

GÖDÖLLŐI AGRÁRTUDOMÁNYI EGYETEM
MEZŐGAZDASÁGTUDOMÁNYI KAR
Kémia és Biokémia Tanszék

Bakteriális O-glikozil hidrolázok izolálása, tisztítása és jellemzése



Fülöp László



Gödöllő
1998

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK	4
BEVEZETÉS	5
I. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	6
I.1. A POLISZACHARIDOK FELÉPÍTÉSE, SZERKEZETE	6
I.2. A POLISZACHARIDOK ENZIMATIKUS HIDROLÍZISE	10
I.2.1. A katalízis mechanizmusa	10
I.2.2. O-glikozil hidrolázok	12
I.2.3. Az enzimek biokémiai, molekuláris biológiai jellemzése	14
I.2.3.1. Cellulázok	14
I.2.3.2. Hemicellulázok	18
I.2.3.2.1. Xylanázok	18
I.2.3.2.2. Mannanázok	20
I.2.3.3. Egyéb fontosabb enzimek	21
I.3. A <i>CELLULOMONAS</i> GENUS	22
II. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	24
II.1. MIKROORGANIZMUSOK	24
II.2. TÁPOLDATOK, TÁPTALAJOK, ANYAGOK ÉS PUFFEREK	25
II.3. MIKROBIOLÓGIAI MÓDSZEREK	28
II.3.1. Cellulózbontó baktériumok izolálása	28
II.3.2. A baktériumok azonosítása	28
II.3.2.1. Elektronmikroszkópos vizsgálat	28
II.3.2.2. (G + C) mol% meghatározása	29
II.3.3. Enzimtermelés vizsgálata különböző szénforrásokon	29
II.3.4. A baktérium szaporodás és enzimtermelés optimalizálása	29
II.3.4.1. A baktérium szaporodásának mérése	29
II.3.4.2. A baktérium fermentálása	29
II.4. BIOKÉMIAI MÓDSZEREK	30
II.4.1. Enzimek preparálása	30
II.4.1.1. Preparálás az izolált baktériumokból	30
II.4.1.1.1. A "szabad" cellulázok preparálása	30
II.4.1.1.2. Cellulózhoz kötött cellulázok preparálása	30
II.4.1.1.3. Baktérium sejthez kötött cellulázok preparálása	31
II.4.1.2. Preparálás rekombináns <i>E. coli</i> -ból	31
II.4.2. Enzimek tisztítása	32
II.4.2.1. Gélkromatográfia	32
II.4.2.2. Affinitáskromatográfia	32
II.4.2.3. Ioncserélő kromatográfia	32
II.4.2.4. FPLC	32
II.4.3. Fehérjekoncentráció meghatározása	33
II.4.4. Fehérjék vizsgálata poliakrilamid gélelektroforézissel	33
II.4.4.1. Az enzimek kimutatása	33
II.4.4.2. Az enzimek molekulatömegének meghatározása	33
II.4.5. pH és hőoptimum meghatározása	34
II.4.6. Színes szubsztrátok készítése	34
II.4.6.1. Blue-CMC előállítása és tisztítása	34
II.4.6.1. Blue-mannán előállítása és tisztítása	34

II.4.7. Enzimaktivitás meghatározása	35
II.4.7.1. Enzimaktivitás mérése színes szubsztráttal	35
II.4.7.1.1. <i>Celluláz aktivitás mérése</i>	35
II.4.7.1.2. <i>Xylanáz aktivitás mérése</i>	35
II.4.7.1.3. <i>Mannanáz aktivitás mérése</i>	35
II.4.7.2. Enzimaktivitás mérése redukáló cukor meghatározásával	35
II.4.7.3. β -glükózidáz meghatározása p-nitrofenil- β -D-glükóziddal	35
II.4.7.4. Cellobiozidáz meghatározása p-nitrofenil- β -D-cellobioziddal	36
II.4.7.5. Enzimaktivitás meghatározása CMC tartalmú agar lemezen	36
II.4.8. Az enzimek szubsztrátspecifitásának meghatározása	36
II.4.9. Cellulóz-kötő domén vizsgálata	36
II.5. MOLEKULÁRIS GENETIKAI MÓDSZEREK	37
II.5.1. DNS tisztítása, koncentrációjának mérése	37
II.5.1.1. Plazmid DNS tisztítása	37
II.5.1.2. Genom DNS tisztítása	37
II.5.1.3. DNS koncentráció mérése	38
II.5.2. Génkönyvtár készítés	38
II.5.3. Az aktív klónok szelektálása a könyvtárból	39
II.5.4. A celluláz és xylanáz aktív klónok restriktációs térképezése	39
II.5.5. DNS elválasztás agaróz gélelektroforézissel	39
II.5.6. A DNS szekvenálás	39
II.6. FEHÉRJÉK ÖSSZEHASONLÍTÁSA, MODELLEZÉSE	40
III. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK	42
III.1. AZ IZOLÁLT BAKTÉRIUMOK	42
III.1.1. A baktériumok izolálása	42
III.1.2. A baktériumok tulajdonságai és azonosításuk	43
III.1.3. Az izolált baktériumok fermentálása	49
III.2. A SZÍNES SZUBSZTRÁTOK	52
III.2.1. Színes szubsztrátok készítése	52
III.2.2. Enzimaktivitás meghatározása színes szubsztráttal	53
III.2.3. Tesztelés színes szubsztráttal	54
III.3. ENZIMEK KARAKTERIZÁLÁSA	56
III.3.1. Fehérje és enzimaktivitás detektálása gélelektroforézis után	56
III.3.2. Az enzimek jellemzése	57
III.4. GENETIKAI MANIPULÁCIÓ	64
III.4.1. A génkönyvtár	64
III.4.2. A pC72 fizikai térképezése	66
III.4.3. A CEGA tisztítása, karakterizálása	67
III.4.4. A pX74 fizikai térképezése, a CEXA tisztítása, jellemzése	69
III.4.5. A CEGA szekvenciája	72
III.5. A CEGA MÁSODLAGOS SZERKEZETE, MODELLEZÉSE	79
IV. ÖSSZEFOGLALÁS - SUMMARY	84
V. IRODALOM	89
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	102

RÖVIDÍTÉSEK

AG-PAS	Ezüst-perjódsav Shiff reagens
Ap	Ampicillin
CBB	Coomassie Brilliant Blue
CBD	Cellulóz kötő domén
CBH	Cellobihidroláz
CD	Katalitikus domén
<i>cegA</i>	<i>Cellulomonas</i> endoglükanáz A gén
CEGA	<i>Cellulomonas</i> endoglükanáz A
<i>cexA</i>	<i>Cellulomonas</i> endoxylanáz A gén
CEXA	<i>Cellulomonas</i> endoxylanáz A
CFE	Sejtmentes kivonat, Cell Free Extract
CMC	Karboximetil-cellulóz
DNSA	Dinitro-szalicilsav
Dv	Desztillált víz
EDTA	Etilén-diamin-tetra-ecetsav
EG	Endoglükanáz
EtBr	Etidium-bromid
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatograph
Gu-HCl	Guanidin hidroklorid
IPTG	Izopropil- β -D-tiogalaktozide
NCAIM	National Collection of Agricultural and Industrial Microorganism
PAGE	Poliakrilamid gélelektroforézis
PMSF	Fenil-metil-szulfonil-fluorid
RBB	Remazol Brilliant Blue
RBB-O-CMC	Remazol Brilliant Blue-O-karboximetil-cellulóz
RBB-O-mannán	Remazol Brilliant Blue-O-galaktomannán
RBB-O-xylán	Remazol Brilliant Blue-O-xylán
SDS	Nátrium-dodecil-szulfát, lauril-szulfát
TRIS	Trisz-hidroximetil-amino-metán
X-Gal	5-bromo-4-kloro-3-indoil- β -D-galaktozid

BEVEZETÉS

A növényi sejtfalat alkotó poliszacharidok a Föld legnagyobb mennyiségben előforduló szerves molekulái. Lebontásuk és hasznosításuk éppen ezért nagyon fontos. Ezen poliszacharidok lebontása óriási jelentőségű ipari, mezőgazdasági és környezetvédelmi szempontból is. A növényi sejtfalban felhalmozódó poliszacharidok energiatartalma 640 millió tonna nyersolajnak felel meg évente (Coughlan, 1985). Ez a megújítható energiaforrás a napenergián és a növények széndioxid fixációján alapul. A hemicellulázokat és cellulázokat takarmány-kiegészítőként is alkalmazzák a bendős és az egyszerű gyomrú állatoknál, mert a növényi sejtfal lebontásával a tápanyagok jobban feltáródnak és jobb a hasznosításuk (Gilbert és Hazlewood, 1991). Ezenkívül a hemicellulázok alkalmazása a papíriparban a legnagyobb költséget és környezeti veszélyt jelentő klórvegyületek felhasználását akár 90%-kal is csökkentheti (Clark és *mtsi.*, 1989).

A növényi sejtfalat alkotó poliszacharidok két nagy csoportra oszthatók, cellulózra és hemicellulózra. A cellulózt bontó enzimek a szubsztrát kémiai hozzáférhetetlensége miatt nagyon kis aktivitással rendelkeznek más enzimekhez, enzimrendszerekhez viszonyítva (Mandels, 1985). A hemicellulózbontó enzimek a szubsztrát felépítéséből adódóan nagyságrenddel nagyobb aktivitással működnek, mint a cellulázok. A hemicellulázok közül elsősorban a xylanázok vizsgálata indult meg leginkább, a nyilvánvaló ipari haszon miatt a papírgyártásban (Clark és *mtsi.*, 1989). A hemicellulózban a xylánon kívül a második legfontosabb komponens a mannán. A mannanázok molekuláris biológiájáról, struktúrájáról és működéséről azonban nagyon kevés adat áll rendelkezésünkre.

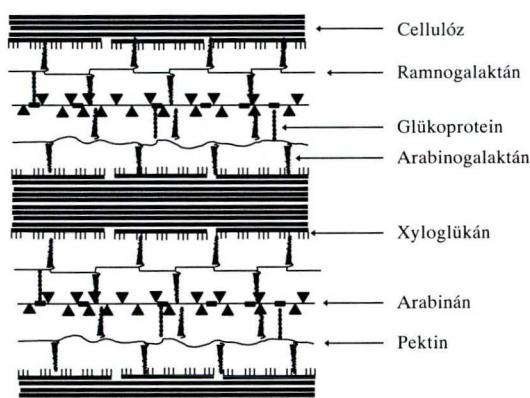
Célkitűzésünk:

- i) Olyan baktérium izolálása, mely jól bontja a cellulózt, valamint rendelkezik a sejtfal bontásához szükséges egyéb enzimekkel is
- ii) A baktérium jellemzése, meghatározása, azonosítása
- iii) A baktérium által termel cellulázok (hidrolázok) tisztítása, biokémiai jellemzése
- iv) Az izolált baktérium celluláz (hidroláz) enzimeit kódoló gének klónozása, expressziója, a géntermék tisztítása, jellemzése
- v) A gén szekvenálása, a fehérje modellezése

I. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

I.1. A POLISZACHARIDOK FELÉPÍTÉSE, SZERKEZETE

A poliszacharidok igen elterjedtek mind a növény- mind az állatvilágban. A felépítésükben résztvevő monoszacharidok vagy α -, vagy β -glikozidos kötésekkel kapcsolódnak össze. Az α -glikozidos kötések tartalmazó poliszacharidok elsősorban energiaraktározó szerepet töltenek be, a β -glikozidos kötések tartalmazók viszont szilárdító, védekező vázanyagok. A keményítő α -glikozidos kötések tartalmaz, amilózból és amilopektinből áll, előbbiben a glükóz molekulák között kizárólag α -1,4 kötések találhatók, míg az utóbbiban az α -1,4 kötések kívül α -1,6 kötések is előfordulnak. Hasonló α -1,4 és α -1,6 kötések találhatók az állatvilágban elterjedt glikogénben. A β -glikozidos kötésekkel felépülő poliszacharidok a mikroorganizmusokban található dextránok, glükánok, galaktánok, xylánok, mannánok (β -1,2-; β -1,3-; β -1,4-; β -1,6-glikozidos kötések tartalmaznak), a rovarok páncélját alkotó kitin (β -1,4 kötésekkel felépülő N-acetilglükózamin) és a növényi inulinok (β -1,2 kötésekkel felépülő fruktóz) mellett elsősorban a növények sejtfalában találhatók.

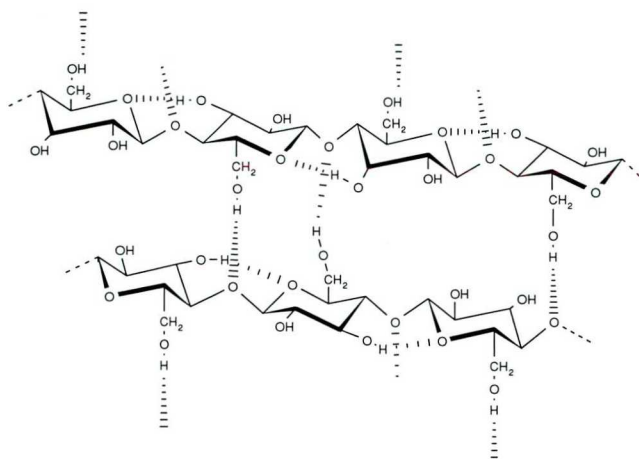


1.ábra Az elsődleges növényi sejtfal vázlatos szerkezete (Carpita és Gilbeaut, 1993).

Kémiai szempontból a növények sejtfalát három fő anyagféleség építi fel: cellulóz, hemicellulóz és lignin. E három fő alkotórészen kívül a növények kisebb nagyobb mértékben tartalmaznak egyéb anyagokat is, amelyek jelentősen befolyásolják a növények, különösen a fa tulajdonságait. Ezek a járulékos anyagok: hamu (ásványi alkotórészek), gyanták és zsírok, tanninok (cserzőanyagok), színezőanyagok, proteinek és alkaloidák.

A virágos növények elsődleges sejtfalának modelljében a xyloglükán monoréteg hidrogénhíd kötésekkel kapcsolódik a cellulóz mikrofibrillumokhoz. A szomszédos mikrofibrillumokat kovalens kötések kapcsolják össze a következő módon: a xyloglükán kapcsolódik az arabinogalaktánhoz, az arabinogalaktán a pektinhez, végül a pektin a hidroxiprolinban gazdag glikoproteinhez (1.ábra). A ramnogalaktán tovább kapcsolódhat arabinán galaktán és arabinogalaktán részekhez (Carpita és Gilbeaut, 1993).

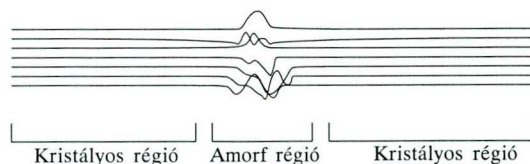
A növények szerves anyagának jelentős részét a **cellulóz** alkotja, a lágyszárú növények 25-30 %-át, az érett fa 40-50 %-át, a gyapot 98 %-át (Brett és Waldron, 1990). A cellulóz



2.ábra A cellulóz molekula szerkezete.

egy lineáris polimer, mely β -1,4-glükozidos kötéssel kapcsolódó β -D-glükóz egységekből áll. A szomszédos glükóz molekulák 180° -os orientáltságúak, az ismétlődő egység a cellobióz (2.ábra). A hidrogénhid kötés segít mind a glükozidos kötések-nél, mind a molekulák között a cellulóz molekula rideg, merev szerkezetének fenntartásában és az oldhatatlanság előidézésében (Carpita és Gilbeaut, 1993). Ha

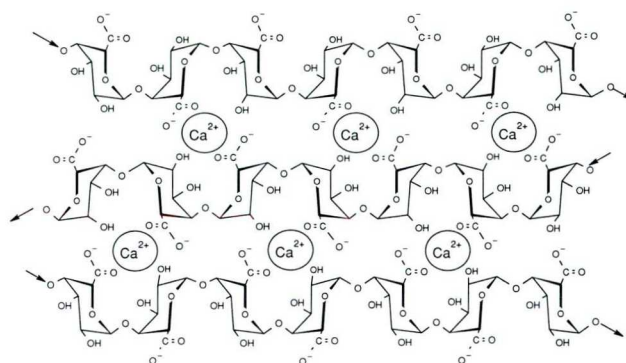
egyedül a glikozidos kötés hasad el, akkor a hidrogénhidak fenntartják a térbeli szerkezetet, mely elég a glükozidos kötés visszaalakulásához. A szomszédos molekulák összekapcsolódnak hidrogénhid kötések és a van der Waal's féle erők segítségével, s ennek eredményeként párhuzamos soraik alkotják a cellulóz rostok kristályos struktúráját (3.ábra). A cellulóz láncok cellulóz rostokká alakulnak a hidrogénhidak és a Van der Waal's féle erők eredményeként, s a rostokban a kristályos régiókat amorf régiók szakítják meg (Béguin és mtsi, 1987). Mivel a cellulóznak, mint megújítható energiaforrásnak jelentős része ipari, városi és mezőgazdasági hulladékként jelenik meg, fontos, hogy megértsük azokat a fizikai, kémiai és ökológiai tényezőket, amelyek lebontására hatnak. A cellulóz felépítéséből és a természetben betöltött szerepéből következik, hogy igen ellenálló vegyület. Természetes állapotban (növényi sejtfal) hidrolízisét számos tényező befolyásolja, elsősorban a többi sejtfal-alkotóval kialakított szoros kapcsolat (1.ábra).



