőre nézve érdemes lenne vizsgálni, hogy mely aminosavak okozhatják ezt a nagyfokú eltérést. A további kutatások egyik célja lehet az általam vizsgált endomannanáz enzim részletes biokémiai jellemzése mellett, ennek a kérdésnek a megválaszolása is.

A stabilitás oka az aminosav sorrendben és az általa meghatározott térszerkezetben keresendő. Ezért a vizsgálatok folytatásának részét képezheti a *T. cellulosilytica* endomannanáz Man5A enzimek 3D szerkezetének meghatározása. Ha sikerülne azonosítani a stabilitásbeli különbségért felelős kritikus aminosavakat, akkor helyspecifikus mutagenézis segítségével növelni lehetne más, mezofil enzimek hőstabilitását.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A növényi sejtfal különböző kémiai tulajdonsággal rendelkező, eltérő szerkezetű összetevőinek felhasználására számos iparágban támaszkodnak már ma is. Új technológiák fejlesztésével gazdaságossá tehető a lignocellulóz alapú bioüzemanyag gyártás, de a cellulózt és a hemicellulózt hidrolizáló enzimeknek, így a különböző mannanázoknak további felhasználási lehetőségei vannak a papírgyártás, vagy a takarmányozás területén. Ezen enzimek alkalmazásával komoly potenciál rejlik továbbá a prebiotikus oligoszacharidok előállításában is, amelyeket a táplálkozástudományban vagy az élelmiszeriparban hasznosíthatnak. Meghatározott ipari célok ellátására speciális enzimmészítmények szükségesek, ezért az újabb enzimek kutatása folyamatos.

A természetben a legaktívabb lignocellulóz transzformáció a komposztok meleg régiójában zajlik, ezen fázis legaktívabb lignocellulóz bontó tulajdonsággal rendelkező aktinomicétái a *Thermobifida* fajok, amelyek a komposztok gyors kolonizációjára képesek. A genusz eddig ismert tagjainak közös bélyege a rendkívüli cellulolitikus tulajdonság. A *thermobifidák* hatékony lignocellulózbontó képessége összetett hidroláz enzimszisztémájukban rejlik, amelyet folyamatosan bővülő kutatások során tanulmányoznak.

Az általam vizsgált enzimet termelő *Thermobifida cellulosilytica* típus törzsét Magyarországon 2001-ben izolálták. A vizsgálatok alapján aerob, Gram-pozitív, spóráképző és termofil tulajdonságú baktérium, amely hasonlóan jó degradációs képességekkel rendelkezik, mint a *T. fusca*. Munkám során elsőként sikerült ennek az összetett és komplett enzimszisztémának az egyik fontos tagját a *T. cellulosilytica* genomjában kódoló gént (*man5A*) klónozni, és heterológ expresszióval az általa meghatározott Man5A endomannanáz enzimfehérjét *E. coli*-ban túltermeltetni.

A biokémiai vizsgálatok során meghatároztam a tisztított endomannanáz enzim molekulatömegét, az enzimaktivitás optimális pH tartományát, valamint az optimális hőmérsékletét. A kísérlet során megállapítottam, hogy az enzim magas hőmérsékleten is aktív, stabilitását 60 °C-on több óráig megőrzi, azonban 70 °C-on hamar denaturálódik, és elveszti funkcióját.

A Debreceni Egyetem Genetikai és Alkalmazott Mikrobiológiai Tanszékén *T. fusca* TM51 törzsből származó endomannanáz enzimmel végzett kísérletek eredményeit felhasználva összehasonlítottam a két homológ enzim egyes biokémiai tulajdonságait. Ezek alapján a két homológ endomannanáz sok tekintetben hasonló tulajdonságokkal bír, ám a nagyfokú aminosav szekvencia hasonlóság ellenére a hőstabilitásuk között nagyfokú különbséget figyeltem meg.

