



Szent István Egyetem

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Lignocellulóz bontó mikrobák 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 Agrárkutatói 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

Kutatási előzmények, és kitűzött célok	2
Anyagok és módszerek.....	3
Cellulóz és hemicellulóz bontó mikrobák izolálása és azonosítása	3
A mikrobák izolálása.....	3
Az izolátumok azonosítása.....	3
Új faj, új nemzetség jelölt mikrobiológiai jellemzése	3
Fenotípusos tulajdonságok vizsgálata	4
Kemotaxonómiai vizsgálatok	4
Genom analízis.....	4
<i>Thermobifida</i> endomannanázok vizsgálata	5
Endomannanáz gének klónozása.....	5
Fehérje expresszió és tisztítás.....	6
Az endomannanázok biokémiai jellemzése.....	6
Eredmények.....	7
Komposzt eredetű törzsgyűjtemény kialakítása	7
A K13 jelzésű törzs rendszertani vizsgálata	7
Genom analízisek eredményei.....	7
Három <i>Thermobifida</i> faj endomannanázának vizsgálata	9
Új tudományos eredmények.....	11
Következtetések, javaslatok	12
A témában megjelent publikációk listája	15

Kutatási előzmények, és kitűzött célok

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 akadálya, hogy rendkívül összetett, és rendezett struktúrája miatt nehezen feldolgozható. Fő összetevői a lignin, a cellulóz, és a változatos felépítésű hemicellulózok, mint amilyen a xilánok és a mannánok. A komposztokban nagyon hatékonyan történik a növényi biomassza bontása, mégpedig a 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 enzimeik 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.

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.

Anyagok és módszerek

A fejezetben leírt kitéket 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.

Cellulóz és hemicellulóz bontó mikrobák izolálása és azonosítása

A mikrobák izolálása

A mintavétel komosztok 40-80 °C-os régióiból történt. A mintákból szuszpenziót, és hígítási sorozatot készítettem. A komposztlakó baktériumokat szilárd táptalajokon izoláltam, amelyek egyedüli szénforrásként különböző formájú cellulóz, illetve hemicellulóz molekulákat tartalmaztak (kristályos cellulóz-Avicel, karboximetil-cellulóz, bükkfa-xilán, és galaktomannán-szentjánoskenyér-liszt).

Az izolátumok azonosítása

Folyadék tenyészetben megfelelő denzitást elérő biomasszát centrifugálással összegyűjtöttem, majd elvégeztem a DNS izolálást a megfelelő kit segítségével (MoBio UltraClean Microbial DNA Isolation Kit). Az izolálás eredményét (és a továbbiakban agaróz gélelektroforézissel A továbbiakban a genomi vagy PCR termék DNS termékek ellenőrzését ennek megfelelően végeztem, a megfelelő futási idő megválasztásával.

A 16S rDNS amplifikálása optimalizált PCR segítségével történt A reakcióhoz 27f-1492r univerzális *Bacteria* primereket használtam

Az amplifikált gének szekvencia analízise (a PCR termékek tisztítását, a szekvenáló reakciót és az etanolos kicsapást követően) 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, majd a kapott 16S rRNS génszakaszokat összehasonlítottam az EzTaxon adatbázisával. Az egyes izolátumok filogenetikai fán való megjelenítése szintén a MEGA4 szoftver segítségével, neighbor joining módszerrel, Kimura 2 paraméteres modell és a "pairwise deletion" opció mellett történt.

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.

Fenotípusos tulajdonságok vizsgálata

A mikroszkópikus vizsgálatok fénymikroszkóp, illetve elektronmikroszkóp segítségével történtek.

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 segítségével végeztem.

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 (<https://www.dsmz.de/services/services-microorganisms/identification.html>). A genom guanin és citozin aránya (G+C) *in silico*, a genom projekt alapján számított érték.

Genom analízis

A genom analízist célzó baktérium törzsek különböző forrásokból származnak. A *T. fusca* TM51, és a *T. cellulosilytica* TB100^T törzseket Dr. Kukolya József bocsátotta rendelkezésemre, a *T. halotolerans* JCM16012^T törzset (megegyezik a YIM90462^T törzssel) törzsgyűjteményből vásároltuk, míg a K13-as törzs saját izolátum.

