

Szent István Egyetem

Doktori (Ph.D.) értekezés

**Lignocellulóz bontó mikroba izolálása és enzimeik
biotechnológiai alkalmazása**

Tóth Ákos

Gödöllő

2016

A doktori iskola

Megnevezése: Környezettudományi Doktori Iskola

Tudományága: Környezettudomány

Vezetője: Csákiné Dr. Michéli Erika
Tanszékvezető, egyetemi tanár
Szent István Egyetem
Mezőgazdasági és Környezettudományi Kar
Környezettudományi Intézet
Talajtani és Agrokémiai Tanszék

Témavezetők: Dr. Kukolya József
Osztályvezető, tudományos főmunkatárs
Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ
Agrár-környezettudományi Kutatóintézet
Környezeti és Alkalmazott Mikrobiológiai Osztály

Dr. Kriszt Balázs
Tanszékvezető, egyetemi docens
Szent István Egyetem
Mezőgazdasági és Környezettudományi Kar
Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet
Környezetbiztonsági és Környezettoxikológiai Tanszék

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezetők jóváhagyása

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	1
1. BEVEZETÉS	2
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	4
2.1. A komposztok fizikai és kémiai összetétele.....	4
2.2. A komposztokra jellemző mikrobiális közösségek	5
2.3. Lignocellulóz bontás a komposztokban.....	8
2.3.1. A lignocellulóz felépítése	8
2.3.2. A komposztok lignocellulolitikus mikroorganizmusai	10
2.4. Komposztlakó baktériumok izolálása, és új baktérium faj leírásának követelményei	13
2.4.1. Lignocellulolitikus mikroorganizmusok izolálása komposztból	13
2.4.2. Új baktérium faj leírásának követelményei	14
2.5. Lignocellulóz bontó aerob baktériumok genomi jellemzői.....	17
2.5.1. A <i>Saccharophagus degradans</i> genom projekt ismertetése	18
2.5.2. <i>Thermobifida fusca</i> YX genom projekt ismertetése	21
2.6. Lignocellulolitikus enzimszerek.....	23
2.6.1. Lignint módosító enzimek.....	24
2.6.2. Glikozid hidrolázok	25
2.7. Manno oligoszacharidok felhasználási lehetőségei	30
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	33
3.1. Cellulóz és hemicellulóz bontó mikrobák izolálása és azonosítása.....	33
3.1.1. A mikrobák izolálása	33
3.1.2. Az izolátumok azonosítása	33
3.2. Új faj új nemzetség jelölt mikrobiológiai jellemzése	35
3.2.1. Fenotípusos tulajdonságok vizsgálata.....	36
3.2.2. Kemotaxonómiai vizsgálatok	36
3.3. Genom analízis.....	36
3.4. <i>Thermobifida</i> endomannanázok vizsgálata	38
3.4.1. Endomannanáz gének klónozása	38
3.4.2. Fehérje expresszió és tisztítás.....	40
3.4.3. Az endomannanázok biokémiai jellemzése.....	41
4. EREDMÉNYEK	43
4.1. Komposzt eredetű törzsgyűjtemény kialakítása	43

4.2. A K13 jelzésű törzs rendszertani vizsgálata.....	46
4.2.1. A K13-as törzs jellemzése.....	46
4.2.2. A K13-as törzssel rokon nemzetségek jellemzése.....	51
4.2.3. A K13-as törzs rendszertani besorolása.....	52
4.3. Genom analízisek eredményei.....	57
4.4. Három <i>Thermobifida</i> faj endomannanázának vizsgálata.....	61
4.4.1. Az endomannanázok vizsgálatához kapcsolódó szekvenciák génbanki számai.....	61
4.4.2. Az endomannanáz gének amplifikációja.....	62
4.4.3. A <i>Thermobifida</i> endomannanáz gének lokalizációja.....	63
4.4.4. Az endomannanázok (Man5ATf, Man5ATc és Man5ATh) <i>in silico</i> vizsgálata.....	64
4.4.5. A heterológ fehérje expresszió és tisztítás eredménye.....	67
4.4.6. A Man5ATf, Man5ATc és Man5ATh β -1,4-endomannanázok biokémiai jellemzése.....	67
4.5. Új tudományos eredmények.....	70
6. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK.....	72
7. ÖSSZEFOGLALÓ.....	80
8. SUMMARY.....	82
1. MELLÉKLET: IRODALOMJEGYZÉK.....	84
2. MELLÉKLET.....	102
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	103

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

APL	aminophospholipid
CAZY	carbohydrate-active enzymes
CBM	carbohydrate-binding module
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
CMC	carboxymethyl cellulose
DAP	diaminopimelinsav
DPG	diphosphatidylglycerol
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EC	enzyme commission
FAME	fatty acid methyl ester
G+C	guanin+citozin
GH	glikozid hidroláz
IMAC	immobilized metal ion affinity chromatography
JCM	Japan Collection of Microorganisms
LBG	locust bean gum
<i>man5ATc</i>	<i>Thermobifida cellulosilytica</i> endomannanáz gén
<i>man5ATf</i>	<i>Thermobifida fusca</i> endomannanáz gén
<i>man5Ath</i>	<i>Thermobifida halotolerans</i> endomannanáz gén
mezo-Dpm	mezo 2,6-diaminopimelinsav
MK	menakinon
MOS	mannooligoszacharid
mtsai	munkatársai
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PE	phosphatidylethanolamine
PG	phosphatidylglycerol
PSer	phosphatidylserine
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
TAT -	twin-arginine translocation

1. BEVEZETÉS

A lignocellulóz a növényi sejtfal meghatározó része, így olyan, nagy mennyiségben megtalálható és megújuló nyersanyagforrás lehet, amely számos iparágban hasznosulhat. A széles körű hasznosítás fő akadályá, hogy rendkívül összetett, és rendezett struktúrája miatt nehezen feldolgozható. Fő összetevői a lignin, a cellulóz, és a változatos felépítésű hemicellulózok, mint amilyenek a xilánok és a mannánok. A lignin egyrészt elfedi a cellulóz szálat, másrészt irreverzibilisen kötődhet bizonyos fehérjékhez, ezzel is nehezítve a molekula enzimátikus bontását. A hemicellulóz frakció szintén nehezíti a cellulóz rostokhoz való hozzáférést, ugyanakkor maga is nyersanyagforrás lehet. A különböző kémiai és mechanikai kezelések emelik a hasznosítás költségeit, sok esetben gátolják a feldolgozás további folyamatait, és általában nem környezetbarát módszerek. Biotechnológiai módszerekkel ezeket a negatív hatásokat lehetséges eliminálni vagy legalább csökkenteni, ezért számos kutatás célozza az alkalmazható mikroszervezetek, illetve a bontásra képes enzimek felkutatását és jellemzését. A komposztokban nagyon hatékonyan történik a növényi biomassza bontása, mégpedig megfelelő enzimekkel rendelkező mikroorganizmusok által. A komposztálás során aerob körülmények között egy termofil szakaszt is tartalmazó folyamaton keresztül, baktériumok és gombák alkotta közösség végzi a lignocellulóz enzimátikus bontását. A lignocellulózt alkotó biopolimerek bontásának tanulmányozásakor, valamint új, szénhidrát polimereken aktív mikroszervezetek vagy enzimek felkutatásakor több szempontból is érdemes komposzt mintával dolgozni. Egyrészt egy nagyon diverz közösség jellemzi, amely komplett és rendkívül hatékony lignocellulóz bontó enzimrendszerrel rendelkezik, másrészt a termofil szakaszban olyan szervezetek dominálnak, amelyek enzimeit is magas hőmérsékleti optimummal és hőstabilitással bírnak. Eddig ismeretlen mikroszervezetek genom analízisével feltárhatóak esetlegesen új anyagcsere utak vagy enzimek, amelyek részt vesznek a biopolimerek bontásában. Ezen enzimek hatékonysága és magas hőstabilitása előnyös az ipari felhasználás területén, hiszen a robosztusabb, stabil enzimeket hatékonyabban lehet ipari körülmények között alkalmazni. Ilyen ipari alkalmazás lehet a cellulóz alapú üzemanyaggyártás, a takarmányozásban történő felhasználás, a papíriparban a klórozás enzimekkel való kiváltása, és az utóbbi

időben egyre hangsúlyosabb prebiotikum előállítás. Az olyan összetett polimerek bontása, mint amilyen a lignocellulóz, még számos kérdést vet fel, amelyek megválaszolása az ipari alkalmazások optimalizálása miatt is fontos.

Doktori munkám során célul tűztem ki: Lignocellulóz bontó baktériumok izolálását komposzt mezofil és termofil régióiból, valamint az izolátumok identifikálását. Az új faj/nemzetség jelölt izolátumok jellemzését és taxonómiai besorolását. Jó lignocellulóz bontó képességükről ismert *Thermobifida* fajok, és az esetlegesen izolált új faj jelölt(ek) genom projektjének elkészítését. Különböző *Thermobifida* fajok *man5A* endomannanáz génjének klónozását és expresszáltatását. A Man5A endomannanáz fehérjék jellemzését és összehasonlítását.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A komposztok fizikai és kémiai összetétele

A növényi biomassza átalakításának egyik legaktívabb színtere a komposzt. A komposztálás egy aerob, szilárd fázisú biodegradatív folyamat, ahol a szerves anyagok bontását szabályozott körülmények között végzik bizonyos mikroorganizmusok, miközben hő termelődik. A komposztálás teljes időtartamában jelen vannak különböző mikroszervezetek, illetve eltérő összetételű közösségek. A komposztálás folyamatát leginkább befolyásoló tényező a hőmérséklet. A jellegzetes hőprofil kezdeti mezofil fázisból, termofil fázisból, lehülési fázisból és érési szakaszból áll (Ryckeboer et al., 2003b). Ezek időtartama eltérő, és nagyban függ a komposzthalom méretétől valamint összetételétől.

A kémiai elemek közül a szén és a nitrogén jelenléte befolyásolja legnagyobb mértékben a komposztálást. A szénvegyületek nemcsak energiaforrásként, hanem az élőlényeket felépítő szerves molekulák alapjaként is hasznosulnak a komposztban lakó szervezetekben, a nitrogén pedig olyan alapvető molekulák fontos építőköve, mint a nukleinsavak, fehérjék, koenzimek. Az ideális C/N arányt körülbelül 30:1-hez szokták meghatározni. Ennyi nitrogénre szüksége van a komposztálást végző mikrobiális közösségnek, magasabb nitrogén arány esetén azonban növekszik az ammónia koncentrációja, ami kellemetlen szagokat okoz. Az érési folyamat végére ez az arány 10-15:1-re alakul az eltávozó széndioxid miatt. Egyéb elemek, mint a foszfor, a kalcium vagy az esszenciális mikroelemek, mint a kálium, vas, bór, réz általában nem limitálóak, mert megfelelő mennyiségben jelen vannak a komposztot felépítő szerves anyagokban.

A komposztálás aerob folyamat, a mikroorganizmusok aerob légzés során használják fel a szerves molekulákat, a folyamat során a terminális elektron akceptor az oxigén. Ezért is fontos (az összetevők homogenizálása mellett) a komposzthalom forgatása, valamint a járatokat képző, szerkezetet lazító állatok (elsősorban *Nematoda* és *Annelida* fajok) tevékenysége is. A komposztálásban kulcsszereplő mikroszervezetek oxigénigénye viszonylag tág határok között mozog. A legtöbb esetben 5%-os oxigén szint mellett már életképesek, és 10% felett már ideális az oxigénszint számukra ([http 1](http://1)).

A közeg kémhatása jellemzően pH 5,5 és 8,5 között van optimális esetben. Kezdetben a szerves savak megjelenése miatt csökken a pH, majd ezek a savak átalakulnak és az ammónia is megjelenik, ami a lúgos irányba mozdítja el a kémhatást. A szellőztetés a pH alakításában szintén fontos, mert az anaerob folyamatok során történő savképzés hatására kialakuló alacsony pH értékek mellett nem képes kialakulni a hatékony komposztáláshoz megfelelő mikrobaközösség. A komposztok nedvességtartalma ugyancsak befolyásolja a mikrobaközösséget, túl alacsony nedvességtartalom (30%-nál kisebb) gátolja a mikroszervezeteket, ugyanis a szerves anyagok mikrobiális bontása egy vékony filmrétegben megy végbe. A túl magas nedvességtartalom (65%-nál nagyobb) inkább az anaerob körülmények kialakításának kedvez, amellett hogy a túl sok víz ki is moshatja a tápanyagokat a komposztból (de Bertoldi et al., 1983, Fogarty és Tuovinen, 1991). Meg kell említeni, hogy a komposzthalmok a gyakorlatban nem teljesen homogének, kialakulhatnak bennük olyan mikronichek, amelyek adottságai eltérőek lehetnek az átlagtól, létrejöhetnek akár 80 °C körüli részek, vagy anaerob területek. Kommunális hulladékból álló komposzthalmok esetében, akár az egy százalékot is elérheti az anaerob fajok aránya (Atkinson et al., 1996).

A fentiek tükrében elmondható, hogy a fizikai-kémiai paraméterek, és a mikrobiális közösségek dinamikus kölcsönhatásban vannak egymással. A szerves anyag átalakulását ennek a közösségnek az anyagcsere folyamatai határozzák meg a komposztálás során.

2.2. A komposztokra jellemző mikrobiális közösségek

A komposztokban megtalálható szerves anyagok közül számottevő mennyiségben szénhidrátok (cellulóz, hemicellulóz, amilóz), fehérjék, lipidek és lignin található meg, ezek hasznosításához a mikroorganizmusoknak megfelelő enzimkészlettel kell rendelkeznie (Insam és de Bertoldi, 2007). A mikroorganizmusok közül a komposztálás során a baktériumok és a gombák a meghatározóak, bár jelen vannak a Protozoa és a Rotifera taxonok tagjai is, utóbbiak elsősorban a baktériumok és gombák fogyasztásával alakítják a komposzthalmok mikrobiális összetételét (http 1). A komposztálás egyes szakaszaiban jelen lévő mikroszervezetek számát tekintve ellentmondásosak az irodalmi adatok. Egyes szerzők szerint az összcsíraszám nem változik szignifikánsan az egyes fázisok között, míg mások szerint az első mezofil fázisban a legnagyobb az abundancia. A komposzt mikroba közösségét vizsgáló módszerek nagyban befolyásolhatják az eredményeket.

Ryckeboer összesítő tanulmányában több mint 150 különböző, legalább faj szintű taxon komposzban való megjelenéséről számolt be (Ryckeboer et al., 2003b), míg tenyésztéstől független módszerekből kiindulva 2000 különböző filotípus jelenléte feltételezhető a teljes komposztálási folyamat során (Partanen et al., 2010). Ezt az ellentmondást demonstrálja Takaku és mtsai-nak (2006) munkája, ahol a tenyésztéssel dominánsnak mutakozó *Bacillus* nemzetség tagjai elhanyagolható számban voltak kimutathatóak molekuláris biológiai módszerekkel. Konszenzus van viszont annak tekintetében, hogy az egyes fázisokat jellemző mikrobiális összetétel más és más (Atkinson et al., 1997). Mivel a kiindulási anyagok és a komposztálási folyamat tág határok között határozza meg a mikrobaközösséget, ezért a konkrét csoportok tekintetében nehéz általános következtetéseket levonni, valamint a komposzthalmok heterogenitása miatt a korrekt mintavételezés is nehézkes (Ryckeboer et al., 2003b).

A kezdeti mezofil fázis elején a mikroba közösséget természetesen nagyban meghatározza, hogy milyen anyagok kerülnek a komposzthalomba. A halom hőmérsékletét ilyenkor még a környezeti hőmérséklet határozza meg, a kémhatás gyakran savas az élelmiszer maradékok szerves savtartalma miatt, amely a gombák szaporodásának kedvez (Choi és Park, 1998). Hansgate és mtsai. (2005) a kezdeti 72 órás intervallumban összesen 12 különböző gomba nemzetséget detektáltak (*Geotrichum*, *Pichia*, *Mucoraceae*, *Backusella*, *Penicillium*, *Candida*, *Galactomyces*, *Williopsis*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Hamigera*, *Neurospora*). A könnyen bontható szerves anyagokat hasznosító tejsav termelő gombák (pl *Rhizopus* sp. vagy *Amylomyces* sp.) meghatározóak a savas közeg kialakításában, de a pH csökkentésében kis számuk ellenére szerepük lehet a tejsavas baktériumoknak is (*Weissella* sp., *Lactobacillus* sp., *Lactococcus* sp. és *Pediococcus* sp) (Schloss et al., 2003). A további mikrobiális aktivitás miatt felszabaduló ammónium lúgos tartományba mozdítja el a kémhatást, és a mezofil baktériumok válnak dominánssá, amelyek rövidebb generációs idejük és széles anyagcsere spektrumuk miatt előnyben vannak a gombákkal szemben a tápanyagforrásokért folytatott versenyben. A baktériumok közül a később jellemzővé váló aktinobaktériumok relatív lassú szaporodásuk miatt, ebben a tápanyagban gazdag fázisban még nem meghatározó közösségalkotók (Ryckeboer et al., 2003b, Insam és de Bertoldi, 2007). Elsősorban a baktériumok felgyorsuló anyagcsere aktivitása generálja azt a hőmenyiséget, amely a komposzthalm felmelegedéséhez és a termofil szakaszba átvivő közösség változáshoz vezet.

Termofil fázisról akkor beszélhetünk, ha a komposzthalom hőmérséklete eléri a 45 °C-ot, azonban ez az érték később 70 °C-ig is emelkedhet, sőt helyenként 80 °C is kialakulhat. Ebben a szakaszban folytatódik a fehérjék bontása, ami további kémhatás emelkedést eredményez, valamint összességében a kezdeti fázishoz képest felgyorsulnak a degradációs folyamatok (de Bertoldi et al., 1983, Fogarty és Tuovinen, 1991). A 30 °C feletti, lúgos környezet kedvez az *Actinobacteria* osztály bizonyos tagjainak (például *Streptomyces* és *Thermobifida* nemzetség), amelyek közül több faj antibiotikum termeléssel gátolja a versenytársak növekedését. Sok faj celluláz és hemicelluláz enzimeit révén biztosítja a hozzáférést a szerves anyagokat felépítő természetes polimerekhez. Jellemző még az *Actinobacteria* csoport komposztokban domináns nemzetségeire, hogy a nem megfelelő körülményeket spóra képzéssel vészelik át, csakúgy mint a szintén meghatározó *Bacillus* fajok. 60 °C felett a bontó folyamatokat termofil baktériumok végzik (Herrmann és Shann, 1997, Ryckeboer et al., 2003b, Strom, 1985). A *Bacillus* nemzetség sok képviselőjét lehet izolálni ebben a szakaszban, de dominanciájuk nem teljesen egyértelmű, de Gannes és mtsai. (2013) 16S rDNS alapú vizsgálataik során kettőből csak egy komposzt termofil fázisban találták dominánsnak a *Bacillus* nemzetséget. 70 °C felett *Hydrogenobacter* spp. és a *Thermus* spp. fajok a meghatározó közösségalkotók.

A termofil gombák hőmérsékleti optimuma általában alacsonyabb, mint a termofil baktériumoké, előbbieket 60 °C felett nem aktívak, illetve eltűnnek a komposztból (Ryckeboer et al., 2003a, Van Gestel et al., 2003, Insam és de Bertoldi, 2007). A termofil fázisra jellemző gomba nemzetségek tagjai a *Thermomyces*, a *Candida* és a *Rhizomucor* fajok, amelyek főleg vagy kizárólag ebben a szakaszban aktívak (Hultman et al., 2010). Ebben a fázisban a baktériumok és gombák diverzitása összességében csökken a hőmérséklet emelkedésével, a termofil és termotoleráns fajoké ellenben nő. A komposztálás folyamatát tulajdonképpen a jelen lévő, és aktív mikroszervezetek anyagcseréje által generált magas hőmérsékletű termofil fázis különbözteti meg az egyéb spontán történő biodegradációs folyamatoktól. Ez a szakasz a kórokozók eliminálásában is meghatározó jelentőségű (Ryckeboer et al., 2002, Ryckeboer et al., 2003b, Insam és de Bertoldi, 2007).

Amikor a rendelkezésre álló szerves anyag források kezdenek kimerülni, csökken a termofil szervezetek aktivitása, ez pedig a hőmérséklet csökkenését okozza. A mezofil szervezetek újra kolonizálják a komposztot, részben a termofil szakaszban kevésbé felmelegedő mikronichekből, részben a komposzthalom környezetéből,

egyed spóráképző szervezetek pedig kitartó képleteik segítségével vészlik át a számukra kedvezőtlen időszakot (Ryckeboer et al., 2003b). Egy 2013-ban született tanulmány piroszekvenálással létrehozott 16S rDNS klónkönyvtárakat vizsgálva szintén elvetette azt a hipotézist, hogy az újrakolonizáció kizárólag a termofil szakaszt túlélő szervezetek révén történik meg (de Gannes et al., 2013). A kihűlési fázisban megfigyelhető hőmérséklet és nedvességtartalom csökkenés, valamint az ellenálló biopolimerek (lignocellulóz, cellulóz, hemicellulóz, lignin) jelenléte kedvez az őket hasznosítani képes gombák szaporodásának (Chamuris et al., 2000, Ryckeboer et al., 2003b).

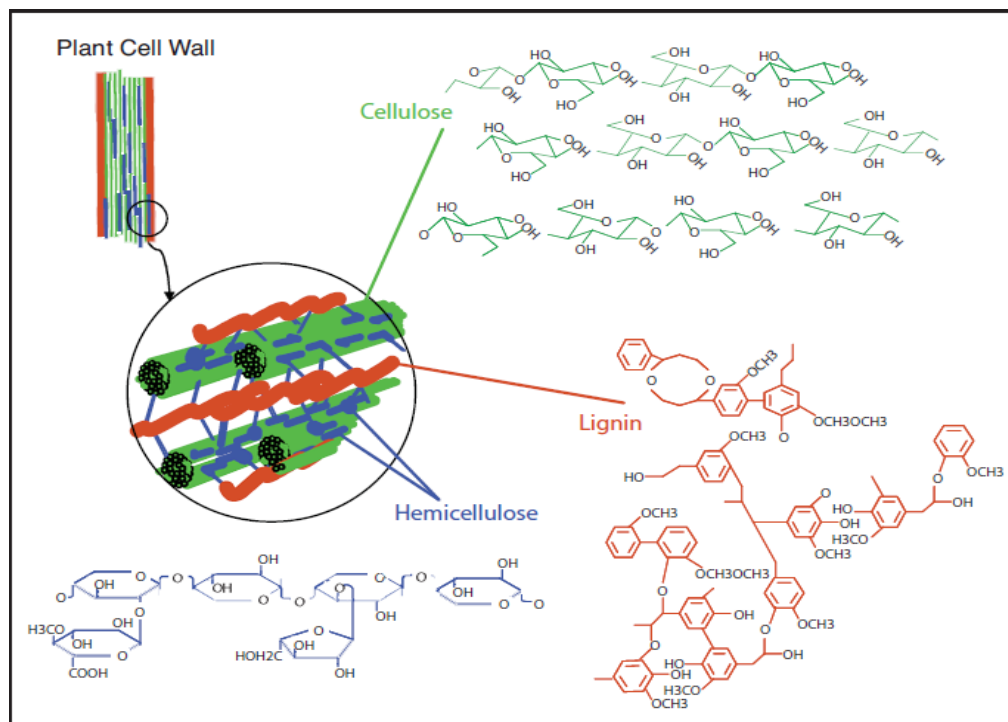
Az érési fázisban fejeződik be a szerves anyag humusszá alakítása, főleg a nehezen bontható szubsztrátok átalakításával (Hoitink és Boehm, 1999, Tuomela et al., 2000). A rendkívül alacsony nedvességtartalom tovább nehezíti a ligno-cellulóz komplexek szerkezetének megbontását. A felhasználható szerves anyag fogyásával fokozatosan nő a komposzt stabilitása, amely így a mikroflóra diverzitását vizsgálva megbecsülhető (Ryckeboer et al., 2003b). A komposztálás ezen szakaszában jellemző az *Archaea*, *Planctomyces*, *Chloroflexi* és *Deltaproteobacteria* baktérium taxonok dominanciája, ellentétben a korábbi fázisokra jellemző *Gammaproteobacteria* túlsúllyal (de Gannes et al., 2013).

2.3. Lignocellulóz bontás a komposztokban

A komposzthalmok alapja általában növényi biomassa, amelynek meghatározó részét teszi ki a lignocellulóz. Ennek a növényi sejtfaalkotónak az összetétele és bontása ezért meghatározó a komposztok fizikai-kémiai és biológiai tulajdonságait tekintve.

2.3.1. A lignocellulóz felépítése

A Földön újratermelő biomassza meghatározó része a lignocellulóz, amely ligninből, cellulózból és hemicellulózból áll (1. ábra) (http 2). A lignin nagy molekulású, oldhatatlan polimer, amelyet fenilpropán alegységek szabálytalan hálózata alakít ki. A fenilpropán alegységek vázat alkotva kovalens kötésekkel kapcsolódnak a hemicellulózhhoz, és ebbe a mátrixba ágyazódnak bele a cellulóz szálak. A lignin felelős a növényi sejtfa rigiditásáért, fokozza a növény ellenálló képességét a mikrobiológiai behatásokkal szemben (Dwivedi et al., 2009, Argyropoulos és Menachem, 1997).



1. ábra A lignocellulóz általános szerkezete (http 2)

A növényi sejtfa legfőbb komponense a cellulóz, amely a legelterjedtebb biopolimer molekula a bioszférában. Kémiai szempontból a legegységesebb sejtfaalkotó, amelynek láncai glükóz egységek β -1,4-glikozidos kötések kapcsolataiból állnak. Az egymás mellé rendeződött szálat hidrogén-híd kötések és van der Waals erők stabilizálják. A cellulózban a szabályos rendben elhelyezkedő glükóz láncok kristályszerű szerkezetet hoznak létre, amely vízhatlan, oldhatatlan, és hatékonyan ellenáll a hidrolízisnek. A növényi sejtfaiban található cellulóz szálat párhuzamosan egymás mellé rendeződve mikrofibrillumokat alkotnak, amelyekben a polimer láncok hosszát növényfajonként változó számú, általában 2000-2500 glükóz egység határozza meg (Kuga és Brown, 1991).

A hemicellulóz a cellulóz után a növényi sejtfaiban, és egyben a természetben is a második leggyakrabban előforduló természetes polimer. Ez az amorf polimer frakció mintegy kapocsként működik a sejtfaiban a lignin és a cellulóz között, összetétele növényfajonként és sejtípusonként is változó lehet. A hemicellulóz nem olyan egyértelműen definiált mint a cellulóz, de elmondható róla, hogy rövid láncú, elágazásokat is tartalmazó, heterogén poliszacharid, amely hexózokat (pl. glükóz, mannóz, galaktóz) és pentózokat (xilóz, arabinóz), valamint az esetek többségében ezek karbonsavszármazékait tartalmazza. Három fő csoportja a xilánok, mannánok, valamint az arabinogalaktánok (Dwivedi et al., 2009).

A xilán és származékai a növényi szárazanyag tartalom 30-35 százalékát teszik ki, felépítése növényfajtól függően változatos, gerincét β -1,4 kötésekkel kapcsolódó xilóz monomerek alkotják. A xilóz monomerek gyakran acetiláltak, és eltérő arányban glükoronsav vagy L-arabinofuranóz oldalláncokat tartalmazhatnak. A mannán és a glükomannán mannóz, illetve mannóz és glükóz monomerekből felépülő, β -1,4-glikozidos kötésekkel kapcsolódó heteropolimerek. Főleg puhafák esetében jellemző lehet a mannán lánc acetiláltsága, és az α -1,6 glikozidos kötéssel kapcsolódó galaktóz csoportok kapcsolódása. A mannán amellet, hogy a vázszerkezet kialakításában is részt vehet, leginkább tápanyag raktározó funkciót tölt be. Az arabinóz és galaktóz egységekből felépülő arabinogalaktán, a másik két hemicellulóz alkotóhoz képest sokkal kisebb mennyiségben van jelen a növényi sejtfalban (Puls, 1997).

Meg kell jegyezni, hogy a hemicellulózok tekintetében többféle meghatározás és csoportosítás lehetséges. Scheller és Ulvskov részletesebb csoportosítása például az arabinánokat, arabinogalaktánokat és galaktánokat nem sorolja a hemicellulózokhoz, azonban megkülönbözteti a xilánt, xiloglükánt, mannánt, glükomannánt és β -(1,3-1,4) glükánt, amely csoportokon belül még további szerkezeti variációk lehetségesek (Scheller és Ulvskov, 2010).

2.3.2. A komposztok lignocellulolitikus mikroorganizmusai

A monoszacharidok, a keményítő és a lipidek degradálásának képessége számos gomba és baktérium csoportban általános, így a komposztálás során ezek felhasználása történik meg először (Ryckeboer et al., 2003b). A hemicelluláz és celluláz enzimek elterjedtek a mikroszervezetek között, ugyanakkor a kristályos szerkezetű cellulóz bontásához szükséges összetett enzimrendszerrel már csak kevés faj rendelkezik. Az olyan összetett polimerek önálló degradációjára, mint a lignocellulóz, keratin vagy bioplasztikok csak néhány nemzetség bizonyos képviselői képesek. Valószínűleg a komposztok mikroflórájának tagjai között tapasztalható szinergizmus kulcsfontosságú a nehezen hozzáférhető szubsztrátok hasznosításában (Golueke, 1991, Tuomela et al., 2000). A növényi sejtfal lignocellulóz tartalmának hatékony bontása komposztokban csak többféle mikroszervezet közös aktivitása által elképzelhető, és feltehetően a lignocellulóz különböző alkotóelemeit gyakran más-más szervezetek degradálják (Wilson, 2011). Az aerob lignocellulóz bontás egyik modellszervezete, a *Thermobifida fusca* képes bontani a xilánt és a cellulózt is, ennek ellenére ha természetes növényi biomasszán

tenyésztik, akkor elsősorban a cellulózt hidrolizálja. Ennek oka feltételezhetően az, hogy a cellobióz gátolja a xilanázok termelését (Chen és Wilson, 2007). Jól demonstrálja az enzim szintű szinergizmust a *T. fusca* xiloglükán szubsztráthoz való affinitása, illetve xiloglükánáz enzimének termelése. A *T. fusca* ugyanis nem nő xiloglükánon, ellenben termel egy nagyon aktív xiloglükánázt, amely cellulóz szubsztráton való tenyésztés során indukálódik, teljesen hidrolizálja a xiloglükánt és rendelkezik egy cellulóz kötő doménnel (CBM-carbohydrate-binding module). A növényi sejtfalban a cellulóz rostokat gyakran xiloglükán borítja, ennek szolubilizálásában játszhat szerepet a xiloglükánáz enzim, tehát a természetben a cellulóz felhasználásához nem elegendőek önmagukban a celluláz enzimek. (McGrath és Wilson, 2006).

Komposztálás során a lignocellulóz alkotók degradációja nem egyszerre történik meg. Yu és mtsai. (2007) mezőgazdasági hulladék komposztálása során azt állapította meg, hogy a cellulóz és a hemicellulóz bontás közös trend mentén halad az érési szakasz végéig. A ligninbontás eléri a maximális értéket a termofil fázis közepére, amikortól a bontási aránya nem változik. A cellulóz-hemicellulóz frakció degradációjának aránya a termofil fázis végétől kezd meredeken emelkedni, és csak az érési fázisban éri el a maximális értéket, ami a komposztálás végéig megmarad. Fontos megjegyezni azonban, hogy egyik polimer bontása sem korlátozódik a komposztálás egyetlen szakaszára.

A lignin bontás elsősorban a gombákhoz köthető, bár vannak baktériumok, amelyek szintén rendelkeznek a lignin részleges bontásának képességével. Tuomela és mtsai-nak (2000) tanulmánya szerint léteznek olyan gombaszervezetek, amelyek a lignint széndioxiddá és vízzé degradálják, baktériumok ellenben erre nem képesek. Lehetséges, hogy a baktériumok szerepe a ligninbontásban a gombák kis molekulású anyagcseretermékeinek fogyasztása által jelentős. Számos baktériumról, főleg az aktinobaktériumok között, azonban kimutatták hogy képesek a lignin szerkezetének módosítására és szolubilizálására, de mineralizációs képességük limitált (Ball et al., 1989, Ruttimann et al., 1991, Godden et al., 1992, Eriksson et al., 1990).

A gombák növekedését leginkább befolyásoló környezeti faktor a hőmérséklet. A legtöbb gomba faj mezofil szervezet, hőmérsékleti optimumuk 25-30 °C között van, továbbá az alacsony nitrogén koncentráció is feltétele a hatékony ligninbontásnak. A legismertebb lignint mineralizáló szervezetek a fehérrothasztó gombák, amelyek azonban nem élik túl a komposztálás termofil szakaszát. A

Basidiomycota taxonba tartozó *Phanerochaete chrysosporium* fehérrothasztó gomba 49 °C fölött már nem képes növekedni. A gombatermelő komposztban elsősorban a termofil gombák felelősek a lignocellulóz bontásáért (Shekhar Sharma, Tuomela et al., 2000), amelyek hőmérsékleti optimuma (40-50 °C) egybeesik a lignin bontás optimumával. A légzési kinonok vizsgálata kvantitatív adatokkal is segíthet feltérképezni, mely közösségalkotók a lignocellulóz bontás főszereplői. Yu és mtsai. (2007) szerint a Q-9(H2) légzési kinont termelő mikroorganizmusok (például *Aureobasidium pullulans* (Takizawa et al., 1992)) és a termofil *Actinobacteria* osztály kulcsszerepet játszanak a lignin bontásában.

A legtöbb cellulolítikus aerob baktérium faj általánosan előfordul a talajokban, és jól ismert a növekedési metabolizmustól eltérő másodlagos anyagcseréjéről. Ilyen szekunder metabolizmushoz köthető a kitartó képletek kialakítása (*Bacillus*, *Thermobifida*) és az antibiotikum termelés (*Bacillus*, *Streptomyces*). Ezek a másodlagos anyagcsere tevékenységek szelektív előnyt jelentenek ezeknek a szervezeteknek, amellyel kompenzálni tudják az aránylag hosszú generációs idejüket, illetve képesek túlélni olyan környezeti feltételeket, mint például a komposztálás termofil szakaszának végét jellemző magas hőmérséklet (Lynd et al., 2002). Általában a gombák cellulóz és ligninbontó képessége magasabb, mint a prokariótákhoz köthető cellulolítikus aktivitás (Godden et al., 1992), ugyanakkor a cellulóz bontás optimális hőmérséklete körülbelül 65 °C-ra tehető, ilyen körülmények között elengedhetetlenek a megfelelő aktivitással rendelkező, hőstabil hidrolítikus enzimek (Ryckeboer et al., 2003b). A termofil cellulolítikus szervezetek, mint például számos *Bacillus* és *Actinobacteria* faj szerepe kulcsfontosságú a lignocellulóz bontásban (Strom, 1985).