3.ábra A cellulóz rostok szerkezete.

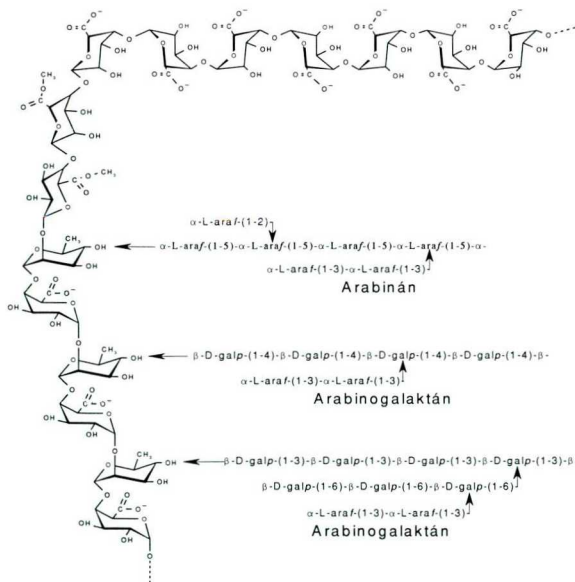
A cellulózon kívül β -glükozidos kötéssel felépülő glükóz polimer a lichenin, mely a *Cetraria islandica* nevű zuzmó termelte tartaléktápanyag. A β -1,4 kötés mellett β -1,3 kapcsolat is megtalálható benne. Egyéb β -glükánt számos mikroorganizmus termel. A *Laminaria digitata* tengeri algában található a laminarin, mely kizárólag β -1,3-glükozidos kötésekkel tartalmaz.

A hemicellulózok közül a **xylán** szerkezete igen hasonló a cellulózához, a különbség mindössze csak annyi, hogy a cellulóz hidroximetil csoportja helyett a xylánban hidrogén található. A xylánok β -D-xylózból elsősorban 1,4- β -D-xylozidos kötések létrejöttével épülnek fel, ritkábban 1,3- β -D-xylozidos kötésekkel kapcsolódó β -D-xylóz elágazásokat is tartalmaznak. Tisztán β -1,3 kötést csak tengeri algákban találtak (Dekker és Richard, 1976). A keményfa 10-35%-át, a puhafa 10-15%-át xylán alkotja (Coughlan és Hazlewood, 1993). A xylán az



4. ábra A poligalakturonsav szerkezete. A három antiparallel lefutású láncot a nem észterezett savcsoporton keresztül Ca^{2+} ionok kapcsolják össze.

α -1,2 kötéssel kapcsolódó glükuronsavval ill. metilglükuronsavval, mint xyloglükán, az α -1,3 és α -1,5 kötéssel kapcsolódó α -L-arabinofuranózzal, mint arabinoxylán (elsősorban a puhafában és a fűfélékben) vesz részt az elsődleges sejtfal felépítésében (1. ábra). A xylánokban a xylóz második hidroxil-csoportja ~70%-ban acetil csoporttal van észteresítve.



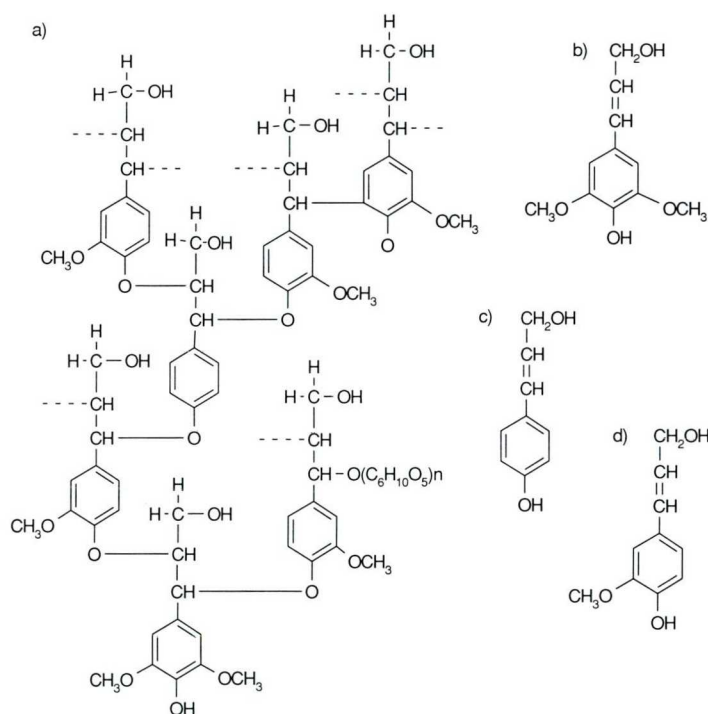
5. ábra Ramnogalakturonán és poligalakturonsav összekapcsolódása. Arabinán és/vagy arabinogalaktán oldalláncok kapcsolódnak a ramnozil részekhez.

A másik fontos hemicellulóz a **mannán** felépítésében elsősorban β -D-mannóz egységekből 1,4- β -D-mannozidos kötésekkel felépülő 1,4- β -D-mannán a legjelentősebb. A mannóz ritkán 1,6- β -D-mannozidos kötéssel is kapcsolódhat a mannánhoz. A mannánhoz kb. 25%-ban β -1,4 kötéssel glükóz is kapcsolódhat, amit glükomannánnak neveznek és elsősorban a keményfában található meg (Hazlewood

és Gilbert, 1993). Galaktózzal β -1,4 kötéssel galaktomannánt képez. Xylóz és arabinóz

β -1,6 ill. α -1,3 kötésekkel is kapcsolódhat mannánhoz (Brett és Waldron, 1990). A mannánok elsősorban a tűlevelűek fás részében, csonthéjas magvakban és egyes gumókban találhatók.

A hemicellulózok közül még a **pektint** kell megemlíteni. A pektin két fő alkotója a poligalakturonsav és a ramnogalakturonán. A poligalakturonsav helikális szerkezetű homopolimer, mely α -D-galakturonsavból α -1,4 kötésekkel épül fel. Az antiparallel láncrészeket Ca^{2+} ionok stabilizálják (4.ábra). A poligalakturonsav kb. 200 galakturonsav egységet tartal-



6.ábra Lignin. a) a lignin szerkezetére jellemző részlet. b) szinapilalkohol. c) p-kumáralkohol. d) konferilalkohol.

mazó helikális részt képez. A ramnogalakturonán pálcika alakú heteropolimer, mely 1,2- α -L-ramnozil-1,4- α -D-galakturonsav diszacharid egységekből áll (Lau és mtsi., 1985). A ramnogalakturonán időnként megszakítja a hosszú poligalakturonsav láncot. A ramnozil részek 4. OH csoportjához arabinán, galaktán ill. arabinogalaktán kapcsolódik (5.ábra).

A **lignin** (latinul *lignum*=fa) a növények elfásodott szöveteinek alkotórésze. A lignin felépítésében három fahéj-alkohol származék vesz részt (6.ábra) – a p-kumáralkohol, a koniferilalkohol és a szinapilalkohol – és ezekből dehidrogenáz enzim hatására képződik a makromolekulás lignin. A különböző fás struktúrájú növények ligninje nem azonos, sőt egy és ugyanazon növény ligninje sem egységes szerkezetű polimerhomológ molekulákból áll, hanem az egyes molekulákban a szerkezeti részletek sorrendisége különböző lehet (Brett és Waldron, 1990).

I.2. A POLISZACHARIDOK ENZIMATIKUS HIDROLÍZISE

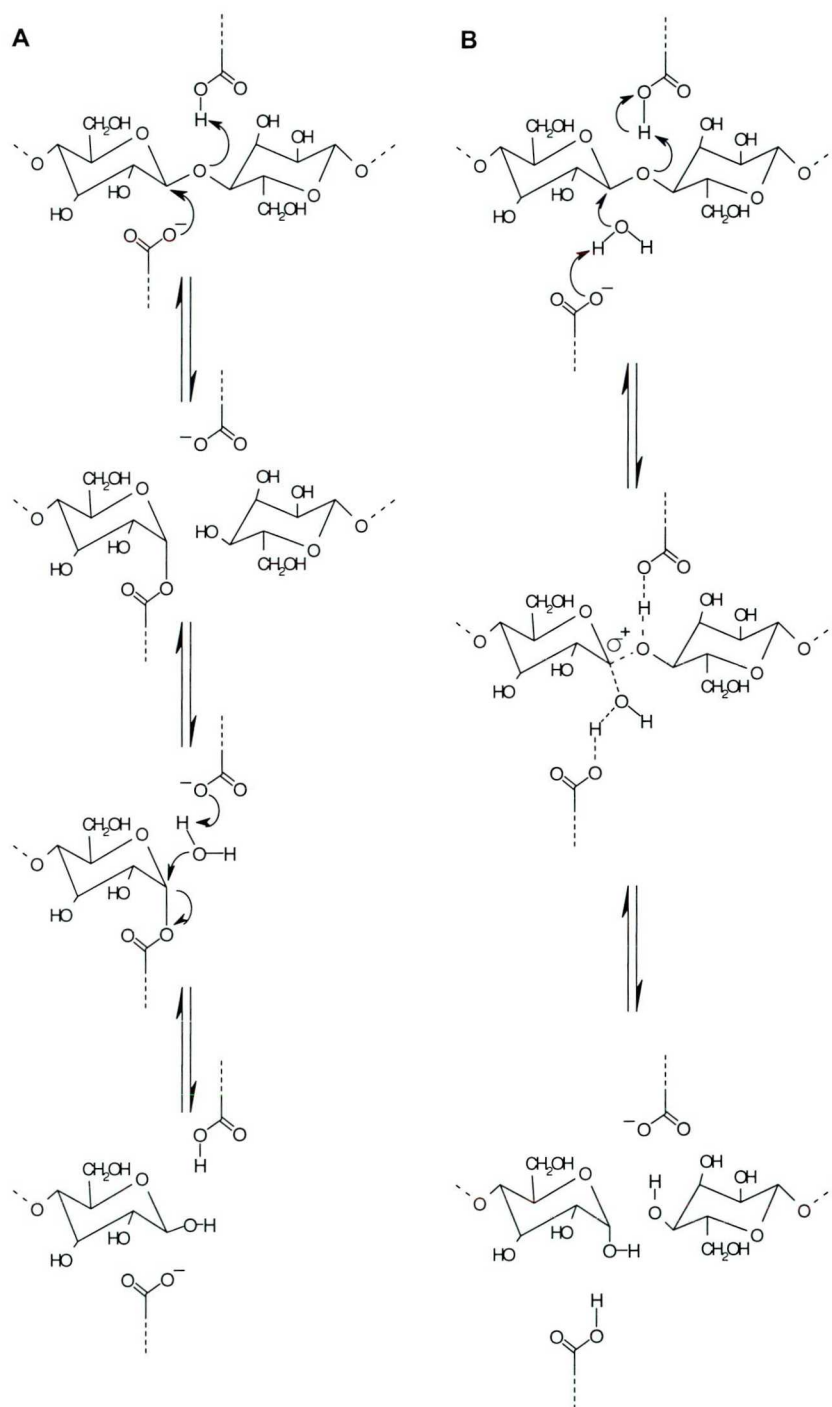
I.2.1. A katalízis mechanizmusa

A glikozidos kötés hidrolízise egy általános sav katalízis, melyhez két kritikus oldallánc szükséges: egy proton donorral rendelkező és egy nukleofil (bázisos) csoporttal rendelkező oldallánc (Davies és Henrissat, 1995). Ez az általános savkatalízis kétféle úton mehet végbe. Az egyik módon a glikozidos kötés felbontásával keletkező anomer megtartja konfigurációját, ezt nevezik megtartó mechanizmusú (retaining mechanism) katalízisnek, míg ha a keletkező anomer másik konfigurációt vesz fel, felcserélő mechanizmusú (invertig mechanism) katalízisnek nevezik. A katalitikus oldalláncokban szerepet játszó aminosavak elsősorban a glutaminsav (GLU) és az aszparaginsav (ASP), de találtak tirozin és glutaminsav együttest is, a virális neuramidáz és a bakteriális szialidáz esetében (Family 33, 34). Ha az oldalláncok felépítésében GLU vesz részt, akkor elsősorban megtartó, ha ASP akkor felcserélő mechanizmus szerint játszódik le a hidrolízis.

Mindkét mechanizmusban a protondonor oldallánc helyzete meghatározott, azaz a glikozidos oxigéntől hidrogénhíd kötésnyi távolságra kell elhelyezkednie. A megtartó (retaining) mechanizmusban a nukleofil (bázisos) katalitikus oldalláncnak az anomer szénatom szomszédságában kell lenni, míg a felcserélő (invertig) mechanizmusban még a nukleofil oldallánc és az anomer szénatom közé még egy vízmolekulának is be kell férni. Így adódik, hogy a két katalitikus oldallánc távolsága a megtartó mechanizmusban $\sim 5,5$ Å, míg a felcserélő mechanizmus szerint lejátszódó reakcióban ~ 10 Å.

A *megtartó mechanizmusban* (7.ábra A) a protondonor oldallánc hidrogénhíd kötést létesítve magához vonzza a glikozidos oxigén elektronjait, ezzel is gyengítve a glikozidos kötést, másrészt a bázisos oldallánc nukleofil támadást intéz az anomer szénatom ellen, mely a glikozidos kötés hasadását jelenti (Lawson és *mtsi.*, 1998). A protondonor leadva a protonját nukleofil oldalláncává válik. Az anomer szénatommal kovalens kapcsolatot létesített nukleofil oldallánc lehasadását az új nukleofillá vált oldallánc egy vízmolekula segítségével végzi el, teljessé téve a hidrolízist, visszanyerve az eredeti reaktív oldalláncokat. Így érthető, hogy az anomer szénatom megtartotta eredeti konfigurációját (β -konfiguráció).

A *felcserélő mechanizmusban* (7.ábra B) a protondonor oldallánc szintén hidrogénhíd kötést létesítve magához vonzza a glikozidos oxigén elektronjait, másrészt a bázisos oldallánc egy vízmolekulán keresztül intéz nukleofil támadást az anomer szénatom ellen (Damude és *mtsi.*, 1996). Így a glikozidos kötés hasadása mellett létrejövő glikozidos OH ellenkező térállású lesz (α -konfiguráció) azaz az anomer szénatom nem tartja meg eredeti konfigurációját.



7.ábra A glikozidos kötés hidrolízisének kétféle mechanizmusa. (A) megtartó mechanizmus (retaining mechanism). (B) felcserélő mechanizmus (inverting mechanism). Magyarázatot lásd a szövegben.

Mindkét mechanizmus a glikozidos kötés hidrolízisét eredményezi. A lizozim volt az első glikozil hidroláz, melynek háromdimenziós térszerkezetét felderítették és meghatározták a katalízisben résztvevő oldalláncokat (ASP, GLU).

I.2.2. O-glikozil hidrolázok

Az O-glikozil hidrolázok (EC 3.2.1.x) azon enzimek csoportja, melyek hidrolizálják a glikozidos kötetést két vagy több szénhidrát vagy a szénhidrát és egy nem szénhidrát rész között. Az IUB (International Union of Biochemistry) enzim nómenklátúra az O-glikozil hidrolázokat szubsztrátspecifitásuk alapján csoportosítja, figyelmen kívül hagyva az enzim hatásmechanizmusát valamint az enzim szerkezetét is.

Néhány évvel ezelőtt a glikozil hidrolázokat az aminosav szekvencia alapján családokba sorolták (Family A - I), (Henrissat, 1991). Később kiderült, hogy közvetlen kapcsolat van a szekvencia és a fehérje folding között, így a fehérjék térszerkezetét is figyelembe véve, az újabb besorolás szerint még több családot (Family1 - Family 66) különböztetnek meg (Henrissat és Bairoch, 1993). Ezzel azt remélték: (i) hogy ez jobban tükrözi az enzim szerkezeti sajátosságait, mint a szubsztrátspecifitás, (ii) segít felfedni az evolúciós összefüggéseket az enzimek között, (iii) alkalmas eszköz az információk rendezésére. Számos enzimcsaládot a fehérje folder szerint csoportokba soroltak (Group A - I), mert ezek jobban tükrözik az összetartozást mint pusztán a szekvencia, és a hasonlóságok, különbségek is jobban kiütököznek (Henrissat és Bairoch, 1996). Jónéhány glikozil hidroláz többféle csoportba is sorolható a katalitikus domén alapján.