A dolgozatban leírt genom projektek gyakorlati kivitelezése a következő intézetekben és szolgáltatóknál történt: MTA-SZBK, Biokémiai Intézet; Roche Magyarország Kft; Seqomics Kft. A genom projektek többféle új generációs platformon valósultak meg, úgymint SOLiD (Life Technologies), Illumina MiSeq és Roche GS Junior. A felhasznált bioinformatikai szoftverek és alkalmazások a következők voltak: Genomics Workbench 4.9 (CLC Bio), Omixon Gapped SOLiD alignment 1.3.2, Mira V 4.0.2 szoftver, NCBI Prokaryotic Genomes Automatic Annotation Pipeline, RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology).

A K13-as törzs esetében Illumina MiSeq platformon történt a szekvencia meghatározása, a *T. cellulosilytica* genom projektjéhez hasonló módszerrel.

Az annotált genomokból a kívánt információk kinyerését, illetve az annotáció manuális ellenőrzését többféle internetes adatbázis és kereső szoftver segítségével végeztem: Pfam, Interpro, SignalP, TATfind, Expasy, TMHMM.

***Thermobifida* endomannanázok vizsgálata**

A nemzetség mind a négy fajának egy-egy képviselőjével dolgoztam a vizsgálataim során. A *T. fusca* TM51, és a *T. cellulosilytica* TB100^T törzseket a laboratóriumi törzsgyűjteményből használtam, míg a *T. halotolerans* JCM16012^T, és a *T. alba* CECT3323 (szinonimaként: *T. alba* ULJB1) a japán, illetve a spanyol nemzeti törzsgyűjteményekből vásároltuk.

Endomannanáz gének klónozása

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> endomannanáz (<i>man5ATf</i>)	GGTGCCATCATATGGCCACCGGGCTCC	forward primer
	GTGCCATCTCGAGTCAGCGAGCGGTG	reverse primer
<i>T. cellulosilytica</i> endomannanáz (<i>man5ATc</i>)	GGTGCCATCATATGGCGACCGGGATCC	forward primer
	GTGCCATCTCGAGTCAGTCGACGGAGCAGGTC	reverse primer
<i>T. halotolerans</i> endomannanáz (<i>man5ATh</i>)	GGTGCCATCATATGGCCACCGGCTTC	forward primer
	GTGCCATCTCGAGTCAGTCGGTGGTG	reverse primer

A gének amplifikálását optimalizált PCR segítségével végeztem el *Pfu* DNS polimerázt használva. A tisztított PCR termékeket *NdeI* és *XhoI* restrikciós endonukleáz enzimekkel emésztettem, 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, és T4 DNS ligázt használtam.

A ligátumokkal ezután *E. coli* Top10 kompetens sejteket hősokkal transzformáltam, amelyekből 12 órás tenyésztést követően (50 µg/ml végkoncentrációban kanamicint tartalmazó LB médiumban) izoláltam az inzertet tartalmazó plazmidokat. A fehérjék expresszáálásához ezekkel a vektorokkal történt az *E. coli* BL21 (DE3) sejtek transzformálása.

Fehérje expresszió és tisztítás

A kanamicint tartalmazó folyadék LB médiumban növesztett transzformált E. coli BL21 sejtekben az expressziót IPTG-vel indukáltam, amelyet további 20 °C-on történő 12 órás rázatás követett. A biomassza lízisét követően a lizátumból 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 gradiens mellett foszfát pufferben történt. A frakciók fehérje koncentrációját csakúgy mint a továbbiakban, Bradford módszer segítségével határoztam meg. A fehérje expresszió és tisztítás sikerességét SDS-PAGE segítségével ellenőriztem.

Az endomannázok biokémiai jellemzése

Az endomannázok szubsztrát specificitását egyrészt különböző poliszacharidokkal CMC, mikrokristályos cellulóz, bükkfa xilán, galaktomannán (szentjánoskenyér-liszt) vizsgáltam, másrészt mesterséges aril-mannozid szubsztrátként 4-nitrofenil β -D-mannopiranozidot használtam. A mannanáz aktivitás meghatározásához az galaktomannánból a redukáló cukrok felszabadulását dinitro-szalicilsavas módszerrel mértem. Az enzimaktivitás különböző paramétereinek vizsgálatához összeállított reakció tipikusan a következő összetétel szerint történt: 2 mg/ml galaktomannán 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 állítottam le. Az endomannázok Michaelis-Menten kinetikai paramétereit 0,4–4 mg/ml galaktomannán szubsztrátkoncentráció mellett lettek meghatározva. Az enzimek pH függésének meghatározása pH 4-10 tartományban, a következő pufferek segítségével történt: 100 mM citrate-foszfát puffer (pH 4.0 - 6.5), 100mM 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 (Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4) 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 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.