Többféle vizsgáló módszerrel próbálták a komposztokban zajló lignocellulóz bontás jellemző mikrobiológiai közösségét megismerni. A légzési kinonok vizsgálata szerint, tápanyagban gazdag, magas lignocellulóz tartalmú komposzt esetében a Q-9 (például *Aspergillus niger*, *Aspergillus japonicus* és a legtöbb *Penicillium* faj) vagy a Q-10(H2) kinont tartalmazó gombák (a legtöbb *Talaromyces* faj például) látszanak a cellulóz és hemicellulóz bontás kulcsszereplőinek. Székely és mtsai. (2009) érett gombakomposztot vizsgálva, TRFLP módszer segítségével a *Pseudoxanthomonas*, *Thermobifida* és *Thermomonospora* nemzetségekhez köthető filotípusok dominanciáját mutatta ki egy feltételezhetően cellulózbontó közösségen belül. A *Pseudoxanthomonas* spp. a cellulóz degradációt feltehetően az acetát fogyasztáson keresztül történő pH

semlegesítő hatással segíti elő, tehát a lignocellulóz bontás nem csak a lignin és/vagy cellulóz-hemicellulóz bontó szervezetek közti szinergizmus, hanem egy tágabb közösség együttműködése révén valósul meg a komposztálás során (Kato et al., 2005, Székely et al., 2009)

2.4. Komposztlakó baktériumok izolálása, és új baktérium faj leírásának követelményei

2.4.1. Lignocellulolitikus mikroorganizmusok izolálása komposztból

A komposztok klasszikus mikrobiológiai vizsgálata során a mikroorganizmusok számlálásához és izolálásához legtöbbször valamilyen szerves anyagban gazdag, komplex táptalajt használnak. Tipikus a TSA (tryptic-soy agar) és a pepton agar lemezek alkalmazása, amelyről véletlen-szerűen vesznek le telepeket, illetve az átlagtól eltérő morfológiájú telepeket izolálják (Strom, 1985, Davis et al., 1992, Choi és Park, 1998). Különböző taxonok képviselőinek izolálásához eltérő összetételű táptalajok lehetnek szükségesek, Nakasaki és mtsai. (1985) a legtöbb izolátumot aktinobaktériumok esetében maláta-élesztő kivonatos agaron figyelte meg, míg a többi baktérium csoporthoz TSA lemezek tűntek az optimálisnak, gombák tenyésztéséhez pedig burgonya-dextróz médiumot használtak számos más táptalaj kipróbálása után. Amennyiben külön szeretnék számlálni a baktérium és a gomba eredetű telepeket, akkor valamilyen fungicid szert is alkalmaznak a táptalajok összeállításakor (Ryckeboer et al., 2003a, Hamaki et al., 2005). Sokszor alkalmaznak talaj extraktumot is a komposzthalmok tenyésztéses vizsgálatai során, mert előfordul, hogy konvencionális médiumokon bizonyos izolátumok nem képesek növekedni: Ryckeboer és mtsai. (2003a) átfogó tenyésztéses vizsgálatuk során nem csak különböző taxonokra többé-kevésbé szelektív táptalajokat használtak, hanem speciálisan amilolitikus, cellulolitikus és proteolitikus mikroorganizmusok izolálásához is alkalmazható, aktív telepek esetén hidrolízis zónát mutató lemezeket is. Kristályos cellulóz alapú lemezekon izoláltak *Thermomonospora* és *Thermobifida* törzseket Kukolya és mtsai. (1997) is, megfigyeléseik alapján az endoglükánáz aktivitású telepek körül kisebb kráterek alakultak ki az agarlemezen. Utóbbi technikákkal közvetlenül lehet az aktív lignocellulóz bontó szervezeteket detektálni és izolálni.

2.4.2. Új baktérium faj leírásának követelményei

A polifázikus karakterizálás jelenleg elkerülhetetlen ahhoz, hogy olyan taxonómiai rendszert hozzunk létre, amely a legjobban tükrözi a prokarióták filogenetikai kapcsolatait. A baktériumok leírásának nincs általános minimális feltétele, hiszen adott csoportoknál ezek eltérőek lehetnek. A fajon belüli variabilitás megfigyeléséhez érdemes több izolátumot is megvizsgálni, valamint az izolálási és a fenntartási körülményeket a lehető legpontosabban specifikálni kell (Tindall et al., 2010). Új faj leírásához a típus törzset két országban egy-egy nyilvánosan hozzáférhető mikroba gyűjteményben deponálni kell. Lehetőség szerint meg kell vizsgálni néhány közel rokon törzset is, nem elég az irodalomból tájékozódni, mivel a fajleíráshoz alkalmazott módszerek sokszor nehezen standardizálhatóak, így az irodalmi adatok nem mindig összehasonlíthatók. Logan és mtsai. (2009) a *Firmicuta* csoportból kiindulva tették meg javaslatukat az új fajok leírásához szükséges vizsgálatokat illetően. A molekuláris biológiára alapozó technológiák mellett nem veszítette el létjogosultságát az alaktani és egyéb fenotípusos vonások megfigyelése sem. Ezek a vizsgálatok kiterjednek a telepmorfológiára, a sejtek méretére, alakjára, Gram festésre, mozgékonyság vizsgálatára, és amennyiben vannak, a spórák morfológiájának leírására is. A vegetatív sejteket fiatal, folyadék tenyészetben érdemes vizsgálni, és a Gram festést még akkor is érdemes elvégezni, ha a sejtfal részletesen is elemzésre kerül, mert praktikus határozóbélyeg, és még a *Firmicutes* csoportba tartozó fajok sem mind adnak pozitív Gram tesztet. Az alaktani leírást ezerszeres nagyításban fázis-kontraszt mikroszkópiával lehet megfelelően elvégezni, de az esetleges flagellumok megfigyeléséhez, azok festése vagy elektron mikroszkóp szükséges. A spóráképzésről szerzett információk szintén értékes adatokkal szolgálhatnak az identifikációhoz. A telepmorfológiai jegyek nagyon változatosak lehetnek adott fajon belül, valamint a táptalaj és egyéb tenyésztési körülmények is erősen befolyásolhatják. A telepek leírásának ki kell terjednie többek között a telep méretére, felszínének textúrájára, színére, állagára. Fiziológiai paraméterek tekintetében a legfontosabbak a növekedés hőmérséklet és pH optimuma, a só tűrés, oxidáz és kataláz aktivitások megléte. Biokémiai jellemzők közül elsősorban a D-glükózból történő gázképzést, a kazein, keményítő és zselatin hidrolízisét valamint a citrát hasznosítást szükséges vizsgálni. A fentiek mellett még több fiziológiai jellemzőt is érdemes lehet feltárni, ehhez alkalmazhatóak az elterjedt rutin tesztek, mint amilyenek a különböző API tesztek (20E, 50CHB stb.), a VITEK vagy a Biolog rendszerek.

Kemotaxonómiai vizsgálatok közül a zsírsav metil észterek (FAME) analízise olyan technika, amelynél csak szigorú standardokat követve kaphatunk összehasonlítható profilokat, ezért baktériumok identifikációjához csak korlátozottan alkalmas, új faj leírásához ellenben követelmény. A sejtfal mureinjének pontos összetétele csak a *Bacteria* ország egy részénél ismert, ennek vizsgálata a poláros lipidekkel egyetemben csak új genus leírásánál feltétlenül szükséges, de a peptidoglikán diaminosav összetételének meghatározása új faj meghatározásakor is elengedhetetlen. A poláros lipidek taxonómiai relevanciája a *Bacillaceae* és *Paenibacillaceae* osztályokon belül több nemzetség esetében (*Cohnella*, *Ornithinibacillus* és *Viridibacillus*) igazolást nyert mostanra (Kämpfer et al., 2006, Mayr et al., 2006, Albert et al., 2007), annak ellenére, hogy ezek szerkezete sok esetben még nem teljesen meghatározott. Fajok leírása esetén ajánlott, míg nemzetség szinten elengedhetetlen a légzési kinonok összetételének meghatározása a *Bacillaceae* osztályban, ahol eddig az MK-7, MK-8 és MK-9 jelenlétét igazolták (Logan et al., 2009).

A kemotaxonómia mellett a nukleinsavak vizsgálatán alapuló tanulmányok alapvetően átrendezték a mikrobiális taxonómiát (Woese et al., 1990). Az utóbbi évtizedekben az egyre elterjedtebb teljes genom szekvenciák segítségével létrejött filogenetikai tanulmányok is megerősítették a 16S rRNS génen alapuló rendszertan létjogosultságát (Snel et al., 1999). A 16S rDNS bázissorrendjének ismerete feltétlenül szükséges az új fajok leírásához, a szekvenciát pedig fel kell tölteni egy hozzáférhető adatbázisba. Amennyiben az új faj kandidátus és egy valid faj típus törzsének 16S rRNS génje között a hasonlóság 97%-nál nagyobb, akkor további vizsgálatok szükségesek ahhoz, hogy új fajnak tekinthessük a vizsgált törzset. Fontos hogy jó minőségű, és legalább 1400 bázispár hosszúságú szekvenciákat használjunk a filogenetikai elemzések során, ehhez általánosan elfogadott és ellenőrzött adatbázisok (SILVA, Living Tree Project (Yarza et al., 2008), EzTaxon (Chun et al., 2007)) állnak rendelkezésre. A baktériumok osztályozásához törzsek szintjén egyéb gének vagy DNS szakaszok vizsgálata is szükséges lehet (Stackebrandt és Goebel, 1994).

A 16S-23S ITS (internal transcribed spacer) régiók, azok 16S rRNS génnél variábilisabb szakaszai miatt, értékes filogenetikai információkat hordozhatnak. Szintén mélyebb elemzésre ad lehetőséget egyéb erősen konzervált háztartási vagy fehérje kódoló gének vizsgálata. A *recN* gén használata *Geobacillus* törzsek esetén (Zeigler, 2005), míg az *rpoB* szekvenciák *Paenibacillus* törzseknél bizonyult

filogenetikai szempontból relevánsnak (da Mota et al., 2005). A *Bacillus* nemzetségen belül a *gyrB* és a *recA* gén analízisét is felhasználták egyes fajok besorolásához (Wang et al., 2007b, Wang et al., 2007a, Cerritos et al., 2008). Különösen az olyan kiterjedt csoportokon belüli viszonyok tisztázásához, mint amilyen a *B. cereus* csoport, szükség lehet több háztartási gén szimultán vizsgálatára (MLST - multilocus sequence typing, MLSA - multilocus sequence analysis) is (Priest et al., 2004, Sorokin et al., 2006, Tourasse et al., 2006). Az egyes új faj jelöltek genomjának guanin és citozin tartalmának vizsgálata erősen javasolt, új genus leírása esetén pedig ettől nem lehet eltekinteni (Logan et al., 2009).

A nagyfokú hasonlóság a 16S rDNS tekintetében nem jelent feltétlenül egyezést faj szinten. Azokban az esetekben, amelyeknél ez 97%-nál magasabb, a fajleíráshoz DNS-DNS hibridizációs vizsgálatokat kell elvégezni a kérdéses törzs és a legközelebbi rokon faj vagy fajok típus törzsei között. Erősen ajánlott a hibrid DNS és a homológ kettős szál hőstabilitása közötti különbséget is meghatározni. DNS-DNS hibridizáció esetében 70%-os hasonlóság a határérték fajok leírásakor (Wayne, 1988), azonban ezt az értéket sem lehet teljesen rugalmatlanul alkalmazni (Goris et al., 2007).

A nukleinsav ujjlenyomat technikák (Amplified Fragment-Length Polymorphism-AFLP, Random Amplified Polymorphic DNA - RAPD, repetitive element-primed PCR - rep-PCR, Pulsedfield Gel Electrophoresis – PFGE, ribotipizálás) faj alatti szintek vizsgálatakor lehetnek hasznosak, amelyekkel a különböző izolátumok között a klonalitást lehet kizárni. Több törzs esetében az azonos nukleinsav ujjlenyomattal rendelkező törzsek feltehetően egy fajhoz tartoznak. A ribotipizálás és az AFLP analízis megbízhatósága a legmagasabb a fent említett technikák között, a többi esetben a standardizálás nehézségeiből fakadóan a különböző laboratóriumokban született eredmények nem hasonlíthatóak össze (Schleifer, 2009).

Újabban a teljes genom szekvenciákra alapozott módszerek is egyre nagyobb teret nyernek a prokarióták taxonómiájában. Vannak törekvések, amelyek alapján egyes vizsgálatok kiválthatóak lennének *in silico* elemzésekkel, vagy az egyes taxonokat elválasztó határértékeket változtatnák meg a teljes DNS állomány analízisére támaszkodó eredmények alapján (Chun és Rainey, 2014).

2.5. Lignocellulóz bontó aerob baktériumok genomi jellemzői

Mint a legrégebbi életforma képviselői, a prokarióták evolúciójuk során óriási fiziológiai és anyagcsere diverzitásra tettek szert, egyúttal hatalmas genetikai rezervoárt képeznek. Gyakori, hogy a lignocellulóz bontásban szerepet vállaló szervezetek számos eltérő aktivitású enzimmel rendelkeznek. A mikroorganizmusok cellulolítikus rendszere azonban nem pusztán a különböző aktivitású enzimek együttese. A különböző specificitású enzimek expressziója jól összehangolt, és genetikai szinten is szabályozott. Az eltérő aktivitású katalitikus fehérjéket kódoló gének evolúciós útja nem teljesen tisztázott. Az olyan polispecifikus enzimesaládok, mint például a GH5-ös, azt a hipotézist erősítik, hogy számos celluláz gén génduplikációval jött létre, azonban több lignocellulóz bontó szervezet esetében a horizontális géntranszfert is sikerült igazolni. Az aerob cellulolítikus baktériumok modellszervezetei a *Cellulomonas* nemzetség tagjai és a *Thermobifida fusca*. A DNS szekvenálás és genomanalízis rohamos fejlődése révén egyre több baktérium teljes genomszekvenciája elérhető, és ezzel egyidőben ezeknek a szervezeteknek a lignocellulóz degradációval kapcsolatos anyagcseréjének genetikai háttere is egyre jobban feltérképezett (Lynd et al., 2002). Anderson és mtsai-nak (2012) vizsgálatai során 11 ismert genom szekvenciájú *Actinobacteria* törzsbe tartozó faj genomikai analízisével számos közös szabályozó mechanizmusra és genetikai elemre derült fény. A cellobióz inducer szerepe jól ismert többek között a *T. fusca* esetében is, ennek ellenére a vizsgált fajok közül csak a *Nocardiopsis dassonvillei* mutatott magasabb celluláz aktivitást cellobióz jelenlétében. A cellulázok és a cellobióz ABC transzporter szabályozásában a *T. fusca* esetében kulcsszerepet játszó CelR transzkripciós faktor 11-ből 9 vizsgált fajnál szintén jelen van, 3 esetben más szabályozókat is sikerült azonosítani. Az eredmények alapján a szerzők megállapítják, hogy teljes genom szekvenciákban keresve, azonosítani lehet a lignocellulóz bontáshoz köthető hidroláz géneket, akár olyan már leírt fajok esetében is, amelyeket nem potenciális cellulóz bontóként tartottak számon korábban. Ebben a tanulmányban 7 potenciális cellulolítikus baktérium közül 6 esetben sikerült a lignocellulóz degradációhoz köthető aktivitást is kimutatni. Anderson és mtsai. (2012) megerősítik, hogy az aktinomicéták körében egy konzervált mechanizmus útján történik a cellulózhasznosítás. Komplexet nem alkotó enzimek segítségével cellobiózig hidrolizálják a cellulóz

polimereket, majd a diszacharidot ABC transzporterek segítségével veszik fel és glükózig bontják a sejtek. A kísérletekből továbbá az is kiderül, hogy a cellulóz és a cellobióz jelenlétének nem csak a celluláz rendszerre van hatása, hanem morfológiai és fiziológiai változásokat is indukálhatnak. Az egyik ilyen leírt jelenség, hogy a cellobióz gátolja a spóráképzést és a légmicéliumok kialakulását.

Az NCBI (National Center for Biotechnology Information) adatbázisa alapján az elkészült prokarióta genom projektek száma több mint 56000, de ennek csak töredéke kapcsolódik különböző fajokhoz ([http 3](http://3)). Ezen genom adatok alapján új, a lignocellulóz bontásban fontos mechanizmusokra, és változatos tulajdonságú enzimek szerepére derülhet fény, amelyek további vizsgálata a megfelelő szekvenciák ismeretében lényegesen egyszerűbb és gyorsabb. A továbbiakban az extrém nagyszámú glikozid hidrolázt kódoló *Saccharophagus degradans*, és a komposztlakó *Actinobacteria* csoport egyik modellszervezetének, a *Thermobifida fusca* YX genom projektjeinek eredményeit ismertetem. A *Saccharophagus degradans* az egyik legtöbb GH génnel rendelkező aerob baktérium, míg a *Thermobifida fusca* a komposztok jellemző, szintén nagy celluláz és hemicelluláz aktivitással rendelkező mikroszervezete.

2.5.1. A *Saccharophagus degradans* genom projekt ismertetése

A globális szén körforgalomban a prokarióták mint CO₂ fixálók, illetve mint a szerves anyagok szén tartalmát mineralizálók is jelentős szerepet játszanak. A szárazföldi ökoszisztémákban jól feltárt, hogy ezekben a folyamatokban milyen baktériumok vesznek részt. A tengerekben és óceánokban azonban elsősorban a CO₂ megkötésért felelős szervezeteket azonosították, az itt aktív lebontó baktériumokról a kétezres évek elejéig keveset tudtunk. Az akkori metagenomikai projektek keretein belül olyan génekre és taxonokra találtak rá, amelyek kulcsszerepet játszhatnak a tengerek és óceánok szerves szénvegyületeinek mineralizációjában.

A *Saccharophagus degradans* 2-40^T volt az első olyan szabadon élő tengeri baktérium, amelyről bebizonyosodott, hogy képes bontani a cellulóz tartalmú növényi biomasszát. Ez a szervezet a gamma-proteobaktériumok csoportjába tartozik, csakúgy mint a rokon *Microbulbifer* és *Teredinibacter* nemzetségek, amelyek szintén tengeri, szénhidrát degradáló szervezetek. A *Saccharophagus degradans* Gram-negatív, aerob, motilis baktérium, amely legalább tíz különböző

biopolimer bontására képes, és ezzel jelentős szerepet vállal a komplex poliszacharidok degradálásában.

A szervezet 5 057 531 bázispárt tartalmazó genomja 4008 gént kódol, G+C tartalma 45,8%. A teljes genom szekvencia megtalálható a NC_007912 génbanki (NCBI) számon. A genom annotáció alapján a *Saccharophagus degradans* 2-40^T különlegesen nagyszámú katalitikus fehérjéből álló és egyedülállóan diverz glikozid hidroláz enzimmrendszerrel rendelkezik, ennek a kódolásában érintett DNS állomány a genom 10%-át teszi ki. A genom analízis alapján, sok szénhidrát bontó gén horizontális transzfer útján került a DNS állományba, erre utal a G+C tartalom mozaikossága is. A genom méretéhez képest a fehérje kódoló gének száma alacsonynak mondható, ez azzal a 15 megaproteinnel is magyarázható, amelyek több mint 2000 aminosavból állnak és az algákhoz való kapcsolódásban lehet szerepük.

A 2-40^T törzs szénhidrát bontó enzimmrendszerének közös vonása, hogy tagjait a rokon szubsztrátok is indukálják. Más cellulolítikus szervezet (*Trichoderma reesei*, *Clostridium thermocellum*) esetében is leírták már, hogy nem expresszálják folyamatosan a teljes degradációs apparátust, hanem csak néhány enzimet termelnek alacsony szinten, amelyek a megfelelő szubsztrát megjelenésekor olyan termékeket szabadítanak fel, amelyek beindítják a lebontó útvonalakat. A vizsgált glikozid hidroláz rendszerek esetében glükóz függő katabolit gátlást tapasztaltak. *In silico* elemzések igazolták egy adenilát cikláz, egy katabolit aktivátor fehérje és a foszfortranszferáz rendszer homológjainak meglétét. A rendkívül sok extracelluláris szénhidrát bontó enzim kiválasztásához, megfelelő szekréciós rendszer szükséges. Ennek megfelelően a *Saccharophagus degradans* 2-40^T törzsben megtalálhatóak a TAT (twin arginin), valamint a proteobaktériumok körében általános Sec szekréciós rendszer elemei is. Ugyancsak jelen vannak az I-es és II-es típusú szekréciós rendszer tagjai is.

Mint ahogy azt a 2.3. fejezetben ismertettem, a komplex poliszacharidok enzimatis bontásához összetett enzimmrendszerre van szükség, amely különböző aktivitású és szubsztrát specificitású katalitikus fehérjékből áll. Ezeknek az enzimeknek a nagy többsége a glikozid-hidrolázok (GH) csoportjába tartozik. Jellemző rájuk a moduláris felépítés, ami a katalitikus valamint a nem katalitikus domének kapcsolódásával jön létre. A nem katalitikus domének általában valamilyen szénhidrát kötő modulok (CBM-carbohydrate-binding module), amelyek hatékonyabbá teszik az oldhatatlan poliszacharid szubsztrátok hidrolízisét.

A komplex szénhidrát struktúrákat hidrolizáló enzimszerek tagjai sokszor szinergisztikus kapcsolatban vannak egymással.

A 2-40^T törzs 128 glikozid hidroláz gént tartalmaz, amely az egyik legtöbb az ismert genom szekvenciájú baktériumok között. Ezek a gének többnyire szétszóródva találhatóak a *Saccharophagus degradans* DNS állományában, de az amilázok, arabinoxilozidázok, pektinázok és alginázok hidroláz szigeteket alakítanak ki. A celluláz, xilanáz és mannanáz szekvenciákat elemezve ez a tengeri mikroba nagy hasonlóságot mutat a szárazföldi *Cellvibrio japonicus* fajjal. A fenti hidrolázokon kívül megtalálható a genomban 8 endo- β -1,3-glükánáz is, amelyek mindegyikén II-es típusú szekrécións szignálszekvencia van. Érdekes még megemlíteni, hogy 33 poliszacharid liáz is található a genomban, ami több mint bármely gomba vagy baktérium esetében (*B. thetaiotamicron* (15), *Erwinia carotovora* (13) és *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (8)). Szintén egyedülálló, hogy ezek az enzimek nagy arányban moduláris szerkezetűek.

A 128-ból 43 enzim tartalmaz legalább egy szénhidrát kötő domént (CBM), ezeket a doméneket a katalitikus egységektől poliszerin régió választja el, amely eltér a más baktériumoknál szokásos prolin/threonin-gazdag kapocs szekvenciáktól. Ez a jellegzetes hasonlóság szintén alátámasztja a *C. japonicus* és a *Saccharophagus degradans* közeli rokonságát. Míg a 2-40^T törzs rendelkezik a legmagasabb meghatározható CBM készlettel (127 db), amely talán a tengeri körülményekhez való alkalmazkodás eredményeként alakult ki. A kristályos cellulózhoz való nagy affinitású CBM2 és CBM10 domének nagy száma szintén kiemeli ezt a mikroorganizmust a többi cellulózbontó szervezet közül. A CBM6 és CBM32 feltűnően nagy száma szintén jellemzi a *Saccharophagus degradans* szénhidrát bontó enzimszereit. Mindkét modul viszonylag tág ligand specificitást mutat, amelyet a tengeri poliszacharidok változatos összetétele tesz szükségessé. Az *S. degradans* poliszacharid bontó enzimeinél eddig nem tapasztalt domén struktúrák is előfordulnak, és számos modulhoz nem tudtak még funkciót társítani. Ezek az eddig nem feltérképezett elemek akár új anyagcsere utakat is jelölhetnek.

A *Saccharophagus degradans* különböző poliszacharid degradáló enzimszereit vizsgálva megállapították, hogy glükózon tenyésztve ezek az enzimek csak alacsony szinten expresszálódnak, a katabolit represszió mechanizmusának megfelelően. Áttérve nem saját poliszacharid szubsztrátokra kismértékben nőtt a génextresszió, hiszen *in vivo* is össze van kapcsolva ezen szubsztrátok bontása. Legnagyobb mértékben azonban a saját szubsztrátok mellett növekedett, akár több

százszorosára is, az adott hidroláz termelése. Kísérletekkel igazolták, hogy a 2-40^T törzs a teljes növényi biomasszát bontja, és ligninbontó képességgel is rendelkezik, amit a gomba eredetű lignináz aktivitást indikáló festékek (Brilliant Blue R, poly B 411) bontásával támasztottak alá (Weiner et al., 2008).

2.5.2. *Thermobifida fusca* YX genom projekt ismertetése

T. fusca az egyik legjelentősebb cellulózbontó szervezet, amely magas hőmérsékletű aerob közegben végzi a növényi szerves anyag bontását. Ez a filamentumokat képző baktérium a lignint és a pektint kivéve minden növényi sejtfalalkotón képes növekedni. Klasszikus biokémiai módszerekkel a genom szekvenálásáig 13 különböző, *T. fusca* által termelt enzimet vizsgáltak. Ezek között vannak cellulázok, egy β -mannanáz, egy β -glükozidáz, egy extracelluláris xiloglukanáz, két xilanáz és β -1,3-glukanáz is. A teljes genom szekvencia vizsgálata során azonban még számos, növényi polimerek bontásához kapcsolódó gént azonosítottak. A genom projekthez különböző méretű inszertet tartalmazó klónkönyvtárak kombinációit alkalmazták. A kódoló szakaszok elemzését manuálisan és az Integrated Microbial Genomes (IMG) annotációs platformon végezték. A *T. fusca* YX teljes genom szekvenciája elérhető a CP000088 génbanki (NCBI) számon. A genom mérete 3 642 249 bázispár, G+C tartalma 67,5 %, a feltételezett kódoló DNS szekvenciák (CDS- coding DNA sequence) száma pedig 3117. Lykidis és mtsai. (2007) 45 hidrolitikus enzim génjét találták meg a genomban, amelyek valamilyen oligo- vagy poliszacharidon aktív enzimet kódolnak, ezek közül 36 a glikozid hidroláz (GH), 9 szénhidrát észteráz és 2 poliszacharid liáz. *In silico* elemzés alapján a talált glikozid hidrolázok 22 különböző GH családba tartoznak, összesen 16 extracelluláris glikozid hidrolázt azonosítottak, ezeken belül pedig 13 a TAT rendszerben előforduló szignálszekvenciához hasonlóval rendelkezik. A teljes DNS szekvencia elemzés alapján 2 GH18-as kitináz enzimet is kódol a vizsgált mikroszervezet genomja. A kitin, xilán és az N- acetil-glükózamin deacetiláz enzimek megléte arra enged következtetni, hogy a *T. fusca* energia szerzés céljából képes hasznosítani ezeket a molekulákat. A *T. fusca* pektinen nem, de annak észterektől mentes származékán, a legtöbb növénynél jelentős sejtfalalkotó poligalakturonsavon képes növekedni. Ezzel összhangban nincsenek pektin metilészteráz és pektin acetilészteráz enzimeik, ellenben kódol két pektát liázhoz nagyfokú szekvencia hasonlóságot mutató enzimet. A ramnagalakturonán szintén jelentős pektin és pektát alkotó, amely

bontásáért felelős rhamnogalakturon liáz gént ugyancsak azonosítottak a kromoszómán. A lignocellulóz jelentős xilán tartalmának degradálásához a *T. fusca* számos enzim génnel rendelkezik, köztük 3 endoxilanázt, egy β -xilozidázt, α -L-arabinofuranozidázt és több, feltételezhetően acetilxilán észterázt kódoló gént azonosítottak. Az első teljes thermobifida genom alapján egy endomannanáz gén jelenlétét megerősítették, azonban Béki és mtsai. (2003) sikeresen klónoztak és expresszáltak egy GH2-es β -mannozidáz gént is, amelynek a másik jelentős növényi hemicellulóz alkotónak, a mannánnak a hidrolízisében van szerepet. A *T. fusca* több celluláz enzimmel is rendelkezik, amelyek a korábbi vizsgálatok alapján részben különböző aktivitásúak. Két GH5-ös és egy-egy GH6-os, illetve GH9-es endoglükánáz, egy GH6-os és egy GH48-as exoglükánáz, valamint egy GH9-es endo/exo aktivitású celluláz alkotja a *T. fusca* celluláz rendszerét, amelyek mellett a cellobióz termékeket bontó β -glukozidázokat is azonosítottak. A *T. fusca* YX genomjában a glikozid hidroláz családok között az amiláz bontással kapcsolatos GH13-as család képviselteti magát a legnagyobb számban, belőlük összesen hatot sikerült azonosítani, más α -glikozidos kötéseket hasító enzim gének mellett. Vannak továbbá olyan *T. fusca* gének is, amelyek ugyan tartalmazznak szénhidrátkötő domént vagy doméneket, de semmilyen jelenleg ismert katalitikus modullal nem rendelkeznek. Meg kell jegyezni, hogy a *T. fusca* YX genom publikálásakor több gén annotációja, mint az később az enzimleírások során kiderült, nem volt helyes, és bár az adatbázisok folyamatosan bővülnek, egy gén által kódolt katalitikus fehérje pontos funkciójáról csak az enzim részletes jellemzésével bizonyosodhatunk meg tökéletesen.

A celluláz enzimrendszer szabályozásának tanulmányozása során egy CelR represszor gén termékét találták meghatározónak (Spiridonov és Wilson, 1999, Spiridonov és Wilson, 2000), amely a DNS láncon a celluláz génekhez képest feljebb (upstream) elhelyezkedő tandem regulátor szakaszhoz (5-TGGGAGCGCTCCCA) kötődik. A CelR fehérje represszorként működik, úgy hogy a megfelelő cellobióz koncentrációnál disszociál a DNS szálról. A CelR molekula feltehetően nem egy univerzális transzkripciósz regulátor, mert mennyisége csökkent, ha a tenyészeteket glükóz vagy xilán szénforráson tartották fent. A genomikai elemzés során további hat CelR molekulához hasonló represszort találtak, amelyek a *lac* családba tartoznak, és feltételezhetően szerepet játszanak a szénhidrát indukálta transzkripciósz szabályozásban.

A *T. fusca* szekréciós rendszerét tekintve komplett Sec rendszerrel rendelkezik, azonban mint ahogyan erre már korábban utaltam, az ettől független TAT rendszer elemei is megtalálhatóak a kromozómán. Ennek a rendszernek fontos tulajdonsága, hogy aktív térszerkezettel rendelkező fehérjék transzlokációjára képes. A *T. fusca* nem rendelkezik az I-es, II-es, III-as típusú szekréciós rendszerekkel. A többi *Actinobacteria* fajhoz hasonlóan a *T. fusca* is kódolja a foszfortranszferáz rendszer tagjait. A genomban továbbá kiterjedt ABC transzport rendszert azonosítottak, amellyel a cellobióz/celotrióz, maltóz és xilobióz molekulák felvételét végzik el a sejtek, a glükóz felvételt GlcP szupercsaládba tartozó permeáz fehérjék biztosítják (Lykidis et al., 2007).

2.6. Lignocellulolitikus enzimrendszerek

A természetben csak mikroorganizmusok képesek a lignocellulóz közvetlen hasznosítására, összetett enzimrendszereik segítségével. A különböző növényevő rovarok, hüllők, madarak és emlősök, mind valamilyen baktérium vagy gomba partner segítségére szorulnak (Dehority, 1991). A cellulóz és a változatos hemicellulóz polimerek önmagukban viszonylag hatékonyan bonthatóak enzimes úton, azonban a növényi sejt falban előforduló komplex szerkezetet alkotva a lignocellulóz rendkívül ellenálló, összetett polimer (Sun és Cheng, 2002, Lynch, 1992). Éppen ezért, a bontásáért nem egyetlen enzim felelős, hanem több katalitikus fehérjéből álló enzimrendszer. Ezeknek az alkotó elemeit expresszálnak egy törzshöz tartozó organizmusok is, de gyakrabban többféle mikroorganizmus alkotta közösség képes a hatékony lignocellulóz bontásra. Gyakran az egyik enzim terméke egy másik szubsztrátja lesz, vagy az egyik enzim aktivitása teszi hozzáférhetővé egy másik katalitikus fehérje szubsztrátját, így a több szinten jelentkező szinergizmus nagyban hozzájárul a hatékonysághoz. A lignocellulóz bontás szereplői között két eltérő stratégia figyelhető meg. Az aerob mikroszervezetek egyedi enzim modulokat termelnek, ellentétben az anaerob baktériumokkal, amelyek cellulozómáknak nevezett hatékony enzimkomplexek segítségével bontják a növényi sejt fal fő alkotóit. A komposzthalmokban természetesen az aerob közösségek jelentősége döntő, amelynek kulcsfontosságú tagjai az aerob, termofil baktériumok (Lynd et al., 2002).

2.6.1. Lignint módosító enzimek

A lignin enzimatis émsztéséhez szükséges fehérjéket elsősorban gombák termelik, azonban van néhány baktérium csoport, amelyik képes a lignin valamilyen mértékű bontására. A lignin biodegradációját végző enzimek olyan extracelluláris, nem specifikus katalitikus fehérjék, amelyek egy-elektron átmenettel járó oxidációs reakciókat katalizálnak. Fő típusaik a magas redox potenciállal rendelkező lignolítikus peroxidázok (lignin peroxidázok - LiP, mangán peroxidázok - MnP, hibrid peroxidázok - VP), valamint a lakkázok (Hatakka, 2001).

Az előbbi csoporton belül a lignin peroxidázok a nem fenolos egységeket támadják veratril alkohol redox mediátor közvetítésével, míg a mangán peroxidázok a nem fenolos és fenolos alkotóelemek bontásában is jelentős szerepet játszanak, egyedülálló módon Mn^{2+} iont használva redox mediátorként. A hibrid peroxidázok az LiP-k és az MnP-k tulajdonságait ötvözik. Mindegyik lignolítikus peroxidáz hem prosztetikus csoporttal működik, és hidrogén-peroxidot igényel a katalízishez, továbbá jellemzően alacsonyabb pH optimummal rendelkeznek, mint más peroxidázok (Martinez et al., 2005). A lignolítikus peroxidázok működése lignin modell molekulákon jól leírt folyamat, azonban natív lignin polimeren ezek az enzimek önmagukban nem aktívak, a természetben más enzimek is részt vesznek a depolimerizációban (Hammel et al., 1993).

A lakkázok többféle fenol tartalmú szubsztrátot képesek oxidálni, miközben molekuláris oxigént redukálnak vízzé. Aktivitásuk nem fenolos egységekre is kiterjedhet, különböző közvetítő molekulák jelenlétében. Növények esetében a lignin bioszintézisének fontos enzimeik, míg mikroorganizmusoknál a lignin bontásában játszanak szerepet, de ennek pontos mechanizmusa nem teljesen tisztázott (Singh Arora és Kumar Sharma, 2010). A lakkázok hiánya bizonyos szervezetek esetében rontja a ligninbontás hatékonyságát (Bermek et al., 1998), azonban vannak rendkívül eredményes lignindegradáló szervezetek, amelyek genomja nem kódol klasszikus lakkáz enzimet (Martinez et al., 2004).