A további kutatások célja lehet a részletes biokémiai jellemzés, a különbségek okainak feltárása, és újabb *T. cellulosilytica* eredetű enzimek vizsgálata.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném köszönetemet kifejezni Tóth Ákos konzulensemnek a tőle kapott sokrétű segítségért, valamint útmutatásért. Gyakorlati tanácsaival és meglátásaival alapvetően hozzájárult szakmai fejlődésemhez és munkámhoz.

Köszönettel tartozom a Környezetvédelmi és Környezetbiztonsági Tanszék és a Regionális Egyetemi Tudásközpont felé, hogy biztosította a lehetőséget vizsgálataim elvégzéséhez és dolgozatom megírásához.

Köszönöm a Környezetvédelmi és Környezetbiztonsági Tanszék és a Regionális Egyetemi Tudásközpont minden munkatársának a dolgozatom létrejöttéhez nyújtott technikai és baráti segítséget.

Továbbá szeretnék köszönetet mondani dr. Barna Teréznek, aki az összehasonlító elemzés elvégzéséhez a *T. fusca*-ra vonatkozó adatokat rendelkezésemre bocsátotta.

Külön köszönettel tartozom családomnak és barátaimnak, akik megértésükkel ösztönözték kitartásomat.

8. IRODALOMJEGYZÉK

1. AKITA, M., TAKEDA, N., HIRASAWA, K., SAKAI, H., KAWAMOTO, M., YAMAMOTO, M., GRANT, W. D., HATADA, Y., ITO, S., HORIKOSHI, K. (2004): Crystallization and preliminary X-ray study of alkaline mannanase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate. *Acta crystallographica. Section D. Biological cristallographic*. 60(Pt. 8): 1490-2.
2. ASPEBORG, H., COUTINHO, P. M., WANG, Y., BRUMER, H., HENRISSAT, B. (2012): Evolution, substrate specificity and subfamily classification of glycoside hydrolase family 5 (GH5). *BMC Evolutionary Biology*. 12:186.
3. BÉKI, E., NAGY, I., VANDERLEYDEN, J., JÄGER, S., KISS, L., FÜLÖP, L., HORNOK, L., KUKOLYA, J. (2003): Cloning and Heterologous expression of a β -D-Mannosidase (EC 3.2.1.25) -Encoding gene from *Thermobifida fusca* TM51. *Applied and Environmental Microbiology*. vol. 69 no. 4 1944-1952.
4. DEBOY, R. T., MONGODIN, E. F., FOUTS, D. E., TAILFORD, L. E., KHOURI, H., EMERSON, J. B., MOHAMOUD, Y., WATKINS, K., HENRISSAT, B., GILBERT, H. J., NELSON, K. E. (2008): Insights into plant cell wall degradation from the genome sequence of the soil bacterium *Cellvibrio japonicus*. *Journal of bacteriology*. 190(15):5455-63.
5. DEHORITY, B. A. (1991): Cellulose degradation in ruminants. In: HAIGLER, C. H., WEIMER, P. J. (eds) *Biosynthesis and Biodegradation od Cellulose*. Marcel Dekker. Inc. New York. pp. 327- 354.
6. DENG, Y., FONG, S. S. (2010): Development and application of a PCR-Targeted gene disruption Method for studying CeIR function of *Thermobifida fusca*. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 76. NO. 7. 2098-2106.
7. DHAWAN, S., KAUR, J. (2007): Microbial mannanases: an overview of production and applications. *Crit Rev Biotechnology. Department of Biotechnology*. 27(4): 197-216.
8. DWIVEDI, P., ALAVAPATI, J., LAI, P. (2009): Cellulosic ethanol production in the United States: Conversion technologies, current pro duction status, economics and emerging developments. *Energy for Sustainable Development*. Vol. 13. 174-182. p.
9. FERREIRA, L. N. (2008): Industrial exploitation of renewable resources: from ethanol production to bioproducts development. *Journal de la Société de biologie*. 202(3):191-9.