A glikozil hidroláz családok (Family 1 - 66) közül néhány fontosabbat kiemelnek.

5. család (Family 5). Ide tartozik a legtöbb endoglükánáz (EC 3.2.1.4), β -mannanáz (EC 3.2.1.78) és néhány exo-1,3-glükánáz (EC 3.2.1.58). A katalizált reakció mechanizmusa megtartó mechanizmus (retaining mechanism). A katalitikus proton donor glutaminsav (GLU), a katalitikus nukleofil bázis szintén glutaminsav (GLU). Mind prokarióták, mind eukarióták által termelt enzimek is találhatóak ebben a családban. A család tagjai mind az A-csoportba tartoznak (Group A, régebbi nómenklátúra szerint Family A).

6. család (Family 6). Endoglükánázok (EC 3.2.1.4) és cellobiohidrolázok (EC 3.2.1.91) tartoznak ide. A katalizált reakció mechanizmusa felcserélő mechanizmus (inverting mechanism). A katalitikus proton donor és a katalitikus nukleofil bázis aszparaginsav (ASP). Régebbi nómenklátúra szerint Family B. Ebbe a családba tartozik a *Cellulomonas fimi* CexA és a CexA is.

9. család (Family 9). A legtöbb endoglükánáz (EC 3.2.1.4) ide tartozik. A katalizált reakció

mechanizmusa felcserélő mechanizmus (inverting mechanism). A katalitikus proton donor glutaminsav (GLU) és a katalitikus nukleofil bázis aszparaginsav (ASP). Régebbi nomenklátúra szerint Family E. Ebbe a családba tartozik a *Cellulomonas fimi* CenB és a CenC is.

10. család (Family 10). A legtöbb xylanáz (EC 3.2.1.8) ide tartozik. A katalizált reakció mechanizmusa megtartó mechanizmus (retaining mechanism). A katalitikus proton donor glutaminsav (GLU), a katalitikus nukleofil bázis szintén glutaminsav (GLU). Mind prokarióták, mind eukarióták által termelt enzimek is találhatók ebben a családban. Ezen család tagjai is mind az A-csoportba tartoznak (Group A, régebbi nomenklátúra szerint F).

11. család (Family 11). Sok xylanáz (EC 3.2.1.8) tartozik ide. A katalizált reakció mechanizmusa megtartó mechanizmus (retaining mechanism). A katalitikus proton donor glutaminsav (GLU), a katalitikus nukleofil bázis szintén glutaminsav (GLU). Mind prokarióták, mind eukarióták által termelt enzimek is találhatók ebben a családban. Ezen család tagjai a régebbi nomenklátúra szerint Family G.

26. család (Family 26). A legtöbb mannán-endo-1,4- β -mannozidáz (EC 3.2.1.78) ide tartozik. A katalizált reakció mechanizmusa megtartó mechanizmus (retaining mechanism). A katalitikus proton donor glutaminsav (GLU), a katalitikus nukleofil bázis szintén glutaminsav (GLU). Csak prokarióták által termelt enzimek találhatók ebben a családban. Ezen család tagjai is mind az A-csoportba tartoznak (Group A, régebbi nomenklátúra szerint I).

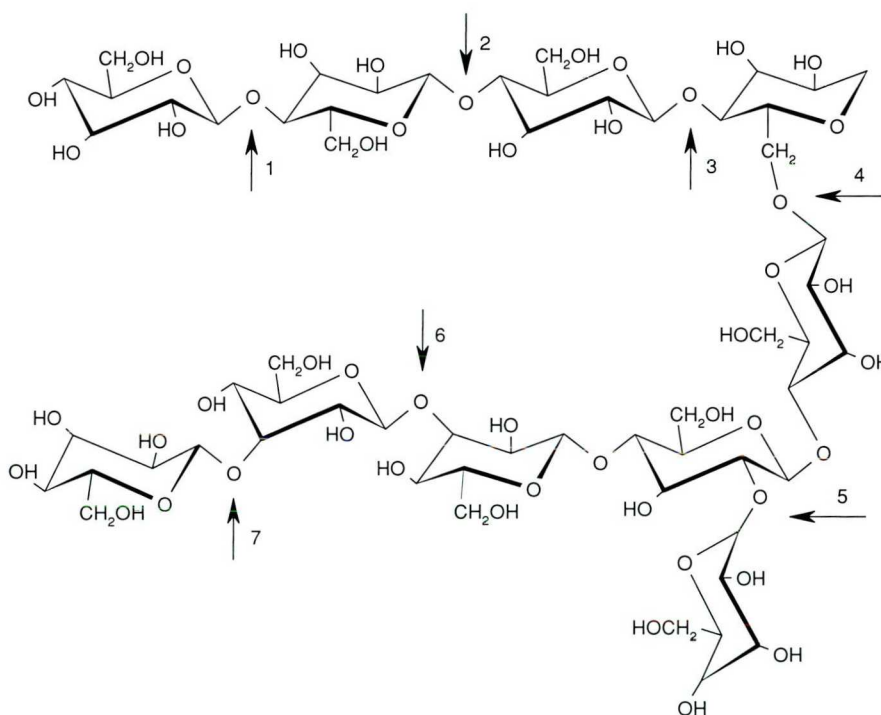
28. család (Family 28). Ide a poligalakturonázok (EC 3.2.1.15) tartoznak. A katalizált reakció mechanizmusa felcserélő mechanizmus (inverting mechanism). A katalitikus proton donor és a katalitikus nukleofil bázis nem ismert. Mind prokarióták, mind eukarióták által termelt enzimek is találhatók ebben a családban. Ezen család tagjait csoportba nem sorolták.

A *Cellulomonas* fajok közül elsősorban a *C. fimi*-vel foglalkoztak. A következő enzimeket izolálták és szekvenálták: endoglükánáz A (Family 6), endoglükánáz B (Family 9), endoglükánáz C (Family 9), endoglükánáz D (Family 5), exoglükánáz (Family 10), exoglükánáz A (Family 6), exoglükánáz B (Family 48), endoxylanáz D (Family 11).

I.2.3. Az enzimek biokémiai, molekuláris biológiai jellemzése

I.2.3.1. Cellulázok

A cellulóz enzimatiskus lebontása, a szubsztrát fizikai jellegéből következően igen nehéz feladat. A sejtfalban a kristályos cellulóz szálakat egyrészt hidrogénhidak tartják össze, másrészt a hemicellulóz és a lignin révén kémiai is összekapcsolódnak. Ennek ellenére a cellulóz és a β -D-glükán lebontása elterjedt mind a gombák, mind a baktériumok körében. A cellulóz lebontásában szereplő enzimeket két nagy csoportra lehet osztani: endoglükánázokra, amelyek a molekulán belüli kötéseket hidrolizálják és exoglükánázokra, amelyek a molekula vége felől hasítanak le glükózt vagy cellobiózt, így rövidítve a polimer molekulát. A glükozidos kötések hidrolizálásának különböző lehetőségeit mutatja be a 8.ábra.



8.ábra Egy hipotetikus β -D-glükán molekula és a lebontásában szereplő enzimek. 1. exo-1,4- β -glükózidáz, 2. exocellobiohidroláz, 3. endo-1,4- β -glükánáz, 4. endo-1,6- β -glükánáz, 5. endo-1,2- β -glükánáz, 6. endo-1,3- β -glükánáz, 7. exo-1,3- β -glükózidáz.

1.táblázat A cellulózt és a β -D-glükánt bontó fontosabb enzimek összefoglalása.

Enzim neve	EC szám	Katalizált reakció
Cellulase endo-1,4- β -glucanase	EC 3.2.1.4	Az 1,4- β -D-glükozidos kötéseket hidrolizálja a cellulóz molekulában (a β -D-glükán hasonló kötéseit is hidrolizálja).
Endo-1,3-(1,4)- β -glucanase laminarinase	EC 3.2.1.6	Hidrolizálja az 1,3- β -D- illetve 1,4- β -D-glükozidos kötéseket a β -D-glükánban, ha a redukáló vég felőli β -D-glükóz 3. szénatomja szubsztituálva van. (Az enzim szubsztrátja a laminarin, lichenin és gabona β -D-glükánja is).
Glucan endo-1,3- β -D-glucosidase endo-1,3- β -glucanase	EC 3.2.1.39	Hidrolizálja az 1,3- β -D-glükozidos kötéseket a β -D-glükánban, de az 1,3- -1,4- β -D-glükán nem szubsztrátja, így különbözik az EC 3.2.1.6-tól.
Glucan 1,3- β -glucosidase exo-1,3- β -glucosidase	EC 3.2.1.58	Glükózt hasít le az 1,3- β -D-kötéseket hidrolizálva a β -D-glükán nem redukáló vége felől.
Glucan endo-1,2- β -glucosidase endo-1,2- β -glucanase	EC 3.2.1.71	Hidrolizálja az 1,2- β -D-glükozidos kötéseket a β -D-glükánban.
Licheninase endo-1,3-1,4- β -glucanase	EC 3.2.1.73	Hidrolizálja az 1,3- β -D- illetve 1,4- β -D-glükozidos kötéseket a β -D-glükánban akkor, ha mindkét típusú kötés jelen van. (Az enzim szubsztrátja a lichenin, és gabona β -D-glükán, de nem bontja a csak 1,3- vagy csak 1,4- β -D kötéseket tartalmazó glükánt).
Glucan 1,4- β -glucosidase exo-1,4- β -glucosidase	EC 3.2.1.74	Glükóz egységeket hasít le az 1,4- β -D-kötéseket hidrolizálva a cellulóz (β -D-glükán) nem redukáló végéről. A cellobiózt igen lassan bontja.
Glucan endo-1,6- β -glucosidase endo-1,6- β -glucanase	EC 3.2.1.75	Hidrolizálja az 1,6- β -D-glükozidos kötéseket a β -D-glükánban.
Cellulose 1,4- β -cellobiosidase exocellobiohydrolase	EC 3.2.1.91	Cellobióz egységeket hidrolizál le a cellulóz (β -D-glükán) nem redukáló végéről.

A cellulóz lebontásában szerepet játszó mikroorganizmusok (melyek képesek a kristályos cellulóz bontására), többé-kevésbé összetett celluláz rendszerrel rendelkeznek. Ezek a rendszerek különböző specifitású és mechanizmusú enzimeket foglalnak magukba (1.táblázat), hogy elősegítsék a cellulóz lebomlását (Béguin, 1990).

A **gombák** cellulázai három fő csoportba sorolhatók: a) cellobiohidrolázok (CBH), melyek a cellulóz molekulát lépésenként a nem redukáló vége felől hasítják, cellobiózt felszabadítva, b) endoglükánázok (EG), melyek a β -glükozidos kötéseket hidrolizálják el a cellulóz molekula közbelső részén, c) β -glükozidázok, melyek a cellobiózt és a kisméretű cellodextrin molekulákat hidrolizálják glükózzá. E három csoportba tartozó enzimek oly

módon segítik egymást, hogy az EG-ok a kristályos cellulóz amorf régióit támadják, (3.ábra) így készítve nem-redukáló véget a CBH-nak, mely a cellulóz rostnak kristályos régióit bontja. A β -glükózidázok fejezik be a folyamatot, utolsó lépésként az oldhatóvá tett cellobióz és cellodextrinek glükózzá történő bontásával, megelőzve ezek felszaporodását, ami gátolja a CBH-k működését. A gombák celluláz rendszere közül előszeretettel a *Trichoderma* fajok cellulázait tanulmányozzák, elsősorban a *Trichoderma reesei*-t. Tisztításukkal és jellemzésükkel (Kim és *mtsi.*, 1994 valamint Woodward és *mtsi.*, 1994), a CBH-k és EG-k működésével (Nidetzky és *mtsi.*, 1994a valamint Macarrón és *mtsi.*, 1993), a cellulázok kölcsönhatásaival (Medve és *mtsi.*, 1994 és Nidetzky és *mtsi.*, 1994b) foglalkoztak. A gombák számos faja közül említést érdemelnek még, *Aspergillus* sp. (Wang és *mtsi.*, 1994), *Penicillium* sp. (Koch és *mtsi.*, 1993), *Botrytis* sp. (Stahmann és *mtsi.*, 1993), mely fajok cellulázait szintén tanulmányozták.

A **bakteriális cellulázok** kevésbé definiáltak. A baktériumok által termelt változatos endoglükanázok általában kisebb aktivitást mutatnak a kristályos cellulózzal szemben, mint a gombáké. Az aerob baktériumok (*Actinomycetes*, *Cellulomonas*) hasonló mechanizmus szerint bontják a cellulózt, mint a gombák azaz a cellulolitikus komponensek nem képeznek asszociátumokat egymással. Az anaerob baktériumok többsége (bendő baktériumok, *Clostridium thermocellum*) viszont szorosan kapcsolt úgynevezett multimolekuláris komplexeket (celluloszóma) alkotó celluláz rendszerrel rendelkeznek.

A **celluloszóma**, melyet elsősorban a *Clostridium thermocellum*-ban tanulmányoztak (Felix és Ljungdahl, 1993), 45-50 különféle polipeptidet tartalmaz 20-200kDa molekulatömeg méretben. A celluloszóma tartalmaz egy igen nagy molekulatömegű (210kDa) fehérjét, mely cellulóz kötő fehérje és nincsen enzimaktivitása. A cellulázok közül több mint 10 endoglükanáz aktivitása kimutatható. Közülük nyolc endoglükanáz gén már ismert és a gént tisztították és meghatározták a szekvenciájukat is (Yague és *mtsi.*, 1990). Négy polipeptidről derült ki, hogy cellobiohidroláz aktivitással rendelkeznek. β -glükózidáz aktivitás mellett gyenge, de jelenlévő β -xylozidáz, β -galaktozidáz és β -mannozidáz aktivitás is kimutatható a celluloszómában (Kohring és *mtsi.*, 1990). Két xylanáz aktivitással rendelkező fehérjét is sikerült izolálni. A celluloszóma 8-12% szénhidrátot is tartalmaz, mely xylóz, mannóz, galaktóz, glükóz és N-acetil-glükózamin monomerekből épül fel. A celluloszóma a sejtfelszínhez kötött. A celluloszóma nem korlátozódik kizárólag a *Clostridium thermocellum*-ra. Az anaerob baktériumok közül az *Acetivibrio cellulolyticus*, *Bacterioides cellulosolvens*, *Clostridium cellobioparum*, *Clostridium cellulovorans* valamint a *Ruminococcus albus* is rendelkezik egy sejtfelszínhez kötött celluloszóma-szerű struktúrával (Felix és Ljungdahl, 1993).

A celluloszómával nem rendelkező baktériumok közül a *Bacillus*, *Thermomonospora*,

Ruminococcus, *Erwinia*, *Pseudomonas* és nem utolsó sorban a *Cellulomonas* genusokat kell megemlíteni. A *Bacillus subtilis*-ből három különböző celluláz gént sikerült izolálni, ezeknek szekvenciája is ismeretes. Az enzimek 50°C-ig hőstabilak és pH 5,0-6,0 között működnek (Krüger és mtsi., 1993). A *Thermomonospora fusca* extracelluláris cellulázai igen aktívak (McGinnis és Wilson, 1993). *Ruminococcus flavefaciens*-ből sikerült egy bifunkcionális enzimet izolálni, mely celluláz és xylanáz aktivitással is rendelkezett (Flint és mtsi., 1993). Az *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*-ból izolált celluláz szerepet játszik a baktérium fitopatogenitásában is.

A *Cellulomonas* genus tagjai közül a *C. flavigena*-t (Silva és mtsi., 1988), a *C. udat* (Nakamura és Kitamura, 1988) valamint a bakteriális cellulázok közül legrészletesebben a *C. fimi*-t tanulmányozták. A *C. fimi*-ből leírtak egy exoglukanázt (cex) (Ong és mtsi., 1993), egy cenA (Din és mtsi., 1994), egy cenB (Meinke és mtsi., 1991a, b), egy cenC (Coutinho és mtsi., 1991), egy cenD (Meinke és mtsi., 1993) és egy cenE (Shen és mtsi., 1994) endoglukanázt. A gének szekvenciája is ismert.

A cellulázok egy részét proteolitikus hasítással kétfelé bonthatjuk: (i) katalitikus aktivitással rendelkező és (ii) cellulóz kötő részekre. A kettőt egy ún. linker rész köti össze. A linker szekvencia (6-60 aminosav) prolinban vagy szerinben és treoninban vagy glutaminsavban és aszparaginsavban gazdag (Giorda és mtsi., 1990).