A baktériumok körében számos esetben kimutattak már ligninbontást, azonban az erre alkalmas enzimrendszer működése jelenleg még kevésbé ismert, feltehetően extracelluláris peroxidázok vesznek részt benne (Zimmermann, 1990). Rendszertanilag az *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria* és a *Gammaproteobacteria* csoportok között vannak lignindegradáló baktériumok. Ligninbontásra utaló kis molekulású termékeket, vagy egyéb metabolitokat

kimutattak már a *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Streptomyces* és *Thermobifida* nemzetség tagjaival végzett kísérletek során, továbbá bioinformatikai elemzések nagyon diverz és komplex ligninbontási útvonalakat jeleznek számos baktérium taxonban. Mivel a növényi sejtfal anyag hatékony bontása egy mikrobiális közösség révén valósul meg, fontos megemlíteni, hogy a peroxidázok által termelt hidroxil gyökök és a peroxid is képes más sejtfalalkotókat is oxidálni, megkönnyítve így többek között a cellulóz és hemicellulóz frakciók degradálását is (Bugg et al., 2011).

2.6.2. Glikozid hidrolázok

A glikozid hidrolázok (GH) széles körben elterjedt enzimescsoport, amelyek glikozidos kötést hidrolizálnak két vagy több szénhidrát, illetve szénhidrát és nem szénhidrát származék között. A cellulázok a legtöbb hemicellulázzal egyetemben az O-glikozid hidrolázokhoz tartoznak, meg kell jegyezni azonban, hogy a hemicellulózok degradálásában a szénhidrát észterázoknak is jelentős szerepe van. A GH enzimek sok esetben moduláris felépítésűek, és a katalitikus domén mellett szénhidrát kötő modult (CBM) is tartalmaznak. A különböző CBM modulok képesek megkötni a poliszacharid láncokat, és megfelelő pozícióba hozni a katalitikus domént (Henrissat és Davies, 2000).

A glikozid hidrolázokat jelenleg aminosav szekvencia hasonlóság alapján osztályozzák, a rendszerezés így reflektál az enzimek háromdimenziós struktúrájára, továbbá az evolúciós viszonyokat is jobban tükrözi, mint a korábbi szubsztrát specifitás alapon történő besorolás. A harmadlagos szerkezet, és azon belül is az aktív centrum struktúrája, meghatározza a katalízis mechanizmusát. A reakció során végbemenő sztereokémiai változások alapján kétféle hidrolázt különböztethetünk meg. Az invertáló enzimek megváltoztatják az anomer oxigén atom konfigurációját, míg a megtartó hidrolázok nem. A glikozidos kötést a glikozid hidrolázok nagy része általános sav-bázis katalízis útján bontja, amelynek kulcs molekulái között van egy savas oldalláncú és egy nukleofil/bázikus oldalláncú aminosav az enzim aktív centrumában. A katalitikus helyek vizsgálata azonban rávilágított arra, hogy nem mindegyik glikozid hidroláz rendelkezik tipikus katalitikus bázissal/nukleofillal, amelyeket eltérő módon helyettesíthetnek (Vuong és Wilson, 2010).

Jelenleg a CAZY (carbohydrate-active enzymes) adatbázisa 135 GH családot különböztet meg, amelyekbe összesen 265792 enzim modult soroltak be, míg a

61682 azonosított szénhidrátkötő domén 71 családba tartozik ([http 4](http://4)). Folyamatosan írnak le azonban új hidroláz enzimeket, amelyek eddig nem létező GH családba tartoznak. 2015-ben Shimizu és mtsai. írtak le egy *Aspergillus nudilans* eredetű mannánbontó enzimet, amelyet az addig nem létező GH134-es családba soroltak be. Az enzim hasítási profiljából egy új katalitikus mechanizmusra következtetnek. A GH134-es családba néhány hónap alatt 135 enzimet soroltak be.

2.6.2.1. Cellulázok

A különböző cellulózbontó mechanizmusok közös vonása, hogy celluláz enzimekre épülnek. A cellulázok azok a glikozid hidrolázok, amelyek képesek két glükóz közti β -1,4-glikozidos kötés hasítására. Az egyedi celluláz enzimek aktivitása viszonylag alacsony kristályos cellulózon, azonban hosszú félélet idejük növeli a katalitikus hatékonyságukat. Polimer szubsztrátokon vizsgálva a cellulázok kinetikája nem lineáris, azonban kisebb és oldható oligoszacharidok esetében a Michaelis-Menten kinetikát követik. Többféle celluláz enzimet sikerült eddig leírni, amelyek közül a legelterjedtebbek az endocellulázok, ezek random kapcsolódnak a polimer lánchoz és azon belül hasítanak néhány kötetést, nyitott árokhoz hasonló aktív centrumukban. Az exocellulázok aktív centruma alagút alakú, és a polimer láncról való diffundálás nélkül egymás után hasítanak le cellobióz egységeket a redukáló, vagy a nem redukáló végről. A harmadik celluláz típus a processzív endoglükánázok (endo/exo celluláz), amelyek egy láncon belüli hasítás után a nem redukáló láncvéget támadva cellotetraózt szabadítanak fel. A hosszú polimereket hasító cellulázok, más oldhatatlan szubsztrátokon aktív enzimekhez hasonlóan, szinte minden esetben tartalmaznak egy vagy több szubsztrátkötő domént, amelyeket flexibilis kapocs régió köt össze a katalitikus modullal. Anaerob mikroorganizmusok esetében is jelen vannak a szénhidrát kötő modulok (CBM), de sokszor nem az enzim fehérjék, hanem a celluloszóma valamely szerkezeti fehérjéje tartalmazza ezeket az egységeket. Különösen fontos a CBM-ek szerepe az exoglükánázok processzivitásának fenntartásában. Lehetséges továbbá, hogy a CBM-ek a katalízis elősegítésén túl képesek lehántani a már hidrolizált cellulóz fragmenteket a rostokról. Az oldhatatlan cellulóz frakció degradációjának termékeiként megjelenő cellodextrinet és elsősorban a cellobiózt a β -glükozidázok bontják glükóz monomerekké (Lynd et al., 2002).

A fentieken túl, a cellulóz enzimátikus bontása során bizonyos mikroszervezetek esetében megfigyeltek olyan mechanizmusokat és fehérjéket, amelyek pontos leírása és szerepe még további kutatásokat igényel. A *Cytophaga hutchinsonii* talajlakó, aerob baktérium cellulázai többségében olyan endoglükánázok, amelyeknek nincs CBM moduljuk, a *C. hutchinsonii* mégis nagyon hatékony cellulózbontó organizmus. Nem teljesen tisztázott a szerepük, de bizonyítottan hatással vannak a cellulózbontás hatékonyságára egyes GH61-es családba tartozó géntermékek, valamint például a *T. fusca* által nagy arányban termelt CBM33 domént tartalmazó fehérjék (Wilson, 2011).

2.6.2.2. Hemicellulázok

A hemicellulázok egy diverz enzim csoportot jelölnek, hiszen a hemicellulóz maga is heterogén felépítésű és nagy variabilitást mutató összetett biopolimer. A hemicellulóz bontásában szerepet játszó glikozid hidrolázok és szénhidrát észterázok is tartalmazhatják a már több helyen említett CBM modulokat. Meg kell jegyezni, hogy a hemicellulóz bontó enzimek köre függ attól, hogy mit tekintünk hemicellulóznak, így azok az α -L-arabinofuranozidázok (EC 3.2.1.55), α -L-arabinanázok (EC 3.2.1.99), valamint endo-galaktanázok (EC 3.2.1.89) és β -galaktozidázok (EC 3.2.1.23), amelyek a különböző arabinánok, illetve arabinogalaktánok hidrolízisében játszanak szerepet, nem tartoznak feltétlenül ehhez a csoporthoz (Scheller és Ulvskov, 2010).

A legnagyobb mennyiségben előforduló hemicellulóz a xilán és származékai. A xilanázok (β -xilanáz vagy endoxilanáz) a xilóz egységekből β -1,4 kötésekkel felépülő polimereket hasítják xilo-oligoszacharidokra. A GH10-es és a GH11-es a legtöbb xilanázt tartalmazó családok, amelyekhez már több száz xilán polimert hasító enzimként sikerült besorolni, azonban a GH5-ös, GH8-as és GH43-as családokban is találhatunk xilanázokat. A xilán gerinchez kapcsolódó oldalláncok sokszor nehezítik a xilanázok hozzáférését a monomerek közötti kötésekhez, bizonyos esetekben azonban akár a hasító hely felismeréséhez is szükségesek lehetnek (Hurlbert és Preston, 2001). A xilo-oligoszacharidokat a β -xilozidáz enzimek hasítják xilóz egységekké. Különböző szervezetekben azonosított gének és bizonyos esetekben a kódolt fehérje vizsgálata alapján ezek az enzimek a GH3-as, GH39-es, GH43-as, GH52-es és GH54-es glikozid hidroláz családokba tartoznak (Shallom és Shoham, 2003).

A második legnagyobb tömegben előforduló hemicellulóz a mannán és származékai, amelyek bontásáért elsősorban a mannanáz (β -mannanáz vagy endomannanáz) enzimek felelősek. Ezek a glikozid hidrolázok szintén β -1,4 kötéseket hasítanak, de mannán polimereken belül. Az általuk felszabadított manno-oligoszacharidokat β -mannozidáz enzimek emésztik mannóz monomerekké. Az endomannanázok elsősorban a GH5-ös, és GH26-os osztályba tartoznak, míg β -mannozidázokat a GH1-es, GH2-es és GH5-ös családokban találhatunk (Shallom és Shoham, 2003).

Az α -L-arabinofuranozidázok és az α -L-arabinanázok közvetlenül az arabinofuranozil tartalmú sejtfal alkotók degradálásában játszanak szerepet. Ezek sokszor széles szubsztrát specificitású enzimek, és a következő családokban találhatóak: GH3, GH43, GH51, GH54 és GH62. A két enzimescsoporton belül vannak, amelyek O-5, O-2 és/vagy O-3 csoporton keresztül kapcsolódó arabinofuranozil csoportot hasítanak le, de előfordulnak olyanok is, amelyek szubsztrátjai kétszeresen szubsztituált (az O-2 és az O-3 helyen) xilózt tartalmaznak. Ezek a fehérjék akár a xilán tartalmú frakció degradációjának sebesség-meghatározó enzimek is lehetnek, mivel sok esetben aktivitásuk révén válik hozzáférhetővé a xilózok alkotta fő lánc. Némely endoxilanáz csak az oldalláncok eltávolítása után képes a xilóz gerincen belüli β -1,4-glikozidos kötéseket hasítani (Lee és Forsberg, 1987), ugyanakkor vannak olyan oldalláncot hasító fehérjék is, amelyeknek csak rövidebb tagszámú oligoxilánok a szubsztrátjai (Saha, 2000, Poutanen et al., 1991).

Az α -D-glükuronidázok kizárólag a GH67-es osztályban találhatóak, és a glükuronoxilán és az arabinoglükurono-xilán polimerekben bontják a 4-O-metil-D-glükuronsav és a xilóz közötti α -1,2-glikozidos kötést.

A glikozid hidrolázokon kívül különböző észterázok szintén részt vesznek a hemicellulóz degradálásában. Közöttük jelentősek az acetil észterázok, és a feruolil észterázok. A legtöbb xilán és mannán származék tartalmaz acetilált monomereket, amelyeknél az acetil csoport általában az O-3-as helyen, ritkábban az O-2-es helyen kapcsolódik. A ferulasav az arabinoglükurono-xilán arabinóz egységeivel létesít észter kötést, amely kötés szerepet játszik a lignin polimerhez való kapcsolódásban is.

További kiegészítő enzimek az α -galaktozidázok és β -glükozidázok, amelyek a galakto-glükomannánok bontását katalizálják, valamint az endo-galaktanázok és β -

galaktozidázok, amelyek az arabinogalaktánok fő láncának degradációjáért felelősek (Shallom és Shoham, 2003).

2.6.2.3. Glikozid hidroláz 5-ös család

A GH5-ös enzimes család jelenleg több mint 6600 enzimet foglal magában, amelyek szubsztrát specifitása széles spektrumon mozog, β kötésekkel kapcsolódó oligaoszacharidok, poliszacharidok és különböző glikokonjugátumok hidrolízisét végzik. Képviselői megtalálhatóak az *Archea*, a *Bacteria* és az *Eukaryota* taxonokon belül is, sőt még vírus eredetű enzimének is tartoznak ebbe a széles csoportba. Aspeborg és mtsai. (2012) átfogó tanulmányukban 51 alcsoportba tudták sorolni a GH5-ös enzimeket. A biokémiai karakterizálás során az alcsoportok harmada monospecifikus, bár ezekben sem zárható ki további aktivitások jövőbeni feltárása. A glikozid hidrolázok osztályozása ma már inkább szekvencia hasonlóság alapján történik, de jól tükrözi a család kiterjedtségét, hogy aktivitásuk alapján 21 csoportba (EC szám-Enzyme Commission number) lehet osztani a tagjait. A számos monospecifikus alcsoport mellett különváltak polispecifikus alcsoportok is, sőt a csoport tagjainak a vizsgálata az eredeti katalitikus szerkezetüket elveszített enzimekre is ráirányította a figyelmet. Hét különböző alcsoportban találhatunk celluláz (EC 3.2.1.4) enzimeket, és hat külön csoportba sorolhatóak a GH5-ös endo- β -1,4-mannozidázok (EC 3.2.1.78). A két legelterjedtebb aktivitás mellett a családon belül találhatunk még többek között β -mannozidázokat (EC 3.2.1.25), endo- β -1,4-xilanázokat (EC 3.2.1.8), sőt eukarióta eredetű mannán transzglykozilázokat is (EC 2.4.1.-).

A GH5-ös család tagjai a glikozidos hidroxilcsoport konfigurációját megtartó enzimek, és a katalitikus helyen egy konzervált glutaminsav pár játszik szerepet általános sav/bázisként, valamint katalitikus nukleofilként. A reakció során ez utóbbi támadja az anomer szénatomot, és alakít ki szubsztrát-enzim intermediert, míg a másik glutamát protonálja a glikozidos oxigén atomot, így hidrolizálva a kötést. A különböző GH5-ös enzimek esetében a teljes mechanizmusban az aktív helyen más konzervált aminosavak is részt vesznek (Rye és Withers, 2000, Rosengren et al., 2014).

Ma már az enzimes család több tucat tagjának ismert a háromdimenziós szerkezete, amelyek alapján megállapítható, hogy $(\beta/\alpha)_8$ topológiát követnek, katalitikus helyük pedig árok alakú. Elsőként a *Clostridium thermocellum* egyik endoglukanázának 3D szerkezetét tárták fel a családon belül (Dominguez et al., 1995), míg Hilge és

mtsai. (1998) a *Thermobifida fusca* (korábban *Thermomonospora fusca*) endomannanázát kristályosították, és a katalitikus egységének 3D szerkezetét vizsgálták.

Domén struktúrájukat tekintve az ide sorolt enzimek egy katalitikus modult tartalmaznak, amelyekhez, sok glikozid hidrolázhoz hasonlóan, szénhidrátkötő domének kapcsolódhatnak a C és az N terminálison egyaránt (Aspeborg et al., 2012).

2.7. Mannooligoszacharidok felhasználási lehetőségei

Az oligoszacharidoknak, köztük a mannán hidrolízisével előállítható mannooligoszacharidoknak (MOS) többféle ipari felhasználása lehetséges. Különösen nagy figyelem övezi ezeknek a termékeknek a prebiotikumként, illetve szimbiotikum alkotóként való hasznosításának lehetőségét, hiszen kutatások sora igazolja ezek bélflórára és immunrendszerre gyakorolt pozitív hatásait. A leggyakoribb prebiotikumként alkalmazott oligoszacharidok a fruktooligoszacharidok, galaktooligoszacharidok, xilooligoszacharidok és a mannooligoszacharidok (Pandey et al., 2015, Zenhom et al., 2011). Ezek a változatos összetételű szénhidrát molekulák segítik a probiotikumok elszaporodását a bélben. Az FDA (Food and Drug Administration) és a WHO (World Health Organization) definíciója szerint a probiotikumok olyan élő mikroorganizmusok, amelyek megfelelő mennyiségben alkalmazva előnyös élettani hatással bírnak. Ez a meglehetősen általános megfogalmazás talán jól demonstrálja, hogy a témában születő tanulmányok egyre növekvő száma ellenére keveset tudunk a prebiotikumok és probiotikumok pontos hatásmechanizmusáról. A leggyakrabban élelmiszerekhez kevert probiotikumok többek között a *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus reuteri*, a *Lactobacillus casei* és a *Lactobacillus acidophilus* csoport bizonyos törzsei, a *Bifidobacterium* nemzetség tagjai, egyes *Bacillus* fajok (pl. *Bacillus coagulans*), *Escherichia coli* Nissle 1917, bizonyos *Enterococcus* törzsek (pl. *Enterococcus faecium* SF68) és a *Saccharomyces boulardii* élesztő faj. Gyakran alkalmazzák a törzsek kombinációit, hiszen az egyes törzseknek eltérő hatásai lehetnek, amelyek kiegészíthetik egymást (Pandey et al., 2015).

A prebiotikumoknak a következő fontos tulajdonságokkal kell rendelkezniük: rezisztensnek kell lenniük a gyomorsavval, az epével és emésztő enzimekkel szemben, nem kötődhetnek a béltraktus felsőbb régióinak falához, a hasznos bélflóra által könnyen fermentálhatóaknak kell lenniük. A prebiotikumok

forrásai bizonyos táplálékok (szójabab, articsóka, cikória gyökér, zab, teljes kiőrlésű búza és árpa) és az anyatej mellett lehetnek a poliszacharidokból előállított különböző összetételű oligoszacharidok is. A prebiotikumok fogyasztásának, illetve takarmányokban adalékanyagként történő felhasználásának kedvező élettani hatásai általánosságban a hasmenések gyakoriságának és hosszának redukálása, a vékonybél gyulladás enyhítése, csökkentik vastagbél rák kialakulásának kockázatát, továbbá segítik az ásványi anyagok hozzáférhetőségét és felvételét, csökkentik bizonyos ér és keringési rendszeri megbetegedések kockázatát, teltségérzetet biztosítanak, ezzel is segítenek elkerülni az elhízást (Pandey et al., 2015).

A prebiotikumok hatásai rendkívül összetettek lehetnek, ezért a pozitív tapasztalatok és a prebiotikumok fogyasztása közti összefüggést sok esetben nehéz minden kétséget kizáróan igazolni. Több, rágcsálókön és emberen végzett tanulmány szerint a MOS és mannán fogyasztás változatlan kalória bevitel mellett volt képes csökkenteni a testtömeget, illetve a szövetek zsírtartalmát (Keithley és Swanson, 2005, Salinardi et al., 2010, Kumao és Fujii, 2006). Más kutatócsoportok vizsgálata ezt azonban nem tudta megerősíteni. Az ilyen anomáliák is rámutatnak, hogy mennyire fontos lenne a prebiotikumok hatásmechanizmusainak pontos feltárása, hiszen így lehetővé válna a hatások korrekt értékelése (Smith et al., 2010). A mannooligoszacharidok alkalmazhatóságát meghatározhatja, hogy mely mikroorganizmusok képesek azt hasznosítani. Kutatások azt igazolták, hogy a MOS fogyasztása szelektív előnyhöz juttatja a *Bifidobacterium adolescentis*, a *Lactobacillus acidophilus* és a *Lactobacillus gasseri* fajokat a mutagén ágenseket termelő *Clostridium perfringens* és az *Escherichia coli* fajokkal szemben. Szintén a mannooligoszacharidok bélflórára és bélmotilitásra gyakorolt hatását vizsgálták Asano és mtsai. (2001), eredményeik alapján az adagolt MOS dózistól függően nőtt a székletürítések gyakorisága, és a *Bifidobacterium* fajok aránya a féces mikroflórájában.

Az oligoszacharidok nem csak a probiotikumokon keresztül fejthetik ki hatásukat, hanem önállóan is immunmodulánsok lehetnek. Kutatások alapján a PGlyRP3 (peptidoglycan recognition protein 3) aktiválásán keresztül az oligoszacharidok képesek csökkenteni a gyulladasi citokinek expresszióját, így a vékonybélgyulladás káros hatásait enyhíthetik. A α 3-szialillaktóz és fruktooligoszacharidok hatását vizsgálva mindkettő gyulladáscsökkentő hatását igazolták, ami az IL-12 szekréció csökkenésében, illetve az IL-12p35, IL-8, TNF α és NF-kB gének alacsonyabb expressziós szintjében mutatkozott meg. A vizsgált oligoszacharidok a PGlyRP3

gyulladáscsökkentő fehérjét szabályozó PPAR γ sejtmag receptort indukálásán keresztül fejtették ki hatásukat (Zenhom et al., 2011).

A haszonállatok számos olyan stressz faktornak vannak kitéve (például a tartási és a takarmányozási körülmények), amelyek miatt a bélrendszerük egészséges ökoszisztémája könnyen felborulhat, így jobban ki vannak téve patogének okozta fertőzéseknek. Ugyancsak nagy a fertőzések rizikója a leválasztáskor, amikor még nem érett a fiatal egyedek immunrendszere. A kockázatok csökkentése érdekében sokan a pre és probiotikumokat javasolják alternatívaként az EU-ban már betiltott AGP (antibiotic growth promoter) helyett. Élesztők sejtfalából vagy különböző növényi extraktumokból származó mannán származékok jó szubsztrátjai lehetnek Gram negatív baktériumok adhéziójának, így érdemes lehet a takarmányozás során alkalmazni ezeket. Badia és mtsai. (2013) sertések vékonybél epithélium sejtjein vizsgálták különböző mannooligoszacharid származékok hatékonyságát *Salmonella enterica* ser. Typhimurium fertőzés ellen. Az *in vitro* fertőzött sejtekben gyulladásos citokinek (IL6) és kemokinek (CXCL8) felszabadulását tapasztalták, amelyek szintje D-mannóz hatására nem, ellenben *Saccharomyces cerevisiae* sejtfalból származó oligomannán és β -galaktomannán hatására csökkent. A sertések esetében igazolt hatásokat csirkékénél is sikerült kimutatni. Sertésnél a mannooligoszacharid források takarmányba keverése pozitívan hatott a súlygyarapodásra, és csökkentette az *Enterobacteria* sejtek számát a jejunumban. Szintén sertések esetében bizonyították, hogy a mannooligoszacharidok alkalmazása módosítja a bélmikrobiótát, és *Salmonella* ferőzést követően növelte a *Bacteroidetes* és *Lactobacillus* törzsek számát.

A takarmányként alkalmazott mannooligoszacharidok immunstimuláns prebiotikumként gyakorolt pozitív hatásait nem csak szárazföldi állatok esetében, hanem akvakultúrákban is igazolták (Song et al., 2014).

Ipari biotechnológiai eljárások fejlesztése szempontjából fontos eredmény, hogy szentjánoskenyér liszt részleges hidrolízisével előállított mannooligoszacharidokkal emelni lehet a *Bacillus licheniformis* bacteriocin A termelését (Murphy et al., 2007), illetve különböző *Basidiomycota* fajok lakkáz enzim fermentálását (Ramirez-Cavazos et al., 2014).

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A fejezetben leírt kiteket és anyagokat abban az esetben, ha ezt külön nem jelölöm, mindig a gyártó utasítása szerint használtam. A felhasznált vegyszereket a Sigma-Aldrich kft.-től szereztük be, minden olyan esetben ahol ezt külön nem jelölöm.

3.1. Cellulóz és hemicellulóz bontó mikrobák izolálása és azonosítása

3.1.1. A mikrobák izolálása

Két különböző típusú komposztból történt mintavétel, magyarországi helyszíneken. Egyrészt szarvasmarha trágyakomposzt 40-80 °C-os régióiból, másrészt nyárfanyesedék alapú komposzt 60-80 °C-os régióiból. A mintákból szuszpenziót és hígítási sorozatot készítettem. A komposztlakó baktériumokat szilárd táptalajokon izoláltam, amelyek egyedüli szénforrásként különböző formájú cellulóz, illetve hemicellulóz molekulákat tartalmaztak. A felhasznált táptalajok alapja egy minimál tápoldat volt (0,5 g élesztő kivonat; 0,5 g pepton; 1 g NaNO₃; 1 g K₂HPO₄; 3 g NaCl; 0,5 g MgCl₂; 1000 ml desztillált víz; pH 7,5), amelyekhez a 25g agar mellett eltérő szénforrásokat (kristályos cellulóz-Avicel, karboximetil-cellulóz, bükkfa-xilán és galaktomannán-szentjánoskenyér-liszt) adtam, és négy különböző hőmérsékleten inkubáltam (40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C). A különálló telepeket ezután tisztító szélesztéssel oltottam tovább, majd a tiszta tenyészeteket LB (5 g élesztő kivonat, 10 g tripton, 9 g NaCl, 1000 ml desztillált víz) vagy TSB (17 g kazein pepton; 3 g szója pepton; 2,5 g D-glükóz; 5 g NaCl; 2,5 g K₂HPO₄; 1000 ml desztillált víz; pH 7,5) folyadék médiumba inokuláltam. A folyadék kultúrákat több napon keresztül 200 rpm sebességgel rázattam a megfelelő hőmérsékleten (40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C).

3.1.2. Az izolátumok azonosítása

A megfelelő denzitást elérő biomasszát centrifugálással összegyűjtöttem, majd elvégeztem a DNS izolálást a megfelelő kit segítségével (MoBio UltraClean Microbial DNA Isolation Kit). Az izolálás eredményét agaróz gélelektroforézissel [1 %-os agaróz gél: 100 ml TBE puffer (10,78 g TRIS bázis; 5,5 g bórsav; 0,74 g

EDTA; 1000 ml desztillált víz; pH 8,3), 1 g agaróz, 5 µl etídium-bromid] ellenőriztem (120 V, 20 perc). A mintafelvitel a következő anyagok felhasználásával történt: 3 µl töltőpuffer (30 v/v % glicerin, 0,25 mM brómfenolkék), 5 µl DNS. A gél egyik zsebébe molekula marker került (GeneRuler DNA Ladder Mix, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA). A DNS mintákat további felhasználásig -20 °C-on tároltam. A továbbiakban a genomi DNS, illetve a PCR termékek ellenőrzését ennek megfelelően végeztem, a megfelelő futási idő megválasztásával.

A 16S rDNS amplifikálása PCR segítségével történt 50 µl végtérfogatban a következő összetevők felhasználásával: 5 µl 10x-es PCR puffer, 2 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 1 U *Taq* DNS polimeráz (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA) 0,3 µM forward primer, 0,3 µM reverse primer, 2-5 µl templát, a keveréket steril dH₂O-val 50 µl-re egészítettem ki. A reakcióhoz 27f-1492r univerzális *Bacteria* primereket használtam (Baker et al., 2003). A reakció hőprofilja:

kezdeti denaturáció:	98 °C - 5 perc
<i>Taq</i> hozzáadás:	94 °C - 10 másodperc
32 ciklusban:	
denaturáció:	94 °C - 30 másodperc
anelláció:	52 °C - 30 másodperc
extenzió:	72 °C - 1 perc
végző extenzió:	72 °C - 10 perc
hűtés:	4 °C - ∞

Az amplifikált gének szekvencia analízisének első lépéseként tisztítottam a PCR termékeket (NucleoSpin Extract II kit, Macherey-Nagel, Düren). Következő lépésként összemértem a szekvenáló reakció komponenseit: 1 µl BigDye Terminator; 1,5 µl BigDye puffer (Applied Biosystems, USA); 0,5 µl 27f primer (32,5 µM-os); 1-7 µl templát DNS; MQ víz 10 µl végtérfogatra kiegészítve. A szekvenáló reakció 28 cikluson keresztül zajlott a következő hőprofillal (a 28 ciklus után 4 °C-on tartva a mintákat):

denaturáció:	96°C	10 mp
anelláció:	50°C	5 mp
extenzió:	60°C	4 perc

A szekvenáló reakció termékeit ezután etanos precipitációval tisztítottam meg. 0,5 ml-es steril Eppendorf csőbe a következőket mértem: 10 µl DNS termék; 1,5 µl nátrium-acetát (2M-os, pH 4,6); 31,25 µl 96% etanol; 7,25 µl dH₂O. Az elegyet összekevertem, majd 15 percig szobahőmérsékleten inkubáltam. Ezután 20 percig 10000 g-n 4 °C-on centrifugáltam, majd a felülúszót pipettával eltávolítottam. A pelletehez 180 µl 70%-os etanolt adtam, kémcsőrázaton alaposan összekevertem, majd 10000 g-n, 4°C-on, 10 percig centrifugáltam. A felülúszót pipettával óvatosan eltávolítottam, majd a mintákat 10 percre vákuumcentrifugába helyeztem. A beszárított pelletet 20 µl Hi-Di formamidban vettem fel.

A szekvenciák meghatározása kapilláris gélelektroforézis segítségével történt (Applied Biosystems® ABI 310 DNA Genetic Analyzer, Applied Biosystems, USA). A szekvenciák kiértékeléséhez és a manuális korrekciókhoz a MEGA6 szoftvert használtam (Tamura et al., 2013), majd a kapott 16S rRNS génszakaszokat összehasonlítottam az EzTaxon adatbázisával ([http 5](http://5)) (Chun et al., 2007). Az egyes izolátumok filogenetikai fán való megjelenítése szintén a MEGA6 szoftver segítségével, neighbor joining módszerrel, Kimura 2 paraméteres modell és a "pairwise deletion" opció mellett történt.

Az izolátumokat részben liofilizálva, részben pedig -80 °C-on fagyasztva tárolom. A liofilizáláshoz a biomasszát krioprotektív vivőanyaggal (5% mezo-inozitol tartalmú 20%-os zsírmentes tejpor oldat - Difco Skim milk) lemostam a táplemezekről, és a baktérium szuszpenzióból 250 µl-t a steril liofilizáló csövekbe pipettáztam, majd ezeket vattával lezártam. A biomasszát tartalmazó ampullákat a fagyasztva szárító berendezéshez illesztettem, végül 24 órás liofilizálást követően az ampullákat vákuum alatt lezártam. A -80 °C-os tárolás esetében a folyadék kultúrákhoz 30%-os glicerol oldatot adtam fele-fele arányban.

3.2. Új faj új nemzetség jelölt mikrobiológiai jellemzése

Az új baktériumfajok leírása polifázikus megközelítéssel történt. A DNS alapú és kemotaxonómiai módszerek mellett, hagyományos mikrobiológiai módszerek segítségével történt az új izolátum karakterizálása. Az új fajok leírásakor támasztott követelményeknek megfelelően egyes vizsgálatokat rokon fajok törzseivel (*Paenibacillus polymyxa* DSM 36, *Fontibacillus aquaticus* DSM 17643) is elvégeztük.

3.2.1. Fenotípusos tulajdonságok vizsgálata

A mikroszkópikus vizsgálatok részben fénymikroszkóp, részben elektronmikroszkóp segítségével történtek. A Gram-festést Buck által leírt módszer alapján végeztem (Buck, 1982). Az elektronmikroszkópos felvételek Dr. Szabó László segítségével és irányítása mellett az MTA TTK elektronmikroszkópos laboratóriumában készültek. A felvételekhez 24, 48 és 96 órás, 40 °C-on, xilán tartalmú (3.1.1. fejezet) agarlemezen növesztett tenyészetet használtam. A tenyészetekből szuszpenziót készítettem, amelyből 5 µl-t néhány mm átmérőjű, rézzel bevont mikrorostélyra (gridekre) helyeztem, szűrőpapírral leitattam a felesleges folyadékot. A mintákat ezt követően 5 µl 1%-os uranil-acetáttal kezeltem, majd szobahőmérsékleten folyékony CO₂-vel szárítottam (Bozzola és Russell, 1992). A fenti módon előkészített mintákról Morgagni 268D transzmissziós elektronmikroszkóppal készültek a felvételek.

A növekedés pH (4-11) és hőmérséklet optimumát (20-50 °C), illetve a sótűrést (1-5% NaCl) TSB médiumban vizsgáltam. A szubsztrát hasznosítás vizsgálatát API 50CHB teszt (bioMérieux, France) segítségével végeztem. A xilán bontást a xilánt tartalmazó táptalajon történt tenyésztést (72 órás 40 °C-on) követően 1%-os Kongó-vörös festékkel való festéssel igazoltam (a 2 órás festést 1M NaCl oldattal történő mosás követte).

3.2.2. Kemotaxonómiai vizsgálatok

A kemotaxonómiai markerek vizsgálatát a DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) laboratóriumaiban végezték, az általam biztosított biomasszából. A megfelelő protokollok elérhetőek a DSMZ weboldalán (zsírsav analízis – [http 6](#), légzési kinonok vizsgálata – [http 7](#), poláris lipidek elemzése – [http 8](#), DAP vizsgálat – [http 9](#)). A vizsgálatokhoz szükséges biomassza előállításához minden esetben TSB médiumban 24 órán keresztül tenyésztettem a törzseket. A genom guanin és citozin aránya (G+C) *in silico* a genom projekt alapján számított érték.

3.3. Genom analízis

A genom analízist célzó baktérium törzsek különböző forrásokból származnak. A *T. fusca* TM51 (Kukolya et al., 1997) és a *T. cellulositytica* TB100^T (Kukolya et al., 2002) törzseket Dr. Kukolya József bocsátotta rendelkezésemre, a *T. halotolerans* JCM16012^T törzset (megegyezik a YIM90462^T törzsszel) (Yang et al., 2008)

törzsgyűjteményből (Japan Collection of Microorganisms - JCM) vásároltuk, míg a K13-as törzs saját izolátum.

Megfelelő mennyiségű és minőségű genomi DNS-t a törzsek tiszta folyadék kultúrájából DNS izoláló kit segítségével nyertem, a gyártó (MoBio UltraClean Microbial DNA Isolation Kit) utasításai szerint.

A dolgozatban leírt genom projektek gyakorlati kivitelezése a következő intézetekben és szolgáltatóknál történt: MTA-SZBK, Biokémiai Intézet; Roche Magyarország Kft; Seqomics Kft.

A *T. fusca* TM51 esetében reszekvenálással és SOLiD (Life Technologies) mate-paired technológia segítségével történt a teljes genomszekvencia meghatározása. Referencia genomként a *T. fusca* YX törzs teljes genomi szekvenciája szolgált. A kontigok összeállítása a Genomics Workbench 4.9 (CLC Bio) felületen történt, az annotációhoz pedig az NCBI Prokaryotic Genomes Automatic Annotation Pipeline (NCBI-PGAAP) ([http 10](http://10)) oldal biztosította a háttérrel.

A *de novo* projektek (*T. cellulositytica* TB100^T, *T. halotolerans* JCM16012^T, K13-as törzs) többféle új generációs szekvenáló platform segítségével valósultak meg. A *T. cellulositytica* TB100^T esetén a 3 és 6 kb fragment méretű DNS könyvtár mate-pair genomic library kit (Illumina) segítségével készült. A bázissorrend meghatározása Illumina MiSeq platformon, MiSeq Reagent Kits V2 használatával történt. A mate-paired read-ek kontigokba, illetve scaffoldokba rendezése Mira V 4.0.2 (Chevreux et al., 1999) szoftver, illetve SSpace 3.0. (Boetzer et al., 2011) szoftver segítségével valósult meg. A draft genom annotálása RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology) szerverrel készült (Aziz et al., 2008).

A K13-as törzs esetében szintén mate-paired könyvtár készült a genomi DNS-ből, és MiSeq platformon történt a szekvencia meghatározása, a *T. cellulositytica* genom projektjéhez hasonló módszerrel.