Eredmények

Komposzt eredetű törzsgyűjtemény kialakítása

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 törzsgyűjteménynek több *Geobacillus*, *Paenibacillus*, *Bacillus*, *Brevibacillus* nemzetséghez és az *Actinomycetales* rendhez tartozó izolátum is a tagja.

A K13 jelzésű törzs rendszertani vizsgálata

A törzsgyűjtemény kialakítása során sikerült izolálnom egy törzset, amely a K13-as jelzést kapta, és amelynek a 16S rDNS szekvenciáját összehasonlítva az EZtaxon nevű adatbázisban szereplő szekvenciákkal a legnagyobb egyezés csupán 93,03% volt (*Paenibacillus montaniterrae* MXC2-2^T). 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, pálcika alakú (2-3 µm hosszú és 0,5-0,8 µm széles) Gram pozitív, aerob, spóráképző, mezofil baktérium. Az új izolátum semleges és lúgos pH tartományban erőteljesen növekedik, optimuma pH 9. Hőmérsékleti optimuma (40-45 °C) szerint mezofil szervezet, illetve 2-4 %-os sókoncentráció mellett tenyészthető. 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 kemotaxonomiai bélyegeket tekintve a törzsre jellemző az MK-7 légzési kinon dominanciája és a mezo-diaminopimelinsav megléte a sejtfalban. A rokon nemzetségek taxonómiájában meghatározó jelentőségű poláris lipid profilt tekintve a K13 a következő poláris lipideket tartalmazza (csökkenő mennyiségben): difoszfatidilglicerol, foszfatidiletanolamin, foszfatidilglicerol, foszfatidilszerin és az aminofoszfolipid. A membrán zsírsavalkotói pedig a következők: anteiso C_{15:0} (34,44 %), iso C_{16:0} (17,28 %) és a C_{16:0} (9,96 %).

Genom analízisek eredményei

Az új generációs szekvenáló módszerek elterjedésével rendkívüli mértékben megugrott a publikált prokarióta genomok száma. A genom által kódolt információk birtokában,

hatékonyabban fel lehet térképezni az egyes mikroorganizmusok metabolikus képességeit. A draft (részleges adatokkal szolgáló) 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 géneiben 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.

K13 törzs teljes genom szekvenciáját 26 kontigba sikerült összerendezni. A 4 251 364 bázispárból álló genom összesen 3937 feltételezett fehérjét kódol, amelyek között számos glikozid hidroláz (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. A katalitikus és szénhidrát kötő domének alkotta moduláris enzimek rendkívül változatos struktúrát mutatnak. A K13-as törzs sokféle cellulózkötő domén mellett, kadherin, immunglobulin-szerű domén és fibronectin részeket hordozó enzimek termelésére is képes, valamint érdekes az SHL (surface layer homology) domént tartalmazó cellulázok, xilánázok és mannanázok megjelenése.

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 xilánáz aktivitással.

A *Thermobifida* nemzetség típusfaja a *T. fusca*, amely az aerob lignocellulóz bontás egyik modellszervezete, ugyanakkor az ide tartozó többi fajnak (*T. cellulosilytica*, *T. halotolerans*, *T. alba*) is bizonyítottan jó lignocellulóz bontó képessége van. A nemzetség eddig leírt fajai közül háromnak (a *T. alba* genom szekvenálása folyamatban van) készítettük el a genom projektjét. A *T. fusca* TM51 genom projekt eredményeképpen a teljes DNS állomány szekvenciáját 88 kontigba sikerült összerendezni. Az eredmények alapján a törzs genomja 3,599,272 bázispárt és 3080 feltételezhetően fehérje gént tartalmaz. A *T. fusca* YX törzsének már korábban publikálták a genom projektjét, így lehetőség nyílt a két törzs glikozid hidroláz génjeinek az összehasonlítására. A törzs GH génkészlete megegyezik a *T. fusca* YX GH génkészletével, összesen 17 celluláz, xilánáz és mannanáz aktivitású glikozid hidrolázt kódol, amelyek 12 különböző GH családba tartoznak. 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 27 SNP-t (single nucleotide

polymorphism), és 13 aminosav cserét tártam fel, amelyek okai lehetnek egyes enzimek tulajdonságai között adódó esetleges különbségeknek.