10. HAKI, G. D., RAKSHIT, S. K. (2003): Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresources Technology*. Vol. 89, No. 1, 17-34. pp.
11. HILGE, M., GLOOR, S. M., RYPNIEWSKI, W., SAUER, O., HEIGHTMAN, T. D., ZIMMERMANN, W., WINTERHALTER, K., PIONTEK, K. (1998): High-resolution native and complex structures of thermostable beta-mannanase from *Thermonospora fusca* – substrate specificity in glycosyl hydrolase family 5. *Structure*. 6(11):1433-44.
12. HOWARD, R. L., ABOTSI E., JANSEN VAN RENSBURG E. L., HOWARD S. (2003): Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 2 (12), pp. 602-619.
13. KUGA, S., BROWN, R. M. JR. (1991): Physical structure of cellulose microfibrils: implications for biogenesis. Haigler, C. H., Weimer, P. J. (szerk.) In.: *Biosynthesis and Biodegradation of Cellulose*. New York, Marcel Dekker. 125-142. pp.
14. KUKOLYA, J., NAGY, I., LÁDAY, M., TÓTH, E., ORAVECZ, O., MÁRIALIGETI, K., HORNOK, L. (2002): *Thermobifida cellulosilytica* sp. nov., a novel lignocellulose-decomposing actinomycete. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 52:1193-1199.
15. LYKIDIS, A., MAVROMATIS, K., IVANOVA, N., ANDERSON, I., LAND, M., DiBARTOLO, G., MARTINEZ, M., LAPIDUS, A., LUCAS, S., COPELAND, A., RICHARDSON, P., WILSON, D. B., KYRPIDES, N. (2007): Genome Sequence and Analysis of the Soil Cellulolytic Actinomycete *Thermobifida fusca* YX. *Journal of Bacteriology*. vol. 189 no. 6 2477-2486.
16. LYNCH, J. M., WOOD, D. A. (1992): Controlled microbial degradation of lignocellulose: the basis for existing and novel approaches to composting. In: Gasser, J. K. R. (szerk.) *Composting of Agricultural and Wastes*. Elsevier Applied Science. London, 183-193. pp.
17. MALINGREAU, J. P., GRÉGOIRE, J. M. (1996): Developing a Global Vegetation Fire Monitoring System for global change studies: A framework. In: Levine, J. S. (szerk.), *Biomass burning and global change*. 14-24. The MIT Press, Cambridge, Massachusetts.
18. POSTA, K., BÉKI, E., WILSON, D. W., KUKOLYA, J., HORNOK, L. (2004): Cloning, characterization and phylogenetic relationships of cel5B, a new endoglucanase encoding gene from *Thermobifida fusca*. *Journal of Basic Microbiology*. 44(5): 383-99.

