

A *Trichoderma reesei* fonalas gomba laktóz és D-galaktóz anyagcseréje: kapcsolat a celluláz enzimek termelődésével

A fungális celluláz illetve hemicelluláz enzimek fermentációs úton történő előállítása az ipari biotechnológia legfontosabb folyamatai közé tartozik. A fermentációs ipari gyakorlatban a tömlősgombák (*Ascomycetes*) közé tartozó *Trichoderma reesei* (teleomorfa: *Hypocrea jecorina*) fonalas gombát használják celluláz termelésre. A *Trichoderma/Hypocrea* fonalas gombanemzetség számos olyan törzset tartalmaz, mely enzimek, antibiotikumok, xenobiotikumok és kereskedelmi forgalomban is kapható biofungicidek termelőjeként vált ismerté. A legjobban termelő *T. reesei* törzsek 100 g/L-t meghaladó koncentrációban képesek extracelluláris fehérjét kiválasztani, és ezt a mennyiséget jórészt (mintegy 90 %-ban) cellulázok illetve hemicellulázok teszik ki.

A nagy mennyiségű kiválasztott enzim felkeltette az érdeklődést egyes *T. reesei* celluláz promóterek, mint pl. a cellobiohidroláz I és II gén expresszióját szabályozó *cbh1* és *cbh2* iránt is. Ezek a promóterek ugyanis elvileg felhasználhatók heterológ fehérjék transzkripciójának szabályozására is. Heterológ fehérjék a *T. reesei*-ben azonban gazdaságosan egyelőre nem termelhetők. A bizonyított okok közé tartozik a termelt fehérjék összerendeződésének ('folding') és érésének ('maturation') zavarai, valamint a túltermeléshez vezető szénforrás hiánya. Ez utóbbi probléma – kisebb mértékben – a cellulázok illetve hemicellulázok előállításánál is jelentkezik. A legerősebben indukáló, cellulóz tartalmú, részlegesen vízdékony hidrolizátumok ugyanis olyan maradványokat tartalmaznak, melyek megnehezítik a keletkezett fehérjék tisztítását. Emiatt jelenleg a laktóz az egyetlen szénforrás, mely gyakorlatban is alkalmazható cellulázok, hemicellulázok illetve (egyenelőre kísérleti üzemi léptékben) rekombináns fehérjék termeltetésére.

Mint említettük, a laktóz olcsó és megújuló szénforrás a mikrobiális fermentációk számára. Igazán hatékony kihasználását (mint szénforrás és mint celluláz inducer) azonban gátolja lassú hasznosulása, és az, hogy laktóz tartalmú táptalajon a *T. reesei* celluláz produkciója gyengébb mint a cellulózt tartalmazón. A *T. reesei* laktóz anyagcseréjének, valamint a celluláz és hemicelluláz enzimek képződését elősegítő mechanizmus(ok)nak a molekuláris szintű ismerete nyilvánvalóan elősegíti a laktóz hatékonyabb felhasználását, mely idővel a termelési értékek növekedésében is jelentkezne.

Ezirányú jelenlegi kutatásaink:

A szekunder metabolizmus kifejezést olyan anyagcsereutak és termékek esetében használjuk, melyek nem feltétlenül szükségesek a sejt illetve az élőlény fennmaradása szempontjából. A szekunder metabolitok jellemzően a gomba növekedési szakaszának befejeződése után, a spóráképzési szakasz kezdetén keletkeznek. Az *Aspergillus* gombagenus esetében bebizonyították, hogy a szekunder metabolizmushoz szükséges enzimeket kódoló gén-klaszterek epigenetikus szabályozás alatt állnak; ezt a felső szintű szabályozást a LaeA nevű metiltranszferáz enzim végzi azáltal, hogy visszaalakítja azokat a represszív heterokromatin struktúrákat, melyek a hiszton 3A fehérje K9 alegységének metilálása illetve a HepA nevű heterokromatin fehérje hiszton 3A-hoz kötődésre révén alakulnak ki. Ebből következően a LaeA a szekunder anyagcsere egyik meghatározó szabályozója *Aspergillusok*-ban. Mivel a szekunder metabolitok közé számos kereskedelmileg jelentős termék tartozik, a

LaeA homológjai – melyekről ma már tudjuk, hogy a többsejtű aszkomikóta gombákban általánosan jelen vannak – komoly célpontjai lehetnek a gomba eredetű metabolitok ipari termelését megcélzó fejlesztéseknek.