Sok celluláz kötődik a cellulózhoz, de a kötődés mechanizmusa még nem teljesen világos. A cellulóz kötésért felelős régió (CBD, cellulose binding domain) valamint az enzim katalízisért felelős régió jól elkülönül, pl. enzimaktiválás (N-bróm-szukcinimid) után a CBD még működik. Ámbár a CBD nem szükséges a katalitikus aktivitáshoz, a legtöbb esetben az enzim aktivitását módosítja az oldható és oldhatatlan cellulóz szubsztráthoz. A bakteriális CBD (i) kevés töltéssel rendelkező aminosavat és (ii) sok hidroxilaminosavat (treonin és szerin) tartalmaznak. A konszenzus szekvenciák rokonságot mutatnak az amilázok keményítő kötő doménjeivel és az állati lektinek cukor felismerő doménjeivel. A bakteriális CBD-k 100-110 aminosavból állnak, a gombáké viszont csak 30-33 aminosavat tartalmaz.

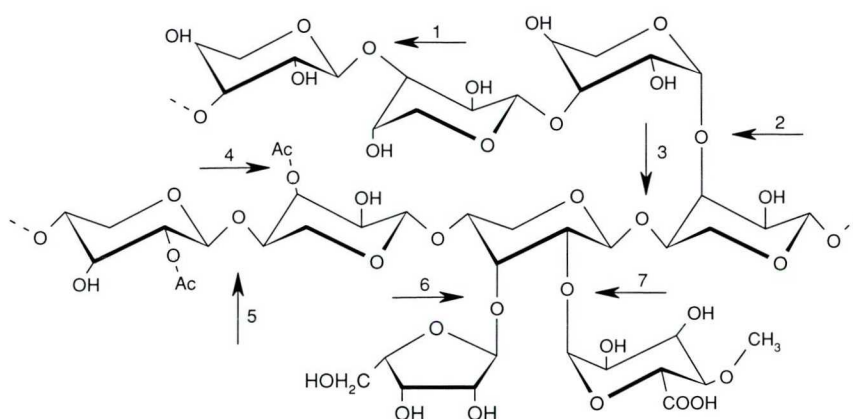
Több mint 80 celluláz és xylanáz katalitikus doménjének a szekvenciája ismeretes. Az aminosav szekvencia alapján kluster analízis segítségével több csoportot (Family A-I) különböztetnek meg. Egy mikroorganizmus különböző csoportokba tartozó cellulázokat is termelhet (Gilkes és mtsi., 1991).

I.2.3.2. Hemicellulázok

I.2.3.2.1. Xylanázok

A xylán egy komplex heteropolimer, melynek lebontásához számos enzim, fő- és oldallánc bontó enzim szükséges (9.ábra). Az enzimek között szinergizmus lép fel, a többféle enzimet (2.táblázat) tartalmazó elegyek sokkal jobban bontják a komplex xylánt (Coughlan és Hazlewood, 1993).

Az aerob gombák közül sokan képesek a teljes xylán hidrolízisére. Tisztítottak és részben



9.ábra Egy hipotetikus xylán heteropolimer és a lebontásában szereplő enzimek. 1. exo-1,3-β-D xylozidáz, 2. endo-1,3-β-D xylanáz, 3. endo-1,4-β-D xylanáz, 4. acetilészteráz, 5. exo-1,4-β-D-xylozidáz, 6. α-L-arabinofuranidáz, 7. α-glükuronidáz.

jellemeztek enzimeket *Trichoderma reesei*-ből (Törrönen és Rouvinen, 1991), valamint *Trichoderma viride*-ből (Yaguchi és mtsi., 1992) is. Ezek az enzimek mind méretükben, mind szekvenciájukban hasonlítanak a *Bacillus subtilis* és *B. pumilus* (Hazlewood és Gilbert, 1993) xylanázaira. Anaerob gombák közül először bendőből izolált *Neocallimastix patriciarum*-ból klónoztak és expresszáltak *E. coli*-ban xylanáz gént (Gilbert és mtsi., 1992).

A bakteriális xylanázok különálló enzimek, gyakran a baktérium a cellulázok mellett több xylanázt is termel. Az egyszerű felépítésű xylanázokon kívül sok moduláris felépítésű enzim is található, melyek a már ismertetett módon épülnek fel, azaz cellulóz kötő domént (CBD) és katalitikus domént is tartalmaznak. A doméneket prolin/treonin gazdag részek (linker szekvenciák) választják el egymástól. A *Cellulomonas fimi*-ből négy különböző endoxylanáz

gént sikerült izolálni. Egyik génben a multifunkcionális doméneket glicin gazdag linker szekvencia választja el (Clarke és *mtsi.*, 1991).

2.táblázat A xylánt és származékait bontó fontosabb enzimek összefoglalása.

Enzim neve	EC szám	Katalizált reakció
Endo-1,4- β -xylanase 1,4- β -D-xylan xylanohydrolase	EC 3.2.1.8	Az 1,4- β -D-xylán 1,4- β -D-xylozidos kötéseit hidrolizálja.
Xylan endo-1,3- β -xylosidase endo-1,3- β -xylanase	EC 3.2.1.32	Az 1,3- β -D-xylán 1,3- β -D-xylozidos kötéseit hidrolizálja.
Xylan 1,4- β -xylosidase exo-1,4- β -xylosidase	EC 3.2.1.37	Az 1,4- β -D-xylán nem redukáló végéről D-xylózt hidrolizál.
α -N-arabinofuranosidase α -L-arabinofuranosidase	EC 3.2.1.55	Az (1,3) és/vagy (1,5)-kötéseket kapcsolódó α -L-arabinofuranozid végeket hidrolizálja az arabinoxylánban és az arabinogalak tánban.
Xylan 1,3- β -xylosidase exo-1,3- β -xylosidase	EC 3.2.1.72	Az 1,3- β -D-xylán nem redukáló végéről D-xylózt hidrolizál.
Acetylesterase C-esterase	EC 3.1.1.6	Acetilészter + H ₂ O $\rightarrow$ alkohol + ecetsav.

Négy gént, két endoxylanázt, egy arabinofuranidázt és egy acetilészterázt sikerült izolálni egy talajlakó szaprofita *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa*-ból, mely talán a legjobban tanulmányozott és karakterizált bakteriális xylán-bontó enzimrendszer (Hall és *mtsi.*, 1989 valamint Ferreira és *mtsi.*, 1993).

A termoanaerob baktériumok közül a *Clostridium thermocellum*-ból a celluloszómán kívüli, önálló moduláris xylanázt is sikerült izolálni (Hazlewood és *mtsi.*, 1988).

A rekombináns DNS technika lehetővé tette több mint 70 xylanáz gén (30-féle mikroorganizmusból) klónozását, szekvenálását és expresszióját elsősorban *E. coli*-ban. A teljes nukleotid szekvenciák ismeretében, a gének két fő osztályba (F és G) sorolhatók (Coughlan és Hazlewood, 1993).

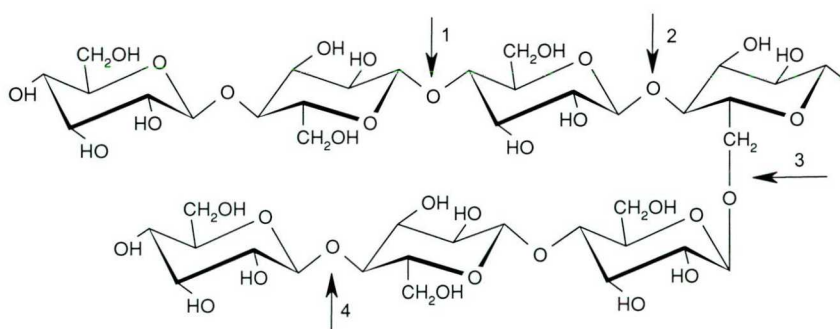
I.2.3.2.2. Mannanázok

Összehasonlítva a mannanázok és a xylanázok felépítéséről szerzett információkat, a mannanázok jóval kevésbé tanulmányozott és ismert enzimek. A mannánok lebontásában szerepet játszó enzimeket a 3. táblázat és a 10. ábra foglalja össze.

3. táblázat A mannánokat bontó fontosabb enzimek összefoglalása.

Enzim neve	EC szám	Katalizált reakció
β -mannosidase mannanase	EC 3.2.1.25	A β -D-mannán nem redukáló végéről β -D-mannózt hidrolizál le.
Mannán endo-1,4- β -mannosidase endo-1,4-mannanase	EC 3.2.1.78	Hidrolizálja az 1,4- β -D-mannozidos kötések a mannánban, galaktomannánban, glükomannánban és a galaktoglükomannánban.
Mannán 1,4- β -mannobiosidase exo-1,4- β -mannobiohydrolase	EC 3.2.1.100	Hidrolizálja a 1,4- β -D-mannozidos kötések az 1,4- β -D-mannánban úgy hogy mannobióz egységeket hasít le a nem redukáló vég felől.
Mannán endo-1,6- β -mannosidase endo-1,6- β -mannanase	EC 3.2.1.101	Hidrolizálja a 1,6- β -D-mannozidos kötések az 1,6- β -D-mannánban.

Habár viszonylag sok adat összegyűlt a mannanáz enzimek biokémiájáról az irodalomban jelenleg csak öt szekvencia ismeretes, egy alkalofil *Bacillus* sp.-ből, mely két enzimet (A és B) kódol (Akino és mtsi., 1989), termofil *Caldocellum saccharolyticum*-ból (Gibbs és mtsi., 1992), *Streptomyces lividans*-ból (Arcand és mtsi., 1993), *Pseudomonas fluorescens*



10. ábra Egy hipotetikus mannán molekula és a lebontását végző enzimek. 1. exo- β -1,4-mannobiosidáz, 2. endo- β -1,4-mannanáz, 3. endo- β -1,6-mannanáz, 4. β -mannosidáz.

subsp. *cellulosa*-ból (Braithwaite és mtsi., 1995), valamint *Pyromyces* sp.-ből (Fanutti és

mtsi., 1995). Az eddig izolált mannanáz gének többsége moduláris felépítésű, tartalmaznak egy cellulóz kötő és egy katalitikus domént, melyeket prolin/treonin linker szekvencia köt össze. A katalitikus domének hasonlóságot mutatnak a cellulázokkal és a xylanázokkal is.

I.2.3.3. Egyéb fontosabb enzimek

A hemicellulázok közé tartozó **pektinázokkal** a dolgozat alig foglalkozik, mégis a növényi sejtfal lebontásában betöltött szerepe miatt a teljesség kedvéért röviden meg kell említeni. Pektinázok a gyümölcsök érésében is fontos szerepet töltenek be. Pektinbontó

4.táblázat A pektint és származékait bontó fontosabb enzimek összefoglalása.

Enzim neve	EC szám	Katalizált reakció
Pectinesterase pectin methylesterase	EC 3.1.1.11	A következő reakciót katalizálja: pektin + $n \cdot \text{H}_2\text{O} \rightarrow n \cdot \text{metanol} + \text{pektinsav}$.
Polygalacturonase pectinase	EC 3.2.1.15	Hidrolizálja az 1,4- α -D-galakturonsav kötéseket a poligalakturonsavban és más galakturonánban.
Galacturan 1,4- α -galacturonidase exopolygalacturonase	EC 3.2.1.67	A következő reakciót katalizálja: $n \cdot (1,4\text{-}\alpha\text{-D-galakturonsav}) + \text{H}_2\text{O} \rightarrow (n-1) \cdot (1,4\text{-}\alpha\text{-D-galacturonide}) + \text{D-galakturonsav}$.
Exo-poly- α -galacturonosidase	EC 3.2.1.82	Hidrolizálja a poligalakturonsavat úgy, hogy digalakturonsav egységeket hasít le a nem redukáló vég felől.
Pectate lyase pectate transeliminase	EC 4.2.2.2	Transzeliminációs reakcióval hasítja a pektinsavat, a nem redukáló vég felől. A pektin nem szubsztrátja az enzimnek.
Pectin lyase	EC 4.2.2.10	Transzeliminációs reakcióval hasítja a pektint. A deészterezett pektin nem szubsztrátja az enzimnek.

enzimeket számos baktérium (*Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Erwinia*) és gomba (*Aspergillus*, *Neurospora*) is termel. A pektin lebontásában szerepet játszó enzimeket a 4.táblázat foglalja össze. Polizeli és mtsi. (1991) extracelluláris poligalakturonázt tisztítottak és jellemeztek *Neurospora crassa*-ból. Liu és mtsi. (1994) pektát liáz gént klónoztak és jellemeztek *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*-ból.

Az eddig megemlített O-glikozil hidrolázokon kívül még ebbe az enzimek kategóriába tartoznak az α -glükánázok, úgymint α -amiláz (3.2.1.1), β -amiláz (3.2.1.2), γ -amiláz (3.2.1.3), valamint kitináz (3.2.1.14), lizozim (3.2.1.17), neuramidáz (3.2.1.18) és még sok egyéb más enzim is melyet itt nem tárgyalunk.

A teljesség kedvéért megemlíjtük a lignin enzimátikus bontását is, mert ezen enzimek a növényi biomassza elbontásában, feltárásában szintén részt vesznek. Mivel a lignin önmagában nem tartozik a poliszacharidok közé, érthető ha lebontásában is az eddigiektől alapvetően eltérő enzimek játszanak szerepet. A lignin lebontásában az enzimek több csoportja vesz részt, így a diarylpropane peroxidase (lignin-peroxidáz, lignináz I., EC 1.11.1.14) mely a ligninben lévő benzil-alkohol, -aldehid és/vagy -keton C-C kötéseit hasítja, a mangán-függő peroxidáz (EC 1.11.1.13) mely a lignint oxidatív úton hasítja és a lignostilbén α - β -dioxigenáz (EC 1.13.11.43) mely elsősorban a diarilpropán struktúrában az interfenolos kettős kötéseket oxidatívén hasítja (Blanchette és mtsi., 1989).

I.3. A *CELLULOMONAS* GENUS

A *Cellulomonas* nemzetséget a rendszertan az *Actinomycetes*, azon belül a *Nocardioform actinomycetes* közé sorolja a *Geodermatophilus*, *Nocardia*, *Oerskovia*, *Rhodococcus* nemzetségek közé.

A *Cellulomonas* nemzetség a *Bergey's Manual* szerint a szabálytalan, nemspórázó Gram-pozitív pálcák közé tartozik (section 15). Ebbe a csoportba tartoznak az aerob baktériumok közül: *Caseobacter*, *Corynebacterium*, *Eureobacterium*, *Curtobacterium*, *Microbacterium*, *Arthrobacterium*, *Brevibacterium*, *Renibacterium* nemzetségek. Az anaerob baktériumok közül: *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Acetobacterium*, *Butyrivibrio*, *Thermoanaerobacter*, *Lachnospira* nemzetségek. A fakultatív anaerob baktériumok közül: *Corynebacterium*, *Agromyces*, *Cellulomonas*, *Oerskovia*, *Rothia*, *Actinomyces*, *Arcanobacterium*, *Propionibacterium*, *Arachnia*, *Gardnella* nemzetségek.

A *Cellulomonas* genusra a karcsú, szabálytalan pálcák (0,5 - 5,0 μ m) jellemzők, melyek egyenes, szögletes vagy lekerekített formájúak. Áttetsző, sárgás telepeket képeznek. A sejtfal peptidoglükánja ornitint tartalmaz, sohasem glicint vagy homoszerint. Optimális hőmérséklet $\sim 30^{\circ}\text{C}$. Neutrális pH-n mérsékelten növekednek (pepton-élesztő kivonat közegben). Cellulolitikus aktivitással rendelkeznek, a keményítőt és zselatint hidrolizálják. A nitrátot nitráttá redukálják. Biotint és tiamint igényelnek a növekedésükhöz. Kataláz pozitívak. Elsődlegesen aerobok, de képesek anaerob körülmények között is növekedni. A

DNS G+C mol%-a 71-76.

5.táblázat Az eddig ismert *Cellulomonas* fajok.

Faj	Leíró
<i>Cellulomonas biazotea</i>	Bergey és mtsi., 1923
<i>Cellulomonas cartae</i>	Stackebrandt és Kandler, 1980
<i>Cellulomonas cellasea</i>	Bergey és mtsi., 1923
<i>Cellulomonas cellulans</i> = <i>Nocardia cellulans</i>	Stackebrandt és Keddie 1988
<i>Cellulomonas fermentans</i>	Bagnara és mtsi., 1985
<i>Cellulomonas fimi</i>	Bergey és mtsi., 1923
<i>Cellulomonas flavigena</i>	Bergey és mtsi., 1923
<i>Cellulomonas gelida</i>	Bergey és mtsi., 1923
<i>Cellulomonas hominis</i>	Funke és mtsi., 1995
<i>Cellulomonas turbata</i> = <i>Oerskovia turbata</i>	Stackebrandt és mtsi., 1983
<i>Cellulomonas uda</i>	Bergey és mtsi., 1923

II. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

II.1. MIKROORGANIZMUSOK

6.táblázat A dolgozatban felhasznált mikroorganizmusok összefoglalása.