A *T. halotolerans* genom szekvencia meghatározása SOLiD 4 (Life Technologies) és Roche GS Junior platformról származó adatok kombinálásával valósult meg. A genom összeszerelés Genomics Workbench 4.8 *de novo* alkalmazással (CLC Bio), és Omixon Gapped SOLiD alignment 1.3.2 alkalmazással történt. Az automata annotáció az NCBI Prokaryotic Genomes Automatic Annotation Pipeline (PGAAP) ([http 10](http://10)) segítségével a GeneMark, Glimmer, és tRNAscan-SE algoritmusok bevonásával történt.

Az annotált genomokból a kívánt információk kinyerését, illetve az annotáció manuális ellenőrzését többféle internetes adatbázis és kereső szoftver segítségével

végeztem: Pfam (<http> 11) (Bateman et al., 2002); Interpro (<http> 12) (Mitchell et al., 2015); SignalP (<http> 13) (Petersen et al., 2011); TATfind (<http> 14) (Rose et al., 2002); Expasy- (<http> 15) (Gasteiger et al., 2005); TMHMM (<http> 16) (Sonnhammer et al., 1998).

3.4. *Thermobifida* endomannázok vizsgálata

A nemzetség mind a négy fajának egy-egy képviselőjével dolgoztam a vizsgálataim során. A *T. fusca* TM51 és a *T. cellulositytica* TB100^T törzseket a laboratóriumi törzsgyűjteményből használtam, míg a *T. halotolerans* JCM16012^T és a *T. alba* CECT3323 (szinonimaként: *T. alba* ULJB1) a japán (a Japan Collection of Microorganisms - JCM), illetve a spanyol (Spanish Type Culture Collection - CECT) nemzeti törzsgyűjteményekből vásároltuk.

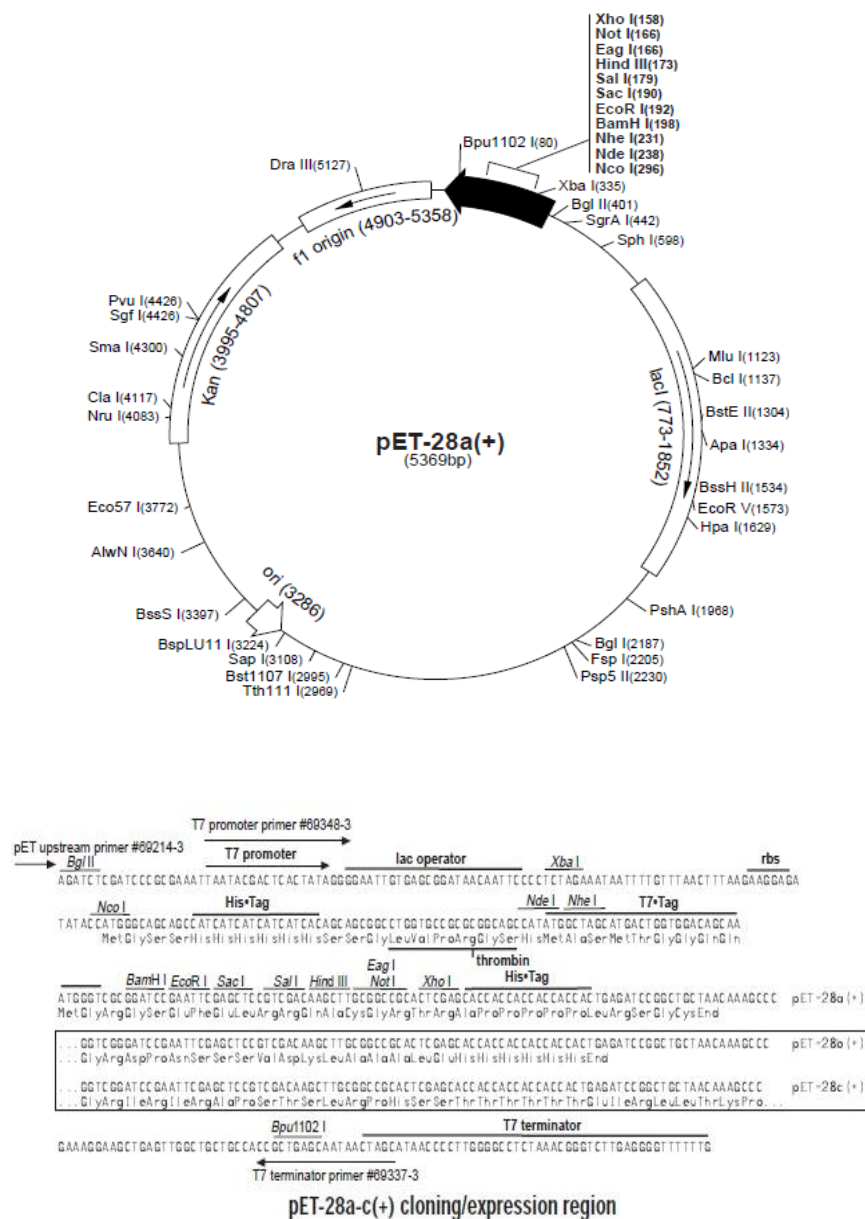
3.4.1. Endomannáz gének klónozása

A genomi DNS izolálását a 3.1.2. fejezetben tárgyaltak szerint végeztem. A genom adatok alapján három primer párt tudtam tervezni (1. táblázat). Mindhárom primer pár forward tagja *NdeI*, reverse tagja *XhoI* hasító szekvenciát, illetve egy 7-8 bázis hosszúságú, véletlenszerű bázisösszetétellel rendelkező szakaszt tartalmazott az 5' végen, amelyek a restrikciós endonukleázok hasító, illetve kapcsolódó helyeiként szolgáltak. A primereket minden esetben a szignál szekvencia utáni szakaszra terveztem, ennek helyét a Signal3P szoftver segítségével állapítottam meg.

1. táblázat A *man5A* génekre tervezett primer szekvenciák (aláhúzva a restrikciós endonukleázok hasító helyei szerepelnek)

Cél gén	Primer szekvencia (5'-3')	
<i>T. fusca</i> endomannáz (<i>man5ATf</i>)	GGTGCCATCATATGGCCACCGGGCTCC	forward primer
	GTGCCATCTCGAGTCAGCGAGCGGTG	reverse primer
<i>T. cellulositytica</i> endomannáz (<i>man5ATc</i>)	GGTGCCATCATATGGCGACCGGGATCC	forward primer
	GTGCCATCTCGAGTCAGTCGACGGAGCAGGTC	reverse primer
<i>T. halotolerans</i> endomannáz (<i>man5ATh</i>)	GGTGCCATCATATGGCCACCGGCTTC	forward primer
	GTGCCATCTCGAGTCAGTCGGTGGTG	reverse primer

A gének amplifikálását PCR segítségével végeztem el, hasonlóan a 3.1.2. fejezetben leírtakhoz, azzal a különbséggel, hogy enzimként *Pfu* DNS polimerázt használtam (Thermo Fisher Scientific Inc.), az anellációs hőmérséklet 60 °C volt, az elongációs idő pedig 3 perc. A tisztított PCR termékeket *Nde*I és *Xho*I restriktációs endonukleáz enzimekkel emésztettem (Thermo Fisher Scientific Inc.), majd agaróz gélelektroforézis után a gélből izoláltam a fragmenteket egy erre alkalmas kit segítségével (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega GmbH, Mannheim). A fragmentek ligálásához pET-28a plazmid vektort (2. ábra) és T4 DNS ligázt használtam (Thermo Fisher Scientific Inc.).



2. ábra A pET28a vektor szerkezete (felül), és poliklónozó helye (alul)

A ligátumokkal ezután *E. coli* Top10 kompetens sejteket transzformáltam, amelyekből 12 órás tenyésztést követően (50 µg/ml végkoncentrációban kanamicint tartalmazó LB médiumban, 37 °C-on, 200 rpm rázatással) izoláltam az inzertet tartalmazó plazmidokat. A fehérjék expresszáálásához ezekkel a vektorokkal történt az *E. coli* BL21 (DE3) sejtek transzformálása. A kompetens sejteket mindkét esetben a gyártó (Invitrogen) utasítása szerint hősokkal transzformáltam. A transzformánsokat 1 órás regenerálást követően 50 µg/ml végkoncentrációban kanamicint tartalmazó LB táplemezekre szélesztettem.

3.4.2. Fehérje expresszió és tisztítás

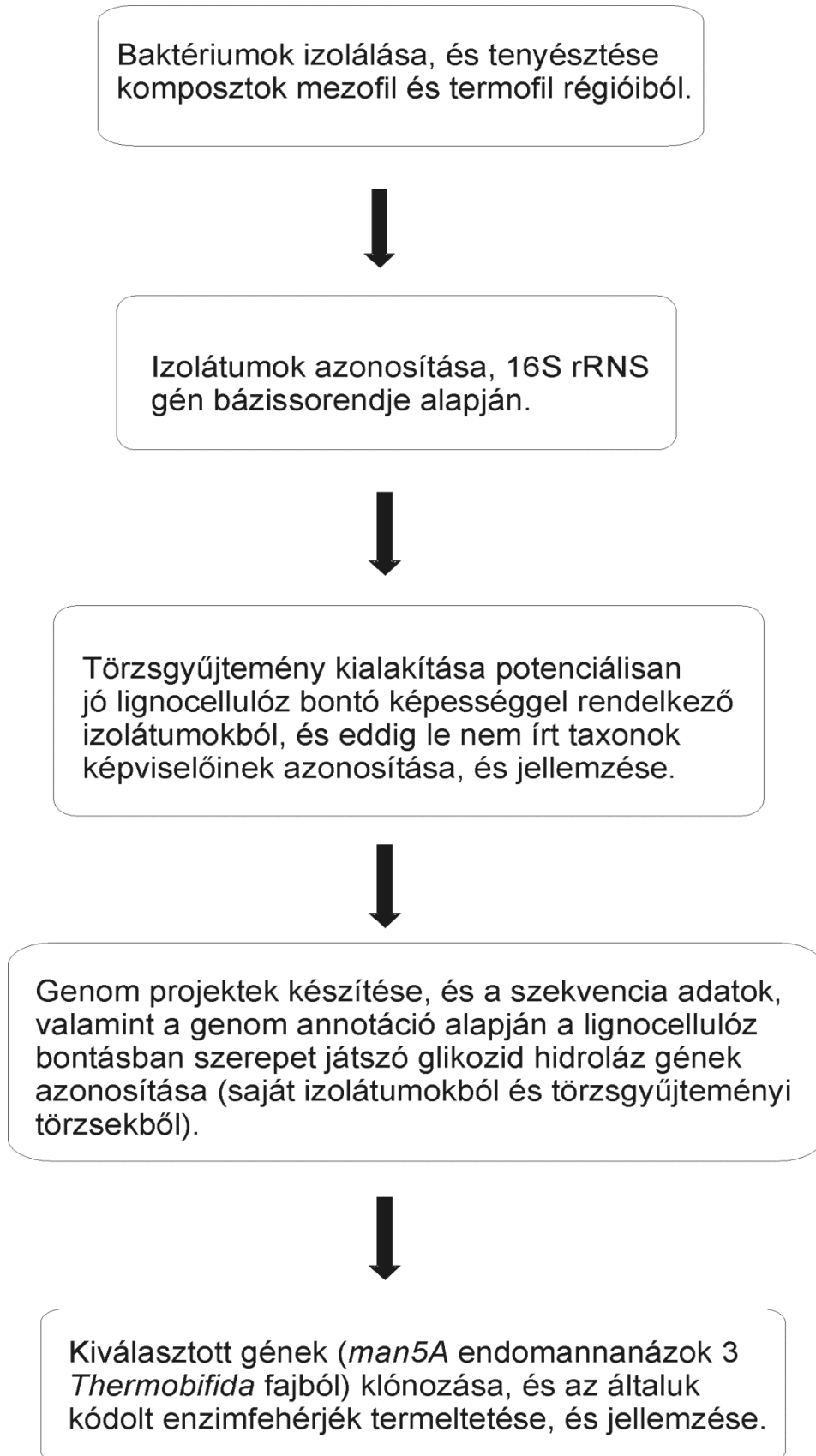
Az LB lemezekről a vektort tartalmazó *E. coli* BL21 telepeket 500 ml folyékony LB médiumban növesztettem tovább, amely szintén 50 µg/ml végkoncentrációban tartalmazott kanamicint. A folyadék kultúrákat 37 °C-on, 200 rpm rázatás mellett 0,6 és 1 közé eső OD₆₀₀ értékig növesztettem, majd a fehérje expressziót IPTG-vel (izopropil β-D-1-thiogalaktopiranozid, 1 mM végkoncentrációban) indukáltam, amelyet további 20 °C-on történő 12 órás rázatás követett. A biomasszát centrifugálással összegyűjtöttem, majd a pelletet grammonként 1 ml lízis pufferben (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 8) felvettem. A proteolízis megakadályozása érdekében 2 mM végkoncentrációban PMFS-t (fenilmetánszulfonil-fluorid) adtam a szuszpenzióhoz, majd a sejteket szonikálással és lizozim (1 mg/ml végkoncentrációban) segítségével jégen tartva tártam fel. A lizátumból centrifugálással eltávolítottam a sejtörmelékét (20 perc, 4 °C, 20000 x g), majd a felülúszót His-Trap oszlopra (GE Healthcare) vittem fel. Az IMAC tisztítást Akta Start rendszeren (GE Healthcare) végeztem, ahol az eluálás 0-500 mM imidazol grádiens mellett foszfát pufferben történt (300 mM NaCl, 20 mM Na-foszfát puffer, pH 7,2). A frakciók fehérje koncentrációját csakúgy mint a továbbiakban, Bradford módszer segítségével határoztam meg (Bradford, 1976). A fehérje expresszió és tisztítás sikerességét SDS-PAGE segítségével ellenőriztem. Az elválasztó gél a következő összetevőket tartalmazta 10 ml-re számolva: 3,3 ml 30 %-os akril-amid; 2,5 ml TRIS (1,5 M); 0,1 ml 10%-os SDS; 0,1 ml 1 %-os ammónium perszulfát; 6 µl TEMED (tetrametilén-diamin); 4 ml dH₂O, míg a gyűjtő gél az alábbiakból állt 4 ml-re számolva: 0,67 ml 30 %-os akril-amid; 0,5 ml TRIS (1M); 40 µl 10%-os SDS; 40 µl 1 %-os ammónium perszulfát; 4 µl TEMED; 2,7 ml dH₂O. Az SDS PAGE-hoz továbbá futtató puffert (végkoncentráció: 25 mM Tris; 192 mM glicin; 0,1 % SDS), 2-szeres töltő puffert (10 ml-re számolva: 1 ml 1

M Tris-HCl pH 6,8; 4 ml 10% SDS; 2 ml glicerol, 0,5 ml 1 %-os brómfenolkék; 2,5 ml d H₂O), és molekulásúly markert használtam (PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific Inc.). A futtatás az elválasztó gélig 80 V feszültséggel, majd a gél aljáig 130 V feszültséggel történt. A gél PAGE-Blue (Thermo Fisher Scientific Inc.) fehérje festékekkel festettem a gyártó utasítása szerint.

3.4.3. Az endomannázok biokémiai jellemzése

Az endomannázok szubsztrát specificitását egyrészt különböző poliszacharidokkal (alacsony viszkozitású karboximetil-cellulóz (CMC), mikrokristályos cellulóz (MN300, Avicel), bükkfa xilán, galaktomannán (szentjánoskenyér-liszt, LBG)) vizsgáltam, másrészt mesterséges aril-mannozid szubsztrátként 4-nitrofenil β -D-mannopiranozidot (pNP- β M) használtam. A mannanáz aktivitás meghatározásához az LBG-mannánból a redukáló cukrok felszabadulását dinitro-szalicilsavas módszerrel mértem (Miller, 1959). Az enzimaktivitás különböző paramétereinek vizsgálatához összeállított reakció tipikusan a következő összetétel mellett történt: 2 mg/ml LBG-mannán mellett, 450 μ l 50 mM-os foszfát pufferben (pH 7,5). Az elegyet 50 °C-on inkubáltam, és a reakciót 50 μ l (0,2-0,7 μ g) endomannáz enzim hozzáadásával iniciáltam, majd 10 perc után 1 ml Miller reagenssel (5 g dinitro-szalicilsav; 1 g fenol; 0,25 g Na₂SO₃; 5 g NaOH; 500 ml desztillált víz) állítottam le. Az endomannázok Michaelis-Menten kinetikai paramétereit 0,4–4 mg/ml LBG-mannán szubsztrátkoncentráció mellett Origin 8.0 szoftver (OriginLab, Northampton, MA) segítségével lettek meghatározva. Az enzimek pH függésének meghatározása pH 4-10 tartományban, a következő pufferek segítségével történt: 100 mM citrát-foszfát puffer (pH 4.0 - 6.5), 100 mM nátrium-foszfát puffer (pH 6.5 - 7.5), 200 mM trietanolamin/HCl (pH 7.5 - 9.0) és 200 mM glicin/NaOH (pH 9.0 - 10.0). A hőmérséklet enzimaktivitásra gyakorolt hatását 50 mM foszfát (Na₂HPO₄-NaH₂PO₄) pufferben (pH 7,5) 40–90 °C-os hőmérséklet tartományban határoztam meg.

Az enzimek hőstabilitásának meghatározása a következő módszer alapján történt: 40 μ g/ml végkoncentrációjú enzim mintát 70 °C-on foszfát pufferben (50 mM Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ foszfát puffer, pH 7,5) inkubáltam. A hőkezelés során az enzimmintából 10-10 μ l-eket vettem ki meghatározott időközönként, majd jégen hűtöttem 30 percig. Az így kezelt enzimekkel ezután elvégeztem az enzimaktivitási vizsgálatot a fent leírtak szerint, és kiszámoltam az enzim kezdeti aktivitásához viszonyított relatív aktivitást.



3. ábra Munkám során végzett feladatok összefoglalása

4. EREDMÉNYEK

4.1. Komposzt eredetű törzsgyűjtemény kialakítása

Munkám során két eltérő típusú komposztból izoláltam baktériumokat. Szarvasmarha trágya alapú komposzt mezofil és termofil régiójából, illetve nyárfanyesedék alapú komposzt 60-80 °C-os régiójából. Munkám során sikerült egy több tucat törzset tartalmazó potenciálisan lignocellulóz bontó, identifikált baktériumokból álló törzsgyűjteményt kialakítanom (2. táblázat). A 2. táblázatban jelölt típusú törzsek 16S rRNS génszekvenciáinak, illetve a fajokhoz tartozó genom projektek hivatkozási számát a 2. melléklet tartalmazza.

2. táblázat A baktérium törzsgyűjteményt alkotó komposzt eredetű izolátumok

Izolátum jele	A legnagyobb hasonlóságot mutató típusú törzs (az EzTaxon adatbázis alapján)	16S rDNS hasonlóság (%)	A GH gének meglétére vonatkozó CAZY adat	A fajhoz tartozó genom projektek
mezofil (40 °C)				
A71	<i>Bacillus oceanisediminis</i> H2	99,45	endoglükánáz, GH5	1 törzsből
CS2	<i>Bacillus oceanisediminis</i> H2	99,24	endoglükánáz, GH5	1 törzsből
CS2/1	<i>Streptomyces cavourensis</i> NBRC13026	99,65	nincs	nincs
CS3	<i>Streptomyces cavourensis</i> NBRC13026	99,64	nincs	nincs
CS8	<i>Streptomyces cavourensis</i> NBRC13026	100	nincs	nincs
CSB1	<i>Streptomyces phaeoluteigriseus</i> NRRL ISP-5182	99,74	nincs	nincs
CSB2	<i>Streptomyces phaeoluteigriseus</i> NRRL ISP-5182	99,81	nincs	nincs
K18	<i>Cellulosimicrobium funkei</i> ATCC BAA-886	99,33	endoglükánáz, GH6	2 törzsből
MC11	<i>Cellulosimicrobium funkei</i> ATCC BAA-886	99,81	endoglükánáz, GH6	2 törzsből
3	<i>Brevibacillus aydinogluensis</i> PDF25	99,76	nincs	nincs
E6	<i>Brevibacillus aydinogluensis</i> PDF25	99,39	nincs	nincs
5c	<i>Brevibacillus aydinogluensis</i> PDF25	99,88	nincs	nincs
323_2	<i>Brevibacillus aydinogluensis</i> PDF25	99,88	nincs	nincs
322_1	<i>Brevibacillus aydinogluensis</i> PDF25	99,74	nincs	nincs
RTM21	<i>Cellulomonas hominis</i> DMMZ CE40	99,61	nincs	1 törzsből
RTM11B	<i>Bacillus aerius</i> 24K	99,05	nincs	nincs
B7	<i>Cellulomonas flavigena</i> DSM20109	98,32	91 GH	2 törzsből

MixobIII	<i>Paenibacillus lautus</i> NRRL NRS-666	98,96	endoglükánáz GH5 és GH44, pullulanáz GH13	nincs
118	<i>Jonesia denitrificans</i> DSM20603	98,5	62 GH	1 törzsből
K13	<i>Paenibacillus montaniterrae</i> MXC2-2	93,03	nincs	nincs
termofil (60 °C)				
102	<i>Thermobifida cellulositytica</i> TB100	99,63	GH5 endomannanáz, hiányos	1 törzsből
342-4	<i>Thermobifida fusca</i> ATCC27730	99,24	39 GH	3 törzsből
343-5/A	<i>Thermobifida fusca</i> ATCC27730	99,86	39 GH	3 törzsből
ECcs	<i>Thermobifida fusca</i> ATCC27730	99,31	39 GH	3 törzsből
ELBGA	<i>Geobacillus thermoleovorans</i> BGSC96A1	98,66	21 GH	3 törzsből
EXILB	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> F84b	100	32 GH	2 törzsből
KLBC	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> F84b	99,64	32 GH	2 törzsből
NLBB	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> F84b	99,48	32 GH	2 törzsből
NXILA	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> F84b	100	32 GH	2 törzsből
ZXILA	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> F84b	100	32 GH	2 törzsből
EXILC	<i>Aeribacillus pallidus</i> DSM3670	99,39	nincs	1 törzsből
XLB	<i>Aeribacillus pallidus</i> DSM3670	99,71	nincs	1 törzsből
ZLB1	<i>Aeribacillus pallidus</i> DSM3670	98,74	nincs	1 törzsből
KLLB	<i>Brevibacillus thermoruber</i> DSM7064	99,46	GH3	2 törzsből
NCELA	<i>Brevibacillus aydinogluensis</i> PDF25	99,16	nincs	nincs
NCELB	<i>Brevibacillus aydinogluensis</i> PDF25	99,83	nincs	nincs
NLBE	<i>Brevibacillus aydinogluensis</i> PDF25	99,61	nincs	nincs
ZCELA	<i>Brevibacillus aydinogluensis</i> PDF25	98,63	nincs	nincs
termofil (70 °C)				
EC1	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> F84b	99,46	32 GH	2 törzsből
EL2ASZ	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> F84b	99,89	32 GH	2 törzsből
EM1	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> F84b	100	32 GH	2 törzsből
KC4	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> F84b	99,55	32 GH	2 törzsből
NC1	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> F84b	100	32 GH	2 törzsből
NL1	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> F84b	99,77	32 GH	2 törzsből
NM1	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> F84b	99,61	32 GH	2 törzsből
ZC2	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> F84b	100	32 GH	2 törzsből
ZL2	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> F84b	100	32 GH	2 törzsből
EL1AT	<i>Geobacillus caldoxylosilyticus</i> NBRC107762	100	GH13,GH51	3 törzsből
EX1	<i>Geobacillus caldoxylosilyticus</i> NBRC107762	99,77	GH13,GH51	3 törzsből
KC2	<i>Geobacillus caldoxylosilyticus</i> NBRC107762	99,54	GH13,GH51	3 törzsből
KC3	<i>Geobacillus caldoxylosilyticus</i> NBRC107762	99,55	GH13,GH51	3 törzsből

KL4	<i>Geobacillus caldxylosilyticus</i> NBRC107762	99,87	GH13,GH51	3 törzsből
KLBKF	<i>Geobacillus caldxylosilyticus</i> NBRC107762	99,64	GH13,GH51	3 törzsből
KM2	<i>Geobacillus caldxylosilyticus</i> NBRC107762	99,88	GH13,GH51	3 törzsből
KM3	<i>Geobacillus caldxylosilyticus</i> NBRC107762	99,61	GH13,GH51	3 törzsből
KMCS	<i>Geobacillus caldxylosilyticus</i> NBRC107762	100	GH13,GH51	3 törzsből
KX1	<i>Geobacillus caldxylosilyticus</i> NBRC107762	99,77	GH13,GH51	3 törzsből
KL3	<i>Aeribacillus pallidus</i> DSM3670	99,17	nincs	1 törzsből
KL5	<i>Caldibacillus debilis</i> Tf	98,64	nincs	2 törzsből
LBX	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> NBRC12550	99,41	22 GH	11 törzsből
termofil (80 °C)				
EXIL2	<i>Thermus composti</i> K-39	99,75	nincs	nincs
EXIL3	<i>Thermus composti</i> K-39	99,77	nincs	nincs
ECEL1B	<i>Thermus composti</i> K-39	99,54	nincs	nincs
ECEL1	<i>Thermus composti</i> K-39	99,83	nincs	nincs

A szarvasmarha trágya komposztból az izolátumok összesen 13 fajhoz tartoztak (az összes mezofil, és a termofilek közül a 102, 342-4, 343-5/A jelzésű izolátumok), amelyek nagy része mezofil körülmények között növekedett. A CAZY adatbázisa alapján több tucat szénhidrát-aktív enzimmel, többek között glikozid hidrolázokkal rendelkeznek a *Cellulomonas flavigena*, *Jonesia denitrificans* és *Thermobifida* fajok. A *Bacillus oceanisediminis*, *Cellulosimicrobium funkei* fajokban egy-egy endoglükánázt, *Paenibacillus lautus* esetében három GH enzimet, vagy az azt kódoló gént igazolták. A szarvasmarha trágya komposztból származó mintákból 50-60 °C-on tenyésztendő izolátumok között, két különböző *Thermobifida* fajhoz tartozó baktériumok is azonosíthatóak voltak. Azoknál a fajknál ahol a teljes genom szekvencia nem ismert, illetve poliszacharid bontásra vonatkozó kísérletes eredményeket sem publikáltak még, természetesen további vizsgálatokat igényel annak eldöntése, hogy genomjuk esetlegesen milyen lignocellulóz bontó enzimeket kódoló géneket tartalmaz. Egy izolátum esetében a 16S rDNS alapú legmagasabb hasonlóság csak 93,3% volt a *Paenibacillus montaniterrae* fajjal, így ez a törzs új faj vagy új nemzetség tagja lehet. Ezzel a törzsel végzett további kísérleteket az 4.2. fejezet tartalmazza.

A nyárfanyesedék alapú komposzt mintákból 60-70 és 80 °C-on végeztem tenyésztést. Az izolátumok a 16S rRNS gén szekvenciák alapján tíz különböző

fajhoz tartoznak. A komposztok jellemző termofil mikrobái közül 60 és 70 °C-on, a *Bacillales* rendbe tartozó *Brevibacillus* és *Geobacillus*, illetve utóbbi nemzetségből kialakított más nemzetségek (*Aeribacillus* sp., *Caldibacillus* sp.) képviselőit sikerült izolálni. Genom projektek alapján a *Geobacillus stearothermophilus*, a *Geobacillus thermoleovorans* és a *Geobacillus thermodenitrificans* komoly lignocellulóz bontó potenciállal rendelkezik, míg a *Geobacillus caldxylosilyticus* és a *Brevibacillus thermoruber* kettő, illetve egy GH enzimet kódol. 80 °C-on csak a *Thermus composti* fajhoz sorolt izolátumok nőttek ki. Ennek a fajnak jelenleg nem ismert a genom szekvenciája vagy az esetleges lignocellulóz bontó enzimeit.

4.2. A K13 jelzésű törzs rendszertani vizsgálata

4.2.1. A K13-as törzs jellemzése

A törzs azonosítása a 16S rRNS dideoxinukleotid módszer szerinti bázissorrend meghatározással történt, ami alapján egyetlen ismert taxonhoz sem sorolható. Az EzTaxon adatbázisa szerint a legmagasabb szekvencia hasonlóságot a *Paenibacillus montaniterrae* MXC2-2^T 16S rRNS génjével mutatta (93,03 %). A K13-as törzs 16S rDNS fenti módszerrel kapott szekvenciája az NCBI GenBank adatbázisában a KP144783 számon található meg.

A K13 jelzésű izolátumot xilán tartalmú táptalajról izoláltam. A tisztító szélesztések után többféle (LB, nutrient, TSA, cellulóz és mannán tartalmú táptalajok) tápagon kísértem meg a törzs tenyésztését, de ez csak a 3.1.1 fejezetben leírt xilán tartalmú szilárd, illetve a folyékony TSB médiumokat alkalmazva sikerült. A morfológiai megfigyelésekhez 40 °C-on, xilán tartalmú tápagon végeztem a tenyésztést. A törzs generációs ideje viszonylag nagy, a leoltás után 2-3 nap elteltével tapasztalható növekedés. Szabad szemmel, illetve fénymikroszkóppal történő megfigyelések alapján a K13-as törzs változatos morfológiájú, állagát tekintve krémszerű, lapos, 1-2 mm átmérőjű, halvány barnás árnyalatú, sötétebb szélű telepeket képez (1. kép). A sejtek Gram pozitív festődésűek, spóráképzést nem sikerült megfigyelni, de a teljes genom szekvencia adatai alapján kódol ehhez szükséges géneket.



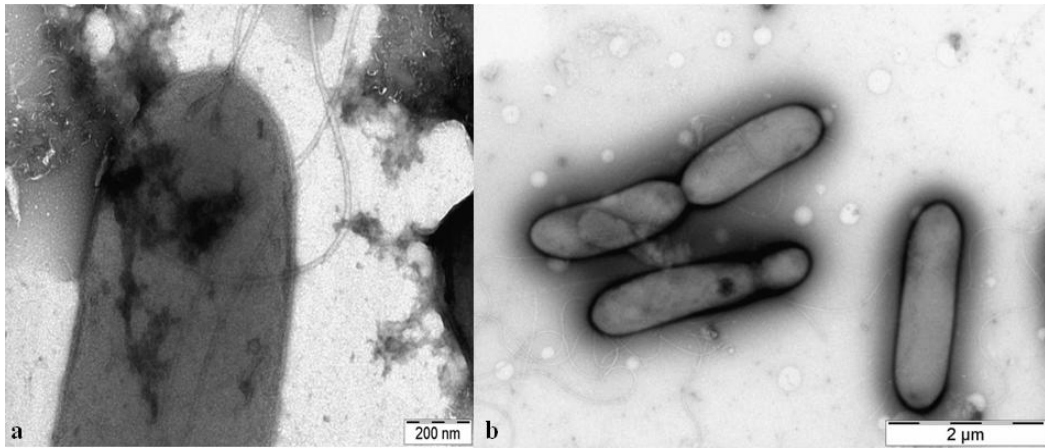
1. kép A K13 jelzésű törzs változatos morfológiájú telepeket képez a xilán tartalmú tápagaron

A telepek megjelenését követően, azok körül egyre határozottabban megjelenő hidrolízis zóna látható, ami jól jelzi a törzs xilánáz aktivitását (2. kép).



2. kép Xilán tartalmú tápagaron a K13-as törzs telepei körül megjelenő hidrolízis zóna a törzs xilánáz aktivitását jelzi

Az elektronmikroszkópos felvételek alapján a sejtek 2-3 μm hosszúak és 0,5-0,8 μm szélesek, pálcika alakúak és két poláris flagellummal rendelkeznek (3a és b kép).

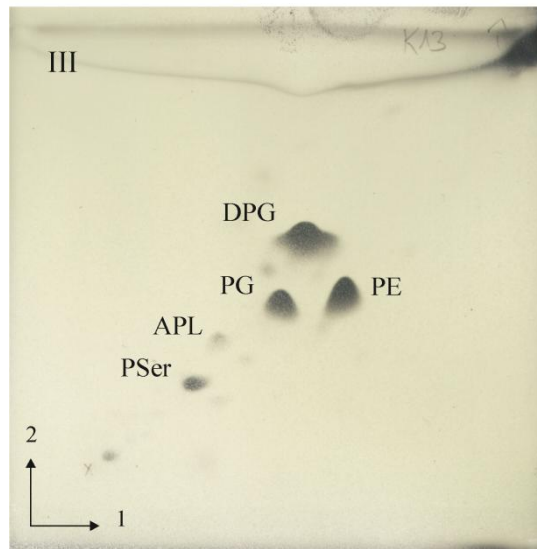


3a és b kép A K13-as törzs sejtjeiről készült elektronmikroszkópos felvételek. A pálcika alakú sejtek 2-3 μm hosszúak és 0,5-0,8 μm szélesek (b), poláris flagellumokkal rendelkeznek (a).

Fiziológiai paramétereit tekintve a K13-as törzs aerob, semleges és lúgos pH tartományban erőteljesen növekedik, optimuma pH 9. Hőmérsékleti optimuma (40-45 °C) szerint mezofil szervezet, amely 2-4%-os sókoncentráció mellett képes növekedni. Az anyagcsere tulajdonságait illetően API20NE teszt alapján képes az eszkulin és a zselatin hidrolízisére, valamint β -galaktozidáz aktivitással is rendelkezik. Az API50CH teszt (amely 49 különböző szénhidrátból történő savképzést vizsgál) eredménye teljesen negatív volt, de feltehetően ez inkább csak azt jelenti, hogy a tenyészet a tesztkörülmények között nem képes az egyes szubsztrátok metabolizmusára. A gyorsdiagnosztikai teszt szerint a K13-as törzs nem hasznosítja például a D-ribóz molekulákat sem, ami ellentmond a xilán tartalmú táptalajon történt tenyésztéskor tapasztaltaknak (2. kép). A többször, különböző sejt koncentrációval elvégzett API tesztek negatív eredményeit fenntartásokkal kell kezelni, a rokon törzsekkel végzett hasonló vizsgálatok eredményeivel történő összehasonlítás értelmetlennek látszik. Ezek a fenotípust jellemző adatok, bár nem perdöntőek a fajleírásnál, de az identifikációhoz és a törzsek közötti differenciáláshoz hasznosak, illetve szükségesek lehetnek.

A kemotaxonomiai vizsgálatok közül a sejtmembrán poláris lipid és zsírsav összetételét, a légzési kinonok analízisét és sejtfal peptidoglikán összetételét végezték el a DSMZ laboratóriumaiban, az általam biztosított biomasszából. A poláris lipidek analízise új nemzetség leírásakor kötelező, közülük a K13-as törzsből kimutatható volt (csökkenő mennyiségi sorrendben): a DPG-

difoszfadilglicerol, PE-foszfadiletanolamin, PG-foszfadilglicerol, a PSer-foszfadilszerin és az APL-aminofoszfolid (4. kép).