A *T. reesei* genom adatbázisában valóban megtalálták (a Trire2: 41617 fehérje képében) a feltételezett LaeA ortológot; neve LAE1. Annak kiderítésére, hogy ez az epigenetikus szabályozó fehérje pontosan milyen szerepet játszik a szekunder anyagcserében, együttműködő partnereink létrehozták a *T. reesei lae1* nullmutánst ($\Delta lae1$) illetve a *lae1* túltermelő mutánst (*tefl::lae1*). A szekunder metabolitok képződése azonban erősen függ a termelő organizmus fizikai és kémiai környezetétől, mindenek előtt azonban a sejtek specifikus növekedési rátájától. A szekunder anyagcsere vizsgálata ezért szigorúan kontrollált tenyésztési körülményeket igényel.

Ahhoz, hogy a fenti problémát megfelelően kezelhessük, kutatásaink során kemosztát típusú folytonos fermentációs rendszert tervezünk használni. Korábban bebizonyítottuk, hogy definiált hígítási (= specifikus növekedési) rátán, kizárólagos limitáló szénforrásként glükózt használva lehetséges szimulálni egy *T. reesei* batch tenyészet gyors növekedési szakaszát ($D = 0.080 \text{ h}^{-1}$), lassú növekedési szakaszát ($D = 0.040 \text{ h}^{-1}$) és a stacioner fázisát ($D = 0.020 \text{ h}^{-1}$) is. A többi fontos fermentációs paraméter (hőmérséklet, kémhatás, oldott oxigén szint) szabályozásával, steady-state állapotban lehetővé válik a különbségtétel a LAE1 szabályozó hatása és a gomba specifikus növekedési rátájának illetve más, a génkifejeződést befolyásoló környezeti paramétereknek a hatása között.

A fentebb leírt kísérleti rendszer képes arra, hogy egyértelműen azonosítson olyan géneket, melyek közvetlenül vagy közvetve a LAE1 hatása alatt állnak. Emiatt genomszintű megközelítést fogunk alkalmazni, melynek során a *T. reesei* összes (9130 db) egyedi alléljét tartalmazó DNS-mikrochip segítségével fogjuk vizsgálni a glükózon, mint limitáló szubsztrátumon, definiált specifikus növekedési rátán átíródó transzkriptumot. A DNS-chip adatainak megbízhatóságát véletlenszerűen kiválasztott, de különböző csoportokba tartozó gének Real-Time PCR-rel történő kifejeződés-vizsgálata során fogjuk leellenőrizni.

A kutatás stratégiai célja tehát a *T. reesei* genom felosztása LAE1-függő, LAE1-független illetve specifikus növekedési ráta-függő és attól független csoportokra. A *T. reesei* gomba élettanának alaposabb megismerésén túl a létrejövő adatbázis segítségével szolgálhat a biotechnológiai célú törzsfélesztő programok számára is.

Tanszéki résztvevők:

- Dr. Fekete Erzsébet
- Dr. Karaffa Levente
- Fekete Éva
- Schweitzer Gábor György (II. évf. Biomérnök MSc)

Együttműködő partnerek:

- Research Area Biotechnology and Microbiology, Institute of Chemical Engineering, TU Wien, Austria, Christian P. Kubicek professzor csoportja.
- Roche (Magyarország) Kft. (Dr. Stágel Anikó)

A témához kapcsolódó publikációink:

1) Seiboth B, **Karaffa L**, **Sándor E**, Kubicek CP (2002): The *Hypocrea jecorina gal10* (UDP-glucose 4-epimerase-encoding) gene differs from yeast homologues in sequence, genomic organization and expression. *Gene*, 295: 143-149.

Impakt faktor: 2.778

2) Seiboth B, Hartl L, Pail M, **Fekete E**, **Karaffa L**, Kubicek CP (2004): The galactokinase of *Hypocrea jecorina* is essential for cellulase induction by lactose but dispensable for growth on D-galactose. *Molecular Microbiology*, 51: 1015-1025.

Impakt faktor: 5.959

3) **Karaffa L**, **Fekete E**, Gamauf C, **Szentirmai A**, Kubicek CP, Seiboth B (2006): D-Galactose induces cellulase gene expression in *Hypocrea jecorina* at low growth rates. *Microbiology-SGM*, 152: 1507-1514.

Impakt faktor: 3.139

4) **Fekete E**, **Karaffa L**, Kubicek CP, **Szentirmai A**, Seiboth B (2007): Induction of extracellular β -galactosidase (*Bgal*) formation by D-galactose in *Hypocrea jecorina* is mediated by galactitol. *Microbiology-SGM*, 153: 507-512.

Impakt faktor: 3.110

5) **Fekete E**, Seiboth B, Kubicek CP, **Szentirmai A**, **Karaffa L** (2008): Lack of aldose-1 epimerase in *Hypocrea jecorina* (anamorph *Trichoderma reesei*): a key to cellulase gene expression on lactose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, 105: 7141-7146.*

Impakt faktor: 9.380

* A közlemény 2009-ben elnyerte a Debreceni Egyetem Publikációs Díját.