A *T. cellulosilytica* fajból jelenleg csak egy kutináz enzimet írtak le, annak ellenére, hogy a genom projekt alapján a *T. cellulosilytica* TB100^T lignocellulóz bontó enzimeket kódoló génkészlete teljesen megegyezik a *T. fusca* esetében feltárttal. A publikált genom szekvencia lehetőséget nyújt új *T. cellulosilytica* eredetű hidrolázok tanulmányozására. A genom projekt eredményeképpen a TB100^T teljes DNS szekvenciája 4,327,869 bázispárból áll, amit 168 kontigba és 19 nagyobb egységbe (scaffold) sikerült rendezni, ezek alapján a genom 3589 feltételezhetően fehérje kódoló részt tartalmaz.

A *T. halotolerans* az egyetlen *Thermobifida* faj, amelynek típus törzsét nem komposztból, hanem egy sóbányából izolálták, ezért is érdekes volt a faj GH génkészletét összevetni más *Thermobifida* fajok lignocellulóz bontó génkészletével. A projekt alapján a JCM16012^T törzs genomja 4 123 689 bázispárból áll, amely összesen 3227 feltételezett fehérjét kódol. A lignocellulóz bontásban közvetlenül résztvevő géneket nézve nagyfokú hasonlóságot tapasztalhatunk, a másik két vizsgált *Thermobifida* fajhoz képest. 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. A *T. halotolerans* fajból eddig három celluláz enzimet és egy GH11-es endoxilanázt jellemeztek, de a genom szekvencia ismeretében újabb enzimek leírása várható.

Három *Thermobifida* faj endomannanázának vizsgálata

A *Thermobifida* nemzetség tagjainak enzimeit, elsősorban magas hőstabilitásuk miatt, jelentős ipari potenciállal rendelkeznek. Az eddig született tanulmányok azonban főként a *T. fusca* celluláz enzimrendszerére koncentrálnak, pedig a nemzetséghez tartozó többi faj enzimeit, beleértve a hemicellulázokat is, hasonló potenciállal rendelkeznek.

Munkám során a négy eddig leírt *Thermobifida* faj (*T. fusca*, *T. cellulosilytica*, *T. halotolerans* és *T. alba*) homológ endomannanáz enzimének jellemzését és összehasonlítását tűztem ki célul. A törzsgyűjteményből vásárolt *T. alba* CECT3323 törzsről vizsgálataim során bebizonyosodott, hogy valójában a *T. fusca* fajhoz tartozik, így ennek a törzsnek az endomannanázát kizártam a további kísérletekből. A három vizsgált *Thermobifida* genomban a *man5A* endomannanáz gén

más glikozid hidroláz gének (egy endoglükánáz (*cel5A*) és egy β -mannozidáz (*β man*) gén) közelében, szigetszerűen helyezkedik el.

Mindhárom mannanáz enzim (a *T. fusca* eredetű - Man5ATf, a *T. cellulosilytica* eredetű - Man5ATc, a *T. halotolerans* eredetű - Man5ATh) 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. A három enzim aminosav szekvenciái között 80% körüli hasonlóságot tapasztaltam.

A fehérjék expresszióját és tisztítását követően SDS-PAGE segítségével állapítottam meg, hogy a három vizsgált enzim molekulatömege körülbelül 50 kDa. A szubsztrát specificitást vizsgálva kijelenthető, hogy a fehérjéknek endomannáz aktivitása van, és az alkalmazott szubsztrátok (karboximetil-cellulóz, mikrokristályos cellulóz, xilán, pNp-mannopiranozid) közül csak a galaktomannán (szentjánoskenyér-liszt) hidrolízisére képesek.

Az enzimek hőmérséklet és pH függését tekintve elmondható, hogy a vizsgált katalitikus fehérjék hőmérsékleti optimuma 70-75 °C között van, amely jellemző más extracelluláris *Thermobifida* eredetű enzimekre. A Man5A fehérjék pH optimuma az enyhén lúgos tartományba (pH 7-8) esik, amely szintén megszokott a nemzetség fajaiból eddig leírt extracelluláris enzimeinél, és általában a komposztáló baktériumok között. Fontos tulajdonság, hogy a pH optimum görbék viszonylag széles sávot fednek le, különösen a Man5ATf enzim esetében.