4. kép A K13-as törzs poláris lipid összetétele. A domináns foszfolipidek a difoszfadilglicerol (DPG), a foszfadiletanolamin (PE) és a foszfadilglicerol (PG), valamint kimutatható volt a foszfadilszerin (PSer), és az aminofoszfolid (APL) is

Sejtfal szerkezetére jellemző a mezo-diaminopimelinsav (mezo-Dpm) tartalom, ami az A1 γ (A31) *Bacillus* nemzetségre is jellemző sejtfalstruktúrára utal. A légzési kinonok vizsgálata szerint a fő légzési kinon a rokon nemzetségekhez hasonlóan a menakinon-7 (MK-7), de kimutatható volt még az MK-8 és MK-6 is, ezek aránya 92:4:3. A zsírsav analízist az új nemzetség leírás követelményeinek megfelelően két rokon nemzetség típusfajával is elvégeztük. A két rokon törzs a *Paenibacillus polymyxa* DSM 36^T és a *Fontibacillus aquaticus* DSM 17643^T volt. A domináns zsírsavak a K13-as törzsnél az anteiso C_{15:0} (34,44%), iso C_{16:0} (17,28%) és a C_{16:0} (9,96%). A másik két törzsnél szintén az anteiso C_{15:0} a főkomponens, és a *P. polymyxa* esetében a második legnagyobb komponens is egyezik a K13 törzsnél tapasztaltakkal, azonban a *F. aquaticus*-nál eltérőbb zsírsavösszetételt látunk. (3a és b táblázat). A K13-as törzs DNS állományának guanin-citozin aránya a genom szekvenálás eredménye alapján 52,25%.

3a táblázat A K13, *Paenibacillus polymyxa* DSM 36, *Fontibacillus aquaticus* DSM 17643, *Paenibacillus selenitireducens* ES3-24 (Yao et al., 2014) törzsek zsírsav összetétele

Zsírsav komponensek	K13	<i>Paenibacillus polymyxa</i> DSM 36 ^T (párhuzamos mérés)	<i>Fontibacillus aquaticus</i> DSM 17643 ^T (párhuzamos mérés)	<i>Paenibacillus selenitireducens</i> ES3-24 ^T (irodalmi adat, 5%<)
C _{10:0}	0,92		0,15	
C _{12:0}	0,63		0,36	
iso C _{14:0}	1,91	1,22	1,01	
C _{14:0}	1,51	0,55	2,65	
iso C _{15:0}	9,81	4,05	6,36	
anteiso C _{15:0}	34,44	46,06	35,54	55,5
C _{15:0}	2,65	0,81	0,83	
C _{16:1} w7c alkohol	0,5			
iso C _{16:0}	17,28	16,38	7,01	9,2
C _{16:1} w11c	1,93			
C _{16:0}	9,96	6,82	31,71	13,4
iso C _{17:0}	7,8	4,81	6,19	
anteiso C _{17:0}	9,54	17,83	7,71	8,5
C _{17:0}	1,12	0,33	0,48	
iso C _{17:1}				
anteiso C _{17:1}				
C _{17:1} w6c		0,35		
iso C _{18:0}		0,53		
C _{18:0}		0,25		

3b táblázat A *Cohnella thermotolerans* CCUG 47242 (Kämpfer et al., 2006), *Cohnella hongkongensis* HKU3 (Kämpfer et al., 2006), *Cohnella fontinalis* YT-1101 (Shiratori et al., 2010), és a *Bacillus subtilis* (Kämpfer, 2008) zsírsav összetétele

Zsírsav komponensek	<i>Cohnella thermotolerans</i> CCUG 47242 ^T (irodalmi adat, 5%<)	<i>Cohnella hongkongensis</i> HKU3 ^T (irodalmi adat, 5%<)	<i>Cohnella fontinalis</i> YT-1101 ^T (irodalmi adat, 5%<)	<i>Bacillus subtilis</i> (irodalmi adat, 5%<)
C _{10:0}				
C _{12:0}				
iso C _{14:0}				
C _{14:0}				
iso C _{15:0}		8,1	14,3	27
anteiso C _{15:0}	28,4	31,2	33,2	39
C _{15:0}		8		
C _{16:1} w7c alkohol				
iso C _{16:0}	45,5	11,9	20,6	
C _{16:1} w11c				
C _{16:0}	6,6	25,3	12,5	
iso C _{17:0}				8
anteiso C _{17:0}	6,7			
C _{17:0}				
iso C _{17:1}				
anteiso C _{17:1}				10
C _{17:1} w6c				
iso C _{18:0}				
C _{18:0}				

4.2.2. A K13-as törzssel rokon nemzetségek jellemzése

A *Paenibacillus* nemzetség tagjaira jellemző a pálcika alak és a Gram pozitív sejtfal, amely a Gram festés során esetenként negatív eredményt mutat. A sejtek nem pigmentáltak, peritrich flagellumokkal mozognak, endospórákat képeznek és fakultatív anaerobok vagy szigorúan aerobok. Nagy többségében kataláz pozitívak, de az oxidáz teszt változatos eredményt mutat a nemzetség egyes tagjainál. A Voges-Proskauer reakció (acetil-metil-karbinol termelés), az indol termelés és a nitrát redukálás változatos képet mutat a nemzetségen belül. Hidrogén szulfidot nem termelnek, ureáz aktivitás előfordul egyes fajoknál. Bizonyos cukrokból (glükóz és ritkán cellobióz, galaktóz, raffinóz, szalicin) előfordul sav és gázképzés,

orto-nitrofenil- β -galaktozidot (ONPG) hidrolizálnak, arginin dihidroláz negatívak és citrátot nem hasznosítanak. 10%-os NaCl-ban nem mutatnak növekedést. Sok tagjuk képes extracelluláris enzimekkel makromolekulákat (karboximetil-cellulóz, keményítő, DNS, fehérjék) bontani. Sejtfalukra jellemző diaminosav a mezo-Dpm, domináns légzési kinonjuk az MK-7. Sejtmembránjuk zsírsav arányai a következő tartományokban találhatóak: anteiso C_{15:0} (36–80 %), iso C_{15:0} (1–12 %) anteiso C_{17:0} (6,7 %), iso C_{16:0} (0,5–6 %). DNS állományuk G+C tartalma 40-54%. A nemzetség legtöbb tagját bomló növényi anyagokról izolálták, típusfaja a *P. polymixa* (Shida et al., 1997, Ash et al., 1993, Kämpfer, 2008).

A *Fontibacillus* nemzetség tagjai fakultatív anaerob, spóráképző, pálcika alakú, Gram pozitív festődésű szervezetek. Ellipszoid endospóráik terminális vagy subterminális helyzetűek. Domináns légzési kinonjuk az MK-7, jellemző poláris lipidjeik pedig a difoszfátidilglicerol, foszfátidiletanolamin, foszfátidilglicerol, valamint kisebb mennyiségben jellemző az aminofoszfoglikolipid, aminofoszfolipid és egy ismeretlen szerkezetű lipid. Fő zsírsavak a nemzetség tagjainál az anteiso C_{15:0}, C_{16:0}, iso C_{17:0} és az anteiso C_{17:0}, de jelen van a C_{14:0}, iso C_{15:0} és az iso C_{16:0} is. A genus típus faja a *Fontibacillus aquaticus* (Saha et al., 2010).

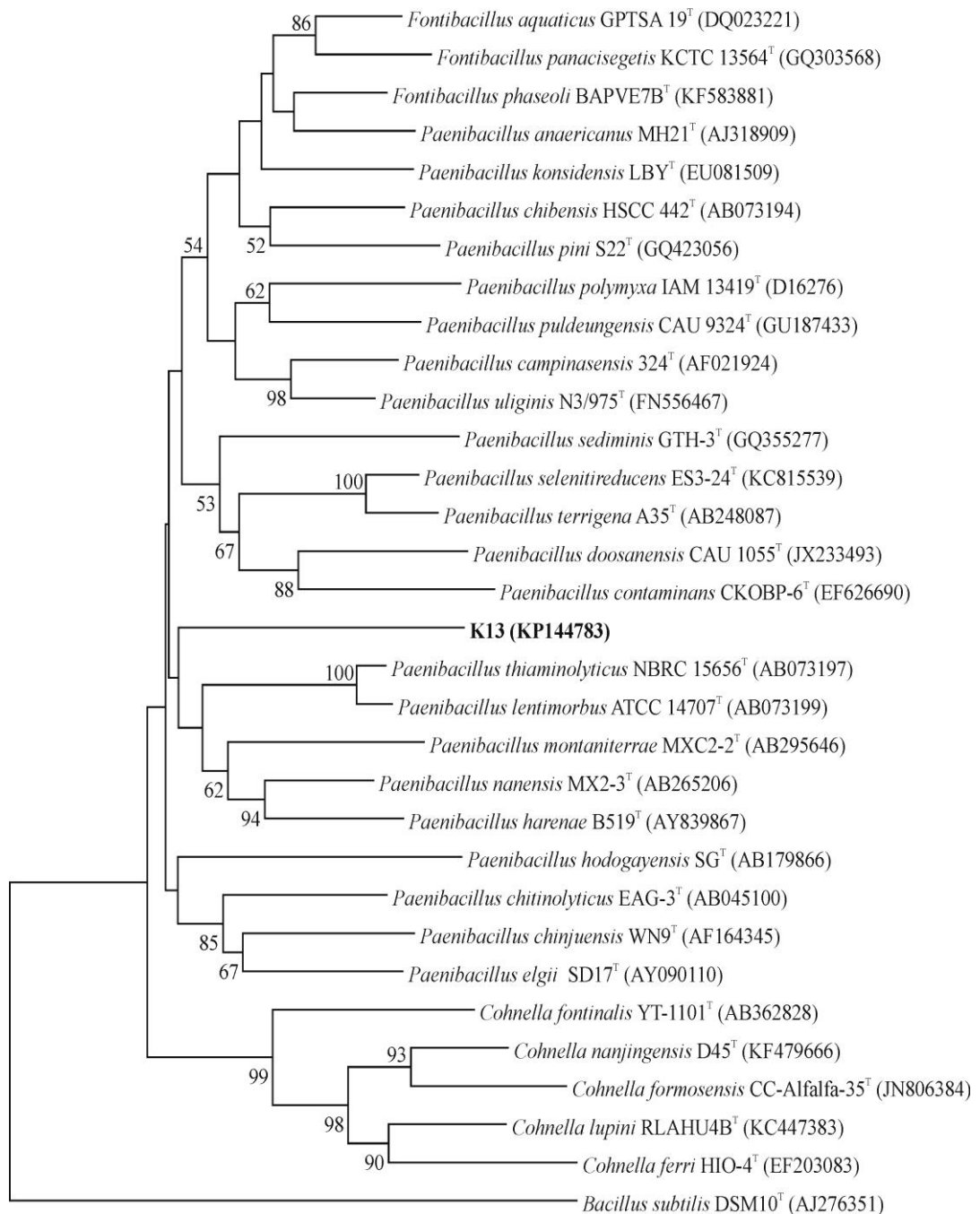
A *Cohnella* genus a nemzetség 2006-os leírása alapján Gram-pozitív, spóráképző, aerob, mozgásra nem képes és termotoleráns fajokból áll, jól tenyészthetőek 25-55 °C-on is. Kemotaxonómiai jegyeiket tekintve a fő légzési kinon az MK-7. Poláris lipidjeik elsősorban a difoszfátidilglicerol, foszfátidiletanolamin, foszfátidilglicerol és a lizil-foszfátidilglicerol, de kisebb arányban jelen van két ismeretlen foszfolipid és négy ismeretlen aminofoszfolipid is. Legjelentősebb zsírsavaik az iso C_{16:0}, anteiso C_{15:0} és a C_{16:0}. Típus faj a *Cohnella thermotolerans* (Kämpfer et al., 2006).

4.2.3. A K13-as törzs rendszertani besorolása

A 16S rDNS szekvenciák alapján, neighbor joining módszerrel készült fa szerint a K13 jelzésű törzs legközelebbi rokonai a *Paenibacillus*, *Fontibacillus* és a *Cohnella* nemzetség tagjai (4. ábra).

A K13-as törzs rendszertani besorolásakor Logan és mtsai. (2009), illetve Tindall és mtsai. (2010) átfogó munkáit vettem figyelembe, amelyekben leírják a prokarióták taxonómiájának trendjeit és ajánlott minimális követelményeit. Új faj leírásakor a gyakorlatban is jól alkalmazható 97%-os 16S rDNS szekvencia hasonlóság, mint határvonal széleskörűen elfogadott és számos tanulmányban

részletesen tárgyalt. Más taxonómiai kategóriák, például nemzetségek esetében nem alakult ki hasonló konszenzus, de a 95%-os hasonlósági arányt tartják iránymutatónak (Tindall et al., 2010). Ez a 95%-os 16S rDNS szekvencia egyezés bár ésszerűnek tűnik, azonban a gyakorlatban esetenként nehézkes az alkalmazása. Új nemzetség leírásakor ezért a kisebb mértékű (<95%) 16S rDNS hasonlóság esetén meg kell próbálni más közeli nemzetségektől való megkülönböztető jegyeket találni. Ilyen megkülönböztető jegyek elsősorban kemotaxonómiai bélyegek lehetnek, amelyek segítségével igazolható, hogy a viszonylag alacsony 16S rDNS szekvencia hasonlóságnak evolúciós okai vannak (Yarza et al., 2008).



4. ábra A K13 törzs elhelyezkedése a törzsfán. A törzs legközelebbi rokonai a *Paenibacillus*, *Fontibacillus* és a *Cohnella* nemzetség tagjai. A törzsfá neighbor joining módszerrel készült.

A *Bacilli* osztály nemzetségein belül meglehetősen nagy a kémiai változatosság, ami alapján a kemotaxonómiai jegyeket jól lehet alkalmazni a taxonon belül (Minnikin és Goodfellow, 1981, O’Leary és Wilkinson, 1988). A légzési kinonok közül az MK-7 dominál, és a zsírsav összetétel alapján való rendszerezésnek is vannak korlátai, elsősorban a szigorú standardizálás szükségessége és az ebből

adódó nehézségek miatt. A taxonómiai munkákban az utóbbi időben egyre nagyobb hangsúlyt fektetnek a sejtmembrán poláris lipid összetételére (Kämpfer et al., 2006, Mayr et al., 2006, Albert et al., 2007, Logan et al., 2009).

A K13-as törzs törzsfán elfoglalt pozíciója alapján legközelebbi rokonságban a *Paenibacillus* nemzetséggel van. A nemzetség *Bacillus* genus-tól való megkülönböztetését Ash és mtsai. (1993) javasolták 16S rRNS gén szekvencia adatokra támaszkodva, végül új nemzetséggé Shida és mtsai. (1997) írták le. A *Bacillaceae* és a *Paenibacillaceae* családokon belüli nemzetségek esetében a poláris lipidek vizsgálata kiemelkedően fontos (Logan et al., 2009), ezt hangsúlyozza a K13-as törzssel aránylag közeli rokonságban lévő *Cohnella* nemzetséget megalapító munka is (Kämpfer et al., 2006).

A *Cohnella* nemzetség megalapítását a típus faj (*Cohnella thermotolerans*) legközelebbi, *Paenibacillus* nemzetséghez tartozó rokon fajjal való 94,4%-os 16S rDNS szekvencia hasonlóság mellett főleg a poláris lipidek összetétele támogatta. Főként a lizil-foszfátidilglicerol (LPG) és az ismeretlen aminofoszfolipidek (APL) mintázata adta az egyedi poláris lipid profilt. A 16S rDNS szekvenciákon alapuló filogenetikai fák sokszor bizonyulnak perdöntőnek a rendszertani pozíció megítélésakor. A *C. fontinalis* például annak ellenére került a *Cohnella* genusba, hogy a legközelebbi rokonnal való 16S rDNS bázissorrend hasonlóság kevesebb, mint 94% és nincs a poláris lipidek között az LPG. A *P. selenitireducens* poláris lipid profilja nem tartalmazza a foszfátidilglicerolt, ami jellemző a *Paenibacillus*, *Cohnella* és *Fontibacillus* nemzetségre is, azonban 16S rDNS alapon egyértelműen a *Paenibacillus* nemzetséghez tartozik. A *Fontibacillus aquaticus* 95%-nál magasabb (96%) hasonlóságot mutatott a *Paenibacillus motobuensis* fajjal, de sok tagból álló poláris lipid profilja, amelyben különösen magas az ismeretlen foszfolipidek száma (4a és b táblázat), más jellegzetességekkel együtt alátámasztotta az új nemzetség létrehozását. A K13-as törzs, a *Fontibacillus*, a *Cohnella* és a *Paenibacillus* nemzetségek zsírsav összetétele nagyjából hasonló, és elkülönül a *Bacillus subtilis* profiljától, előbbiekre jellemzőek az iso C_{15:0}, anteiso C_{15:0}, iso C_{16:0}, anteiso C_{17:0}, valamint a C_{16:0} szerkezetű zsírsavak (3a és b táblázat).

4a táblázat A K13, *Paenibacillus polymixa* DSM 36^T, *Paenibacillus selenitireducens* ES3-24^T, *Fontibacillus aquaticus* DSM 17643^T törzsek poláris lipid összetétele (Yao et al., 2014, Saha et al., 2010, Kämpfer et al., 2006)

	K13	<i>P. polymixa</i> DSM 36 ^T	<i>Paenibacillus selenitireducens</i> ES3-24 ^T	<i>Fontibacillus aquaticus</i> DSM 17643 ^T
difoszfatidilglicerol (DPG)	+	+	+	+
foszfatidiletanolamin (PE)	+	+	+	+
foszfatidilglicerol (PG)	+	+		+
foszfatidilszerin (PSer)	+			
ismeretlen aminofoszfolipid (APL)	+		2	1
ismeretlen foszfolipidek (PL)		3		6
lizil-foszfatidilglicerol (LPG)				
ismeretlen foszfoglikolipid				
ismeretlen glikolipidek		1		3
ismeretlen aminolipid				2
aminofoszfoglikolipid				1
ismeretlen lipid				3

4b táblázat A *Cohnella thermotolerans* CCUG 47242^T, *Cohnella hongkongensis* HKU3^T, *Cohnella fontinalis* YT-1101^T, *Bacillus subtilis* törzsek poláris lipid összetétele (Kämpfer et al., 2006, Shiratori et al., 2010)

	<i>Cohnella thermotolerans</i> CCUG 47242 ^T	<i>Cohnella hongkongensis</i> HKU3 ^T	<i>Cohnella fontinalis</i> YT-1101 ^T	<i>Bacillus subtilis</i>
difoszfatidilglicerol (DPG)	+	+	+	+
foszfatidiletanolamin (PE)	+	+	+	+
foszfatidilglicerol (PG)	+	+	+	+
foszfatidilszerin (PSer)				
ismeretlen aminofoszfolipid (APL)	3	3	2	1
ismeretlen foszfolipidek (PL)	1	2	1	
lizil-foszfatidilglicerol (LPG)	+	+		
ismeretlen foszfoglikolipid				
ismeretlen glikolipidek				1
ismeretlen aminolipid				
aminofoszfoglikolipid				
ismeretlen lipid				

A fentiekből következik, hogy a K13 a *Paenibacillus*, *Fontibacillus* és a *Cohnella* nemzetségekkel rokon, rendszertani besorolása család szintig a következő:

Domén: *Bacteria*

Törzs: *Firmicutes*

Osztály: *Bacilli*

Rend: *Bacillales*

Család: *Paenibacillaceae*

4.3. Genom analízisek eredményei

Az új generációs szekvenáló (NGS-Next Generation Sequencing) módszerek elterjedésével rendkívüli mértékben megugrott a publikált prokarióta genomok száma. A technológia fejlődésével és elterjedésével az elkészült komplett és draft (részleges adatokkal szolgáló) genomok aránya eltávolodott egymástól, hiszen utóbbiak száma sokkal nagyobb ütemben emelkedett (Barbosa et al., 2014). A genom által kódolt információk birtokában, hatékonyabban fel lehet térképezni az egyes mikroorganizmusok metabolikus képességeit. A draft genom szekvenciák alapján történő mélyebb genetikai elemzésnek vannak korlátai, valós fizikai térkép nem készíthető, de cél gének vagy gén csoportok keresésére az ilyen projektek tökéletesen alkalmasak. Munkám során a teljes genom szekvenálásokkal komposztlakó baktériumok génekben kódolt lignocellulóz bontó potenciáljának feltárása volt az elsődleges célom. A K13-as törzs és a három *Thermobifida* faj (*T. fusca*, *T. cellulosilytica*, *T. halotolerans*) annotált draft genomja lehetőséget adott cellulóz, xilán és mannán bontó enzimek keresésére, amelyek később a heterológ expressziót követően tovább vizsgálatok célpontjává váltak és válhatnak.

T. fusca TM51 lótrágya alapú komposzt meleg régiójából származó izolátum, 70 °C-on is képes a növekedésre. Cellulóz (MN300) tartalmú táptalajon növesztve szemmel látható fehér színű spóratömeget képez. A TM51 törzs nem csak cellulózbontásra képes, hanem a hemicellulóz frakciót is képes hidrolizálni (Kukolya et al., 1997). Az utóbbi évtizedekben több *T. fusca* TM51 eredetű GH enzimként klónoztak, és írták le az általuk kódolt katalitikus fehérjéket, ezek pontosan egy endoglükánáz (Cel5B), egy β -mannozidáz (Man2A) és egy endoxilánáz (Xyl43A) voltak (Posta et al., 2004, Béki et al., 2003, Fekete és Kiss, 2012). A genom összeszereléséhez referenciaként a *T. fusca* YX törzs genomját használtuk (Lykidis et al., 2007). A szekvenálás eredményeképpen kapott

6,352,623 mate-paired readet 88 kontigba sikerült összerendezni, ami több mint nyolcvanszoros lefedettséget biztosított. A *T. fusca* TM51 genomja 3 599 272 bázispárt, 3080 feltételezhetően fehérje gént, 52 tRNS-t és 12 rRNS-t kódoló szekvenciát tartalmaz. A törzs GH génkészlete megegyezik a *T. fusca* YX GH génkészletével, összesen 39 glikozid hidrolázt tartalmaz, amelyek 23 különböző GH családba tartoznak. Legnagyobb arányban a GH13 családba tartozó keményítő és dextrán bontó enzimei vannak jelen a genomban. A két publikált *T. fusca* teljes DNS szekvencia alapján a TM51 és az YX törzs genomja között 99,85% a hasonlóság. A két törzs lignocellulóz bontásban szerepet játszó glikozid hidroláz génjeit összehasonlítva (5. táblázat) 27 SNP-t (single nucleotide polymorphism) és 13 aminosav cserét tártam fel, amelyek okai lehetnek egyes enzimek tulajdonságai között adódó esetleges különbségeknek (Tóth et al., 2013). A teljes genom szekvencia elérhető az NZ_AOSG00000000.1 génbanki számon (NCBI).

5. táblázat A *T. fusca* TM51, *T. cellulosilytica* TB100^T, *T. halotolerans* JCM16012^T, K13 törzsek lignocellulóz bontásban résztvevő GH enzim génjei az elkészült genom projektek alapján.

Cellulóz bontó gének	<i>T. fusca</i> TM51	<i>T. cellulosilytica</i> TB100 ^T	<i>T. halotolerans</i> JCM16012 ^T	K13
GH1	2	2	2	
GH3	1	1	3	
GH5	2	2	2	5
GH6	2	2	1	
GH9	2	2	1	2
GH44				1
GH48	1	1	1	1
Xilán bontó gének				
GH3				1
GH8				1
GH10	2	2	2	3
GH11	1	1	1	2
GH31				1
GH39				1
GH43	1	1	1	3
GH52				1
GH67				1
GH74	1	1	1	
GH81				1
Mannán bontó gének				
GH2	1	1	1	
GH5	1	1	1	1
GH26				1

A *Thermobifida* nemzetségből leírt GH enzimek elsősorban *T. fusca* eredetűek, pedig az ide tartozó többi fajnak, így a *T. cellulosilytica*-nak is bizonyítottan jó lignocellulóz bontó képessége van (Kukolya et al., 1997, Kukolya et al., 2002). A jelentős alapkutatói és ipari potenciál ellenére a faj hidrolázai közül csupán egy kutináz enzim leírásával és modifikációjával kapcsolatos folyóirat cikk jelent meg (Herrero Acero et al., 2013). A valós potenciál feltérképezését nagyban megkönnyíti a genom szekvencia ismerete. A projekt által kapott eredmények alapján a genom 4 327 869 bázispárból áll. A 168 kialakított kontigot összesen 19 nagyobb egységbe (scaffold) sikerült rendezni, ezek alapján a genom 3589 feltételezhető kódoló szekvencia részt, és 53 tRNS valamint 4 rRNS kódját tartalmazza. A *T. fusca*-hoz képest kevesebb, de jelentős számú (27) hidroláz feltételezhető az annotáció alapján, amelyek 14 különböző GH családba tartoznak. Csak a cellulóz, xilán és mannán bontásban résztvevő hidroláz enzimek kódolásáért felelős gének tekintetében a *T. cellulosilytica* és a *T. fusca* génkészlete megegyezik (5. táblázat). A projekt adatai megtalálhatóak a következő génbanki számon (NCBI): KQ950180.1.

A harmadik *Thermobifida* faj, amelynek elkészült a draft genom projektje, a *T. halotolerans* volt. Ez a faj az egyetlen a négy eddig leírt *Thermobifida* faj között, amelyiket nem komposztból származó törzsként írtak le. A *T. halotolerans* JCM16012^T törzset egy kínai sóbányában izolálták. Különösen érdekes volt emiatt, hogy ez a szervezet rendelkezik-e a komposzt eredetű *Thermobifida* fajokéhoz hasonló glikozid hidroláz enzimmészlettel. A projekt alapján a genom 4 123 689 bázispárból áll, amely összesen 3227 feltételezett fehérjét kódol. A nagyobb genom ellenére a *T. halotolerans* kevesebb növényi biomassza bontásában potenciálisan szerepet játszó glikozid hidroláz enzimet kódol, mint a *T. fusca*. A lignocellulóz bontásban szerepet játszó enzimesoportok közül a xilán és a mannán hidrolízisét végző enzim gének is megtalálhatóak a *T. halotolerans* genomjában. Celluláz enzimekből azonban a *T. fusca* és a *T. cellulosilytica* hét darab cellulolítikus fehérjéjével szemben az annotált genom alapján ennél a törzsnél csak ötöt sikerült azonosítani (5. táblázat). A *T. halotolerans* fajból eddig három celluláz enzimet és egy GH11-es endoxilánázt jellemeztek (Zhang et al., 2015, Yin et al., 2015, Zhang et al., 2012, Zhang et al., 2011), de a genom szekvencia ismeretében újabb enzimek leírása várható. A komposzt eredetű *Thermobifida* fajok genomjaival való összehasonlítással, illetve a glikozid hidrolázok részletes jellemzésével fel lehetne

tárni azokat a különbségeket, amelyek az eltérő környezethez történő alkalmazkodás során genetikai és fehérje szinten is megjelentek.

A három *Thermobifida* faj lignocellulóz bontásban szerepet játszó, glikozid hidrolázokat kódoló génjeit összehasonlítva láthatjuk, hogy a *T. fusca* és a *T. cellulosilytica* teljesen azonos lignocellulóz bontó GH enzimmészettel rendelkezik. A *T. halotolerans* esetében, az eltérő élettér ellenére is csak kis eltérés mutatkozik a másik két *Thermobifida* fajhoz képest. Ez a GH3-as β -glükozidázok nagyobb számában, illetve egy-egy GH9-es és GH6-os celluláz gén hiányában mutatkozik meg. A vizsgált három *Thermobifida* faj homológ hidroláz génjei által kódolt enzimek között az aminosav szekvencia hasonlóság általában 80% körüli, amely már jelentős eltérést jelenthet egyes biokémiai tulajdonságokat tekintve.

A *Thermobifida* fajok genom projektjei mellett a szintén komposzt eredetű K13 törzs teljes genom szekvenálását is elvégeztük. A 26 kontigba összerendezett, és 4 251 364 bázispárból álló genom összesen 3937 feltételezett fehérjét kódol, amelyek között számos GH családba tartozó enzimgént is sikerült azonosítanom. Az annotáció és a manuális adatelemzés során 33 GH enzim génjét találtam meg a genomban, amelyek 21 különböző családba tartoznak. Legnagyobb számban a GH5-ös család tagjai képviseltetik magukat, amely csoportba celluláz, xilanáz, mannanáz, cellobiozidáz, glükozidáz és mannozidáz aktivitású katalitikus fehérjék is tartoznak (5. táblázat). A tenyésztések során tapasztalható hatékony xilán bontó képességet biztosító xilanáz géneket is nagy számban sikerült azonosítani. A katalitikus és szénhidrátkötő domének alkotta moduláris enzimek rendkívül változatos struktúrát mutatnak. A K13-as törzs sokféle cellulózkötő domén mellett kadherin, immunglobulin-szerű domén és fibronektin részeket hordozó enzimek termelésére is képes, valamint érdekes az SHL (surface layer homology) domént tartalmazó cellulázok, xilanázok és mannanázok megjelenése. Ezek a változatos modulok szerepet játszhatnak a különböző poliszacharidok megkötésében, így hatékonyabbá téve a lignocellulóz bontását. Ezen feltételezések igazolásához az egyes enzimeket kódoló gének klónozására és a fehérjék expresszióját követően azok részletes karakterizálásra lenne szükség.

A K13 hidroláz génjeit összesítve feltűnő a rendkívül nagyszámú (15) és sokféle GH csoportba tartozó (10) xilán bontásában potenciálisan szerepet játszó enzim gén. Ezek a genom adatok összhangban vannak a törzs tenyésztésekor tapasztalt hatékony xilanáz aktivitással. Érdekes a GH26-os mannan bontó hidroláz gén jelenléte, amely elsősorban gombákra jellemző. A *Bacteria* doménen belül szintén

ritka (100 gén alatti) GH44, GH52 és GH81 család egy-egy képviselőjét is megtalálhatjuk a törzs lignocellulóz bontásban részt vevő génjei között. A genom annotációja alapján a törzs nem kódol β -glükozidáz enzimet, azonban a nagyszámú GH5-ös gén, illetve a GH9-es gének között lehetnek ilyen aktivitású hidrolázokat kódoló szekvenciák (5. táblázat). Sajnos a szoftveres annotáció és a manuális adatbázis keresések se feltétlenül tárják fel specifikusan a valós aktivitásokat, mindenesetre a CAZY adatbázisa alapján a fenti két családba sorolt enzimek között találhatunk glükozidáz aktivitású hidrolázokat is.

4.4. Három *Thermobifida* faj endomannanázának vizsgálata

A hemicellulóz frakció a növényi sejtfalban különböző összetételű xilán és mannán polimerekből áll, továbbá a pillangós virágúak magvaiban nagy mennyiségű mannán található, amely tartalék tápanyagként van jelen. Ezeket a nyersanyagforrásokat kihasználó biotechnológiai alkalmazásokban játszhatnának fontos szerepet az ipari körülmények között is jól működő enzimek, továbbá a növényi biomassza cellulóz frakciójának enzimes kinyerése is hemicellulázokkal együtt érhető el hatékonyan. A *Thermobifida* nemzetség tagjainak enzimeit, elsősorban magas hőstabilitásuk miatt, jelentős ipari potenciállal rendelkeznek. Az eddig született tanulmányok azonban főként a *T. fusca* celluláz enzimszisztémájára koncentrálnak, pedig a többi faj enzimeit, beleértve a hemicellulázokat is, hasonló potenciállal rendelkeznek. A homológ enzimek egyes tulajdonságaiban felmerülő különbségek hátterének feltárása hasznos információkkal szolgálhat esetleges fehérje mérnökségi munkákhoz.

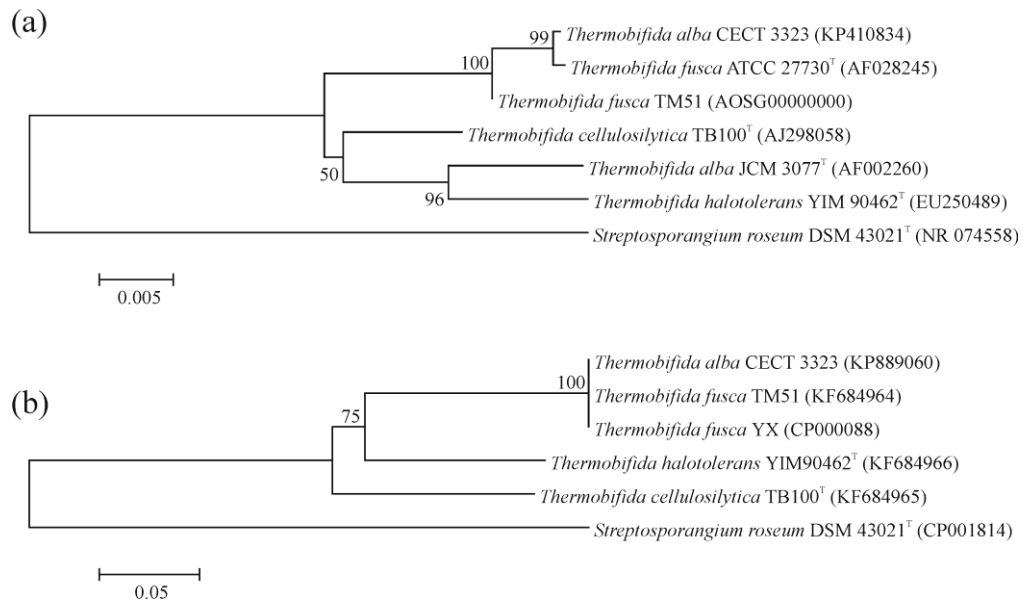
4.4.1. Az endomannanázok vizsgálatához kapcsolódó szekvenciák génbanki számai

A dolgozatban felhasznált és a szekvenálások, genom analízisek eredményeképpen kapott nukleotid és aminosav szekvenciákat a következő hivatkozási számokkal töltöttem fel, illetve találhatóak meg az NCBI adatbázisaiban: *man5ATf*: KF684964, *man5ATc*: KF684965, *man5ATh*: KF684966, *man5ATa*: KP889060. 16S rDNS szekvenciák: *T. alba* CECT3323: KP410834, *T. alba* JCM3077: AF002260, *T. cellulosilytica* TB100^T: NR_025438, *T. halotolerans* JCM16012^T: NR_044446, *T. fusca* ATCC27730^T: AF028245, *T. fusca* TM51: AOSG01000000. A három vizsgált endomannanáz aminosav szekvenciája a következő génbanki

számokon érhetőek el: Man5ATf: AHB89702, Man5ATc AHB89703 és Man5ATh AHB89704.