19. PULS, J., SCHUSEIL, J. (1996): Chemistry of hemicelluloses: relationship between hemicellulose structure and enzymes required for hydrolysis. IN: COUGHLAN, M. P., HAZLEWOOD, G. P., EDITORS; COUGHLAN, M. P., HAZLEWOOD, G. P., editors. Hemicelluloses and hemicellulases. London, England: Portland Press. pp. 1–28.
20. RÁCZ, O. (2009): A GH 5-ös családba tartozó termofil endo-b-1,4- mannanáz biokémiai jellemzése. Debreceni Egyetem Genetikai és Alkalmazott Mikrobiológiai Tanszék. Debrecen. Szakdolgozat.
21. RITTER, S. K. (2008): Lignocellulose: A Complex Biomaterial. Plant Biochemistry. vol. 86. number 49. 15. p.
22. SACHSLEHNER, A., FOIDL, G., FOIDL, N., GÜBITZ, G., HALTRICH, D. (2000): Hydrolysis of isolated coffee mannan and coffee extract by mannanases of *Sclerotium rolfsii*. Journal of Biotechnol. 80(2): 127-34.
23. SAMBROOK, J., FRITISCH, E. F., MANIATIS, T. (1989): Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbob. N. Y.
24. SCHWARZ, W. H. (2001): The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. Applied Microbiology and Biotechnology. 56(5-6):634-49.
25. SHALLOM, D., SHOHAM, Y. (2003): Microbial hemicellulases. Current Opinion in Microbiology. Elsevier Science. 6:219-228. p.
26. SUURNÄKKI, A., TENKANEN, M., BUCHERT, J., VIIKARI, L. (1997): Hemicellulases in the bleaching of chemical pulps. Advances in Biochemical Engineering Biotechnology. Vol. 57:261-87.
27. TAMÁS, J., BLASKÓ, L. (2008): Environmental management. Debreceni Egyetem a TÁMOP 4.1.2 pályázat keretein belül.
28. TUCKER M. P., KIM K. H, NEWMAN M. M., NGUYEN Q. A. (2003): Effects of Temperature and Moisture on Dilute-Acid Steam Explosion Pretreatment of Corn Stover and Cellulase Enzyme Digestibility. Applied Biochemistry and Biotechnology. 105-108:165-77.
29. VOUNG, V. T., WILSON, D., W. (2010): Glycoside hydrolases: Catalytic base nucleophile diversity. Biotechnology and Bioengineering. Vol 107. (2):195-205.p.
30. WILSON, D. W. (2004): Studies of *Thermobifida fusca* Plant Cell Wall Degrading Enzymes. The Chemical Record. Vol. 4. 72-82.

31. YANG, L. L., TANG, S. K., ZHANG, Y. Q., ZHI, X. Y., WANG, D., XU, L. H., LI, W. J. (2008): *Thermobifida halotolerans* sp. nov., isolated from a salt mine sample, and emended description of the genus *Thermobifida*. International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology. vol. 58. no. 8. 1821-1825.
32. ZHANG, Z., WANG, Y., RUAN, J. (1998): Reclassification of Thermomonosporand Microtetraspora. International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology. Vol. 48 no. 2 411-422.

INTERNETES HIVATKOZÁSOK

HTTP1: biotech.szbk.u-szeged.hu/.../bachelor2009/5_feherje_szenhidrat.ppt

HTTP2: http://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside_Hydrolase_Family_5

<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>

<http://www.thermoscientificbio.com/molecular-biology/>

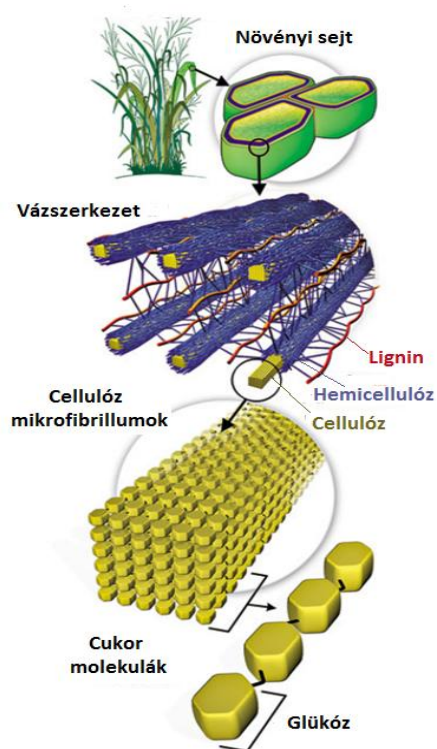
<http://www.thermoscientificbio.com/pcr-qpcr-and-reverse-transcription/>

