



A *RHIZOMUCOR PUSILLUS* JÁROMSPÓRÁS GOMBA REKOMBINÁNS B-GALAKTOZIDÁZAINAK VIZSGÁLATA

Kovács Dániel¹, Reznyák Brigitta¹, Kovács Tamás¹, Vágvölgyi Csaba¹, Papp Tamás^{1,2},
Takó Miklós¹, Nagy Gábor^{1,2}

¹Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar, Biotechnológiai és
Mikrobiológiai Tanszék,

²Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar, HUN-REN-SZTE
Gombafertőzések Patomechanizmusai Kutatócsoport
e-mail: kov.daniel2001@gmail.com

ABSZTRAKT

A járomspórás gombák a fonalas gombák egyik legváltozatosabb csoportja. Többségük a talaj bomló állati és növényi szerves anyagain élő szaprotróf szervezet. Közöttük ipari, mezőgazdasági, biotechnológiai és orvosi szempontból jelentős fajok lelhetők fel. Számos képviselőjüket alkalmazzák a gyógyszer- és élelmiszeriparban, extracelluláris enzimek (pl. lipázok, proteázok, amilázok, cellulázok) termeltetésére. Az ide tartozó *Mucoromycota* gombák kiváló forrásai lehetnek ipari enzimeknek. Ennek ellenére galaktozidáz termelésük, a termelt enzimfehérjék és a kódoló gének molekuláris és funkcionális jellemzői kevésbé vizsgált területek. A béta-galaktozidáz (laktáz) egy szacharid bontó enzim, mely a béta-galaktozidokban a glikozidos kötések hidrolízisét katalizálja. Laktózbontó képessége okán előszeretettel alkalmazzák az élelmiszeriparban tejtermékek laktóz tartalmának csökkentésére, valamint a sajtgyártás során melléktermékként keletkező tejsavó kezelésére. A laktózérzékenység napjainkban már népbetegségnek számít, így egyes tejalapú élelmiszerek laktóz tartalmának csökkentése, ennek érdekében új típusú jellemzett béta-galaktozidáz enzimek fejlesztése, hatékony, gazdaságos előállításának kidolgozása kiemelt egészségügyi és élelmiszeripari jelentőséggel bír. A mikroorganizmusok jelentős forrásai a béta-galaktozidáz enzimeknek. Az ilyen típusú enzimek mikrobiális előállítása költséghatékony, többek között a jól optimalizálható fermentációs körülmények, az olcsó növekedési szubsztrát, és a nagyléptékű tenyésztethetőség miatt. A mikrobiális előállítás így nagy enzimhozamot biztosít, illetve a termofil fajokból származó enzimek nagyobb hőstabilitással is rendelkezhetnek. Előzetes munkákban számos béta-galaktozidáz termelő *Mucoromycota* törzset azonosított, és tesztelt csoportunk. Az enzimaktivitás gyakorlati szempontból is fontos biokémiai jellemzőinek megfelelő vizsgálata szükséges, ugyanakkor az elvárt tisztulási minőségű natív enzim előállítása e fermentációs rendszerekből nehézkes. Az alkalmazott szubsztrátból származó fehérjék, szénhidrátok jelenléte, valamint a termelő gombák egyéb fehérjeinek megjelenése az enzimfehérje tisztasági paramétereit befolyásolhatja. Az enzim erre alkalmas heterológ rendszerekben való célzott termeltetésével ugyanakkor már biztosított a megfelelő aktivitás pontos elemzése és jellemzése. Jelen kutatásban egy jó termelőként leírt termofil *Rhizomucor pusillus* törzs β -galaktozidáz kódoló génjeinek feltárását, jellemzését, majd a kódolt enzimfehérje heterológ termeltetését és tisztítását tűztük ki célul. Vizsgálni kívántuk a tisztított enzimaktivitás biokémiai tulajdonságait is. Adatbázisban elérhető *R. pusillus* genom elemzése során három, a *Trichoderma atroviride* béta-galaktozidáz aminosav-szekvenciájával nagyfokú



hasonlóságot mutató feltételezett béta-galaktozidáz kódoló gént azonosítottunk. A levezethető feltételezett béta-galaktozidáz fehérjék méretükben, aminosav-szekvencia hosszukban és izoelektromos pontjukban is különböztek. Mindhárom fehérjében azonosítottunk glikozid-hidroláz 35 családra jellemző konzervált domént, ami kulcsfontosságú szerepet játszhat a béta-galaktozidáz aktivitásban. Izoláltuk a gének kódoló cDNS szakaszait, melyeket *Komagataella phaffii* élesztőben való heterológ kifejeztetéshez alkalmas vektorba klónoztunk. Sikeres termeltetést követően affinitás kromatográfia technikával izoláltunk a hisztidin címkézett enzimfehérjét. A tisztított béta-galaktozidáz aktivitás működésének optimumát 60 °C hőmérséklet körül és pH 5,8-7,0 tartományon azonosítottuk. A tisztítási eljárás 30,78% kihozatal mellett egy 1312518,6 U/mg specifikus aktivitással és 45938 U/ml térfogati aktivitással rendelkező rekombináns *R. pusillus* béta-galaktozidázt eredményezett. A kapott béta-galaktozidáz elegy összaktivitása és térfogati aktivitása jelentős, az eddig heterológ rendszerben termeltetett gomba béta-galaktozidázokkal összehasonlítva, ahol többnyire 0,25-40000 U/ml aktivitásokat nyertek. Tudomásunk szerint elsőként termeltettünk járomspórás gomba béta-galaktozidázt heterológ rendszerben. A célzott termeltetéssel biztosítottuk az enzimaktivitás biokémiai jellemzéséhez elvárható megfelelő minőségű tisztaságot. Terveink között szerepel az expresszió mértékének növelése, azaz nagyobb enzimhozam elérése, melynek érdekében a heterológ fehérje termeltetési rendszer körülményeinek optimalizálása szükséges. Tervezzük a tisztított rekombináns béta-galaktozidáz aktivitás biokémiai jellemzőinek további vizsgálatát is. Reményeink szerint a *R. pusillus* β -galaktozidáz enzim tulajdonságait tekintve alkalmas jelölt lehet élelmiszeripari gyakorlati folyamatok (pl. tejcukor mentesítés, galakto-oligoszacharid előállítás) gazdaságos katalizálásához.

Köszönetnyilvánítás: A kutatást a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal FK 134886, a TKP2021-EGA-28 projektek támogatták. A kutatómunka továbbá a Magyar Tudományos Akadémia Bolyai János Kutatási Ösztöndíj (N.G.) támogatásával készült.