4.4.2. Az endomannanáz gének amplifikációja

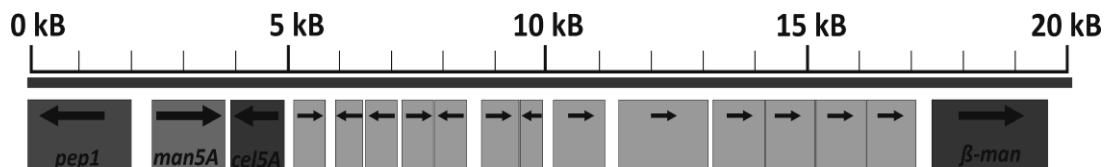
Munkám során a négy eddig leírt *Thermobifida* faj homológ endomannanáz enzimének jellemzését és összehasonlítását tűztem ki célul. Ehhez a törzsek beszerzése után, mivel a *T. alba* genom projektje még nem készült el, három genom szekvenálás (*T. fusca*, *T. cellulositytica* és *T. halotolerans* fajok genomjai) eredményét felhasználva három primer párt terveztem az endomannanáz gének amplifikációjához. A kényszerből született megoldás sikeresnek látszott, mert a *T. fusca* genom alapján tervezett primerekkel sikerült a spanyol CECT (Colección Española de Cultivos Tipo) törzsgyűjteményből vásárolt *T. alba* CECT3323 törzs (megegyezik a *T. alba* ULJB1 törzssel) endomannanázát (*man5ATa*) is amplifikálni. A szekvencia elemzés azonban váratlan eredményt hozott, miszerint a *T. fusca* TM51 eredetű endomannanáz (*man5ATf*), és a *T. alba* CECT3323 törzs endomannanáz génjének bázissorrendje teljes egyezést mutatott. A két törzs 16S rDNS szekvencián alapuló összehasonlítása is megerősítette, hogy a *T. alba* CECT3323 törzs valójában egy helytelenül identifikált *T. fusca* törzs. Törzsfát készítve a 16S rDNS szekvenciákból, és a *man5A* génekből jól látszik, hogy a törzs a *T. fusca* fajhoz tartozik (5. ábra). Ezen adatok tükrében az eddig leírt *T. alba* eredetű endoxilanáz (Blanco et al., 1997, Ahsan et al., 2001), valójában egy *T. fusca* hidroláz, így jelenleg nincs leírt enzim a *T. alba* fajból. A CECT3323-as törzset érintő első publikáció szerint, az identifikáció morfológiai bélyegek alapján történt, amelyek nem biztosítanak kellő differenciálási lehetőséget a *Thermobifida* fajok között (Blanco et al., 1997). Mivel a fenti eredmények alapján kénytelen voltam a *man5ATa* endomannanáz gént, és az általa kódolt Man5ATa fehérjét kizárni a további vizsgálataimból, csak három *Thermobifida* faj endomannanázára vonatkoznak a további eredményeim.



5. ábra a: A *T. alba* CECT3323 és a *T. fusca* TM51, valamint a nemzetség típus törzseinek 16S rDNS alapon készült filogenetikai fája. b: A *T. fusca* TM51, *T. halotolerans* YIM90462^T (megegyezik a JCM16012^T törzsszel), *T. alba* CECT3323 és a *T. cellulosilytica* TB100^T eredetű *Man5A* enzimek aminosav szekvencián alapuló filogenetikai kapcsolata. A *Streptosporangium roseum* DSM 43021^T mindkét fa esetében külső csoportként van feltüntetve. A két törzsfá alapján egyértelmű, hogy a *T. alba* CECT3323 jelzésű törzs valójában a *T. fusca* fajhoz tartozik.

4.4.3. A *Thermobifida* endomannanáz gén lokalizációja

A *man5A* gén lokalizációját teljes pontossággal csak a *T. fusca* TM51 esetében sikerült meghatározni (6. ábra), mert a másik két *Thermobifida* genom szekvenciában több töredék szekvencia nehezíti a vizsgálatot.



6. ábra A *man5A*Tf endomannanáz gén genomi lokalizációja. Az endomannanáz génhez közel helyezkedik el egy β -mannozidáz és egy endoglükánáz gén is.

Az ábrán látszik, hogy egymáshoz viszonylag közel (20 kilobázison belül) helyezkedik el az endomannanáz (*man5A*), egy endoglükánáz (*cel5A*) és egy β -mannozidáz (β *man*) gén, amelyek előtt még egy peptidáz (*pep1*) gént is találhatunk. Ez a genomi lokalizáció jól demonstrálja, hogy a hatékony lignocellulóz bontás

összetett folyamatához a megfelelő enzimek szabályozott együttműködésére van szükség, ezért az ezeket kódoló gének gyakran szigetszerűen helyezkednek el a genomban. A *T. cellulosilytica* endomannanáz génjének (*man5ATc*) elhelyezkedése szinte teljesen megegyezik a *man5ATf* lokalizációjával, annyi eltéréssel, hogy az endoklükanáz (*cel5A*) és a β -mannozidáz (β -man) között több gént vagy gén töredéket találni, illetve van egy gén töredék a peptidáz (*pep1*) és a *man5ATc* között is. Mivel a *T. halotolerans* genom esetében két kontigra esik a kérdéses szakasz, csak annyi állapítható meg, hogy az endomannanáz, a celluláz és a β -mannanáz hasonló lokalizációval bír, mint ami a 4. ábrán látható, azonban az ábrán jelölt peptidáz gén homológját egy másik kontigon sikerült megtalálnom.

4.4.4. Az endomannanázok (Man5ATf, Man5ATc és Man5ATh) *in silico* vizsgálata

Az extracelluláris fehérjékhez tartozó szignál szekvenciák meglétét és pontos helyét a SignalP szoftver segítségével a genom projektek alapján kapott aminosav szekvenciák alapján határoztam meg. Ezen szignál szekvenciák nélkül a gének és a fehérjék hossza a 6. táblázatban leírtaknak megfelelő.

6. táblázat A vizsgált endomannanáz gének és fehérjék hossza.

	Gén hossza (bp)		Fehérje hossza (AA)
<i>man5ATf</i>	1362	Man5ATf	425
<i>man5ATc</i>	1320	Man5ATc	424
<i>man5ATh</i>	1368	Man5ATh	423

Mindhárom mannanáz enzim moduláris felépítésű, az N terminálison katalitikus domént, míg a C terminálison CBM2-es szénhidrát kötő modult tartalmaz. A két domént egy körülbelül 20-25 aminosavból álló kapocs régió köti össze, amelyekben a következő ismétlődő szekvencia motívumok fedezhetőek fel: 3xTEEP-Man5ATf, 5xPTDP-Man5ATc és 6xDPGT-Man5ATh (7. ábra). Hasonló kapocs szekvencia meglétét leírták, és funkcióját vizsgálták már egy *T. fusca* eredetű endoglükánáz (Cel9A) esetében is (Wilson, 2004). Lao és Wilson (1996) egyik publikációjukban beszámolnak egy olyan proteáz enzimről, amely a Cel9A poszttranszlációs módosítását végzi, úgy hogy lehasítja a katalitikus doménról a szénhidrátkötő modult (Lao és Wilson, 1996). A hasítás eredményeként a CBM domén nélküli endoglükánáz enzim szubsztrát specifikusa megváltozott úgy, hogy nagyobb affinitást mutatott az oligoszacharidok felé. A jelenség hátterében az állhat, hogy

így a sejteknek kisebb enzim készlet kódolására van szüksége. A relatív kis méretű genommal rendelkező *Thermobifida* fajok a poliszacharid bontó enzimeik poszttranszlációs módosításával diverzifikálhatják és tehetik hatékonyabbá a lignocellulózt felépítő frakciók hidrolízisét. A különböző, de adott esetben azonos élőhelyeket elfoglaló fajokhoz tartozó homológ enzimek kapocs régióin belül megfigyelhető eltérő aminosav szekvencia motívumok biztosíthatják a poszttranszlációs modifikálás kontrolálhatóságát, amellyel kompetitív előnyhöz juthatnak a szén- és energiaforrásokért folytatott versenyben. További kutatásokkal meg lehetne találni az endomannanáz enzim poszttranszlációs proteolízisét végző fehérjét, amellyel közelebb juthatnánk a fenti elmélet igazolásához vagy elvetéséhez.

A három érett (szignál szekvencia nélküli) enzim aminosav szekvenciáját összehasonlítva meglehetősen magas hasonlósági arányt tapasztalhatunk (93-96%), míg a konkrét egyezés az enzimek között a következő: a Man5ATf és a Man5ATc között 79%, a Man5ATf és a Man5ATh között 81%, valamint a Man5ATc és a Man5ATh között 82% (7. ábra). Külön vizsgálva az enzim két modulját a GH5-ös katalitikus egység esetében a szekvencia egyezés 84-86%-os, míg a CBM2 szénhidrát kötő domének között ez valamivel alacsonyabb érték (74-83%). A legnagyobb variabilitást a kapocs régió mutatja, amelyben jellemzően prolin, threonin, aszparaginsav és glutaminsav tartalmú, jellegzetes repetitív motívumok találhatóak.

```

Man5ATc          MLLASVFVTAQPASAATGIHVRNGRIYEANGQEFVMRQVSHAH
Man5ATf          MRKRLAVAAATVLALLASVFALTQPANAATGLHVKNRGLYEANGQEFIIRGVSHPH
Man5ATh          MRKAMRKRLTVAAATILALLASVVFQAQANAATGFYVDNGRLYEAGGQEFVIRGVSHPH
                  ***** . :***.*****:* ***.*** *****:***** *

Man5ATc          TWYPQHTRAFADIKSHGANTVRVVLNSGVRWSKNGPSDVADIISLCKQNRLICMLEVHDT
Man5ATf          NWYPQHTQAFADIKSHGANTVRVVLNSGVRWSKNGPSDVANVISLCKQNRLICMLEVHDT
Man5ATh          AWYAQETDSFAGIKSHGANTVRVVLNSGVRWTKNDAADVANVISLCKQNRLICMLEVHDT
                  ** *.* :** *****:*** :***:*****

Man5ATc          TGYGEQSGAATLDQAVDYWIELKSVLQGEEDYVLINIGNEPYGNAATVANWASDTSAAI
Man5ATf          TGYGEQSGASTLDQAVDYWIELKSVLQGEEDYVLINIGNEPYGNSATVARWASDTSAAI
Man5ATh          TGYGEQSGASTLDQAVDYWIEIQSALEGQEDYVLINIGNEPYGNSATVADWASDTSAAI
                  *****:*****:.*.:.*****:**** *****

Man5ATc          RRLRAAGFEHAIIVDAPNWGDWSHTMRNAADVYASDPTGNTIFSIHMYGVYSQGSTVT
Man5ATf          QRLRAAGFEHTLVVDAPNWGDWTNTMRNADQVYASDPTGNTVFSIHMYGVYSQASTIT
Man5ATh          QRMRDAGFDHTLVVDAPNWGDWSHTMRDNAGSVYTS DPTGNTVFSIHMYGVYEQGSTVT
                  :*: * ***:.*:*****:*** * .**:******:*****.*.***:

Man5ATc          SYLEHFVNAGLPLVIGEFGHDHSDGNPDEDTIMAEERLGLGYIGWSWSGNGGGVEYLDM
Man5ATf          SYLEHFVNAGLPLIIGEFGHDHSDGNPDEDTIMAEERLKLGYIGWSWSGNGGGVEYLDM
Man5ATh          SYLEHFVNAGLPIIMIGEFGHDHSDGNPDEDTIMAEERLGLGYIGWSWSGNGGGVEYLDM
                  *****:***** *****

Man5ATc          VDNFDGDSLTSWGRRIFYGPNGISGTAREATVYSGDPGTDPGTDPGTDPT--DPGTDPG
Man5ATf          VYNFDGDNLSPWGERIFYPNGIASTAKEATIFGGSQPGPTE-EPTEEPTEPTPTPPA
Man5ATh          VNNFDADSLTSWGRRIFYGANGISSTAEEATVYGGEPPTDPT-DPPTDPTDPT--PTDPPA
                  * **.*.*: **.**** ***:.*.***:.*. :* :* * *.

Man5ATc          TGACSAAYTTVGDWGSFGQGEVTVTAGSSAISHWKVTWTFPGGQSVSHGWNAAFNGSSV
Man5ATf          EGDCATATYATIGSWGGFQGEVTVTAGDSAISWQVSWTFPGGQSVAHGWNASFSGTSTV
Man5ATh          EGDCSADYTTVGSWGGFQGEVTVTAGDSAISNWTVSWTFPGGQSVSHGWNASFSGGSPV
                  * *:* *:*.*.***.*****.*** * *:******:*****:* * * *

Man5ATc          TATSLSYNGQLGAGQSTAFGFISGSGAPGALTLTCSVD
Man5ATf          TASNLSYNGQLGAGQSATFGFISGSDAPSSLTSLCTAR
Man5ATh          TASNAPYNGQLGAGQSTTFGFISGSGAPGSLTLTCTTD
                  **:. *****:*****.*.:.***:*.

```

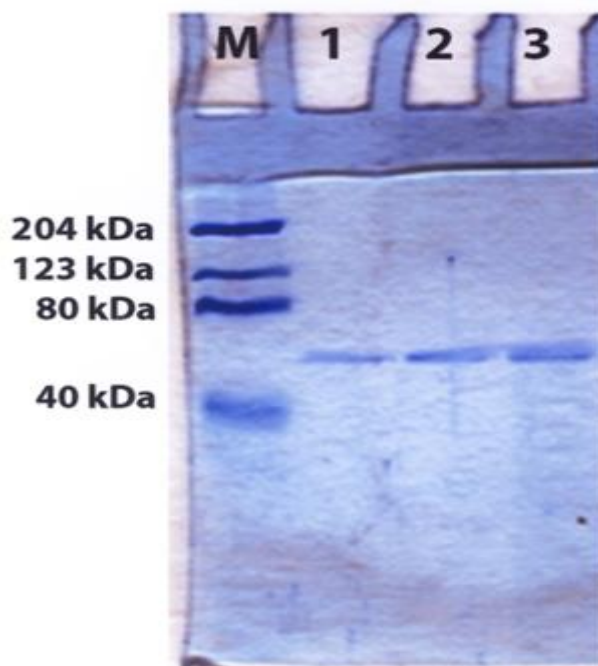
7. ábra A vizsgált endomannáz enzimek közötti hasonlóság aminosav szinten, és a domének orientációja az enzimeken belül. A fehérjék között 80% feletti a hasonlóság. Mindhárom enzim egy N terminálison található katalitikus egységből és egy CBM2-es doménből áll. A bekeretezett régió a kapcsos szekvenciákat jelzi.

Jelölések: * - teljesen konzervált aminosavak, : - nagyon hasonló aminosav csoportok közötti csere, . – kevésbé hasonló aminosav csoportok közötti csere

Az izoelektromos pontot mindhárom enzim esetében a Kozlowski algoritmus alapján számoltam a megfelelő interneten elérhető segítségével ([http 17](http://17)). Ennek alapján a legsavasabb fehérje a Man5ATh (pI 4.102), míg a Man5ATf (pI 4.519) és a Man5ATc (4.567) kevésbé savasak, izoelektromos pontjuk közel azonos.

4.4.5. A heterológ fehérje expresszió és tisztítás eredménye

A Man5ATc, Man5ATf és Man5ATh fehérjéket *E. coli* BL21 (DE) sejtekben expresszáltam. Az IMAC kromatográfiás tisztítást követően 1 liter tenyészetből a következő fehérje kihozatalt értem el: Man5ATf 45 mg, Man5ATc 33 mg, Man5ATh 25 mg. Az SDS PAGE analízis alapján a fehérjék molekulatömege 48-50 kDa közé esik, amelyek jól megegyeznek az aminosav szekvenciák alapján számított értékkel (5. kép).



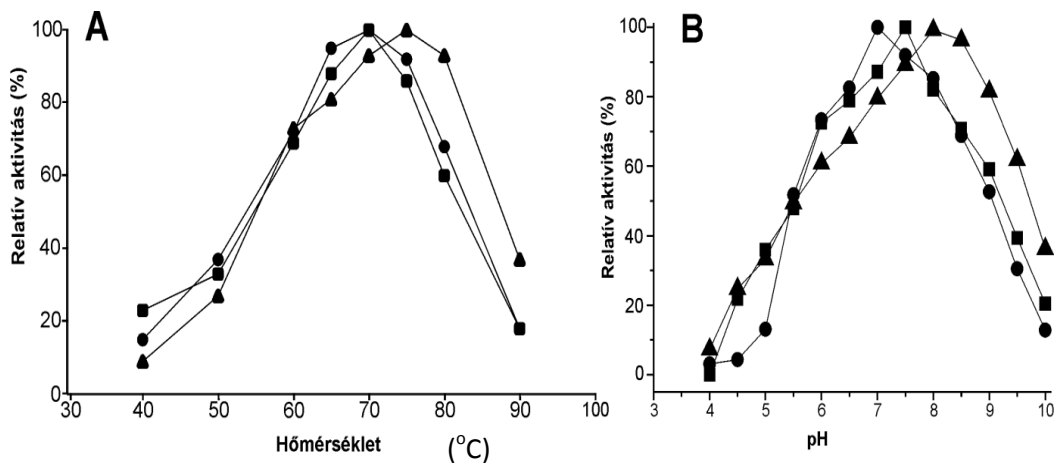
5. kép A tisztított Man5A fehérjék PAGE analízise. A fehérjék molekulatömege körülbelül 50 kDa. M zseb: molekulásúly marker, 1. zseb: Man5ATh; 2. zseb: Man5ATc; 3. zseb: Man5ATf

4.4.6. A Man5ATf, Man5ATc és Man5ATh β -1,4-endomannanázok biokémiai jellemzése

A vizsgált fehérjék a GH5-ös családba tartoznak, amelyben az endomannanázok mellett többek között endocelluláz, xilanáz, glükozidáz és mannozidáz aktivitású fehérjék is vannak. Az enzimek specifitásának vizsgálatát az LBG (Locust Bean Gum- szentjánoskenyér liszt) mellett különböző cellulóz formák (Avicel, MN300, karboxi-metil-celulóz), bükkfa xilán és pNp-mannopiranozid szubsztrátokkal végeztem. Ennek eredményeképpen elmondható, hogy mindhárom enzim csak LBG-n mutatott aktivitást. Ez a szűk szubsztrát specifitás arra utal, hogy a piranoz gyűrű kettős szénatomján elhelyezkedő axiális hidroxil csoport szükséges a

ligandum aktív helyhez való kötődéséhez. Az ipari alkalmazások során gyakran használnak hasonlóan szűk szubsztrátspecifitású enzimeket, mert ezekkel jobban kontrolálható a termékképzés, így a Man5A enzimek ebből a szempontból is alkalmasak lehetnek ipari felhasználásra.

A kinetikai paraméterek összehasonlításához szükséges méréseket az enzimek specifitásának megfelelően LBG szubsztráton végeztem. Az enzimek hőmérséklet és pH függését a 8. ábra mutatja, amelyen jól látszik, hogy az enzimek hőmérsékleti optimuma 70-75 °C között van, amely jellemző más extracelluláris *Thermobifida* eredetű enzimekre. A Man5A fehérjék pH optimuma a lúgos tartományba esik, amely szintén megszokott a nemzetség fajaiból eddig leírt extracelluláris enzimeknél, és általában a komposztlakó baktériumok között (Posta et al., 2004, Wilson, 2004, Lynd et al., 2002). Fontos tulajdonság, hogy a pH optimum görbék viszonylag széles sávot fednek le, különösen a Man5ATf enzim esetében.



8. ábra A vizsgált fehérjék hőmérséklet és pH optimuma. Az enzimek hőmérsékleti optimuma 70-75 °C között van, pH optimumuk enyhén lúgos tartományba esik.

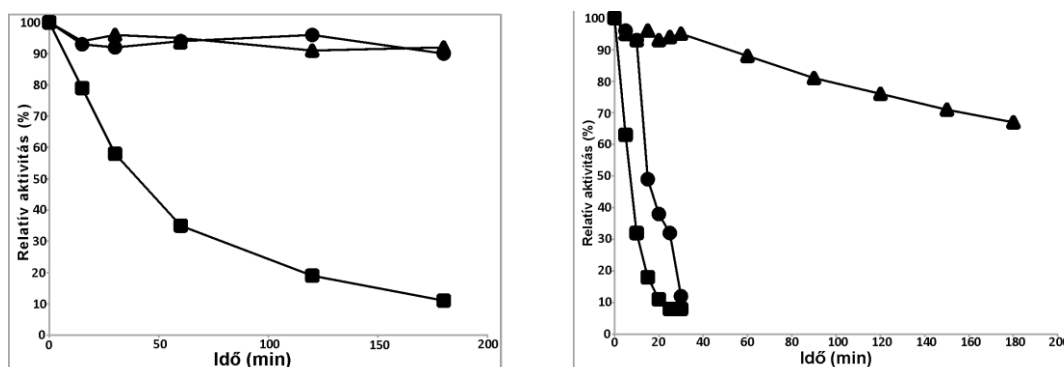
Jelölések: ●-Man5ATc, ■-Man5ATh, ▲-Man5ATf

A meghatározott Michaelis-Menten kinetikai paramétereiket a 7. táblázat tartalmazza. A katalitikus konstansban (k_{cat}) kifejezett enzim aktivitás nagyon hasonló a három enzim esetében. Az eredmények alapján azonban elmondható, hogy a Man5ATf enzimnek van a legkisebb affinitása az LBG szubsztráthoz, valamint a *T. cellulolytica* és a *T. halotolerans* β -(1,4)-endomannázainak körülbelül másfélszer akkora a katalitikus hatékonysága (k_{cat}/K_M).

7. táblázat A vizsgált endomannanáz enzimek kinetikai paramétereit

Endomannanáz	K_M (mg/mL)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($mL s^{-1} mg^{-1}$)
Man5ATf	1.65 ± 0.4	122 ± 11	74
Man5ATh	1.3 ± 0.3	78 ± 9	60
Man5ATc	0.84 ± 0.15	89 ± 5	106

Az enzimek összehasonlításában a legváratlanabb különbségek a hőstabilitások vizsgálatakor adódtak. A nagy szekvencia hasonlóság ellenére, meglepően eltérő volt az enzimek 60 és 70 °C-on mért hőstabilitása (9. ábra).



9. ábra A három enzim hőstabilitása 60 °C-on (bal oldal) és 70 °C-on (jobb oldal). A

Man5ATf fehérje hőstabilitása kiemelkedő, 3 óráig, 70 °C-os kezelés után is megőrzi aktivitásának több mint 60%-át. A legkisebb hőstabilitása a Man5ATh enzimnek van. Jelölések: ●-Man5ATc, ■-Man5ATh, ▲-Man5ATf

A 60 °C-os kezelés során a Man5ATf és a Man5ATc enzimek akár 3 órán keresztül is megőrzik aktivitásukat, míg a Man5ATh aktivitása már 40 perc alatt 50% alá süllyed. A 70 °C-os hőkezelésnek már csak a Man5ATf enzim képes ellenállni, a másik két vizsgált endomannanáz fél óra alatt szinte teljesen elveszíti aktív térszerkezetét. A mérések alapján a Man5ATf a legrobosztusabb enzim, míg a legkisebb hőstabilitása a Man5ATh enzimnek van.

4.5. Új tudományos eredmények

I. tézis: Eddig ismeretlen, új fajként, új nemzetséggként leírható mikroba törzs izolálása, annak klasszikus és molekuláris taxonómiai leírása. A komposztból izolált K13 jelzésű törzs a tenyésztéses vizsgálatok alapján rendkívül nagy xilánáz aktivitással rendelkezik. A *Xylanobacillus xylanolyticus* sp. nov., gen. nov. K13 törzset az új taxonok leírásának követelményei alapján két nemzetközi mikroba törzsgyűjteményben is deponáltam (DSM 29793, NCAIM B.02605).

II. tézis: A *Xylanobacillus xylanolyticus* K13 *de-novo* genom projektje alapján azonosítottam 26 lignocellulóz bontásban szerepet játszó (celluláz, xilánáz és mannanáz) gént, amelyek összesen 16 különböző glikozid hidroláz (GH) családba tartoznak. A genomban kódolt nagyszámú (15) és változatos (10 GH család) xilánáz gén alapján a K13 törzs az aerob prokarióta xilánbontás modell szervezetévé válhat.

III. tézis: Elkészítettem a *Thermobifida fusca* TM51 genom projektjét, valamint a *Thermobifida cellulosilytica* TB100^T, *Thermobifida halotolerans* JCM16012^T *de novo* genom projektjeit, amelyek alapján azonosítottam a törzsek mind a 17 lignocellulóz bontásban résztvevő glikozid hidroláz génjét. Az összehasonlítás alapján a *T. fusca* TM51 és a *T. cellulosilytica* TB100^T GH génkészlete teljesen egyezik, míg a *T. halotolerans* JCM16012^T celluláz génkészlete két GH3-as génnel többet, egy GH6-os és egy GH9-es cellulázzal kevesebbet tartalmaz.

IV. tézis: Molekuláris taxonómiai vizsgálatokkal igazoltam, hogy a *Thermobifida alba* fajból eddig leírt hidrolázok forrásaként megjelölt *T. alba* CECT3323 törzs (korábban *Thermomonospora alba* ULJB1) valójában a *T. fusca* fajhoz tartozik, így jelenleg nincs a *T. alba* fajból leírt hidroláz enzim.

V. tézis: Elsőként klónoztam a *Thermobifida cellulosilytica* eredetű *man5ATc*, és a *Thermobifida halotolerans* eredetű *man5ATh* géneket, valamint heterológ expresszáltatásukat követően igazoltam, hogy az általuk kódolt enzimek endomannanáz aktivitással bírnak.

VI. tézis: Meghatároztam a Man5ATf, a Man5ATc és a Man5ATh enzimek egyes biokémiai paramétereit, ezek alapján megállapítottam, hogy a fehérjék molekulatömege 50 kDa, hőmérsékleti optimumuk 70-75 °C, és pH optimumuk enyhén lúgos tartományba esik (pH 7-8). Az enzimek összehasonlítása során megállapítottam, hogy a 80% feletti aminosav szekvencia egyezés ellenére a *T. fusca* TM51 törzs Man5ATf endomannanázának kiemelkedő a hőstabilitása, de az enzim affinitása a galaktomannán szubsztráthoz kisebb, mint a másik két endomannanázé.

6. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK

Munkám során célként tűztem ki lignocellulóz bontó baktériumok izolálását és egy törzsgyűjtemény kialakítását. Ennek érdekében komposztok mezofil és termofil régióiból izoláltam baktériumokat cellulóz, xilán és mannántartalmú táptalajokon, majd az egyes izolátumokat 16S rDNS szekvencia analízis segítségével azonosítottam. Ennek a munkafolyamatnak az eredményeképpen kialakítottam egy baktérium törzsgyűjteményt, amely 64 potenciális lignocellulóz bontó izolátumot tartalmaz (2. táblázat). Az izolátumok összesen 21 különböző fajhoz tartoznak. A fajok között 14 fajnál (a *Cellulosimicrobium funkei*, *Cellulomonas flavigena*, *Thermobifida fusca*, *Geobacillus thermoleovorans*, *Geobacillus thermodenitrificans*, *Brevibacillus thermoruber*, *Geobacillus caldoxylosilyticus*, *Caldibacillus debilis*, *Geobacillus stearothermophilus* fajok esetében legalább 2 különböző törzsnél is) ismerjük a teljes genom szekvenciát. Kísérletes alapon vagy a genom projektre támaszkodva 12 faj esetében számoltak be glikozid hidroláz gének vagy enzimek meglétéről (<http> 4). Az izolálás során, illetve az identifikációra való kiválasztáskor törekedtem arra, hogy lehetőleg különböző morfológiájú telepeket válogassak ki, és így nagyobb eséllyel találjak eddig nem leírt fajhoz tartozó törzseket.

Összességében a tenyésztéses munkám során azt tapasztaltam, hogy a hőmérséklet emelkedésével egyre kevesebb fajhoz tartozó baktériumot sikerült izolálnom, 80 °C-ról már csak a *Thermus composti* fajhoz tartozó izolátumokat sikerült tenyészteni. Nem a tenyésztések eredményeinek következtetéseként interpretálható (hiszen az alkalmazott módszerek erre nem voltak megfelelőek), de érdemes megjegyezni, hogy az izolátumok aránylag sok fajhoz tartoztak. Ryckeboer és mtsai. (2003a) különböző növényi hulladékból összeállított komposztalomban diverzitását vizsgálták, és munkájuk során a *Streptomyces* nemzetségen kívül összesen 22 fajhoz tartozó izolátumot identifikáltak. Egy másik, összegző tanulmányában Ryckeboer és mtsai. (2003b) összesen több mint 150 különböző faj komposztban való megjelenését számolták össze irodalmi adatok alapján. Természetesen a valóságban, az ezzel a számmal jellemzett diverzitásnál is sokkal

változatosabb a komposztok faji összetétele, hiszen a baktériumok döntő hányadát eddig még nem sikerült tenyésztésbe vinni. Alátámasztják ezt a tenyésztéstől független vizsgálati módszerek (DGGE, TRFLP, 16S rDNS szekvenálás, metagenom analízis stb.), amelyek hatékonysága az újgenerációs szekvenáló módszerek elterjedésével egyre nagyobb. Partanen és mtsai. (2010) 16S rDNS alapon végzett kutatásai alapján 2000 különböző filotípus komposztokban való előfordulását feltételezik. Piroszekvenálással vizsgálva egy komposzthalomból amplifikálható 16S rRNS gének szekvenciáját de Gannes és mtsai. (2013) nemzetség szinten is több mint 20 különböző taxont tudtak elkülöníteni, amelyek közül többet, eddig egyáltalán nem tartottak jellemzőnek komposzthalmokban.

Az általam izolált és bizonyítottan jó cellulóz illetve hemicellulóz bontó potenciállal rendelkező baktériumokból hatékony lignocellulóz hasznosító törzskeveréket lehetne összeállítani. Ehhez a továbbiakban érdemes lenne az egyes törzsek és törzskeverékek polimer szubsztrátokat bontó aktivitását vizsgálni. Az ismert genom szekvenciájú fajokból további hidroláz enzimgéneket lehetne klónozni biotechnológiai alkalmazás céljából.

A törzsgyűjtemény kialakítása mellett egyik fő célom volt új baktérium fajok izolálása, azok jellemzése. A K13 jelzésű törzs 16S rDNS szekvenciája a legnagyobb hasonlóságot a *Paenibacillus montaniterrae* MXC2-2^T törzs 16S rRNS génjével mutatja, ez az érték azonban csak 93,03%, ami jóval az új fajok leírásakor irányadó 97%-os érték alatt van.

A fenotípusos jellemzőket és tápanyag hasznosítást vizsgáló általánosan alkalmazott tesztekkel (API tesztek), a gyártó utasításainak megfelelő körülmények mellett a K13-as törzs nem növekedett, így ezek az eredmények sajnos nem értékelhetőek. A kemotaxonómiai vizsgálatok eredményei szintén feltártak jellegzetes különbségeket a rokon fajokhoz képest (3a,b és 4a,b táblázatok). A rokon nemzetségek rendszertanában kiemelt fontossággal bír a membránt alkotó poláris lipidek összetétele (Logan et al., 2009). A K13 tartalmazza a *Paenibacillaceae* család több csoportjára és a *Bacillus* nemzetségre is jellemző difoszfátidilglicerol, foszfátidiletanolamin és foszfátidilglicerol molekulákat, de egyedi bélyegként megjelenik a foszfátidilszerin is a poláris lipidek között. A *Fontibacillus*, a *Cohnella* és a *Paenibacillus* nemzetségekhez hasonló zsírsav összetételében meghatározóak az iso C_{15:0}, anteiso C_{15:0}, iso C_{16:0}, anteiso C_{17:0}, valamint a C_{16:0} szerkezetű molekulák (Saha et al., 2010, Kämpfer et al., 2006, Kämpfer, 2008). Domináns légzési kinonja a *Bacilli* osztályon belül jellemző MK-

7. Megnehezíti az új izolátum taxonómiai besorolását, hogy a rokon nemzetségek rendszertana nem teljesen következetes. A gyakorlatban a 16S rDNS szekvencia összehasonlítás eredménye alapján tartanak új faj jelöltnek egy törzset. Fajok esetében a 97% alatti hasonlóság általában elfogadott, de nem elégséges feltétele az új faj leírásának. Magasabb taxonómiai kategóriák esetében, mint például a nemzetség, még kevésbé van körülhatárolva milyen bélyegeken és mekkora különbség esetében beszélhetünk új taxonról (Tindall et al., 2010). Több szerző a 95%-os 16S rDNS szekvencia értéket tartja a nemzetségeket elválasztó határnak, ez az érték azonban csak egyfajta iránymutatás. A gyakorlatban a jellemző bélyegek összességével kell alátámasztani, hogy az adott törzs elkülönül az eddig leírt nemzetségektől (Yarza et al., 2008).

Véleményem szerint a K13 törzssel rokon nemzetségek leírásánál a szerzők értelmezése eltérő lehetett az új nemzetség megalkotásának feltételeiről. A *Cohnella* nemzetség a 16S rDNS szekvenciák alapján készített filogenetikai fán jól elkülönül a *Paenibacillus* ágától, azonban a *Fontibacillus* nemzetség tagjai nem válnak el egyértelműen a *Paenibacillus* fajoktól (4. ábra). Igaz ugyanakkor, hogy elsősorban kemotaxonómiai és fenotípusos bélyegek alapján a *Fontibacillus* nemzetség elkülönül a *Paenibacillus* fajoktól. A K13 törzssel rokon fajok között találhatjuk a *Cohnella fontinalis* fajt, amely új nemzetséghez való sorolása talán indokolt lett volna a fenti elveknek megfelelően. Ez a faj mind a törzsfán (4. ábra), mind kemotaxonómiai jellemzőit tekintve elkülönül a *Cohnella* nemzetségtől (3b és 4b táblázatok), legközelebbi rokonával (*Cohnella nanjingensis*) pedig csak 94,89%-os 16S rDNS szekvencia hasonlóságot mutat (Huang et al., 2014).

A K13 törzs jellemzésekor kapott eredmények alátámasztják, hogy a törzs új faj és új nemzetség típusörzse legyen. Az új nemzetség megalakítása mellett szükség lehet a *Paenibacillus* nemzetség revíziójára is, monofiletikus csoportok kialakítása érdekében.

A K13 törzs DNS állományának guanin és citozin (G+C) arányát, vagy a spóráképzéshez szükséges gének meglétét, genom projekt alapján ismertem meg, ami jól mutatja, hogy a teljes genom szekvenciának az elemzése a taxonómiai munkákhoz is fontos adatokkal járulhat hozzá (Chun és Rainey, 2014). Az új generációs szekvenáló berendezések elterjedése, és a genomból nyerhető adatok információ tartalma talán indokoltá teszik új fajok leírásakor a teljes genom szekvencia közzétételét is a jövőben.

Munkám során négy faj teljes genom szekvenciáját vizsgáltam elsősorban a

lignocellulóz bontásban részt vevő glikozid hidroláz génkészletek feltérképezését tartva fő célnak. A *T. fusca* TM51, *T. cellulosilytica* TB100^T, *T. halotolerans* JCM16012^T és a K13 törzs esetében is részleges adatokkal szolgáló (draft) genom szekvencia áll jelenleg rendelkezésre. A teljes genom szekvenálást lehetővé tévő technológiák fejlődésével és elérhetőségével önmagukban, tudományos érdeklődésre számot tartó analízis nélkül, ezek publikálhatósága ma már nehézkes. Mély genomikai vizsgálatokhoz csak korlátozottan, vagy egyáltalán nem elégségesek a draft genomok, de egyes cél gének megkeresésére, és bizonyos anyagcsere potenciál feltérképezésére tökéletesen alkalmasak (Barbosa et al., 2014).