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>

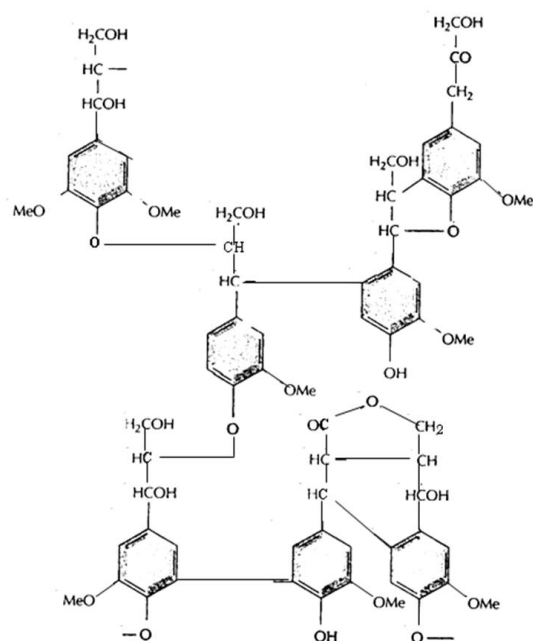
http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome

9. MELLÉKLETEK

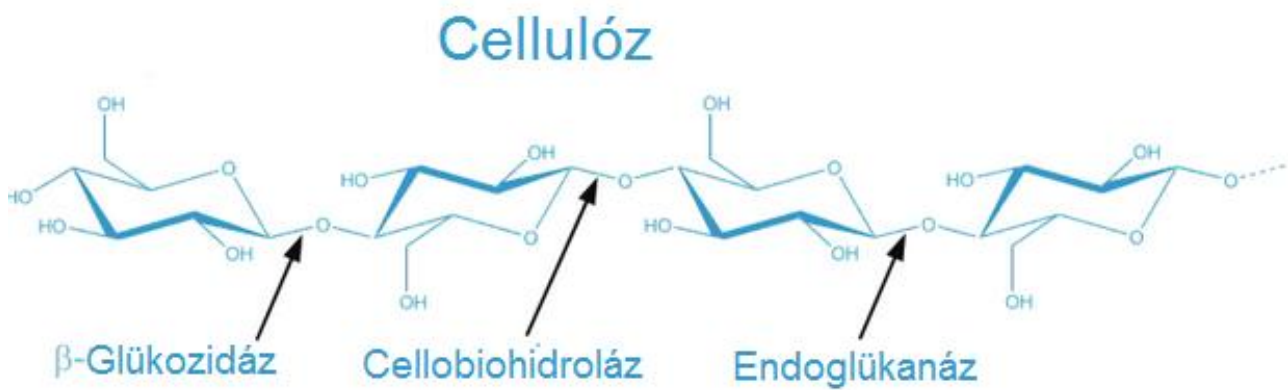
7. számú melléklet – A növényi vázszerkezet felépítése (RITTER, 2008)