Baktériumok, plazmidok	Származás/Azonosító
<i>Cellulomonas uda</i> ^T	Type strain, B 1380 (DSM 20107, ATCC 491)
<i>Cellulomonas flavigena</i> ^T	Type strain, B 1381 (DSM 20109, ATCC 482)
<i>Cellulomonas gelida</i> ^T	Type strain, B 1384 (DSM 20111, ATCC 488)
<i>Cellulomonas biazotea</i> ^T	Type strain, B 1385 (DSM 20112, ATCC 486)
<i>Cellulomonas fimi</i> ^T	Type strain, B 1386 (DSM 20113, ATCC 484)
<i>Cellulomonas cellasea</i> ^T	Type strain, B 1387 (DSM 20118, ATCC 487)
<i>E.coli</i> DH5α	Laboratóriumi törzsgyűjtemény
pBluescript® II KS ⁺ plazmid	Stratagene, La Jolla, CA, USA.
* <i>Cellulomonas</i> sp. CelB2	***NCAIM {P} B 001203
** <i>Cellulomonas</i> sp. CelB7 Az izolált törzsek ipari szabadalommal védve, törzsgyűjteményben elhelyeztük *(Felföldi és Fülöp, 1993), *(Fülöp és Felföldi, 1993)	NCAIM {P} B 001204 ***Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteménye (National Collection of Agricultural and Industrial Microorganism)

A *Cellulomonas* sp. CelB2 és CelB7 törzseket, valamint a törzsgyűjteményből beszerzett *Cellulomonas* sp. baktériumokat Stewart és Leatherwood (1976) által közölt táptalajon, az *E. coli* törzset YTA táptalajon tartjuk fenn.

II.2. TÁPOLDATOK, TÁPTALAJOK, ANYAGOK, OLDATOK ÉS PUFFEREK

7.táblázat A dolgozatban szereplő táptalajok és tápoldatok.

Megnevezés	Összetétel
FF tápoldat	0,2% NaNO ₃ , 0,2% K ₂ HPO ₄ , 0,1% MgSO ₄ ·7H ₂ O, 0,1% KCl, 0,2%
FF táptalaj	élesztőkivonat (pH 6,8)
SL* tápoldat	Az FF tápoldat kiegészítve 1,2% agar-aggarral.
SL táptalaj	0,1% NaNO ₃ , 0,1% K ₂ HPO ₄ , 0,05% MgSO ₄ ·7H ₂ O, 0,05% KCl, 0,05% élesztőkivonat (pH 7,0)
PD** tápoldat	Az SL tápoldat kiegészítve 1,2% agar-aggarral.
PD táptalaj	0,6% NaCl, 0,1% (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,1% K ₂ HPO ₄ , 0,05% KH ₂ PO ₄ , 0,05% MgSO ₄ ·7H ₂ O, 0,01% CaCl ₂ , 0,1% élesztőkivonat, 0,25% Sigmacell vagy Avicel (pH 7,0)
YTA tápoldat	Az PD tápoldat kiegészítve 1,5% agar-aggarral.
YTA lágyagar	0,5% élesztőkivonat, 1,0% Tripton, 0,5% NaCl (pH 7,2). Sterilizés után 1mM MgCl ₂ -t és 0,5mM CaCl ₂ -t adunk hozzá.
YTA táptalaj	Az YTA tápoldat kiegészítve 0,45% agar-aggarral.
LB tápoldat	Az YTA tápoldat kiegészítve 1,2% agar-aggarral.
LB lágyagar	1,0% tripton, 0,5% élesztőkivonat, 1,0% NaCl, (pH 7,2).
LB táptalaj	Az LB tápoldat kiegészítve 0,45% agar-aggarral.
	LB tápoldat kiegészítve 1,2% agar-aggarral.

* Stewart és Leatherwood tápoldat (Stewart és Leatherwood, 1976)

** Prasertsan és Doelle tápoldat (Prasertsan és Doelle, 1987)

A dolgozatban felhasznált mikroorganizmusokat a 6.táblázat foglalja össze. A dolgozatban szereplő táptalajokat és tápoldatokat a 7.táblázat foglalja össze. A 8.táblázatban kerültek leírásra a DNS technikákhoz használt oldatok. A PAGE-hoz használt oldatokat a 9. és 10.táblázatban adjuk meg. A 11.táblázatban szerepelnek az agaróz gélelektroforézis oldatai. A munkánk során használt egyéb anyagok és vegyszerek leírását a 12.táblázat tartalmazza.

8.táblázat DNS (plazmid és genom) izolálásához és tisztításához használt oldatok.

Megnevezés	Összetétel
Lizozim oldat	2mg/cm ³ lizozim (Serva), 0,3 M szacharóz, 25mM TRIS-HCl, 25mM EDTA és 0,02% brómkrezolzöld (pH 8,0).
Lúgos SDS	0,3M NaOH, 2% SDS.
Savas fenol/kloroform	5g fenol, 5cm ³ kloroform, 1cm ³ Dv, 5mg 8-hidroxiquinolin.
Semleges fenol/kloroform	A savas fenol/kloroformot ekvilibrálni kell először 0,5 térfogat 1M TRIS-HCl-lel (pH 8,8), majd 0,5 térfogat 0,1M TRIS-HCl-lel (pH 8,0).
SAM-oldat	0,3M Na-acetát, 10mM MgCl ₂ .
TE-puffer	10mM TRIS-HCl, 1mM EDTA (pH 8,0).

9.táblázat Poliakrilamid gélelektroforézis oldatai I.

SDS POLIAKRILAMID GÉL	12,5%-os választógél	3,6%-os gyűjtőgél
30% Akrilamid - 0,8% Bis (cm ³)	6,25	1,20
Desztillált víz (cm ³)	6,68	6,00
3M-os TRIS-HCl pH 8,8 (cm ³)	1,88	—
0,5M-os TRIS-HCl pH 6,8 (cm ³)	—	2,50
10%-os SDS (cm ³)	0,15	0,10
cc. TEMED (μl)	13,50	30,00
10%-os Perszulfát (μl)	30,00	100,00
ÖSSZESEN (cm ³)	15,00	9,90

10.táblázat Poliakrilamid gélelektroforézis oldatai II.

FEHÉRJE KEZELŐLÉ		FUTTATÓ PUFFER		
0,5M-os TRIS-HCl pH 7,4 (cm ³)	2,50		Felső	Alsó
Glicerín (cm ³)	2,00			
SDS (g)	0,80	TRIS (g)	3,0	3,0
0,2%-os brómfenolkék (cm ³)	0,50	Glicin(g)	14,4	14,4
β-merkaptotetanol (cm ³)	0,50	SDS (g)	1,0	—
Feltöltve 10,0 cm ³ -re deszt.vízzel		1-1 dm ³ -re feltöltve		

11.táblázat Agaróz gélelektroforézis oldatai.

AGARÓZ GÉLELEKTROFORÉZIS	
TAE oldat:	40mM TRIS-acetát, 2mM EDTA (pH 8,0).
TBE oldat:	89mM TRIS, 89mM borát, 2,5mM EDTA (pH 8,3).
0,7% agaróz gélhez:	0,7g agaróz 100cm ³ TAE vagy TBE oldatban oldva, 0,5 µg/cm ³ EtBr-ot adunk hozzá.
STOP oldat:	50mM EDTA, 2% szarkozil, 60% glicerín, 0,05% brómfenolkék.

12.táblázat A munkánk során használt egyéb anyagok és vegyszerek.

Anyagok, vegyszerek	CÉG
A mikrobiológiai munkákhoz (élesztőkivonat, tripton, agar)	Oxoid
PAGE-hez (akrilamid, biszakrilamid, TRIS, TEMED, SDS), szubsztrátok (low viscosity CMC, sigmacell, poligalakturonsav, lichenin, laminarin, galaktomannán, birchwood xylán és RBB-O-xylán [blue-xylan])	Sigma
DNS tisztításhoz (fenol, kloroform és β-merkaptóetanol)	Loba Chemie AG
Kromatográfiához (TRIS, SDS, NaCl)	Pharmacia
Antibiotikumok, etidium-bromid és agaróz	Serva
Egyéb vegyszerek	Reanal

II.3. MIKROBIOLÓGIAI MÓDSZEREK

II.3.1. Cellulózbontó baktériumok izolálása

Han és Srinivasan (1968) módszerét követtük, az izolálásnál Stewart és Laetherwood (1976) által közölt táptalajt használva. A cellulózbontó baktériumok szelektálására Taether és Wood (1982) módszerét alkalmaztuk. Az izolált baktériumokat cellulózbontó képességük szerint bíráltuk el a további munkához, amit annak alapján határoztunk meg, hogy 6 nap alatt 300cm³ FF tápoldatban lévő 5g cellulóznak hány %-át képesek elbontani.

II.3.2. A baktériumok azonosítása

A vizsgálatok folyamán Stewart és Laetherwood (1976) által közölt táptalajt használtuk, a vizsgálatokhoz szükséges módosításokkal. A baktériumsejteket Gram módszerrel (JATE, mikrobiológia gyakorlati jegyzet) festettük. A keményítő- és cellulóz-hidrolízist Wynne és Pemberton (1986) szerint, a CMC hidrolízist pedig Teather és Wood (1982) módszerével detektáltuk. Az ammóniaképzést peptonból, a nitrátredukciót a Stackebrandt és Kandler (1979) által alkalmazott módszer alapján értékeltük. Szénhidrát hasznosítást, kataláz aktivitást, zselatin hidrolízist, anaerob szaporodást, a szénhidrátból való savtermelést (glükóznál aerob és anaerob körülmények között), foszfátáz és szulfátáz reakciót a JATE, mikrobiológia gyakorlati jegyzetben leírtak szerint vizsgáltuk. Az antibiotikum érzékenységet és az oxidáz reakciót Gilardi (1971) módszerével teszteltük. A tesztekhez használt oldatokat szűrővel sterilizáltuk. Minden fiziológiai tesztet aerob körülmények között, 30°C-on hajtottunk végre. Az azonosítási vizsgálatok során a *Cellulomonas uda*^T, *Cellulomonas flavigena*^T, *Cellulomonas gelida*^T, *Cellulomonas biazotea*^T, *Cellulomonas fimi*^T, *Cellulomonas cellasea*^T típusörzseket referenciaként használtuk.

II.3.2.1. Elektronmikroszkópos vizsgálat

A baktériumtenyészetből kb. 10⁸ sejt/cm³ sűrűségű szuszpenziót készítettünk. A szuszpenzióból 1 cseppet műanyag hártával és szénrel bevont rostélyra cseppentettünk. Hagytuk ülepedni kb. 2 percig, majd szűrőpapír segítségével a felesleges szuszpenziót leitattuk. Ezután 1 csepp foszfowolframát oldatot (2% H₃PO₄·12WO₃·xH₂O oldat 1M KOH-dal pH 7,0-re állítva) adtunk hozzá. 20-30 másodperc múlva az oldatot leitatjuk és 24 órán át pormentes helyen szárítjuk (Lickfeld, 1976). A preparátumokat Zeiss EM 910 típusú

elektronmikroszkóppal vizsgáltuk (A mikroszkópos vizsgálat a Mezőgazdasági Biotechnológiai OTKA műszerközpontban [A 334] történt).

II.3.2.2. (G + C) mol% meghatározása

A genom DNS-t tisztítás után feloldottuk 0,1-szeres SSC oldatban (0,015 M NaCl; 0,0015 M nátrium-citrát, pH 7,0). A denaturációs hőmérséklet (T_m) meghatározását egy termoprogramozóval ellátott Gilford Response 2 UV-VIS spektrofotométerrel végeztük, kontrollként a *Candida parapsilosis* CBS 604 DNS preparátumot használva ($T_m = 70,6$). Három mérés átlagát számoltuk a következő képlet alapján (Marmur és Doty, 1962):

$$(G + C) \text{ mol \%} = 2,44 \cdot (T_m - 81,5 - 16,6 \cdot \log c)$$

ahol c a kation koncentrációja (mol/dm^3) az oldatban.

0,1SSC-re ($c = 0.0195$):

$$(G + C) \text{ mol \%} = 2,44 \cdot (T_m - 53,11)$$

II.3.3. Enzimtermelés vizsgálata különböző szénforrásokon

A CelB7 jelű törzset egyedüli szénforrásként cellulózt, cellobiózt, glükózt illetve glicerint tartalmazó FF tápoldatban rázatva tenyésztettük a logaritmus szakasz végéig (60 óra; 30°C), majd vizsgáltuk a fermentlé és a sejtekhez kötött celluláz és β -glükozidáz aktivitását.

II.3.4. A baktérium szaporodás és enzimtermelés optimalizálása

II.3.4.1. A baktérium szaporodásának mérése

A tenyészetek sejtszámának változását spektrofotométerrel a 600 nm-en mért optikai denzitás, vagy Pulfrich-féle nefelométerrel a fényszórás méréssel követtük.

II.3.4.2. A baktérium fermentálása

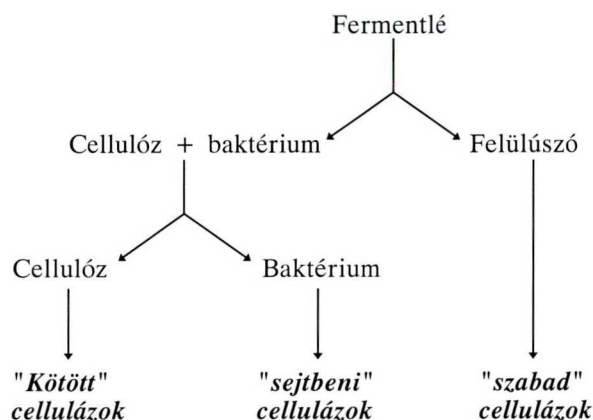
A baktérium fermentálását 3 literes Erlenmeyer lombikban végeztük Prasertsan és Doelle (1987) tápoldatát használva kiegészítve 2% cellulózzal. Egy liter tápoldatot kevertettünk mágneses keverővel (MLM P3, 600 RPM), 72 óráig 30°C -on.

II.4. BIOKÉMIAI MÓDSZEREK

II.4.1. Enzimek preparálása

II.4.1.1. Preparálás az izolált baktériumokból

A fermentléből centrifugálással (Janetzky, MLW K 80, 4000g, 30 perc, 4°C) különválasztottuk a felülúszót (a felülúszóban található cellulázokat "szabad" cellulázoknak neveztük el). A csapadékot (cellulóz és baktériumsejtek) 50mM foszfát-pufferben (pH 7,0) szuszpendáltuk és centrifugálással (Janetzky, MLW K80, 200g, 5 perc, 4°C) elválasztottuk a cellulózt (a cellulózban található cellulázokat "kötött" cellulázoknak



11.ábra Cellulázok preparálásának vázlatja az izolált baktérium fermentlevéből.

neveztük el) és a sejteket (a sejtekhez kötött és a sejtekben található cellulázokat "sejtbeni" cellulázoknak neveztük el). A frakcionálás menete sematikusán a 11. ábrán látható.

II.4.1.1.1. A "szabad" cellulázok preparálása

A továbbiakban "szabad" cellulázok alatt a fermentlében szabadon lévő (cellulózhoz és sejthez nem kötött) cellulázokat értjük. A fermentlé felülúszót 1 mM végkoncentrációig PMSF-fel és 5 mM végkoncentrációig EDTA-val kiegészítettük, majd 0,2µm membránszűrőn (ME24 NL16, Schleicher & Schuell) történő sterilre szűrés után százszorosára koncentráltuk Amicon PM10 membránszűrővel (Moser és *mtsi.*, 1989). A preparátumot 50%-os glicerinben -20°C-on tároltuk.

II.4.1.1.2. Cellulózhoz kötött cellulázok preparálása

A cellulózhoz kötött cellulázokat Langsford és *mtsi.* (1984) által leírt, általunk módosított módszerrel preparáltuk. A sejtektől elválasztott cellulóz csapadékot négyszer mostuk 50mM-os foszfát-pufferben (pH 7,0), így eltávolítva az aspecifikusan kötődött fehérjét. A cellulózhoz kötődött cellulázokat először bidesztillált vízzel eluáltuk, majd oldatukat kiegészítettük PMSF-fel, EDTA-val és foszfát-pufferrel 1mM, 5mM és 30mM végkoncentrációig (pH 7,6), majd 0,2µm membránszűrőn (ME24 NL16, Schleicher &

Schuell) történő sterilre szűrés után pufferrel (1mM PMSF, 5mM EDTA, 30mM TRIS-HCl, pH 8,2) szemben dializáltuk, amit Amicon PM10 membránszűrőn való koncentráció követett, majd 50%-os glicerinné téve -20°C-on tároltuk.