A *Thermobifida* genomok ismerete lehetőséget ad a hidroláz gének összehasonlítására is, amely azért is érdekes, hiszen a *T. halotolerans* típus törzset nem komposztból, hanem egy sóbányából izolálták. Ahhoz, hogy a teljes nemzetség eddig leírt négy fájának ismerhessük a genom szekvenciáját, a jelenleg folyamatban lévő *T. alba* DSM43795^T genom projektjét is be kell fejezni. A *Thermobifida* fajok eddig ismert három genom szekvenciája alapján a nemzetség tagjainak GH gén készlete nagyban hasonlít (5. táblázat). A *T. fusca* és a *T. cellulosilytica* ugyanazokkal a lignocellulóz bontó enzimeket kódoló génekkel rendelkezik. A *T. halotolerans* esetében, az eltérő habitat ellenére is csak kis eltérések mutatkoznak a másik két *Thermobifida* fajhoz képest, ez a GH3-as β -glükózidázok nagyobb számában, illetve egy-egy GH9-es és GH6-os celluláz gén hiányában mutatkozik meg. A vizsgált genomok analízise során a három *Thermobifida* fajban 17 lignocellulóz bontásban szerepet játszó glikozid hidroláz gént sikerült azonosítani.

A K13 törzs tenyésztése során feltűnő volt rendkívüli xilánáz aktivitása, amelynek genetikai hátterét a genom szekvencia analízise is megerősítette. Összesen 26 lignocellulóz bontásban szerepet játszó gént sikerült azonosítani, ezek között figyelemre méltóan magas a xilán hidrolízisében szerepet játszó gének aránya (15 darab), amelyek rendkívül változatos GH családokba tartoznak (5. táblázat).

Hasonlóan nagyszámú xilán bontásban résztvevő gént találhatunk a *Saccharophagus degradans* genomját vizsgálva. Ez az aerob mikroszervezet az egyik legtöbb GH gént hordozza, és legalább 10 különböző poliszacharid bontására képes (Weiner et al., 2008). A 14 xilán bontáshoz köthető GH gén, ennél a különlegesen hatékony lignocellulóz bontó szervezetnél összesen 5 családban oszlik el (1 GH3-as, 5 GH10-es, 3 GH11-es, 1 GH31-es és 4 GH43-as gén) (http 4).

A K13 és a *Saccharophagus degradans* xilán bontó GH génkészletét összevetve tehát láthatjuk, hogy a K13 esetében rendkívül változatosak a xilanáz gének, így a későbbiekben ez a törzs akár az aerob xilán bontás modellszervezetévé is válhat.

A továbbiakban érdekes lenne megvizsgálni, hogy a különböző GH családba tartozó xilanázok és xilozidázok között mi lehet a különbség a szubsztrát specificitást, illetve egyéb enzim tulajdonságokat tekintve. Kérdésként merülhet fel, hogy a rendkívül diverz xilanáz rendszernek mik lehetnek a funkcionális, illetve evolúciós okai. A K13-as törzs rendelkezik továbbá néhány a *Bacteria* doménon belül ritka GH génnel, mint például a GH26-os endomannanáz, amely elsősorban gombák mannán degradáló rendszerének a tagja.

A szekvenálás eredményeképpen mind a négy esetben száznál kevesebb kontigba, illetve scaffoldba sikerült a readeket összeilleszteni. Mindegyik szekvenált törzs DNS állománya kódol cellulóz, xilán és mannán bontására alkalmas enzim géneket, így megfelelő potenciállal rendelkeznek a lignocellulóz hatékony hidrolíziséhez. Az azonosított gének jelentős része moduláris fehérjéket kódol, amelyek a katalitikus domén mellett valamilyen szénhidrátkötő modult is tartalmaznak. A továbbiakban érdemes lenne a genomok fizikai térképét is elkészíteni, és a pontosabb genomikai ismeretek segítségével az aerob lignocellulóz bontás hátterét részletesebben megismerni, különös tekintettel a szabályozó funkciókra, és a lignocellulolitikus aktivitások összehangolására.

További kutatásokat igényelne még a változatos szénhidrátkötő modulok (CBM) pontos szerepe, és a hidrolízist elősegítő mechanizmus részletes feltárása is. Egyrészt a különböző CBM egységek képesek megkötni a poliszacharid láncokat, és megfelelő pozícióba hozni a katalitikus domént, azonban lehetséges, hogy a CBM-ek a katalízis elősegítésén túl, képesek lehántani a már hidrolizált cellulóz fragmenteket a rostokról (Lynd et al., 2002, Wilson, 2004). A *Thermobifida fusca* egyik endoglükánázán (Cel9A korábban E4) végzett vizsgálatok alapján a CBM nélküli fehérje akár teljesen elveszítheti az aktivitását vagy a cellulóz rosthoz való kötődés képességét (Irwin et al., 1998). A fenti kérdések megválaszolásához lehetséges lenne a CBM egységek nélküli fehérje részletek vagy csak a CBM-ek külön-külön történő heterológ expressziója.

A glikozid hidrolázok működésének genetikai hátterének megismerését célzó kutatásoknak nagy lendületet adhatna a *Thermobifida* fajok genetikai manipulációs eszközrendszerének a továbbfejlesztése, a jelenleg ismert transzformációs módszer nehézségei miatt (Deng és Fong, 2010). A konkrét enzmaktivitások teljes

biztonsággal való megismeréséhez és más enzimatisz jellemzők leírásához szükséges a gének expressziója és az általuk kódolt fehérjék vizsgálata.

Munkám utolsó szakaszaként három *Thermobifida* faj GH5-ös családba tartozó homológ endomannanáz enzimét jellemeztem és hasonlítottam össze. Ezek a *T. fusca* Man5ATf, a *T. cellulosilytica* Man5ATc és a *T. halotolerans* Man5ATh enzimek voltak. Célul tűztem ki a nemzetség negyedik tagjának, a *T. alba* fajnak az endomannanáz enzimét is vizsgálni, azonban a CECT törzsgyűjteményből rendelt *T. alba* CECT3323 törzsről (szinonimaként: *T. alba* ULJB1) kiderült, hogy valójában a *T. fusca* fajhoz tartozik (5. ábra). Az első CECT3323 törzshöz tartozó publikációban a szerzők beszámolnak arról, hogy az izolátumot morfológiai jegyei alapján identifikálták (Blanco et al., 1997). A *Thermobifida* nemzetség egyes tagjait pusztán alaki bélyegek alapján megkülönböztetni nagyon nehézkes és félrevezető lehet. Ennek megfelelően következtetésként levonható, hogy jelenleg nincs leírt enzim a *T. alba* fajból, a XylA endoxilanáz enzimiről beszámoló eddigi tanulmányokban valójában *T. fusca* enzimet vizsgáltak (Blanco et al., 1997, Ahsan et al., 2001).

A vizsgált három enzimgén genomi lokalizációja nagyon hasonló, a *man5A* gén közelében egy celluláz (*cel5A*) és egy mannozidáz (*βman*) gént is lehet azonosítani (6. ábra). A hidroláz gének szigetszerű elrendeződése logikus következménye annak, hogy a komplex szerkezetű lignocellulóz degradálásához többféle aktivitású enzim közreműködése szükséges.

Az endomannanázok aminosav szekvenciáit összevetve 80% feletti hasonlóságot tapasztaltam, valamint az extracelluláris enzimekre jellemző moduláris szerkezet is igazolódott a szekvencia adatbázisokban való keresés során. Érdekesség az N-terminálison elhelyezkedő katalitikus domént és a CBM2 egységet összekötő kapocs régiókban megfigyelhető, eltérő szekvencia motívumok ismétlődése (7. ábra). A jellegzetes motívumok szerepe a poszttranszlációs módosításokban lehet, amely során egy proteáz enzim lehasítja a CBM domént a fehérjéről, így növelve az enzim affinitását az oligoszacharid szubsztrátok felé (Lao és Wilson, 1996, Wilson, 2004).

Az endomannanázok biokémiai jellemzését nehezítette hogy a poliszacharid szubsztrátok nem oldódnak megfelelően a reakcióközegben. Az enzimek vizsgálata során egyező szubsztrát specifikitást, illetve hasonló pH és hőmérséklet optimumokat tapasztaltam (8. ábra). A Man5A enzimek csak a galaktomannán (LBG) szubsztráton voltak aktívak a vizsgált poliszacharidokon és a pNp-

mannopiranozidon tesztelve. A pH optimumokat tekintve elmondható, hogy viszonylag széles és enyhén lúgos tartományban aktívak. Ezzel az enyhén savas pH optimummal a thermobifida endomannanáz enzimek egy különálló alcsoportját képezik a GH5-ös endomannanázoknak. A csoport többi prokarióta eredetű mannanáz enzime vagy kissé bázikusabb közeget kedvel (pH 9), vagy neutrális kémhatáson van az optimuma (*Streptomyces lividans*, *Clostridium cellulovorans*, *Vibrio* sp. és *Geobacillus stearothermophilus*). A gomba eredetű extracelluláris enzim fehérjék ellenben savas pH érték mellett érik el aktivitásuknak maximumát (Arcand et al., 1993, Ma et al., 2004, Kauppinen MS, 2003, Akita et al., 2004, Tamaru és Doi, 2000, Tamaru et al., 1995, Talbot és Sygusch, 1990, Song et al., 2008, Luo et al., 2009, Puchart et al., 2004). A hőmérsékletfüggés tekintetében az általam vizsgált három enzimről elmondható, hogy magas hőmérsékleti optimummal (70-75 °C) rendelkeznek. Az irodalmi adatok alapján az eubaktériumok közül a *Caldibacillus cellulovorans* (Sunna et al., 2000), illetve a *Thermotoga neapolitana* nevű archeon termelnek olyan endomannanáz enzimeket (McCutchen et al., 1996), amelyek szignifikánsan magasabb hőmérsékleti optimummal (85 °C) rendelkeznek. A *T. fusca* KW3 endomannanázának CBM domén nélküli katalitikus egységének ugyan már meghatározták a hőmérsékleti optimumát (80 °C), de ez nem vethető össze az általam vizsgált teljes enzim tanulmányozása során kapott eredményekkel (Hilge et al., 1998). Egy 2016-os publikációban ugyancsak leírnak egy *T. fusca* BCRC19214 törzs eredetű endomannanáz enzimet, amelyet *Yarrowia lipolytica* élesztőben expresszáltak, és hasonló hőmérsékleti tartományban (80-85 °C) van az optimuma (Chen et al., 2016).

A meghatározott Michaelis-Menten kinetikai paraméterek alapján a három endomannanáz enzim k_{cat} értéke nagyon hasonló, azonban az eredmények rámutatnak, hogy a Man5ATf enzimnek van a K_M értékben kifejezett legnagyobb affinitása ($0,61 \pm 0,12$ mg/ml) az LBG szubsztráthoz (7. táblázat). Az *Aspergillus niger* BK01 és a *Bacillus* sp. MG-33 eredetű endomannanázok esetében számol be az irodalom ennél magasabb affinitásról (Do et al., 2009, Meenakshi et al., 2010), de az irodalmi adatok többnyire a Man5ATc esetében tapasztaltnál magasabb K_M értékeket írnak le (Songsiriritthigul et al., 2010, Liao et al., 2014).

Az enzimek tulajdonságait összehasonlítva a legmarkánsabb különbség a hőstabilitások között adódott. A 60 és 70 °C-on végzett kísérletek alapján a magas hőmérsékletnek leginkább ellenálló a Man5ATf enzim, míg a legkevésbé robusztus

a Man5ATh fehérje (9. ábra). A 80% aminosav szekvencia hasonlóság ellenére a Man5ATf 180 percig megőrizte aktivitásának több mint 60%-át, míg a másik két enzim esetében az aktív szerkezet 30 perc alatt szinte teljesen denaturálódott. A hőstabilitásban tapasztalt különbségek tükrözik a vizsgált *Thermobifida* törzsek hőmérsékleti optimumát is, hiszen a legmagasabb hőmérsékleti optimummal a *T. fusca* TM51, míg a legalacsonyabbal a *T. halotolerans* JCM16012^T rendelkezik (Kukolya et al., 1997, Kukolya et al., 2002, Yang et al., 2008). Kumagai és mtsai. (2011) vizsgálták a *T. fusca* endomannanázának hőstabilitását, és annak pozitív Ca²⁺ függésére hívták fel a figyelmet, majd meghatározták azokat az aminosavakat is, amelyek felelősek ezért a hatásért (Kumagai et al., 2012). Az általuk leírt szekvencia motívum mindhárom vizsgált enzim esetében megtalálható. A fenti eredmény jól mutatja, hogy akár néhány aminosav cseréje befolyásolhatja egyes enzimek fontos tulajdonságait, így az összehasonlítás eredménye alapján meg lehetne határozni azokat az oldalláncokat, amelyek megváltoztatásával növelhető lenne bizonyos fehérjék hőstabilitása. Ezeket az eredményeket pedig fel lehetne használni későbbi fehérje mérnöki munkákhoz.

A dolgozatomban bemutatott eredményekhez szervesen kapcsolódva a *T. fusca* TM51 törzs endomannanáz (Man5ATf) gyakorlati felhasználásának előkísérlete a tavalyi év folyamán megtörtént. Dolgozatomba részletesen ezek az eredmények már nem kerültek be, azonban elmondható, hogy az általam klónozott Man5ATf enzimmel, szentjános-kenyér liszt szubsztráton prebiotikum termelést sikerült kivitelezni közös projekt keretében a Debreceni Egyetem és a Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet kutatócsoportjaival. A négytagú oligomannán termék bélgyulladásos egérmodellben csökkentette egy gyulladásos citokin, az IL1 β szintjét. Az elsőként vizsgált mannotetraóz termék hatásossága azonban jelentősen elmaradt a pozitív kontrollként használt erős prebiotikus hatású Biomoss-tól, ami az Altec cég gomba sejtfalhidrolizátum alapú, mannooligoszacharid tartalmú terméke. Eredményeinkről pro- és prebiotikum tematikájú nemzetközi konferencián számoltunk be (Bata-Vidács et al., 2015). A jövőben a termékek szélesebb spektrumának előállítására alkalmas membrán–reaktor alapú prebiotikum termelés és tesztelés a kitűzött cél, melynek során további olcsó, nagy mannántartalmú és eltérő oldalláncokat tartalmazó szubsztrátok, például konjak liszt, guár-gumi és gomba eredetű mannánok, is bevezetésre kerülnek majd a hasítási termékpaletta növelése érdekében.

7. ÖSSZEFOGLALÓ

A lignocellulóz a növényi sejtfal meghatározó komponense, amely így nagy tömegben előforduló, megújuló nyersanyagforrást jelenthet számos iparág számára. A lignocellulóz rendkívül ellenálló struktúrával rendelkezik, fő komponensei a lignin, a cellulóz és a változatos összetételű hemicellulózok, mint amilyenek a xilánok és a mannánok. Az utóbbi évtizedekben számos tanulmány foglalkozik a lignocellulóz bontó mikroorganizmusokkal és enzimekkel. A lignocellulóz aerob biodegradációja a leghatékonyabban a komposztokban megy végbe. A növényi biomassza hatékony átalakítását a komposztokban egy mikrobiális közösség végzi, amely rendelkezik a különböző aktivitású enzimeket tartalmazó megfelelő enzimrendszerrel. A komposztálás folyamata különböző hőprofillal rendelkező fázisokból áll, amelyek között van egy termofil szakasz is. Ez a különleges fázis diverz mikrobiológiai közösséggel rendelkezik, amelyben a lignocellulóz bontás szempontjából meghatározó szerepe van az *Actinobacteria* és a *Bacillales* baktérium csoportoknak. Ezek a baktériumok több hőstabil enzimet termelnek, hogy hasznosítani tudják a lignocellulózt alkotó polimereket. Új baktériumok izolálása a komposztokból, és ezek genom szekvenciáinak az elemzése lehetőséget biztosít új, és biotechnológiai szempontból hasznosítható enzimek keresésére és jellemzésére. A cellulázok és hemicellulázok a lignocellulóz bontás kulcsszereplői. Ezek a glikozid hidroláz enzimek széles körben elterjedtek a mikroorganizmusok között, de csak limitált számú faj rendelkezik a bontáshoz szükséges komplett enzimrendszerrel.

Doktori munkám során célül tűztem ki:

- Lignocellulóz bontó baktériumok izolálását komposzt mezofil és termofil régióiból, valamint az izolátumok identifikálását.
- Az új faj/nemzetség jelölt izolátumok jellemzését és taxonómiai besorolását.
- Jó lignocellulóz bontó képességükről ismert *Thermobifida* fajok és az esetlegesen izolált új faj jelölt(ek) genom projektjének elkészítését.
- Különböző *Thermobifida* fajok *man5A* endomannanáz génjének klónozását és expresszáltatását.
- A *Man5A* endomannanáz fehérjék jellemzését és összehasonlítását.

Első számú célkitűzésem alapján komposztok meleg régióiból izoláltam poliszacharid tartalmú agar lemezekre, és az izolátumokat 16S rDNS szekvencia alapon azonosítottam. Munkám eredményeként 64 izolátumból álló törzsgyűjteményt hoztam létre, amelynek tagjai összesen 21 különböző fajhoz tartoznak. A törzsgyűjteményt több *Geobacillus*, *Paenibacillus*, *Bacillus*, *Brevibacillus* nemzetséghez és az *Actinomycetales* rendhez tartozó izolátum alkotja, amelyekből hatékony lignocellulóz bontó törzskeverék állítható össze.

A törzsgyűjtemény kialakítása során sikerült izolálnom egy törzset, amely a K13-as jelzést kapta (deponálva: DSM 29793, NCAIM B.02605), és amelynek a 16S rDNS szekvenciáját összehasonlítva az EZtaxon nevű adatbázisban szerepelő szekvenciákkal a legnagyobb egyezés csupán 93,03% volt. A 16S rRNS gén alapján készített filogenetikai fa szerint a K13-as törzs a *Paenibacillus*, *Fontibacillus* és *Cohnella* nemzetségekkel mutat rokonságot. A K13-as törzs rendkívül jó xilán bontó képességgel rendelkező, Gram pozitív, aerob, mezofil baktérium. A 16S rDNS alapú filogenetikai elemzések mellett a kemotaxonómiai bélyegeket is figyelembe véve javaslom egy új nemzetség és új faj leírását, amelynek típus törzse a K13.

Munkám során négy faj genom analízisét végeztem el új generációs szekvenáló platformok segítségével kapott szekvenciákon. A három *Thermobifida* faj (*T. fusca*, *T. cellulosilytica*, *T. halotolerans*) és a K13-as törzs genom szekvenciájában is sikerült cellulóz, xilán és mannán hidrolízisében szerepet játszó géneket azonosítanom. A szekvencia analízisek alapján a három *Thermobifida* faj lignocellulóz bontó glikozid hidroláz készlete nagyon hasonló, míg a K13-as törzs genomja rendkívül nagyszámú xilánáz enzimet kódol.

A genom projektek alapján három különböző *Thermobifida* faj endomannánáz génjét (*man5A*) sikerült klónoznom és expresszáltatnom, majd a fúziós fehérjéket (Man5A) részlegesen jellemeznem és összehasonlíttanom. A körülbelül 50 kDa molekulásúlyú fehérjék csak a galaktomannánon voltak aktívak a vizsgált szubsztrátok közül. Mindhárom enzimnek magas hőmérsékleti optimuma és enyhén lúgos tartományba eső pH optimuma van. A nagy szekvencia hasonlóság ellenére figyelemre méltó különbség tapasztalható az enzimek hőstabilitásában. A 70 °C-on vizsgálva kiemelkedő hőstabilitással rendelkezik a *T. fusca* eredetű endomannánáz enzim. A nagyfokú szekvencia hasonlóság lehetőséget adhat a különbségeket okozó aminosav oldalláncok azonosításához, amely új információkkal szolgálhat későbbi fehérje mérnöki munkákhoz.

8. SUMMARY

Lignocellulose is one of the main components of plant cell wall, providing abundant renewable raw material for a range of industries. Lignocellulose is physically hard, dense, and resistant to degradation. Main components of lignocellulose are lignin, cellulose, and hemicelluloses of diverse composition, like xylan and mannan. In recent decades, many studies have been published dealing with lignocellulolytic microorganisms and enzymes. The most effective aerobic biodegradation of lignocellulosic biomass occurs in composts. The effective conversion of lignocellulose requires a microbial community and a set of enzymes with different activities. The composting process contains different phases with dissimilar thermal profiles. In the peculiar thermophilic phase, there is a diverse microbial community dominated by *Actinobacteria* and *Bacillales*. These bacteria express a set of effective thermostable enzymes to utilize lignocellulosic plant biomass. Isolation of new bacterial species and examination of their genome sequence provide the possibility to find and describe new and useful enzymes. Cellulases and hemicellulases are the key enzymes in lignocellulose degradation. These glycoside hydrolases are widespread among microorganisms, but only a limited number of species have full cellulolytic and hemicellulolytic enzyme sets. Five objectives were set out in this dissertation: Isolation and identification of potential lignocellulolytic bacteria from compost piles to build a mesophile and a thermophile strain collection. Characterization and classification of new species candidate isolates. Making of genome projects of lignocellulolytic *Thermobifida* species and the new species candidate strain(s). Cloning and making an overexpression of *man5A* endomannanase genes from different *Thermobifida* species. Characterizing and comparing Man5A recombinant proteins. For the first aim, I have isolated bacteria from different compost samples on polysaccharide containing agar plates; the identification of the isolates was done by 16S rDNA sequence analysis. As a result, I have set up a strain collection with 64 isolates belonging to 21 different bacterial species. The strain collection consists of *Geobacillus* spp., *Paenibacillus* spp., *Bacillus* spp., *Brevibacillus* spp., and isolates from the *Actinomycetales* order, and it is possible to prepare an effective lignocellulolytic strain mixture with these isolates.

During the building of the strain collection, I managed to isolate a new species and new genus candidate bacterium that received the name K13. This strain has a low 16S rDNS sequence similarity (93.03% as the highest similarity) to other bacterial strains according to EzTaxon database. Strain K13's closest relatives are *Paenibacillus* spp., *Fontibacillus* spp., and *Cohnella* spp. according to the filogenetic tree based on 16S rDNA sequences. Strain K13 is a Gram positive, aerobic, mesophilic bacterium with a great potential in degrading xylan. Based on the filogenetic analysis and the results of chemotaxonomic examinations, I propose the description of a new genus and new species, with K13 as type strain.

During my work I have done genome analysis of four species based on sequences received by next generation sequencing platforms. I could identify several hydrolase genes in the three *Thermobifida* genomes (*T. fusca* TM51, *T. cellulositytica* TB100^T, *T. halotolerans* JCM16012^T) and the genome of K13 strain, which might play key roles in cellulose, xylan, and mannan degradation. As a result of the sequence analysis, I concluded that the glycoside hydrolase pools of the examined *Thermobifida* species are very similar, and the genome of K13 encodes a high number of xylanase genes.

Based on the genome projects, I managed to clone and overexpress *man5A* genes of three different *Thermobifida* species, and then I partially characterized in detail and compared the fusion proteins (Man5A). The approximately 50 kDa proteins were active only on galactomannan from the tested substrates. All three enzymes have high thermal optimum and slightly alkaline pH optimum. In spite of the high similarity among the aminoacid sequences, there are remarkable differences in the thermal stability of the enzymes. Endomannanases of *T. fusca* are the most heat stable at 70 °C. The high sequence similarity gives an opportunity to identify the amino acid side-chains responsible for the differences, and these data may provide useful information for further protein engineering studies.

1. MELLÉKLET: IRODALOMJEGYZÉK

- AHSAN, M. M., KANEKO, S., WANG, Q., YURA, K., GO, M. & HAYASH, K. 2001. Capacity of *Thermomonospora alba* XylA to impart thermostability in family F/10 chimeric xylanases. *Enzyme Microb Technol*, 28, 8-15.
- 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 Crystallogr D Biol Crystallogr*, 60, 1490-2.
- ALBERT, R. A., ARCHAMBAULT, J., LEMPA, M., HURST, B., RICHARDSON, C., GRUENLOH, S., DURAN, M., WORLICZEK, H. L., HUBER, B. E., ROSSELLO-MORA, R., SCHUMANN, P. & BUSSE, H. J. 2007. Proposal of *Viridibacillus* gen. nov. and reclassification of *Bacillus arvi*, *Bacillus arenosi* and *Bacillus neidei* as *Viridibacillus arvi* gen. nov., comb. nov., *Viridibacillus arenosi* comb. nov. and *Viridibacillus neidei* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 57, 2729-37.
- ANDERSON, I., ABT, B., LYKIDIS, A., KLENK, H. P., KYRPIDES, N. & IVANOVA, N. 2012. Genomics of aerobic cellulose utilization systems in actinobacteria. *PLoS One*, 7, e39331.
- ARCAND, N., KLUEPFEL, D., PARADIS, F. W., MOROSOLI, R. & SHARECK, F. 1993. Beta-mannanase of *Streptomyces lividans* 66: cloning and DNA sequence of the *manA* gene and characterization of the enzyme. *Biochem J*, 290 (Pt 3), 857-63.
- ARGYROPOULOS, D. S. & MENACHEM, S. B. 1997. Lignin. In: ERIKSSON, K.-E. L. (ed.) *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*. Germany: Springer.
- ASANO, I., NAKAMURA, Y., HOSHINO, H., AOKI, K., FUJII, S., IMURA, N. & IINO, H. 2001. Use of mannoooligosaccharides from coffee mannan by intestinal bacteria. *Nippon Nōgeikagaku Kaishi*, 75, 1077-1083.
- ASH, C., PRIEST, F. G. & COLLINS, M. D. 1993. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR

probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 64, 253-60.

- 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, 1-16.
- ATKINSON, C. F., JONES, D. D. & GAUTHIER, J. J. 1996. Putative anaerobic activity in aerated composts. *Journal of Industrial Microbiology*, 16, 182-188.
- ATKINSON, C. F., JONES, D. D. & GAUTHIER, J. J. 1997. Microbial activities during composting of pulp and paper-mill primary solids. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13, 519-525.
- AZIZ, R. K., BARTELS, D., BEST, A. A., DEJONGH, M., DISZ, T., EDWARDS, R. A., FORMSMA, K., GERDES, S., GLASS, E. M., KUBAL, M., MEYER, F., OLSEN, G. J., OLSON, R., OSTERMAN, A. L., OVERBEEK, R. A., MCNEIL, L. K., PAARMANN, D., PACZIAN, T., PARRELLO, B., PUSCH, G. D., REICH, C., STEVENS, R., VASSIEVA, O., VONSTEIN, V., WILKE, A. & ZAGNITKO, O. 2008. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics*, 9, 75.
- BADIA, R., LIZARDO, R., MARTINEZ, P. & BRUFAU, J. 2013. Oligosaccharide structure determines prebiotic role of beta-galactomannan against *Salmonella enterica* ser. Typhimurium in vitro. *Gut Microbes*, 4, 72-5.
- BAKER, G. C., SMITH, J. J. & COWAN, D. A. 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J Microbiol Methods*, 55, 541-55.
- BALL, A. S., BETTS, W. B. & MCCARTHY, A. J. 1989. Degradation of lignin-related compounds by actinomycetes. *Appl Environ Microbiol*, 55, 1642-4.
- BARBOSA, E. G., ABURJAILE, F. F., RAMOS, R. T., CARNEIRO, A. R., LE LOIR, Y., BAUMBACH, J., MIYOSHI, A., SILVA, A. & AZEVEDO, V. 2014. Value of a newly sequenced bacterial genome. *World J Biol Chem*, 5, 161-8.
- BATA-VIDÁCS, I., BAKA, E., CSERNUS, O., TÓTH, Á., SZÉKÁCS, A., KOVÁCS, J. K., SÓS, E., BARNA, T. & KUKOLYA, J. 2015. Preliminary results of research on novel synbiotic combining unique *Lactobacillus* strains and mannoooligosaccharides. International Scientific Conference Probiotics and Prebiotics, 2015 Budapest, Hungary. 113-116.

- BATEMAN, A., BIRNEY, E., CERRUTI, L., DURBIN, R., ETWILLER, L., EDDY, S. R., GRIFFITHS-JONES, S., HOWE, K. L., MARSHALL, M. & SONNHAMMER, E. L. 2002. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res*, 30, 276-80.
- BÉKI, E., NAGY, I., VANDERLEYDEN, J., JAGER, S., KISS, L., FÜLOP, L., HORNOK, L. & KUKOLYA, J. 2003. Cloning and heterologous expression of a beta-D-mannosidase (EC 3.2.1.25)-encoding gene from *Thermobifida fusca* TM51. *Appl Environ Microbiol*, 69, 1944-52.
- BERMEK, H., LI, K. & ERIKSSON, K.-E. L. 1998. Laccase-less mutants of the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus* cannot delignify kraft pulp. *Journal of Biotechnology*, 66, 117-124.
- BLANCO, J., COQUE, J. J., VELASCO, J. & MARTIN, J. F. 1997. Cloning, expression in *Streptomyces lividans* and biochemical characterization of a thermostable endo-beta-1,4-xylanase of *Thermomonospora alba* ULJB1 with cellulose-binding ability. *Appl Microbiol Biotechnol*, 48, 208-17.
- BOETZER, M., HENKEL, C. V., JANSEN, H. J., BUTLER, D. & PIROVANO, W. 2011. Scaffolding pre-assembled contigs using SSPACE. *Bioinformatics*, 27, 578-9.
- BOZZOLA, J. J. & RUSSELL, L. D. 1992. *Electron microscopy*, New York, Jones and Bartlett Publishers.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- BUCK, J. D. 1982. Nonstaining (KOH) method for determination of Gram reactions of marine bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 44, 992-3.
- BUGG, T. D. H., AHMAD, M., HARDIMAN, E. M. & RAHMANPOUR, R. 2011. Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi. *Natural Product Reports*, 28, 1883-1896.
- CERRITOS, R., VINUESA, P., EGUIARTE, L. E., HERRERA-ESTRELLA, L., ALCARAZ-PERAZA, L. D., ARVIZU-GOMEZ, J. L., OLMEDO, G., RAMIREZ, E., SIEFERT, J. L. & SOUZA, V. 2008. *Bacillus coahuilensis* sp. nov., a moderately halophilic species from a desiccation lagoon in the Cuatro Ciénegas Valley in Coahuila, Mexico. *Int J Syst Evol Microbiol*, 58, 919-23.

- CHAMURIS, G. P., KOZIOL-KOTCH, S. & BROUSE, T. M. 2000. Screening fungi isolated from woody compost for lignin-degrading potential. *Compost Science & Utilization*, 8, 6-11.
- CHEN, C. Y., HUANG, Y. C., YANG, T. Y., JIAN, J. Y., CHEN, W. L. & YANG, C. H. 2016. Degradation of konjac glucomannan by *Thermobifida fusca* thermostable beta-mannanase from yeast transformant. *Int J Biol Macromol*, 82, 1-6.
- CHEN, S. & WILSON, D. B. 2007. Proteomic and transcriptomic analysis of extracellular proteins and mRNA levels in *Thermobifida fusca* grown on cellobiose and glucose. *Journal of Bacteriology*, 189, 6260-6265.
- CHEVREUX, B., WETTER, T. & SUHAI, S. 1999. Genome sequence assembly using trace signals and additional sequence information. Computer Science and Biology: Proceedings of the German Conference on Bioinformatics (GCB), 1999. 45-56.
- CHOI, M. H. & PARK, Y. H. 1998. The influence of yeast on thermophilic composting of food waste. *Lett Appl Microbiol*, 26, 175-8.
- CHUN, J., LEE, J. H., JUNG, Y., KIM, M., KIM, S., KIM, B. K. & LIM, Y. W. 2007. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol*, 57, 2259-61.
- CHUN, J. & RAINEY, F. A. 2014. Integrating genomics into the taxonomy and systematics of the *Bacteria* and *Archaea*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 64, 316-24.
- DA MOTA, F. F., GOMES, E. A., PAIVA, E. & SELDIN, L. 2005. Assessment of the diversity of *Paenibacillus* species in environmental samples by a novel *rpoB*-based PCR-DGGE method. *FEMS Microbiol Ecol*, 53, 317-28.
- DAVIS, C. L., HINCH, S. A., DONKIN, C. J. & GERMISHUIZEN, P. J. 1992. Changes in microbial population numbers during the composting of pine bark. *Bioresource Technology*, 39, 85-92.
- DE BERTOLDI, M., VALLINI, G. & PERA, A. 1983. The biology of composting: a review. *Waste Management & Research*, 1, 157-176.
- DE GANNES, V., EUDOXIE, G. & HICKEY, W. J. 2013. Prokaryotic successions and diversity in composts as revealed by 454-pyrosequencing. *Bioresour Technol*, 133, 573-80.

- DEHORITY, B. A. 1991. *Cellulose degradation in ruminants*, New York, Marcel Dekker Inc.
- DENG, Y. & FONG, S. S. 2010. Development and application of a PCR-targeted gene disruption method for studying CelR function in *Thermobifida fusca*. *Appl Environ Microbiol*, 76, 2098-106.
- DO, B. C., DANG, T. T., BERRIN, J. G., HALTRICH, D., TO, K. A., SIGOILLOT, J. C. & YAMABHAI, M. 2009. Cloning, expression in *Pichia pastoris*, and characterization of a thermostable GH5 mannan endo-1,4-beta-mannosidase from *Aspergillus niger* BK01. *Microb Cell Fact*, 8, 59.
- DOMINGUEZ, R., SOUCHON, H., SPINELLI, S., DAUTER, Z., WILSON, K. S., CHAUVVAUX, S., BEGUIN, P. & ALZARI, P. M. 1995. A common protein fold and similar active site in two distinct families of beta-glycanases. *Nat Struct Biol*, 2, 569-76.
- DWIVEDI, P., ALAVALAPATI, J. R. R. & LAL, P. 2009. Cellulosic ethanol production in the United States: Conversion technologies, current production status, economics, and emerging developments. *Energy for Sustainable Development*, 13, 174-182.
- ERIKSSON, K.-E., BLANCHETTE, R. A. & ANDER, P. 1990. *Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components*, Berlin; New York, Springer-Verlag.
- FEKETE, C. A. & KISS, L. 2012. Purification and characterization of a recombinant beta-D-xylosidase from *Thermobifida fusca* TM51. *Protein J*, 31, 641-50.
- FOGARTY, A. M. & TUOVINEN, O. H. 1991. Microbiological degradation of pesticides in yard waste composting. *Microbiol Rev*, 55, 225-33.
- GASTEIGER, E., HOOGLAND, C., GATTIKER, A., DUVAUD, S. E., WILKINS, M. R., APPEL, R. D. & BAIROCH, A. 2005. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: WALKER, J. M. (ed.) *The Proteomics Protocols Handbook*. Totowa, NJ: Humana Press.
- GODDEN, B., BALL, A. S., HELVENSTEIN, P., MCCARTHY, A. J. & PENNINCKX, M. J. 1992. Towards elucidation of the lignin degradation pathway in actinomycetes. *Microbiology*, 138, 2441-2448.
- GOLUEKE, C. G. 1991. Principles of composting. *The Staff of Biocycle Journal of Waste Recycling. The Art and Science of Composting*. Pennsylvania, USA: The JG Press Inc.