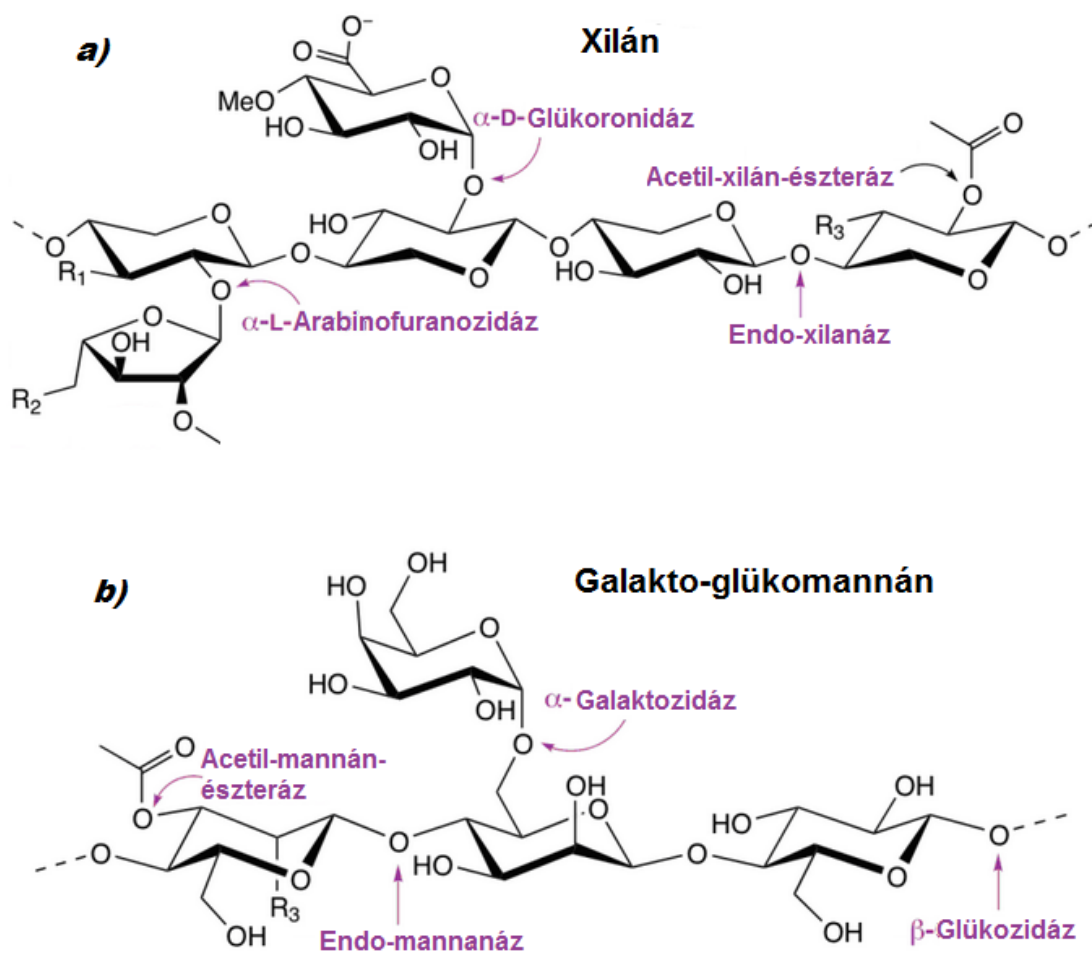
8. számú melléklet – A lignin reprezentatív szerkezete (HTTP1)



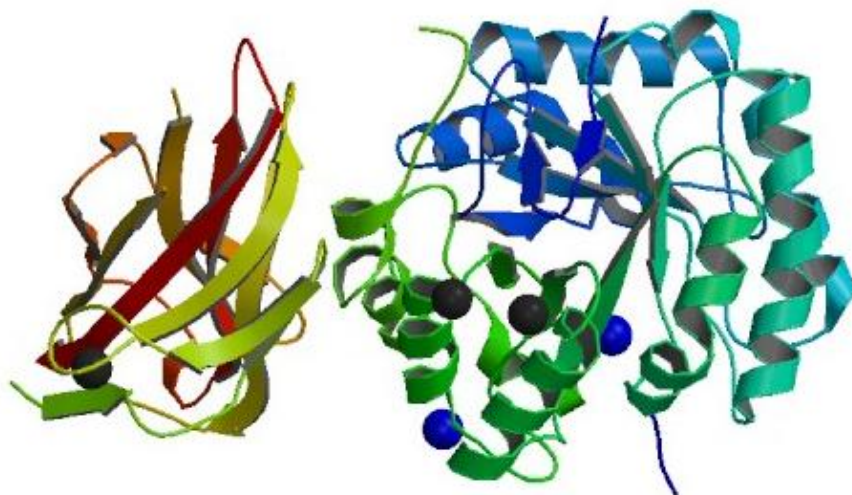
9. számú melléklet – A cellulóz bontásában részt vevő enzimek (DEBOY et al., 2008)