A fehérjék kinetikai paramétereinek meghatározásakor a Michaelis-Menten kinetika elveit követtem. A katalitikus konstansban (k_{cat}) kifejezett enzim aktivitás szintén nagyon hasonló a három enzim esetében (Man5ATf-122±11 s⁻¹, Man5ATc-89±5 s⁻¹, Man5ATh - 78±9 s⁻¹). Az eredmények alapján azonban elmondható, hogy a Man5ATf enzimnek van a legkisebb affinitása az LBG szubsztráthoz (legmagasabb K_M érték), valamint a *T. cellulosilytica* és a *T. halotolerans* β -(1,4)-endomannánázainak körülbelül másfélszer akkora a katalitikus hatékonysága (k_{cat}/K_M).

Az enzimek összehasonlításában a legváratlanabb különbségek a hőstabilitások vizsgálatokor adódtak. A nagy szekvencia hasonlóság ellenére, meglepően eltérő volt az enzimek 60 és 70 °C-on mért hőstabilitása. 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 endomannánáz fél óra alatt szinte teljesen elveszíti aktív térszerkezetét. A mérések alapján a Man5ATf a legrobosztusabb enzim, míg a legkisebb hőstabilitása a Man5ATh enzimnek van.

Új tudományos eredmények

I tézis: Eddig ismeretlen, új fajként, új nemzetségként leírható mikroba törzs izolálása, annak klasszikus és molekuláris taxonómiai leírása. A komposztból izolált K13 jelzésű törzs a tenyésztési 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.

Következtetések, javaslatok

A komposzt eredetű baktérium izolátumokból létrehozott törzsgyűjtemény tagjai, a komposztok lignocellulóz bontó mikrobaközösségeinek jellemző nemzetségeihez illetve fajaihoz tartoznak. Egy 2033-ban publikált összegző tanulmányban több mint 150 különböző faj komposztban való megjelenését számolták össze irodalmi adatok alapján. Az általam tenyésztett 64 izolátum összesen 21 fajhoz tartozik, ami nagy számnak mondható, az izolálás szelektív jellegét (cellulóz és hemicellulóz tartalmú táptalajok, 40 °C feletti tenyésztési hőmérséklet) tekintve. Összességében a tenyésztési 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.

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. A K13 tartalmazza a *Paenibacillaceae* család több csoportjára és a *Bacillus* nemzetségre is jellemző difoszfatidilglicerol, foszfatidiletanolamin és foszfatidilglicerol molekulákat, de egyedi bélyegként megjelenik a foszfatidilszerin 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. A K13 törzs jellemzésekor kapott eredmények alátámasztják, hogy a törzs új faj és új nemzetség típus törzse 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.

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. cellulositytica* TB100^T, *T. halotolerans* JCM16012^T és a K13 törzs esetében is részleges adatokkal szolgáló (draft) genom szekvencia áll jelenleg rendelkezésre, amelyek mély genomikai vizsgálatokhoz csak korlátozottan elégségesek, de egyes cél gének megkeresésére, és bizonyos anyagcsere potenciál feltérképezésére tökéletesen alkalmasak.

A *Thermobifida* fajok eddig ismert három genom szekvenciája alapján a nemzetség tagjainak GH gén készlete nagyban hasonlít. A *T. fusca* és a *T. cellulositytica* ugyanazokkal a lignocellulóz bontó enzimeket kódoló génekkel rendelkezik. A *T. halotolerans* esetében, az eltérő habitat (a nemzetséghez tartozó fajok közül egyedülként nem komposztból, hanem egy sóbányából izolálták a típus törzset) ellenére is csak kis eltérések mutatkoznak a másik két *Thermobifida* fajhoz képest. 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 hidrolízisben szerepet játszó gének aránya (15 darab), amelyek rendkívül változatos GH családokba tartoznak, így a későbbiekben ez a törzs akár az aerob xilán bontás modellszervezetévé is válhat.

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.

Munkám utolsó szakaszaként három *Thermobifida* faj GH5-ös családba tartozó homológ endomannanáz enzimét jellemeztem és hasonlítottam össze. Ezek a *T. fusca* Man5ATf, a *T. cellulositytica* 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. Ennek megfelelően következtetésként levonható, hogy jelenleg nincs leírt enzim a *T. alba* fajból, a XylA endoxilanáz enzimről beszámoló eddigi tanulmányokban valójában *T. fusca* enzimet vizsgáltak.