- GORIS, J., KONSTANTINIDIS, K. T., KLAPPENBACH, J. A., COENYE, T., VANDAMME, P. & TIEDJE, J. M. 2007. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int J Syst Evol Microbiol*, 57, 81-91.
- HAMAKI, T., SUZUKI, M., FUDOU, R., JOJIMA, Y., KAJIURA, T., TABUCHI, A., SEN, K. & SHIBAI, H. 2005. Isolation of novel bacteria and actinomycetes using soil-extract agar medium. *J Biosci Bioeng*, 99, 485-92.
- HAMMEL, K. E., JENSEN, K. A., MOZUCH, M. D., LANDUCCI, L. L., TIEN, M. & PEASE, E. A. 1993. Ligninolysis by a purified lignin peroxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 12274-81.
- HANSGATE, A. M., SCHLOSS, P. D., HAY, A. G. & WALKER, L. P. 2005. Molecular characterization of fungal community dynamics in the initial stages of composting. *FEMS Microbiol Ecol*, 51, 209-14.
- HATAKKA, A. 2001. Biodegradation of Lignin. In: HOFRICHTER, A. (ed.) *Biopolymers.Lignin.Humic Substances and Coal*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH.
- HENRISSAT, B. & DAVIES, G. J. 2000. Glycoside hydrolases and glycosyltransferases. Families, modules, and implications for genomics. *Plant Physiol*, 124, 1515-9.
- HERRERO ACERO, E., RIBITSCH, D., DELLACHER, A., ZITZENBACHER, S., MAROLD, A., STEINKELLNER, G., GRUBER, K., SCHWAB, H. & GUEBITZ, G. M. 2013. Surface engineering of a cutinase from *Thermobifida cellulosilytica* for improved polyester hydrolysis. *Biotechnol Bioeng*, 110, 2581-90.
- HERRMANN, R. F. & SHANN, J. F. 1997. Microbial community changes during the composting of municipal solid waste. *Microb Ecol*, 33, 78-85.
- 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 *Thermomonospora fusca* - substrate specificity in glycosyl hydrolase family 5. *Structure*, 6, 1433-44.
- HOITINK, H. & BOEHM, M. 1999. Biocontrol within the context of soil microbial communities: A substrate-dependent phenomenon. *Annu Rev Phytopathol*, 37, 427-446.

- HUANG, Z., YU, Y. J., BAO, Y. Y., XIA, L., SHENG, X. F. & HE, L. Y. 2014. *Cohnella nanjingensis* sp. nov., an extracellular polysaccharide-producing bacterium isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol*, 64, 3320-4.
- HULTMAN, J., VASARA, T., PARTANEN, P., KUROLA, J., KONTRO, M. H., PAULIN, L., AUVINEN, P. & ROMANTSCHUK, M. 2010. Determination of fungal succession during municipal solid waste composting using a cloning-based analysis. *J Appl Microbiol*, 108, 472-87.
- HURLBERT, J. C. & PRESTON, J. F., 3RD 2001. Functional characterization of a novel xylanase from a corn strain of *Erwinia chrysanthemi*. *J Bacteriol*, 183, 2093-100.
- INSAM, H. & DE BERTOLDI, M. 2007. Microbiology of the composting process. In: DIAZ, L. F., DE BERTOLDI, M., BIDLINGMAIER, W. & STENTIFORD, E. (eds.) *Waste Management Series*. Amsterdam: Elsevier Science.
- IRWIN, D., SHIN, D. H., ZHANG, S., BARR, B. K., SAKON, J., KARPLUS, P. A. & WILSON, D. B. 1998. Roles of the catalytic domain and two cellulose binding domains of *Thermomonospora fusca* E4 in cellulose hydrolysis. *J Bacteriol*, 180, 1709-14.
- KÄMPFER, P. 2008. Whole—cell fatty acid analysis in the systematics of *Bacillus* and related genera. In: BERKELEY, R., HEYNDRICKX, M., LOGAN, N. & DE VOS, P. (eds.) *Applications and Systematics of Bacillus and Relatives*. Oxford, UK: Blackwell Science Ltd.
- KÄMPFER, P., ROSSELLO-MORA, R., FALSEN, E., BUSSE, H. J. & TINDALL, B. J. 2006. *Cohnella thermotolerans* gen. nov., sp. nov., and classification of '*Paenibacillus hongkongensis*' as *Cohnella hongkongensis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 56, 781-6.
- KATO, S., HARUTA, S., CUI, Z. J., ISHII, M. & IGARASHI, Y. 2005. Stable coexistence of five bacterial strains as a cellulose-degrading community. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 7099-7106.
- KAUPPINEN MS, S. M., SCHNORR K, ANDERSEN LN, BJØRNVAD ME. 2003. *Mannanases*. United States patent application 09/339159.
- KEITHLEY, J. & SWANSON, B. 2005. Glucomannan and obesity: a critical review. *Altern Ther Health Med*, 11, 30-4.

- KUGA, S. & BROWN, R. M. J. 1991. Physical structure of cellulose microfibrils: implications for biogenesis. *In*: HAIGLER, C. H. & WEIMER, P. J. (eds.) *Biosynthesis and Biodegradation of Cellulose*. New York: Marcel Dekker.
- KUKOLYA, J., DOBOLYI, C. & HORNOK, L. 1997. Isolation and identification of thermophilic cellulolytic actinomycetes. *Acta Phytopathol. Entomol. Hung.*, 32, 97-107.
- KUKOLYA, J., NAGY, I., LÁDAY, M., TÓTH, E., ORAVECZ, O., MÁRIALIGETI, K. & HORNOK, L. 2002. *Thermobifida cellulolytica* sp. nov., a novel lignocellulose-decomposing actinomycete. *Int J Syst Evol Microbiol*, 52, 1193-9.
- KUMAGAI, Y., KAWAKAMI, K., MUKAIHARA, T., KIMURA, M. & HATANAKA, T. 2012. The structural analysis and the role of calcium binding site for thermal stability in mannanase. *Biochimie*, 94, 2783-90.
- KUMAGAI, Y., USUKI, H., YAMAMOTO, Y., YAMASATO, A., ARIMA, J., MUKAIHARA, T. & HATANAKA, T. 2011. Characterization of calcium ion sensitive region for beta-mannanase from *Streptomyces thermolilacinus*. *Biochim Biophys Acta*, 1814, 1127-33.
- KUMAO, T. & FUJII, S. 2006. Mannooligosaccharides blended coffee beverage intake increases the fat level in feces. *Journal of Health Science*, 52, 329-332.
- LAO, G. & WILSON, D. B. 1996. Cloning, sequencing, and expression of a *Thermomonospora fusca* protease gene in *Streptomyces lividans*. *Appl Environ Microbiol*, 62, 4256-9.
- LEE, S. F. & FORSBERG, C. W. 1987. Isolation and some properties of a beta-D-xylosidase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl Environ Microbiol*, 53, 651-654.
- LIAO, H., LI, S., ZHENG, H., WEI, Z., LIU, D., RAZA, W., SHEN, Q. & XU, Y. 2014. A new acidophilic thermostable endo-1,4-beta-mannanase from *Penicillium oxalicum* GZ-2: cloning, characterization and functional expression in *Pichia pastoris*. *BMC Biotechnol*, 14, 90.
- LOGAN, N. A., BERGE, O., BISHOP, A. H., BUSSE, H. J., DE VOS, P., FRITZE, D., HEYNDRIKX, M., KÄMPFER, P., RABINOVITCH, L., SALKINOJA-SALONEN, M. S., SELDIN, L. & VENTOSA, A. 2009. Proposed minimal standards for describing new taxa of aerobic, endospore-forming bacteria. *Int J Syst Evol Microbiol*, 59, 2114-21.

- LUO, H., WANG, Y., WANG, H., YANG, J., YANG, Y., HUANG, H., YANG, P., BAI, Y., SHI, P., FAN, Y. & YAO, B. 2009. A novel highly acidic beta-mannanase from the acidophilic fungus *Bispora* sp. MEY-1: gene cloning and overexpression in *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 82, 453-61.
- 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. *J Bacteriol*, 189, 2477-86.
- 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. (ed.) *Composting of Agricultural and Wastes*. London: Elsevier Applied Science.
- LYND, L. R., WEIMER, P. J., VAN ZYL, W. H. & PRETORIUS, I. S. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev*, 66, 506-77.
- MA, Y., XUE, Y., DOU, Y., XU, Z., TAO, W. & ZHOU, P. 2004. Characterization and gene cloning of a novel beta-mannanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. N16-5. *Extremophiles*, 8, 447-54.
- MARTINEZ, A. T., SPERANZA, M., RUIZ-DUENAS, F. J., FERREIRA, P., CAMARERO, S., GUILLEN, F., MARTINEZ, M. J., GUTIERREZ, A. & DEL RIO, J. C. 2005. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *Int Microbiol*, 8, 195-204.
- MARTINEZ, D., LARRONDO, L. F., PUTNAM, N., GELPKE, M. D., HUANG, K., CHAPMAN, J., HELFENBEIN, K. G., RAMAIYA, P., DETTER, J. C., LARIMER, F., COUTINHO, P. M., HENRISSAT, B., BERKA, R., CULLEN, D. & ROKHSAR, D. 2004. Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. *Nat Biotechnol*, 22, 695-700.
- MAYR, R., BUSSE, H. J., WORLICZEK, H. L., EHLING-SCHULZ, M. & SCHERER, S. 2006. *Ornithinibacillus* gen. nov., with the species *Ornithinibacillus bavariensis* sp. nov. and *Ornithinibacillus californiensis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 56, 1383-9.

- MCCUTCHEN, C. M., DUFFAUD, G. D., LEDUC, P., PETERSEN, A. R., TAYAL, A., KHAN, S. A. & KELLY, R. M. 1996. Characterization of extremely thermostable enzymatic breakers (alpha-1,6-galactosidase and beta-1,4-mannanase) from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga neapolitana* 5068 for hydrolysis of guar gum. *Biotechnol Bioeng*, 52, 332-9.
- MCGRATH, C. E. & WILSON, D. B. 2006. Characterization of a *Thermobifida fusca* beta-1,3-glucanase (Lam81A) with a potential role in plant biomass degradation. *Biochemistry*, 45, 14094-100.
- MEENAKSHI, SINGH, G., BHALLA, A. & HOONDAL, G. S. 2010. Solid state fermentation and characterization of partially purified thermostable mannanase from *Bacillus* sp. MG-33. *BioResources*, 5, 1689-1701.
- MILLER, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 426-428.
- MINNIKIN, D. E. & GOODFELLOW, M. 1981. Lipids in the classification of *Bacillus* and related taxa. In: BERKELEY, R. C. W. & GOODFELLOW, M. (eds.) *The Aerobic Endospore-Forming Bacteria*. London: Academic Press.
- MITCHELL, A., CHANG, H. Y., DAUGHERTY, L., FRASER, M., HUNTER, S., LOPEZ, R., MCANULLA, C., MCMENAMIN, C., NUKA, G., PESSEAT, S., SANGRADOR-VEGAS, A., SCHEREMETJEW, M., RATO, C., YONG, S. Y., BATEMAN, A., PUNTA, M., ATTWOOD, T. K., SIGRIST, C. J., REDASCHI, N., RIVOIRE, C., XENARIOS, I., KAHN, D., GUYOT, D., BORK, P., LETUNIC, I., GOUGH, J., OATES, M., HAFT, D., HUANG, H., NATALE, D. A., WU, C. H., ORENGO, C., SILLITOE, I., MI, H., THOMAS, P. D. & FINN, R. D. 2015. The InterPro protein families database: the classification resource after 15 years. *Nucleic Acids Res*, 43, D213-21.
- MURPHY, T., PARRA, R., RADMAN, R., ROY, I., HARROP, A., DIXON, K. & KESHAVARZ, T. 2007. Novel application of oligosaccharides as elicitors for the enhancement of bacitracin A production in cultures of *Bacillus licheniformis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 1518-1523.
- NAKASAKI, K., SASAKI, M., SHODA, M. & KUBOTA, H. 1985. Change in microbial numbers during thermophilic composting of sewage sludge with reference to CO₂ evolution rate. *Appl Environ Microbiol*, 49, 37-41.

- O'LEARY, W. M. & WILKINSON, S. G. 1988. Gram-positive bacteria. *In*: RATLEDGE, C. & WILKINSON, S. G. (eds.) *Microbial Lipids*. London: Academic Press.
- PANDEY, K. R., NAIK, S. R. & VAKIL, B. V. 2015. Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review. *J Food Sci Technol*, 52, 7577-87.
- PARTANEN, P., HULTMAN, J., PAULIN, L., AUVINEN, P. & ROMANTSCHUK, M. 2010. Bacterial diversity at different stages of the composting process. *BMC Microbiol*, 10, 94.
- PETERSEN, T. N., BRUNAK, S., VON HEIJNE, G. & NIELSEN, H. 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods*, 8, 785-6.
- POSTA, K., BÉKI, E., WILSON, D. B., KUKOLYA, J. & HORNOK, L. 2004. Cloning, characterization and phylogenetic relationships of *cel5B*, a new endoglucanase encoding gene from *Thermobifida fusca*. *J Basic Microbiol*, 44, 383-99.
- POUTANEN, K., TENKANEN, M., KORTE, H. & PULS, J. 1991. Accessory enzymes involved in the hydrolysis of xylans. *In*: LEATHAM, G. F. & HIMMEL, M. E. (eds.) *Enzymes in Biomass Conversion*. Washington (DC): American Chemical Society.
- PRIEST, F. G., BARKER, M., BAILLIE, L. W., HOLMES, E. C. & MAIDEN, M. C. 2004. Population structure and evolution of the *Bacillus cereus* group. *J Bacteriol*, 186, 7959-70.
- PUCHART, V., VRSANSKA, M., SVOBODA, P., POHL, J., OGEL, Z. B. & BIELY, P. 2004. Purification and characterization of two forms of endo-beta-1,4-mannanase from a thermotolerant fungus, *Aspergillus fumigatus* IMI 385708 (formerly *Thermomyces lanuginosus* IMI 158749). *Biochim Biophys Acta*, 1674, 239-50.
- PULS, J. 1997. Chemistry and biochemistry of hemicelluloses: Relationship between hemicellulose structure and enzymes required for hydrolysis. *Macromolecular Symposia*, 120, 183-196.
- RAMIREZ-CAVAZOS, L. I., JUNGHANNS, C., NAIR, R., CARDENAS-CHAVEZ, D. L., HERNANDEZ-LUNA, C., AGATHOS, S. N. & PARRA, R. 2014. Enhanced production of thermostable laccases from a native strain of *Pycnoporus sanguineus* using central composite design. *J Zhejiang Univ Sci B*, 15, 343-52.

- ROSE, R. W., BRUSER, T., KISSINGER, J. C. & POHLSCHRODER, M. 2002. Adaptation of protein secretion to extremely high-salt conditions by extensive use of the twin-arginine translocation pathway. *Mol Microbiol*, 45, 943-50.
- ROSENGREN, A., REDDY, S. K., SJOBERG, J. S., AURELIUS, O., LOGAN, D. T., KOLENOVA, K. & STALBRAND, H. 2014. An *Aspergillus nidulans* beta-mannanase with high transglycosylation capacity revealed through comparative studies within glycosidase family 5. *Appl Microbiol Biotechnol*, 98, 10091-104.
- RUTTIMANN, C., VICUNA, R., MOZUCH, M. D. & KIRK, T. K. 1991. Limited bacterial mineralization of fungal degradation intermediates from synthetic lignin. *Appl Environ Microbiol*, 57, 3652-5.
- RYCKEBOER, J., COPS, S. & COOSEMANS, J. 2002. The fate of plant pathogens and seeds during anaerobic digestion and aerobic composting of source separated household wastes. *Compost Science & Utilization*, 10, 204-216.
- RYCKEBOER, J., MERGAERT, J., COOSEMANS, J., DEPRINS, K. & SWINGS, J. 2003a. Microbiological aspects of biowaste during composting in a monitored compost bin. *J Appl Microbiol*, 94, 127-37.
- RYCKEBOER, J., MERGAERT, J., VAES, K., KLAMMER, S., DE CLERCQ, D., COOSEMANS, J., INSAM, H. & SWINGS, J. 2003b. A survey of bacteria and fungi occurring during composting and self-heating processes. *Annals of Microbiology*, 53, 349-410.
- RYE, C. S. & WITHERS, S. G. 2000. Glycosidase mechanisms. *Curr Opin Chem Biol*, 4, 573-80.
- SAHA, B. C. 2000. Alpha-L-arabinofuranosidases: biochemistry, molecular biology and application in biotechnology. *Biotechnol Adv*, 18, 403-23.
- SAHA, P., KRISHNAMURTHI, S., BHATTACHARYA, A., SHARMA, R. & CHAKRABARTI, T. 2010. *Fontibacillus aquaticus* gen. nov., sp. nov., isolated from a warm spring. *Int J Syst Evol Microbiol*, 60, 422-8.
- SALINARDI, T. C., RUBIN, K. H., BLACK, R. M. & ST-ONGE, M. P. 2010. Coffee manooligosaccharides, consumed as part of a free-living, weight-maintaining diet, increase the proportional reduction in body volume in overweight men. *J Nutr*, 140, 1943-8.

- SCHELLER, H. V. & ULVSKOV, P. 2010. Hemicelluloses. *Annu Rev Plant Biol*, 61, 263-89.
- SCHLEIFER, K. H. 2009. Classification of *Bacteria* and *Archaea*: past, present and future. *Syst Appl Microbiol*, 32, 533-42.
- SCHLOSS, P. D., HAY, A. G., WILSON, D. B. & WALKER, L. P. 2003. Tracking temporal changes of bacterial community fingerprints during the initial stages of composting. *FEMS Microbiol Ecol*, 46, 1-9.
- SHALLOM, D. & SHOHAM, Y. 2003. Microbial hemicellulases. *Curr Opin Microbiol*, 6, 219-28.
- SHEKHAR SHARMA, H. S. Economic importance of thermophilous fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 31, 1-10.
- SHIDA, O., TAKAGI, H., KADOWAKI, K., NAKAMURA, L. K. & KOMAGATA, K. 1997. Transfer of *Bacillus alginolyticus*, *Bacillus chondroitinus*, *Bacillus curdlanolyticus*, *Bacillus glucanolyticus*, *Bacillus kobensis*, and *Bacillus thiaminolyticus* to the genus *Paenibacillus* and emended description of the genus *Paenibacillus*. *Int J Syst Bacteriol*, 47, 289-98.
- SHIMIZU, M., KANEKO, Y., ISHIHARA, S., MOCHIZUKI, M., SAKAI, K., YAMADA, M., MURATA, S., ITOH, E., YAMAMOTO, T., SUGIMURA, Y., HIRANO, T., TAKAYA, N., KOBAYASHI, T. & KATO, M. 2015. Novel beta-1,4-mannanase belonging to a new glycoside hydrolase family in *Aspergillus nidulans*. *J Biol Chem*, 290, 27914-27.
- SHIRATORI, H., TAGAMI, Y., BEPPU, T. & UEDA, K. 2010. *Cohnella fontinalis* sp. nov., a xylanolytic bacterium isolated from fresh water. *Int J Syst Evol Microbiol*, 60, 1344-8.
- SINGH ARORA, D. & KUMAR SHARMA, R. 2010. Ligninolytic fungal laccases and their biotechnological applications. *Appl Biochem Biotechnol*, 160, 1760-88.
- SMITH, D. L., JR., NAGY, T. R., WILSON, L. S., DONG, S., BARNES, S. & ALLISON, D. B. 2010. The effect of mannan oligosaccharide supplementation on body weight gain and fat accrual in C57Bl/6J mice. *Obesity (Silver Spring)*, 18, 995-9.
- SNEL, B., BORK, P. & HUYNEN, M. A. 1999. Genome phylogeny based on gene content. *Nat Genet*, 21, 108-10.

- SONG, J. M., NAM, K. W., KANG, S. G., KIM, C. G., KWON, S. T. & LEE, Y. H. 2008. Molecular cloning and characterization of a novel cold-active beta-1,4-D-mannanase from the Antarctic springtail, *Cryptopygus antarcticus*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 151, 32-40.
- SONG, S. K., BECK, B. R., KIM, D., PARK, J., KIM, J., KIM, H. D. & RINGO, E. 2014. Prebiotics as immunostimulants in aquaculture: a review. *Fish Shellfish Immunol*, 40, 40-8.
- SONGSIRIRITTHIGUL, C., BURANABANYAT, B., HALTRICH, D. & YAMABHAI, M. 2010. Efficient recombinant expression and secretion of a thermostable GH26 mannan endo-1,4-beta-mannosidase from *Bacillus licheniformis* in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact*, 9, 20.
- SONNHAMMER, E. L., VON HEIJNE, G. & KROGH, A. 1998. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol*, 6, 175-82.
- SOROKIN, A., CANDELON, B., GUILLOUX, K., GALLERON, N., WACKEROW-KOUZOVA, N., EHRLICH, S. D., BOURGUET, D. & SANCHIS, V. 2006. Multiple-locus sequence typing analysis of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* reveals separate clustering and a distinct population structure of psychrotrophic strains. *Appl Environ Microbiol*, 72, 1569-78.
- SPIRIDONOV, N. A. & WILSON, D. B. 1999. Characterization and cloning of celR, a transcriptional regulator of cellulase genes from *Thermomonospora fusca*. *J Biol Chem*, 274, 13127-32.
- SPIRIDONOV, N. A. & WILSON, D. B. 2000. A celR mutation affecting transcription of cellulase genes in *Thermobifida fusca*. *J Bacteriol*, 182, 252-5.
- STACKEBRANDT, E. & GOEBEL, B. M. 1994. Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol*, 44, 846-849.
- STROM, P. F. 1985. Identification of thermophilic bacteria in solid-waste composting. *Appl Environ Microbiol*, 50, 906-13.
- SUN, Y. & CHENG, J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour Technol*, 83, 1-11.
- SUNNA, A., GIBBS, M. D., CHIN, C. W., NELSON, P. J. & BERGQUIST, P. L. 2000. A gene encoding a novel multidomain beta-1,4-mannanase from

Caldibacillus cellulovorans and action of the recombinant enzyme on kraft pulp. *Appl Environ Microbiol*, 66, 664-70.

- SZÉKELY, A. J., SIPOS, R., BERTA, B., VAJNA, B., HAJDÚ, C. & MÁRIALIGETI, K. 2009. DGGE and T-RFLP analysis of bacterial succession during mushroom compost production and sequence-aided T-RFLP profile of mature compost. *Microb Ecol*, 57, 522-33.
- TAKAKU, H., KODAIRA, S., KIMOTO, A., NASHIMOTO, M. & TAKAGI, M. 2006. Microbial communities in the garbage composting with rice hull as an amendment revealed by culture-dependent and -independent approaches. *J Biosci Bioeng*, 101, 42-50.
- TAKIZAWA, K., FUKUSHIMA, K., MAEBAYASHI, Y., OKADA, K., NISHIMURA, K. & MIYAJI, M. 1992. Isolation and structural elucidation of a dihydroubiquinone-9 from the fungus *Aureobasidium pullulans*. *FEMS Microbiology Letters*, 92, 129-132.
- TALBOT, G. & SYGUSCH, J. 1990. Purification and characterization of thermostable beta-mannanase and alpha-galactosidase from *Bacillus stearothermophilus*. *Appl Environ Microbiol*, 56, 3505-10.
- TAMARU, Y., ARAKI, T., AMAGOI, H., MORI, H. & MORISHITA, T. 1995. Purification and characterization of an extracellular beta-1,4-mannanase from a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain MA-138. *Appl Environ Microbiol*, 61, 4454-8.
- TAMARU, Y. & DOI, R. H. 2000. The *engL* gene cluster of *Clostridium cellulovorans* contains a gene for cellulosomal *manA*. *J Bacteriol*, 182, 244-7.
- TAMURA, K., STECHER, G., PETERSON, D., FILIPSKI, A. & KUMAR, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*, 30, 2725-9.
- TINDALL, B. J., ROSSELLO-MORA, R., BUSSE, H. J., LUDWIG, W. & KÄMPFER, P. 2010. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *Int J Syst Evol Microbiol*, 60, 249-66.
- TÓTH, A., BARNA, T., NAGY, I., HORVÁTH, B., NAGY, I., TÁNCICS, A., KRISZT, B., BAKA, E., FEKETE, C. & KUKOLYA, J. 2013. Draft genome sequence of the lignocellulose decomposer *Thermobifida fusca* strain TM51. *Genome Announc*, 1.

- TOURASSE, N. J., HELGASON, E., OKSTAD, O. A., HEGNA, I. K. & KOLSTO, A. B. 2006. The *Bacillus cereus* group: novel aspects of population structure and genome dynamics. *J Appl Microbiol*, 101, 579-93.
- TUOMELA, M., VIKMAN, M., HATAKKA, A. & ITÄVAARA, M. 2000. Biodegradation of lignin in a compost environment: A review. *Bioresource Technology*, 72, 169-183.
- VAN GESTEL, K., MERGAERT, J., SWINGS, J., COOSEMANS, J. & RYCKEBOER, J. 2003. Bioremediation of diesel oil-contaminated soil by composting with biowaste. *Environ Pollut*, 125, 361-8.
- VUONG, T. V. & WILSON, D. B. 2010. Glycoside hydrolases: catalytic base/nucleophile diversity. *Biotechnol Bioeng*, 107, 195-205.
- WANG, L. T., LEE, F. L., TAI, C. J. & KASAI, H. 2007a. Comparison of *gyrB* gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA-DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. *Int J Syst Evol Microbiol*, 57, 1846-50.
- WANG, L. T., LEE, F. L., TAI, C. J., YOKOTA, A. & KUO, H. P. 2007b. Reclassification of *Bacillus axarquiensis* Ruiz-Garcia *et al.* 2005 and *Bacillus malacitensis* Ruiz-Garcia *et al.* 2005 as later heterotypic synonyms of *Bacillus mojavensis* Roberts *et al.* 1994. *Int J Syst Evol Microbiol*, 57, 1663-7.
- WAYNE, L. G. 1988. International Committee on Systematic Bacteriology: announcement of the report of the ad hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A*, 268, 433-4.
- WEINER, R. M., TAYLOR, L. E., 2ND, HENRISSAT, B., HAUSER, L., LAND, M., COUTINHO, P. M., RANCUREL, C., SAUNDERS, E. H., LONGMIRE, A. G., ZHANG, H., BAYER, E. A., GILBERT, H. J., LARIMER, F., ZHULIN, I. B., EKBORG, N. A., LAMED, R., RICHARDSON, P. M., BOROVOK, I. & HUTCHESON, S. 2008. Complete genome sequence of the complex carbohydrate-degrading marine bacterium, *Saccharophagus degradans* strain 2-40 T. *PLoS Genet*, 4, e1000087.
- WILSON, D. B. 2004. Studies of *Thermobifida fusca* plant cell wall degrading enzymes. *Chem Rec*, 4, 72-82.
- WILSON, D. B. 2011. Microbial diversity of cellulose hydrolysis. *Curr Opin Microbiol*, 14, 259-63.

- WOESE, C. R., KANDLER, O. & WHEELIS, M. L. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and *Eucarya*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 4576-9.
- 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*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 58, 1821-5.
- YAO, R., WANG, R., WANG, D., SU, J., ZHENG, S. & WANG, G. 2014. *Paenibacillus selenitireducens* sp. nov., a selenite-reducing bacterium isolated from a selenium mineral soil. *Int J Syst Evol Microbiol*, 64, 805-11.
- YARZA, P., RICHTER, M., PEPLIES, J., EUZEBY, J., AMANN, R., SCHLEIFER, K. H., LUDWIG, W., GLOCKNER, F. O. & ROSSELLO-MORA, R. 2008. The All-Species Living Tree project: a 16S rRNA-based phylogenetic tree of all sequenced type strains. *Syst Appl Microbiol*, 31, 241-50.
- YIN, Y. R., ZHANG, F., HU, Q. W., XIAN, W. D., HOZZEIN, W. N., ZHOU, E. M., MING, H., NIE, G. X. & LI, W. J. 2015. Heterologous expression and characterization of a novel halotolerant, thermostable, and alkali-stable GH6 endoglucanase from *Thermobifida halotolerans*. *Biotechnol Lett*, 37, 857-62.
- YU, H., ZENG, G., HUANG, H., XI, X., WANG, R., HUANG, D., HUANG, G. & LI, J. 2007. Microbial community succession and lignocellulose degradation during agricultural waste composting. *Biodegradation*, 18, 793-802.
- ZEIGLER, D. R. 2005. Application of a *recN* sequence similarity analysis to the identification of species within the bacterial genus *Geobacillus*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 55, 1171-9.
- ZENHOM, M., HYDER, A., DE VRESE, M., HELLER, K. J., ROEDER, T. & SCHREZENMEIR, J. 2011. Prebiotic oligosaccharides reduce proinflammatory cytokines in intestinal Caco-2 cells via activation of PPARgamma and peptidoglycan recognition protein 3. *J Nutr*, 141, 971-7.
- ZHANG, F., CHEN, J. J., REN, W. Z., LIN, L. B., ZHOU, Y., ZHI, X. Y., TANG, S. K. & LI, W. J. 2012. Cloning, expression, and characterization of an alkaline thermostable GH11 xylanase from *Thermobifida halotolerans* YIM 90462T. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 39, 1109-16.

ZHANG, F., CHEN, J. J., REN, W. Z., NIE, G. X., MING, H., TANG, S. K. & LI, W. J. 2011. Cloning, expression and characterization of an alkaline thermostable GH9 endoglucanase from *Thermobifida halotolerans* YIM 90462 T. *Bioresour Technol*, 102, 10143-6.

ZHANG, F., ZHANG, X. M., YIN, Y. R. & LI, W. J. 2015. Cloning, expression and characterization of a novel GH5 exo/endoglucanase of *Thermobifida halotolerans* YIM 90462^T by genome mining. *J Biosci Bioeng*, 120, 644-9.

ZIMMERMANN, W. 1990. Degradation of lignin by bacteria. *Journal of Biotechnology*, 13, 119-130.

HTTP1: <http://compost.css.cornell.edu/science.html> (2015. december)

HTTP2: https://microbewiki.kenyon.edu/images/1/1d/Lignocellulose_structure.png
(2016. április)

HTTP3: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/> (2015. december)

HTTP4: <http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html> (2015. december)

HTTP5: <http://www.ezbiocloud.net/eztaxon> (2015. december)

HTTP6: <https://www.dsmz.de/services/services-microorganisms/identification/analysis-of-cellular-fatty-acids.html> (2015. december)

HTTP7: <https://www.dsmz.de/services/services-microorganisms/identification/analysis-of-respiratory-quinones.html> (2015. december)

HTTP8: <https://www.dsmz.de/services/services-microorganisms/identification/analysis-of-polar-lipids.html> (2015. december)

HTTP9: <https://www.dsmz.de/services/services-microorganisms/identification/dap-26-diaminopimelic-acid.html> (2015. december)

HTTP10: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok/ (2015. december)

HTTP11: <http://pfam.xfam.org/> (2015. december)

HTTP12: <http://www.ebi.ac.uk/interpro/> (2015. december)

HTTP13: <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> (2015. december)

HTTP14: <http://signalfind.org/tatfind.html> (2015. december)

HTTP15: <http://web.expasy.org/protparam/> (2015. december)

HTTP16: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/> (2015. december)

HTTP17: <http://isoelectric.ovh.org/> (2015. december)

2. MELLÉKLET

A törzsgyűjteményt alkotó fajok típusörzsei. A típusörzsekhez tartozó 16S rRNS génszekvenciáknak, illetve a genom projektek génbanki (NCBI) hivatkozási számai.

A törzsgyűjteményt alkotó fajok típusörzsei	16S rDNS szekvencia génbanki száma	A fajhoz tartozó genom projektek génbanki számai
<i>Aeribacillus pallidus</i> DSM3670	Z26930	NZ_JYCD00000000.1
<i>Bacillus aureus</i> 24K	AJ831843	
<i>Bacillus oceanisediminis</i> H2	GQ292772	NZ_ALEG00000000
<i>Brevibacillus aydinogluensis</i> PDF25	HQ419073	
<i>Brevibacillus thermoruber</i> DSM7064	Z26921	NZ_ATNE00000000.1 NZ_JQMH00000000.1
<i>Caldibacillus debilis</i> Tf	AJ564616	NZ_ARVR00000000.1 NZ_LQYT00000000.1
<i>Cellulomonas flavigena</i> DSM20109	CP001964	NC_014151.1 NZ_JVEY00000000.1
<i>Cellulomonas hominis</i> DMMZ CE40	X82598	BBHJ01000001.1
<i>Cellulosimicrobium funkei</i> ATCC BAA-886	AY501364	NZ_JNBQ00000000.1 NZ_BCSK00000000.1
<i>Geobacillus caldoxylosilyticus</i> NBRC107762	BAWO01000028	NZ_AMRO00000000.1 NZ_BAWO00000000.1 NZ_LQYS00000000.1
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> NBRC12550	AB271757	NZ_CM002692.1 NZ_CP008934.1 NZ_LDNU00000000.1 NZ_LDNS00000000.1 NZ_LDNT00000000.1 NZ_JALS00000000.1 NZ_JQCS00000000.1 NZ_JPYV00000000.1 NZ_JYNW00000000.1 NZ_LQYY00000000.1 NZ_LQYV00000000.1
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> F84b	EU477773	NC_009328.1, NZ_AYKT00000000.1
<i>Geobacillus thermoleovorans</i> BGSC96A1	AY608936	NC_016593.1 CP014336.1 NZ_BATY00000000.1
<i>Jonesia denitrificans</i> DSM20603	CP001706	NC_013174.1
<i>Paenibacillus lautus</i> NRRL NRS-666	D78473	
<i>Streptomyces cavourensis</i> NBRC13026	AB184264	
<i>Streptomyces phaeoluteigriseus</i> NRRL ISP-5182	AJ391815	
<i>Thermobifida cellulosilytica</i> TB100	AJ298058	KQ950180.1
<i>Thermobifida fusca</i> ATCC27730	AF002264	NZ_AOSG00000000.1, NC_007333.1, NZ_BCWB00000000.1
<i>Thermus composti</i> K-39	EU701067	

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Doktori munkám a Szent István Egyetem, Környezettudományi Doktori Iskola keretein belül a Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet, Környezetbiztonsági és Környezettoxikológiai Tanszékén valósulhatott meg, amiért szeretnék köszönetet mondani az ott dolgozó munkatársaknak.

Szeretném megköszönni témavezetőmnek Dr. Kukolya Józsefnek, hogy elkezdte velem, és végig támogatta doktori munkámat, egyrészt szakmai útmutatással, másrészt a hétköznapi problémák leküzdésében nyújtott segítséggel.

Köszönetet mondok Dr. Kriszt Baláznak, hogy vállalta a belső témavezetői feladatokat, illetve hogy tanszékvezetőként olyan feltételeket biztosított, amelyek nagyban megkönnyítették feladataim elvégzését.

Köszönöm a munkám során nyújtott segítséget Dr. Barna Teréziának, akitől sokat tanulhattam a fehérje vizsgálatokkal kapcsolatos munkafolyamatok során. A Debreceni Egyetem, Genetikai és Alkalmazott Mikrobiológiai Tanszék munkatársai közül külön is köszönöm Elek László és Szabó Erna segítségét.

Szeretném megköszönni Dr. Tóth Erikának és Dr. Tánicsics Andrásnak, hogy tanácsaikkal támogatták a dolgozatom elkészülését.

Hálásan köszönöm a NAIK AKK, Környezeti és Alkalmazott Mikrobiológiai Osztály dolgozóinak a munkáját, és folyamatos támogatását, amely nélkül dolgozatom nem készülhetett volna el.

Végül családomnak, és barátaimnak szeretnék köszönetet mondani a türelemért, és a bátorításért, ami végig segített a doktori munkám során, és a dolgozatom elkészítésekor.