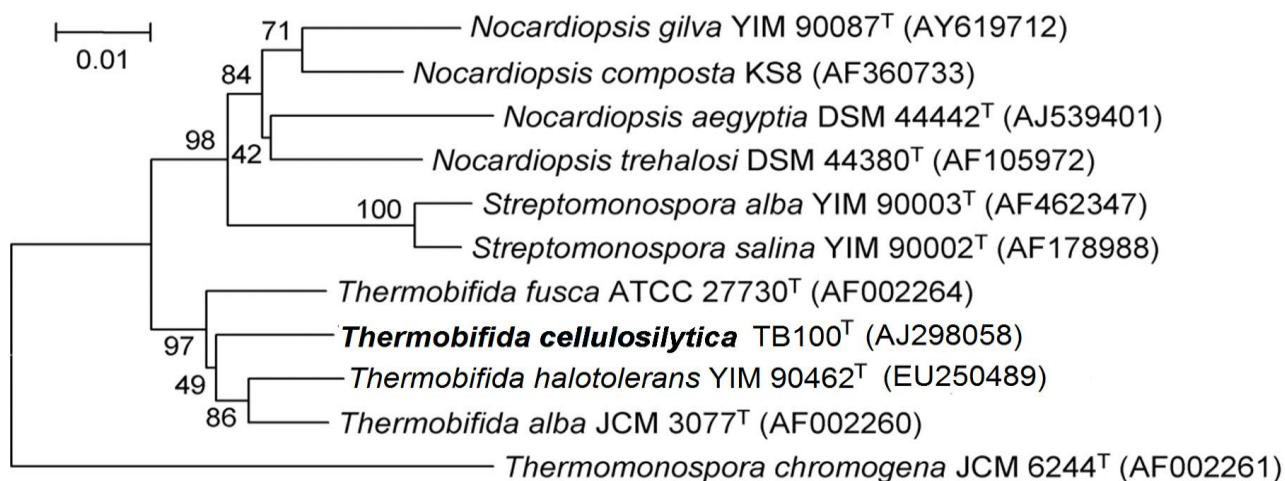
10. számú melléklet – A xilán *a)* és a galakto-glükomannán *b)* szerkezete valamint enzimatikus bontása (DEBOY et al., 2008)



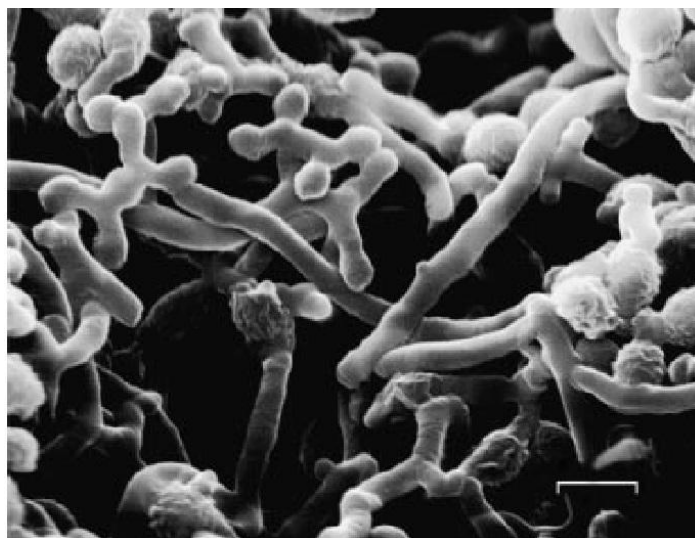
11. számú melléklet – *Bacillus* sp. JAMB-602 törzsből származó β -mannanáz háromdimenziós szerkezeti felépítése a katalitikus és CBM modulokkal (AKITA et al., 2004)



12. számú melléklet - A *T. cellulosilytica* rendszertani pozíciója (YANG et al., 2008)



13. számú melléklet - A *T. cellulosilytica* TB100-as törzs elektronmikroszkópos felvétele (a méretvonal 1 μ m-es) (KUKOLYA et al., 2002)



NYILATKOZAT

Alulírott Hermán Boglárka, a Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar Genetika és Biotechnológiai Intézetének hallgatója nyilatkozom, hogy a dolgozat saját munkám, melynek elkészítése során a felhasznált irodalmat korrekt módon, a jogi és etikai szabályok betartásával kezeltem.

....., 2013.hó.....nap

.....

hallgató aláírása