A cellulózzal desztillált vízzel nem elújlható fehérjéket (cellulózhoz kötött cellulázokat) továbbiakban 8M Gu-HCl oldattal (8M Gu-HCl, 50mM foszfátpuffer, pH 7,0) elújlaltuk. A Gu-HCl-dal elújlalt cellulázok oldatát pufferrel (1mM PMSF, 5mM EDTA, 30mM TRIS-HCl, pH 8,2) hígítottuk és 0,2µm membránszűrőn (ME24 NL16, Schleicher & Schuell) történő sterilre szűrés után ultraszűréssel koncentráltuk kevesebb, mint 10⁻³M Gu-HCl tartalomig, majd a preparátumot 50%-os glicerinné téve -20°C-on tároltuk.

II.4.1.1.3. Baktérium sejthez kötött cellulázok preparálása

A sejthez kötött cellulázokon a továbbiakban a baktérium sejtben lévő ill. a sejtfelszínhez kötött cellulázokat értjük. A 11.ábra szerint preparált baktériumsejteket feltáró oldatban szuszpendáltuk (2mM PMSF, 5mM EDTA, 30mM TRIS-HCl, pH 7,5) és szonikálással feltártuk (Branson 450 Sonifier, 20kHz, 300 Watt, 50% időtartam, 2 perc, 0°C), majd Sorvall RC5R centrifugával SS34-es rotorral (48000g, 60 perc, 4°C) centrifugáltuk. A citoplazma frakciót a felülújló (citoplazma frakció I.), a sejttörmeléket pedig a csapadék tartalmazta. A sejttörmeléket 0,5M-os NaCl oldatban (0,5M NaCl, 1mM PMSF, 5mM EDTA, 30mM TRIS-HCl, pH 7,6) szuszpendáltuk (sejttörmelék frakció I.). Mindkét frakciót 50%-os glicerinné téve -20°C-on tároltuk.

A baktérium sejteket enzimés úton is feltártuk. A sejteket lizozimes feltáró oldatban (30mM TRIS-HCl, 0,32M szacharóz, 0,5mg/cm³ lizozim, 5mM EDTA, 1mM PMSF, pH 8,0) szuszpendáltuk, 30°C-on 20 percig inkubáltuk, majd centrifugáltuk (Sorvall RC5R, SS34, 11000g, 30 perc, 4°C). A felülújló képezte a citoplazma frakció II.-t. A csapadékot pufferrel (1mM PMSF, 5mM EDTA, 30mM TRIS-HCl, pH 8,0) szemben dializáltuk és Amicon PM10 membránszűrővel tízszeresére koncentráltuk (sejttörmelék frakció II.). A felülújló a citoplazma frakció II.-t alkotta. A frakciókat 50%-os glicerinné téve -20°C-on tároltuk.

II.4.1.2. Preparálás rekombináns *E. coli*-ból

A rekombináns plazmidot tartalmazó *E. coli*-val beoltott 100µg/cm³ Ap-vel kiegészített 100cm³ LB tápoldatot 37°C-on egy éjszakán át rázattunk. A sejteket centrifugáltuk (15000g, 1 perc), majd pufferben (0,1M foszfát puffer, pH 6,8) szuszpendáltuk és szonikáltuk (Branson 450 Sonifier, 20kHz, 300 Watt, 50% időtartam) 2 percig 0°C-on. A szonikált sejteket centrifugáltuk (15000g, 10 perc) és a felülújlót (CFE) használtuk enzim aktivitás

meghatározásához.

A CFE oldatot tovább tisztítottuk etanolos kicsapással (50% végkoncentráció, 4°C). A centrifugálást (15000g, 1 perc) követően a csapadékot feloldottuk puffer A-ban (50mM TRIS-HCl, pH 7,4). Ezt az oldatot FPLC-vel, Mono Q HR 5/5 (Pharmacia) anioncserélő oszlopon frakcionáltuk tovább puffer B (1M NaCl, 50mM TRIS-HCl, pH 7,4) grádienssel. A frakciók celluláz aktivitását CMC-ből felszabadított redukáló cukor meghatározásával és/vagy CMC tartalmú agar lemezen követtük.

II.4.2. Enzimek tisztítása

II.4.2.1. Gélkromatográfia

A 0,05M $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ -tal ekvilibrált Sephadex G-10, G-25 gél (Pharmacia) használtunk a különböző preparátumok sómentesítésére (20cm x 1cm oszlop). Sómentesítés után a preparátumokat liofilizáltuk.

II.4.2.2. Affinitáskromatográfia

A ConA Sepharose affinitáskromatográfiát (3cm x 0,5cm) Gilkes és *mtsi.* (1988), alapján végeztük. A cellulóz affinitáskromatográfiát (3cm x 0,5cm) a fermentlé felvitele után a "Cellulózhoz kötött cellulázok preparálása" II.4.1.1.2. fejezet alapján végeztük.

II.4.2.3. Ioncserélő kromatográfia

TRIS pufferrel (30mM TRIS-HCl, pH 8,0 "puffer A") ekvilibrált DEAE-Sepharose Fast Flow (Pharmacia) anioncserélő oszloptöltettel feltöltött oszlopon (30mM TRIS-HCl, 0,5M NaCl, pH 8,0 "puffer B") lineáris 0,5M NaCl grádienssel (puffer B) végeztük a szeparálást.

II.4.2.4. FPLC

Az FPLC (Fast Protein Liquid Chromatograph) két pumpából (High Precision Pump P-500), egy programozó egységből (Gradient Programmer GP-250) és egy frakciószedő kollektorból (Fraction Collector FRAC-100) állt. Az oszlopokat (Mono Q, Phenyl Superose) a gyári előírásnak megfelelően használtuk. Az eluáláshoz használt pufferek összetételét a megfelelő ábraszövegben adjuk meg.

II.4.3. Fehérjekoncentráció meghatározása

A minták fehérjetartalmát egyrészt Lowry és *mtsi.* (1951) által leírt módszer szerint határoztuk meg, másrészt, kis mennyiségű illetve kis koncentrációjú minták esetében Bradford (1976) módszerét alkalmaztuk, mindkét esetben humán szérum albumint (HSA) használva standardként.

II.4.4. Fehérjék vizsgálata poliakrilamid gélelektroforézissel

Az SDS PAGE-t (0,75mm vastag, 10,0 - 12,5% poliakrilamid koncentrációjú) O'Farrel (1975) szerint végeztük apró módosításokkal (Fábián és *mtsi.*, 1995). A fehérjék festése CBB (Coomassie Brilliant Blue) R-250-nel Chen és *mtsi.* (1993), az ezüst-festés Wray és *mtsi.* (1981), vagy Merril és *mtsi.* (1984) szerint történt. A glikoproteinek detektálását SDS-PAGE-ben Dubray és Bezard (1982) cikke alapján végeztük el. Abban az esetben, ha a gélben is ki akartuk mutatni a celluláz aktivitást, akkor a mintákat 60°C-on 10 percig kezeltük fehérje kezelőlében Gilkes és *mtsi.* (1989) szerint a szokásos 100°C, 5 perc helyett.

II.4.4.1. Az enzimek kimutatása

A cellulázok detektálására eddig a PAGE utáni agar replika gélben (mely tartalmazza a vizsgálandó enzim szubsztrátját) Kongó vörössel történő festést használták (Béguin, 1983).

Az általunk kidolgozott módszert használtuk a cellulázok kimutatására SDS PAGE után (Fülöp és Felföldi, 1990). A módszer lényege: Béguin (1983) módszerével eltávolítottuk a gélből az SDS jelentős részét, majd négyszer 20'-ig 50mM-os foszfátpufferben (pH 6,8) rázattuk a gélt. Az átpufferolás után a gélt CMC oldatban (1% CMC, 50mM foszfát, pH 6,8), vagy a megfelelő szubsztrát oldatában inkubáltuk 40°C-on 180 percig, majd Teather és Wood (1982) módszere szerint Kongó vörössel megfestettük a gélt. A fehérjéket egyes esetekben CBB R-250-nel, más esetekben ezüst-festéssel tettük láthatóvá, a kimutatni kívánt enzim mennyisége és aktivitása függvényében.

II.4.4.2. Az enzimek molekulatömegének meghatározása

A molekulatömeg meghatározás, az SDS PAGE-ben történő ismert molekulatömegű standardek felhasználásával történt.

II.4.5. pH és hőoptimum meghatározása

A pH optimum meghatározása a II.4.7.2. pontban leírt módon, az enzimeknek megfelelő szubsztrát, valamint 3,0-tól 10,0-ig 0,5 egységenként növekvő pH-jú (citrát-, foszfát- és TRIS-) puffer jelenlétében, 30°C-on történt.

A hőoptimumot az optimális pH-n, a II.4.7.2. pontban leírt módon, a megfelelő szubsztráttal, 10°C-tól 70°C-ig 5°C-onként határoztuk meg.

II.4.6. Színes szubsztrát készítése

II.4.6.1. Blue-CMC előállítása és tisztítása

A színes szubsztrát készítéséhez McCleary (1988) módszerét módosítottuk és továbbfejlesztettük. 1000cm³ desztillált vízben feloldottunk 10g CMC-t, majd feloldódás után az oldatot 10g NaOH-dal és 10g NaCO₃-tal lúgosítottuk, majd 60°C-on 10 percig kevertettük. Ezután óvatosan 7g RBB-t adtunk az oldathoz és 0,5 órán keresztül 60°C-on tartottuk. Lehűtés után állandó kevertetés mellett két térfogat etanol:aceton (4:1 tf%) elegyet adtunk hozzá cseppenként. A keletkezett RBB-O-CMC csapadékot szűrtük (centrifugáltuk) és visszaoldottuk 700cm³ desztillált vízben (1óra, szobahőmérsékleten), majd etanol:aceton elegyével újra kicsaptuk (ha a felülúszó nagyon kék lenne, megismételjük még egyszer a kicsapást). Az újra oldott blue-CMC-t liofilizáltuk és levegőtől elzárva szobahőmérsékleten tároltuk. Ezzel az eljárással kb. 10-11g blue-CMC kapunk (60-65 % kitermelés) (Fülöp és Ponyi, 1997).

II.4.6.2. Blue-mannán előállítása és tisztítása

1000cm³ desztillált vízben feloldottunk 5g galaktomannánt, majd az oldatot 10g NaOH-dal és 10g NaCO₃-tal lúgosítottuk, majd 60°C-on 10 percig kevertettük. Ezután óvatosan 2,5g RBB-t adtunk az oldathoz és 0,5 órán keresztül 60°C-on tartottuk. Lehűtés után állandó kevertetés mellett két térfogat etanol:aceton (4:1 tf%) elegyet adtunk hozzá cseppenként. A keletkezett RBB-O-mannán csapadékot szűrtük (centrifugáltuk), visszaoldottuk 700cm³ desztillált vízben (1óra, szobahőmérsékleten), majd etanol:aceton elegyével újra kicsaptuk (ha a felülúszó nagyon kék lenne, megismételjük még egyszer a kicsapást). Az újra oldott blue-mannánt liofilizáltuk és levegőtől elzárva szobahőmérsékleten tároltuk. Ezzel az eljárással kb. 4-5g blue-mannánt kapunk (70-75 % kitermelés) (Fülöp és Ponyi, 1997).

II.4.7. Enzimaktivitás meghatározása

II.4.7.1. Enzimaktivitás mérése színes szubsztráttal

II.4.7.1.1. Celluláz aktivitás mérése

0,5cm³ 1,1 % blue-CMC-t (0,1M TRIS-HCl pH 7,2 pufferben oldva), 0,25cm³ puffert és 0,25cm³ enzim-oldatot összemértünk, 60 percig 35°C-on inkubáltuk. A reakciót leállítottuk 2cm³ etanol:aceton (1:1 tf%) elegyével, alaposan összeráztuk és 2 perc elteltével 3000g-vel 3 percig centrifugáltuk. A felülúszó fényelnyelését vakkal szemben 590 nm-en mértük. A vak fényelnyelése nem lehetett több mint 0,02 AU.

Egy enzim egységen az enzim azon mennyiségét értjük, mely a reakció körülményei között 1 AU fényelnyelést szabadít fel a blue-CMC-ből.

II.4.7.1.2. Xylanáz aktivitás mérése

A mérés körülményei megegyeznek a celluláz mérésével, csak 0,5cm³ 1,1 % blue-xylánt használtunk szubsztrátnak. Egy enzim egységnek az enzim azon mennyiségét értjük, mely a reakció körülményei között 1 AU fényelnyelést szabadít fel a blue-xylánból.

II.4.7.1.3. Mannanáz aktivitás mérése

A mérés körülményei megegyeznek a celluláz mérésével, csak 0,5cm³ 1,1 % blue-mannánt használtunk szubsztrátnak. Egy enzim egységnek az enzim azon mennyiségét értjük, mely a reakció körülményei között 1 AU fényelnyelést szabadít fel a blue-mannánból.

II.4.7.2. Enzimaktivitás mérése redukáló cukor meghatározásával

A redukáló cukor meghatározása 3,5-dinitroszalícilsav (DNSA) módszerrel (Miller, 1959) történt, glükózt használva standardként. A celluláz (endoglükánáz) aktivitás egysége: μg glükóz/ μg enzim/perc.

II.4.7.3. β -glükozidáz meghatározása p-nitrofenil- β -D-glükoziddal

A β -glükozidáz aktivitást a p-nitrofenil- β -D-glükozidból felszabadított nitrofenol meghatározásával mértük (Wood és Bhat, 1988). A β -glükozidáz aktivitás egysége: μmol p-nitrofenol / μg enzim/perc.

II.4.7.4. Cellobiozidáz meghatározása p-nitrofenil- β -D-cellobioziddal

A cellobiozidáz aktivitást a p-nitrofenil- β -D-cellobiozidból felszabadított nitrofenol meghatározásával mértük (Wood és Bhat, 1988). A cellobiozidáz aktivitás egysége: μmol p-nitrofenol/ μg fehérje/perc.

II.4.7.5. Enzimaktivitás meghatározása CMC tartalmú agar lemezen

A celluláz (β -glükanáz) aktivitás egyszerű félkvantitatív meghatározását CMC tartalmú agar lemezen (1,2% agar-agar, 0,1% CMC, 0,1M TRIS-HCl, pH 7,2) végeztük. A vizsgálandó mintákból 10 μl -t a lemezre cseppentettünk (Egy lemezen nagyszámú minta tesztelése végezhető el). 30 perces 30°C-on történő inkubálás után a lemezt 30 percig Kongó-vörös oldattal (0,1%) festettük, majd az aktivitást 1M NaCl-dal 30 percig történő differenciálással tettük láthatóvá. Az aktivitást 0-tól 3-ig terjedő skálán osztályoztuk a világos folt átmérője és intenzitása alapján. Ugyanilyen módon mérhető a xylanáz aktivitás 0,1% xylánt tartalmazó agar táplemezen is.

II.4.8. Az enzimek szubsztrátspecifitásának meghatározása

Az optimális pH-n és hőmérsékleten, a II.4.7.2. pontban leírt módon, a megfelelő szubsztrátokkal (Avicel PH 102, Sigmacel, cellulóz por MN300, szűrőpapír (Schleicher & Schuell), CMC, laminarin, lichenin, xylán (birchwood), galaktomannán, poligalakturonsav) végeztük.

II.4.9. Cellulózkötő domén vizsgálata

A rekombináns *E. coli*-ból származó sejtmentes felülúszót (CFE) szűrőpapírral (Schleicher & Schuell) inkubáltuk 30 percen át szobahőmérsékleten. Centrifugálás után a felülúszó valamint az eredeti CFE aktivitását blue-CMC-vel határoztuk meg, hogy a redukáló cukor háttere ne zavarjon (Montgomery és Fu, 1988).

II.5. GENETIKAI MÓDSZEREK

II.5.1. DNS tisztítása, koncentrációjának mérése

II.5.1.1. Plazmid DNS tisztítása

Nagy mennyiségű plazmid DNS preparátumot Sambrook és *mtsi.* (1989) alapján lúgos lízissel állítottunk elő.

A transzformált sejtek plazmid DNS jelenlétét gyors-teszt (quick-test) módszerrel vizsgáltuk (Prágai és *mtsi.*, 1994a). A vizsgálandó telepekből egy kicsnyi baktériumot 50 μ l lizozim oldatban szuszpendáltunk és ezeket 20 percig 37°C-on inkubáltuk. A szuszpenziót 25 μ l 2% SDS oldattal összekevertük, majd 25 μ l semleges fenol/kloroformmal extraháltuk. A centrifugálás (20°C, 5 perc, 12000g) után a felülúszóban lévő DNS és RNS struktúrákat 0,7% agaróz gélelektroforézissel választottuk el.