A vizsgált három enzimgén genomi lokalizációja nagyon hasonló, a *man5A* gén közelében egy celluláz (*cel5A*) és egy mannozidáz (*βman*) gént is lehet azonosítani. 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. Az enzimek vizsgálata során egyező szubsztrát specifitást, illetve hasonló pH és hőmérséklet optimumokat tapasztaltam. A Man5A enzimek csak a galaktomannán szubsztráton voltak aktívak a vizsgált poliszacharidokon és a pNp-mannopiranozidon tesztelve. A pH optimumokat tekintve elmondható, hogy viszonylag széles és enyhén lúgos tartományban aktívak (pH 7-8). Ezzel az enyhén savas pH optimummal a *thermobifida* endomannanáz enzimek egy különálló alcsoportját képezik a GH5-ös endomannanázoknak. A hőmérsékletfüggés tekintetében az általam vizsgált három enzimről elmondható, hogy magas hőmérsékleti optimummal (70-75 °C) rendelkeznek. Az irodalmi adatok alapján az eubaktériumok közül csak a *Caldibacillus cellulovorans*, illetve a *Thermotoga neapolitana* nevű archeon termelnek olyan endomannanáz enzimeket, amelyek szignifikánsan magasabb hőmérsékleti optimummal (85 °C) rendelkeznek. 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±0,12 mg/ml) az galaktomannán szubsztráthoz. Az *Aspergillus niger BK01* és a *Bacillus sp. MG-33* eredetű endomannanázok esetében számol be az irodalom ennél magasabb affinitásról, de az irodalmi adatok többnyire a Man5ATc esetében tapasztaltnál magasabb K_M értékeket írnak le.

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. 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.

Összességében elmondható, hogy a három vizsgált endomannanáz enzim a legtöbb biokémiai jellemzőt tekintve hasonlít egymásra, azonban a nagyfokú aminosav szekvencia hasonlóság ellenére markáns eltéréseket tapasztaltam a fehérjék hőstabilitását vizsgálva.

Korábbi kutatási eredmények azt mutatják, 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.

A dolgozatomban bemutatott eredményekhez szervesen kapcsolódva a *T. fusca* TM51 törzs endomannanáz (Man5ATf) gyakorlati felhasználásának lehetőségeit vizsgáló kísérletek megkezdődtek a tavalyi év folyamán.

A témában megjelent publikációk listája

Folyóiratcikkek:

Tóth Á, Baka E, Luzics Sz, Bata-Vidács I, Nagy I, Bálint B, Herczeg R, Olasz F, Wilk T, Nagy T, Kriszt B, Nagy I, Kukolya J. (2015) Plant polysaccharide degrading enzymic system of *Thermobifida cellulositytica* TB100^T revealed by *de novo* genome project data. *Acta Alimentaria* DOI: 10.1556/066.2016.0014

Tóth Á, Barna T, Nagy I, Horváth B, Nagy I, Táncsics A, Kriszt B, Baka E, Fekete Cs, Kukolya J. (2013) Draft genome sequence of the lignocellulose decomposer *Thermobifida fusca* strain TM51. *Genome Announc* 1(4): e00482-13

Kongresszusi kiadványokban megjelent közlemény:

Tóth Á, Kriszt B, Baka E, Táncsics A, Nagy I, Horváth B, Stágel A, Fekete Cs, Kukolya J. (2013) Genome sequence of *Thermobifida halotolerans* type strain (YIM 90462T). *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 60 (Suppl.): p. 100. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2012. évi Nagygyűlése. Keszthely, Magyarország: 2012.10.24 -2012.10.26.

Luzics Sz, Tóth Á, Baka E, Varga S, la Riccia C, Bata-Vidács I, Szabó L, Schumann P, Tóth E, Kukolya J. (2015) *Xylanobacillus xylanolyticus* gen. nov., sp. nov., a moderately thermophilic species within the family *Paenibacillaceae*. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 62 (Suppl.2): p. 179. 17th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology. Budapest, Hungary: 2015.07.8. -2015.07.10.

Wilk T, Nagy T, Barta E, Olasz F, Bálint B, Herczeg R, Nagy I, Tóth Á, Luzics Sz, Kukolya J. (2015) De novo genome project of the polysaccharide degrader bacterium *Xylanobacillus xylanolyticus* gen. nov., sp. nov. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 62 (Suppl.2): pp. 240-241. 17th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology. Budapest, Hungary: 2015.07.8. -2015.07.10.

Tóth Á, Szabó E, Elek R, Hubert Á, Nagy I, Kriszt B, Táncsics A, Nagy I, Barna T, Kukolya J. (2015) Cloning, expression and biochemical characterization of endomannanases from three different *Thermobifida* species. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 62 (Suppl.2): p. 231. 17th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology. Budapest, Hungary: 2015.07.8. -2015.07.10.