II.5.1.2. Genom DNS tisztítása

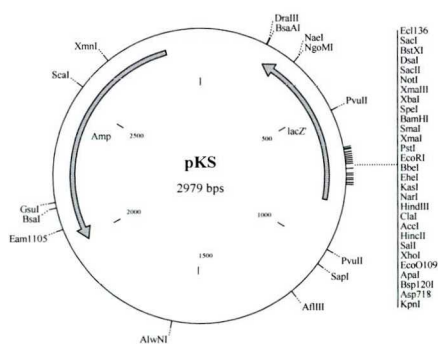
5cm³ 14-16 órán át szaporított baktérium tenyészetet a centrifugálás (20°C, 5 perc, 12000g) után 500 μ l lizozim oldatban szuszpendáltuk, majd 20 percig 37°C-on inkubáltuk. A szuszpenziót 360 μ l 2% SDS oldattal és 500 μ l semleges fenol/kloroformmal összekevertük, majd centrifugáltuk (20°C, 5 perc, 12000g). A vizes fázist óvatosan, vágott végű pipettával tiszta eppendorf csőbe vittük át és azonos térfogatú semleges fenol/kloroformmal újra extraháltuk. Az extrakciót addig ismételtük, amíg a határfázison már nem látható kicsapódott fehérje. Ekkor a felülúszót 2,5 térfogat etanollal összekevertük. A csapadékot centrifugáltuk (20°C, 5 perc, 12000g), 70 tf%, -20°C-os etanollal mostuk, majd a felülúszót teljesen eltávolítottuk. A csapadékot 300 μ l TE pufferben oldottuk és 6 μ l RNázt (10mg/cm³) adtunk hozzá. A keveréket 30 percig 37°C-on inkubáltuk, majd 100 μ l semleges fenol/kloroformmal extraháltuk. A centrifugálás (20°C, 5 perc, 12000g) után a vizes fázist azonos térfogatú kloroform/izoamil-alkohollal (24:1) extraháltuk. A centrifugálás (20°C, 5 perc, 12000g) után a felső fázist 2,5 térfogat etanollal összekevertük. A kicsapódott DNS-t centrifugálással gyűjtöttük össze (20°C, 5 perc, 12000g), 70 tf%, -20°C-os etanollal mostuk, végül a felülúszót teljesen eltávolítottuk. Vákuumszáritás után a DNS-t 300 μ l steril bidesztillált vízben oldottuk és -20°C-on tároltuk (Prágai és *mtsi.*, 1994b).

II.5.1.3. DNS koncentráció mérése

A TE pufferben oldott DNS minta koncentrációját Beckman DU-50 spektrofotométerrel 259nm-en mért abszorbancia alapján számoltuk. $50\mu\text{g}/\text{cm}^3$ DNS koncentrációnak 1 A_{259} felel meg.

II.5.2. Génkönyvtár készítés

A *Cellulomonas* sp. génkönyvtárat pBluescript® II KS⁺ vektorban készítettük el Zabarovsky és Allikmets (1986) szerint a következő módosításokkal. Az általunk izolált *Cellulomonas* sp. CelB2 és CelB7 törzsek genom DNS-ét részlegesen emésztettük *Sau*3AI restriktációs endonukleázzal. A DNS fragmenseket agaróz gélelektroforézissel elválasztottuk és a 2-8 kb tartományba esőket a gélből izoláltuk. A *Sau*3AI képezte 5' ragadós végeket részlegesen feltöltöttük Klenow DNS polimerázzal dATP és dGTP nukleotidok felhasználásával. A *Sal*I-el emésztett pBluescript® II KS⁺ vektor (Stratagene, 12.ábra) DNS-ét hasonlóan parciálisan töltöttük dTTP és dCTP nukleotidokkal. A kromoszóma és vektor DNS-t 1:1 arányban ligáltuk. A könyvtárat nem amplifikáltuk *Escherichia coli*-ban, hogy megelőzzük olyan klónok elvesztését, melyek az *E. coli* életképességét nagymértékben csökkentik. A könyvtár megbízhatóságának vizsgálatához *E. coli* DH5 α -t elektrotranszformáltunk $1\mu\text{l}$ ligációs keverékkel, mely $0,04\mu\text{g}$ vektor és $0,04\mu\text{g}$ genom DNS-t tartalmazott. A transzformált sejteket LB agar lemezen szelektáltuk $100\mu\text{g}/\text{cm}^3$ Ap, 0,6mM IPTG és $40\mu\text{g}/\text{cm}^3$ X-Gal jelenlétében. $1,7 \times 10^5$ Ap rezisztens telepet kaptunk, melyek közül 90,5% volt fehér, ami azt mutatja, hogy ezek rekombináns plazmidot hordoztak. Az inzert átlagos méretét 30 véletlenszerűen választott fehér telepből izolált plazmid *Eco*RI és *Xho*I emésztésével határoztuk meg. Ez körülbelül 2,5 kb volt. A $P = 1 - (1 - f/F)^N$ képletből számolva az átlag inzert méret (f) és a genom méret (F) alapján (*Cellulomonas* becsült genom mérete 4,5Mb) kb. 8290 fehér ill. 9110 Ap rezisztens telep (N) reprezentálja a *Cellulomonas* sp. CelB7 genomját 99% valószínűséggel (P).



12.ábra A pBluescript® II KS⁺ klónozó vektor.

II.5.3. Az aktív klónok szelektálása a könyvtárból

A *Cellulomonas* génkönyvtárral transzformált *E. coli* DH5 α sejteket Ap-nel 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ -re, blue-CMC-vel (blue-xylánnal) 0,1%-ra kiegészített LB lágyagar gélbe szuszpendáltuk (700 transzformáns/ cm^3), majd a szuszpenziót Ap-nel kiegészített (100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$) LB agar lemezre (20cm átmérőjű) rétegeztük, hogy a transzformált és endoglükánázt (endoxylanázt) termelő klónokra szelektáljunk.

A deléciós klónok szelektálását endoglükánáz és endoxylanáz aktivitásra Ap-t (100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$) tartalmazó és 0,1% blue-CMC-vel (blue-xylánnal) kiegészített LB agar lemezen végeztük.

II.5.4. A celluláz és xylanáz aktív klónok restrikciós térképezése

A DNS endonukleáz emésztéshez, defoszfátáláshoz és ligáláshoz az enzimeket (restrikciós endonukleázok, CIAP és a T4 DNS ligáz) a Stratagene, az Amersham és a Boehringer Mannheim cégektől vásároltuk. Az emésztéseket, a defoszfátálást és a ligálást a gyártók javaslata alapján végeztük.

II.5.5. DNS elválasztás agaróz gélelektroforézissel

A különböző méretű DNS-ek elválasztására horizontális agaróz gélelektroforézist használtunk. A nagyméretű DNS fragmenteket TAE pufferben kis feszültséggel (1-2 V/cm), a kis méretűeket TBE pufferben magasabb feszültséggel (5-10 V/cm) választottuk el (Hopwood és *mtsi.*, 1985). Végül az EtBr-ot tartalmazó agaróz gél UV transzilluminátoron vizsgáltuk, mert UV fényben az EtBr-os DNS jellegzetes vörös fényt emittál.

II.5.6. A DNS szekvenálása

A manuális szekvenáláshoz a pBluescript® II KS plazmidba épült inzertet T7 DNS polimerázzal (⁷T Sequencing Kit - Pharmacia) a gyártó javaslata szerint a Sanger-féle láncterminációs módszerrel (Sanger és *mtsi.*, 1977) szekvenáltuk. 5 μg plazmid DNS-t 20 percig 37°C-on lúggal denaturáltuk, majd etanollal kicsaptuk és 70 tf%-os etanollal mostuk. A csapadékot 10 μl bidesztillált vízben felvettük, majd 1 μl Annealing puffert és 1 μl megfelelő primert adtunk hozzá. A mintát 65°C-on tartottuk 2 percig, majd

szobahőmérsékletűre hűtöttük. A primer ekkor kapcsolódik a vele komplementer plazmid részhez. Ezután 3 μ l Labelling Mix-dNTP-t, 1 μ l Enzyme Dilution puffert, 0,5 μ l 35 S-dATP-t és 0,5 μ l T7 DNS polimeráz enzimet adtunk az elegyhez. Az 5 percig 37°C-on tartó polimerizálás után a mintát 3,5 μ l-enként négy eppendorfcsőbe tettük, melyekbe előzőleg 2,5 μ l "A", "C", "G" és "T" Mix-Short-ot mértünk be. A mintákat a didezoxi-nukleotidokkal 37°C-on 5 percig inkubáltuk, majd a reakciót 4 μ l Stop oldattal leállítottuk. A mintákat hűdenaturáltuk (100°C, 3 perc), majd az egyszálú DNS fragmenteket 6,0%-os poliakrilamid gélben választottuk el, végül a karbamid mentesített gélről autoradiogramot készítettünk.

Az automata szekvenáláshoz a *Cellulomonas* sp. genom DNS *Sau*3AI-val emésztett darabját, (mely a keresett celluláz gént kódolja) különféle restriktációs enzimekkel térképeztük és vizsgáltuk, hogy a különböző fragmentek képesek-e a keresett enzim termelésére. A legkisebb aktív DNS darabot hordozó klónt ezután a térképezés eredményeinek felhasználásával daraboltuk és szubklónokat készítettünk pBluescript® II KS klónozó vektorba. A keletkezett szubklónokból a vektorban található T7 és T3 promóternek megfelelő primerekkel amplifikáltuk az inszertet PCR segítségével 25 ciklusban, amelyet gélből tisztítás után festék terminációs szekvenáló kit segítségével (Amersham) a T7 és T3 primerek felhasználásával szekvenáltuk. A szekvenálási reakció előtti PCR módszert azért állítottuk be, mert a *Cellulomonas* sp. igen magas GC tartalommal rendelkezik, és így a szekvenálás nem volt hatékony magából a vektorból. A szekvenálási reakciót ABI 373 (ABI 310) szekvenáló gépen analizálták. A szekvenálási reakció eredményeinek értékelése után a nagyobb szubklónokból újabb klónokat készítettünk és így a keresett gént kódoló régiót a fenti módszerrel szekvenáltuk a két szálon végig.

II.6. FEHÉRJÉK ÖSSZEHASONLÍTÁSA, MODELLEZÉSE

A szekvenciák összehasonlítására BLASTP 1.3.11 (Altschul és *mtsi.*, 1990) és BLASTP 1.4.10 (Altschul, és *mtsi.*, 1997) programokat használtunk, melyek a világ különböző molekuláris biológiai szerverein megtalálhatók.

A másodlagos szerkezet előrejelzéséhez a következő programokat használtuk: Double prediction (Deléage és Roux, 1987), Gibrat (Gibrat és *mtsi.*, 1987), Garnier (Garnier és *mtsi.*, 1978), GOR és GOR IV (Garnier és *mtsi.*, 1996), Homologue (Levin és Garnier, 1988), Predator (Frishman és Argos, 1996), SOPM (Geourjon és Deléage, 1994), SOPMA3 (Geourjon és Deléage, 1995), SOPMA4 (Geourjon és Deléage, 1994).

A fehérjeszekvencia összeállításában a GCG programcsomag (embnet.abc.hu) volt segítségünkre.

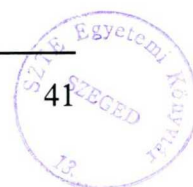
A fehérjék homológia modellezéséhez szerverként a SWISS-MODEL Protein Modelling Servert, adatbázisként a SWISS-PROT protein sequence database Release 36.0-t használtuk.

A fehérjemolekulák modellezéséhez a következő programokat használtuk:

Swiss-PdbViewer v 3.0 (Guex és Peitsch, 1998)

HyperChemTM 4.5 molekula modellező program

A dolgozat külleme a Corel WordPerfect Suite 7 programcsomaggal készült.



III. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

III.1. AZ IZOLÁLT BAKTÉRIUMOK

III.1.1. A baktériumok izolálása

Gödöllői és békéscsabai talajból 17 cellulózbontó baktériumot izoláltunk. A baktériumok Whatman No. 1 szűrőpapíron sárga telepeket képeztek, MN 300 cellulózt tartalmazó agar-lemezen pedig jól látható

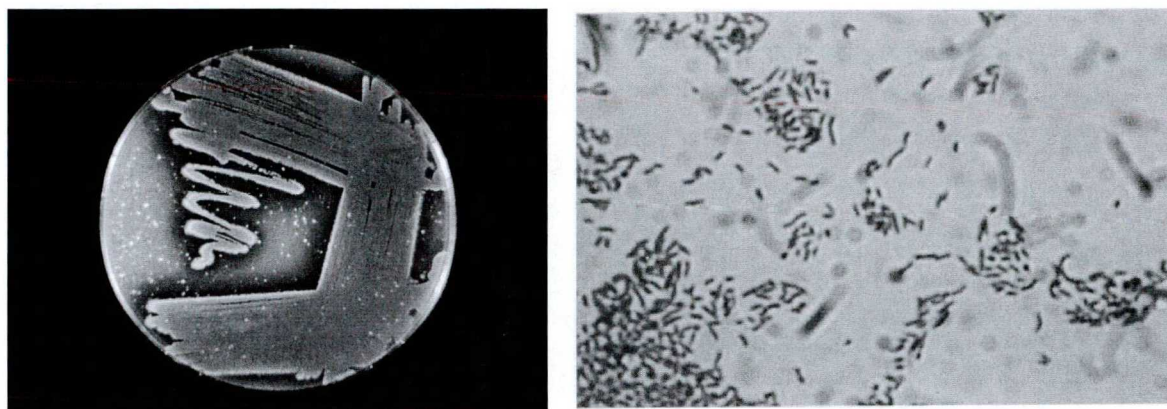
feltisztulási zónát alakítottak ki (13.ábra A). A talajban a cellulózbontó baktériumok szorosan a növényi szervesanyaghoz tapadva fordulnak elő, ami megnehezíti izolálásukat. Az izolálás eredményesebbé tehető ezen mikroorganizmusok dúsításával, amely a talajba kevert cellulózzal való inkubálással történik. A talajkivonattal beoltott kémcsövekben a tápoldat és a levegő határán a cellulózbontó mikroorganizmusok felszaporodnak,

13.táblázat Cellulózbontó baktériumok cellulolitikus aktivitása Whatman No. 1 szűrőpapíron.

Törzs	Whatman No 1 szűrőpapír	
	Visszamaradt cellulóz (g)	Elbontott cellulóz (%)
B1	2,74	45,2
CelB2	2,40	52,0
B3	2,69	46,1
B4	2,75	45,0
B5	2,53	49,3
CelB7	2,01	59,8
B10	2,45	51,0
B11	2,64	47,2
B13	2,60	48,0
B16	2,67	46,5
B17	2,55	49,0
<i>Cellulomonas flavigena</i>	2,65	47,0
<i>Cellulomonas fimi</i>	2,25	55,0
<i>Cellulomonas uda</i>	2,15	57,0

a szűrőpapír bomlásnak indul és szétfoszlik. A cellulózbontó kultúrából beoltott szűrőpapíron a cellulolitikus baktériumok telepei láthatóvá válnak, miközben a cellulózt elfolyósítják. A cellulózt bontó telepeket többszöri átoltással Han és Srinivasan (1968), módszere szerint tovább dúsítottuk, majd a dúsított kultúrákból vett inokulumokat 1% cellulózporral kiegészített SL táptalajra szélesztettük. A cellulózt bontó baktériumok telepei körül a jól ismert tisztulási zóna jelentkezett a cellulóz elbontásának eredményeként (13.ábra A). A cellulózagaron szaporodó baktériumtelepek mindegyikét megvizsgáltuk CMC-bontó képességre. Teather és Wood (1982) módszerével érzékenyen, gyorsan és egyértelműen el lehet dönteni egy mikroorganizmusról, hogy képes-e enzimjeivel a CMC bontására. Az

eljárással csak az endoglükanázokat lehet detektálni, mivel a módszer lényege, hogy a Kongó vörös öt vagy több, β -1,4 kötéssel összekapcsolt β -D-glükopiranozil egységekkel reagál. Ezért a kb. 600 glükózegységből álló CMC-t az exoglükanázok (melyek glükózt vagy cellobióz egységeket hasítanak le a cellulózlánc nem redukáló végéről) hosszabb idő alatt bontják le a kritikus határig, mint a véletlenszerűen a lánc közben hasító



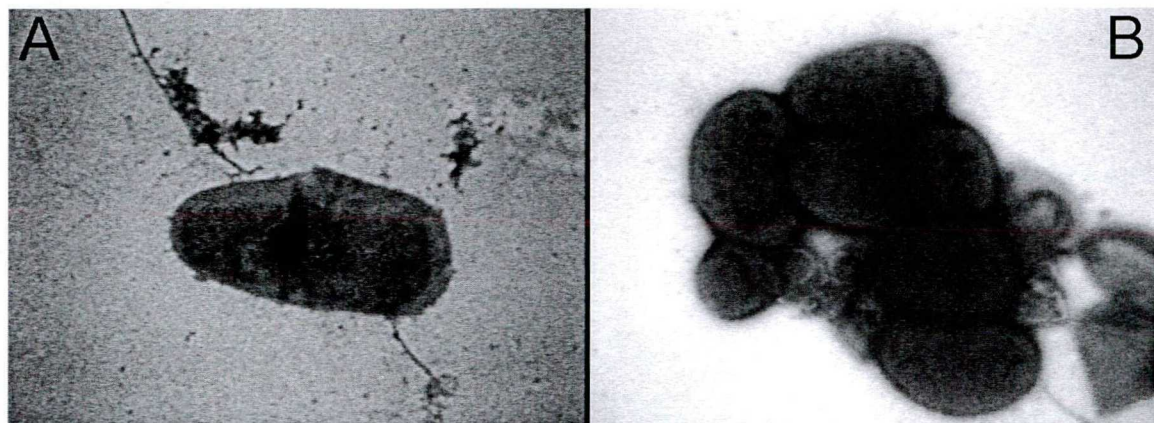
13.ábra 'A': A cellulóz tartalmú agaron a cellulózbontó baktériumok (CelB7) telepei körül a cellulózbontás hatására hidrolizálási zóna jelenik meg (bal ábra). 'B': A CelB7 mikroszkópos képe (jobb ábra).

endoglükanázok. A mikrokristályos cellulóz bontásához az exoglükanázokra is szükség van (Gilkes és mtsi., 1988), aminek jelenlétére utal a baktériumok telepei körül a cellulózagaron megjelenő tisztulási zóna (13.ábra A). Munkánk során az izolált cellulózbontó baktériumokat cellulózagarra történő többszöri szélesztéssel tisztítottuk meg a kísérő baktériumoktól. Az izolátumok tisztaságát más szénforrást (glükóz, cellobióz, keményítő) tartalmazó, Stewart és Leatherwood által leírt táptalajon ellenőriztük, kiegészítve mikroszkópos vizsgálatokkal. Az izolált baktériumok közül a CelB7 jelű békéscsabai talajból izolált baktérium a Whatman No. 1 szűrőpapír közel 60%-át, míg a többi izolátum a cellulóz 45-52%-át bontotta el 6 nap alatt (13. táblázat). A cellulózbontó képesség alapján a CelB2 és a CelB7 jelű békéscsabai szántóföldi talajból (búzatarló) izolált cellulózbontó baktériumot vizsgáltuk tovább.

III.1.2. A baktériumok tulajdonságai és azonosításuk

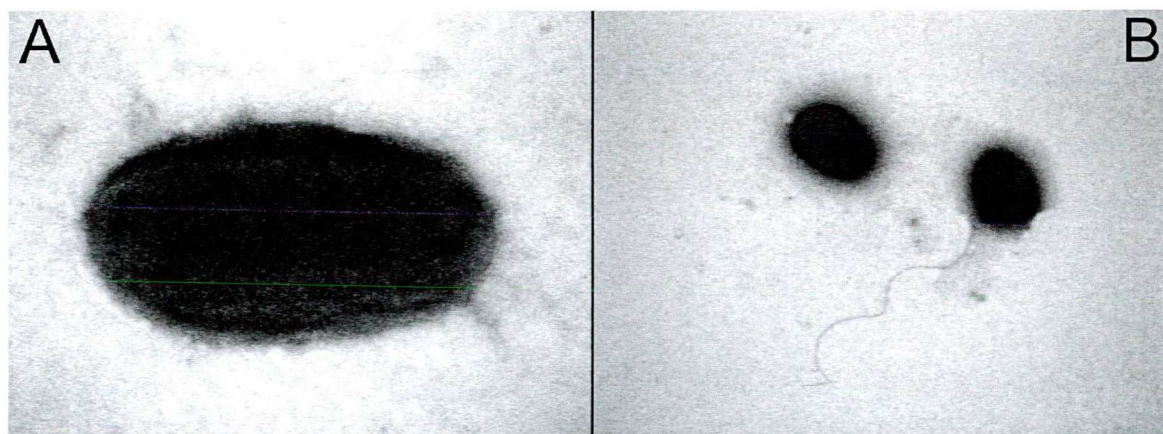
Az azonosításhoz a *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Sneath és mtsi., 1986) irányelveit, leírását használtuk kiegészítve a *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt és mtsi., 1994) útmutatásaival is. Az elektronmikroszkópos vizsgálatok szerint (14.

és 15. ábra) mindkét izolátum aktívan mozgó, helyváltoztatásra képes poláris ostorral



14. ábra Az izolált CelB2 elektronmikroszkópos képe. 'A': 12500-szoros nagyításban, 'B': 10000-szeres nagyításban.

rendelkezik, mely az esetek túlnyomó részében egy hosszú flagellum. Fiatal korban a *Cellulomonas* sp. CelB2 sejtjei a mérések szerint 0,5-0,6 - 2,5-3,0 μm nagyságúak, melyek idősebb korban rövidebbek 0,5 - 1,4 μm -esek és sokszor összetapadnak. A *Cellulomonas*



15. ábra Az izolált CelB7 elektronmikroszkópos képe. 'A': 25000-szeres nagyításban, 'B': 6300-szoros nagyításban.

sp. CelB7 sejtjei hasonlóan a CelB2-höz 0,5-0,6 - 2,2-2,8 μm , idősebb korban 0,5 - 1,2 μm nagyságúak. Mindkét baktérium cellulóz vagy más poliszacharidot tartalmazó közegben nyálkát termel, sokszor a sejtek tömegesen tapadnak össze e nyálka hatására. Ez a jelenség más *Cellulomonas* fajok esetében is megfigyelhető (pl. *C. fimi*, *C. flavigena*). A nyálka sokszor igen megnehezíti a sejtek ill. a sejtekben lévő enzimek, genetikai anyagok

izolálását.

A kiválasztott törzs a referencia törzseknél is eredményesebben hidrolizálta a Whatman No. 1 szűrőpapírt (13.táblázat). Mindkét (CelB2 és CelB7 jelű) izolátum egy Gram

14.táblázat Az izolált baktériumok közül a B2 és B7 jelű törzs általános tulajdonságainak összehasonlítása a referenciaként használt *C. fimi*-vel.

Általános tulajdonságok	<i>Cellulomonas fimi</i>	CelB2	CelB7
Telep morfológia	kör, csillogó	kör, sima	kör, sima
Telep pigmentáció	sárga	világos sárga	sárga
Telepátmérő (mm)	0,4-1,8	0,9-3,1	0,4-2,1
Mozgásképeség	+	+	+
Optimális hőmérséklet	30°C	30°C	30°C
Növekedési faktor	tiamin, biotin	tiamin, biotin	tiamin, biotin
Gram festődés	+	+	+
Sejt alakja	pálcika	pálcika	pálcika
Anaerob növekedés	+	+	+

pozitívan festődő, pálcika alakú (13.ábra B), mozgásra képes baktérium, amely sárga, 0,4-2,1 mm átmérőjű telepeket képez a CelB7, illetve világos sárga, 0,9-3,1 mm átmérőjű telepeket képez a CelB2 esetében (14.táblázat). Növekedésükhöz tiaminra és biotinra van

15.táblázat Az enzimaktivitások összehasonlítása a CelB2, CelB7 jelű törzs és a referenciaként használt *C. fimi* között.

Enzim aktivitás	<i>Cellulomonas fimi</i>	CelB2	CelB7
Amiláz	+	+	+
Celluláz	+	+	++
Cellobiozidáz	+	+	+
CMCáz	+	++	++
Xylanáz	+	++	+
Xylobiozidáz	+	+	+
Pektináz	+	±	-
Mannanáz	+	+	+
Zselatináz	±	±	±
Kataláz	+	+	+
Oxidáz	-	-	-
Foszfátáz	+	+	+
Szulfatáz	-	-	-
Nitrát redukció	+	+	+

szükség és képesek anaerob körülmények között növekedni.

A keményítőt, a cellulózt, a CMC-t és a zselatint (gyengén) hidrolizálják. Cellobiózt,

16.táblázat A CelB2, CelB7 valamint a referenciaként használt *C. fimi* szénforrás hasznosítása.

Egyedüli szénforrás	<i>Cellulomonas fimi</i>	CelB2	CelB7
Cellulóz	+	+	+
Keményítő	+	+	+
D-xylóz	+	+	+
L-arabinóz	+	+	+
D-glükóz	+	+	+
D-mannóz	+	+	+
D-galaktóz	+	+	+
Cellobióz	+	+	+
Maltóz	+	+	+
Szacharóz	+	+	+
Acetát	-	+	+
Glicerín	+	+	+
L-laktóz	+	-	-
D-ribóz	-	+	-

xylobiózt, xylánt és mannánt bontó enzimeket is termelnek. Pektináz aktivitással csak a CelB2 rendelkezik. Peptonból ammóniát termelnek és a nitrátot redukálják. Kataláz és foszfatáz pozitívak. Szulfatáz és oxidáz reakciójuk negatív (15.táblázat).

17.táblázat Savtermelés a CelB2, CelB7 valamint a referenciaként használt *C. fimi* között különböző szénforrás hasznosításakor.

Savtermelés	<i>Cellulomonas fimi</i>	CelB2	CelB7
D-glükóz aerob	+	+	+
D-glükóz anaerob	+	+	+
Laktóz	+	-	+
Fruktóz	+	+	+
L-arabinóz	+	+	+
Maltóz	+	+	+
Cellobióz	+	+	+
D-xylóz	+	+	+
Szacharóz	+	+	+
Dextrin	+	+	+

Szénforrásként a következő vegyületeket hasznosítják: zselatin, cellulóz, keményítő, poligalakturonsav, D-xylóz, L-arabinóz, D-glükóz, D-mannóz, D-galaktóz, xylobióz,

cellobióz, maltóz, szacharóz, acetát, glicerin. L-laktózt egyik sem, D-ribózt csak a CelB2 képes felhasználni (16.táblázat).

Savat termelnek D-glükózból, laktózból, fruktózból, L-arabinózból, maltózból, cellobiózból, D-xylózból, szacharózból és dextrinből (17.táblázat).

18.táblázat A CelB2, CelB7 valamint a referenciaként használt *C. fimi* antibiotikum rezisztenciája.

Antibiotikum rezisztencia	<i>Cellulomonas fimi</i>	CelB2	CelB7
Sztreptomicin	-	-	-
Tetraciklin	-	-	-
Polimicin B	-	-	-
Neomicin	-	-	-
Kanamicin	-	-	-
Ampicillin	-	+	+

A vizsgált antibiotikumokra érzékenyek, egyedül ampicillin rezisztencia figyelhető meg az izolált két törzsnél (18.táblázat).

Az izolált baktériumok közül a két kiválasztott CelB2 és CelB7 jelűt az elsődleges vizsgálódás eredményei alapján a szabálytalan, nem spórázó Gram⁺ pálcák közé soroltuk.

Ez a Bergey's Manual of Systematic

Bacteriology 15.csoportját jelenti

(Sneath és mtsi, 1986). A csoportba

tartozó nemzetségek közül fakultatív

anaerob tulajdonsággal csak a

következők rendelkeznek:

Corynebacterium, *Agromyces*,

Cellulomonas, *Oerskovia*, *Rothia*,

Actinomyces, *Arcanobacterium*,

Propionibacterium, *Arachia*,

Gardnerella. Három genus kivételé-

vel (*Agromyces*, *Cellulomonas*,

Oerskovia) – melyek elsősorban talaj-

ban fordulnak elő – mind emberi és állati patogének, így vizsgálatunkból kiestek. Az

Agromyces kataláz negatív, az *Oerskovia* sejtjeinek kiterjedt elágazó hifaszerű alakja van.

Így csak a *Cellulomonas* genusba sorolhatók az izolátumok (CelB2 és CelB7). A

Cellulomonas genusban a következő fajok találhatók: *Cellulomonas biazotea* (Bergey és

mtsi., 1923) *Cellulomonas cartae* (Stackebrandt és Kandler, 1980), *Cellulomonas cellasea*

19.táblázat (G+C)% a *Cellulomonas* genuson belül.

Faj	(G + C) mol %
<i>Cellulomonas biazotea</i>	72,2
<i>Cellulomonas cellasea</i>	74,8
<i>Cellulomonas cellulans</i>	76,6
<i>Cellulomonas fimi</i>	71,7
<i>Cellulomonas flavigena</i>	72,7
<i>Cellulomonas gelida</i>	72,4
<i>Cellulomonas uda</i>	72,0
CelB2	74,5
CelB7	74,3

(Bergey és mtsi., 1923), *Cellulomonas cellulans* (Stackebrandt és Keddie, 1988), *Cellulomonas fermentans* (Bagnara és mtsi., 1985), *Cellulomonas fimi* (Bergey és mtsi., 1923), *Cellulomonas flavigena* (Bergey és mtsi., 1923), *Cellulomonas gelida* (Bergey és mtsi., 1923), *Cellulomonas hominis* (Funke és mtsi., 1995), *Cellulomonas turbata* (Stackebrandt és mtsi., 1983), *Cellulomonas uda* (Bergey és mtsi., 1923). Az Anyagok és módszerek fejezetben bemutatott és törzsgyűjteményből beszerzett fajokat hasonlítottuk össze az izolátumokkal. Az izolátumok optimális növekedéséhez biotinra és tiaminra van szükség, a *Cellulomonas* genus tagjaira jellemzően (Sneath és mtsi., 1986). Az izolált és kiválasztott törzs minimál táptalajon nem képes növekedni, más növekedési faktorokat is igényel, mint arról a *Cellulomonas flavigena* esetében is beszámoltak (Kim és Wimpenny, 1981). A *Cellvibrio* genusba tartozó baktériumok ásványi só táptalajon is képesek növekedni (Blackall és mtsi., 1985) és a Polymixin B antibiotikumra nem érzékenyek. Az izolátumok leginkább a *Cellulomonas fimi*-re hasonlítottak, de attól több tekintetben is eltértek. Nem bontják, vagy csak kis mértékben (CelB2) a pektint, az acetátot hasznosítják, a laktózt viszont nem. Az ampicillinnel (20 μ g/ml) szemben kismértékű rezisztencia tapasztalható. Az elvégzett azonosítási vizsgálatokból kitűnik (14.-18.táblázat), hogy a CelB2 és a CelB7 jelű törzs a *Cellulomonas* genusba sorolható, de a genuson belül annak egyik ismert tagjával sem azonos.

A (G+C) % mérésének eredménye alapján (19.táblázat) a két izolált baktérium szintén a *Cellulomonas* genusra jellemző magas 70% feletti (G+C) % értéket mutatja, de nem egyezik egyik ismert fájával sem.

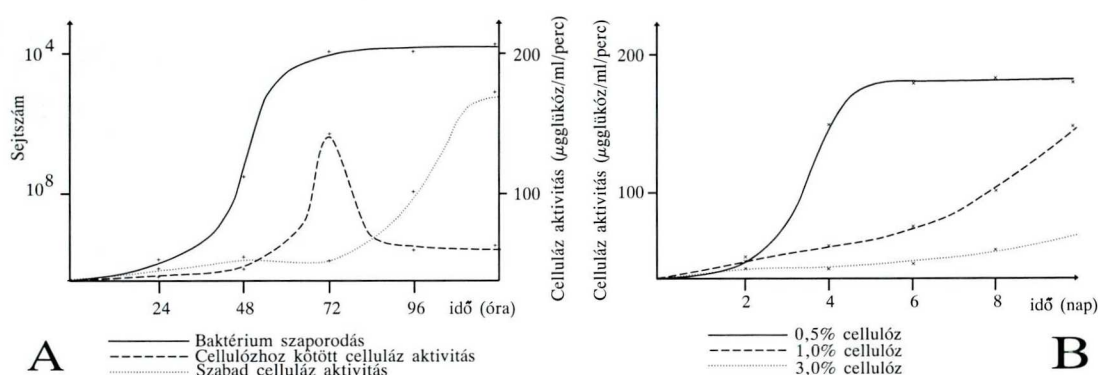
A további genetikai vizsgálatok nagymértékben valószínűsítik, hogy a békéscsabai talajból izolált cellulózbontó baktériumok közül legalább a *Cellulomonas* sp. CelB7 a genus új tagja, önálló, új faj.

Az izolált törzseket a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményénél nemzetközi ipari szabadalommal védve, a *Cellulomonas* sp. CelB2-t NCAIM {P} B 001203 (Felföldi és Fülöp, 1993) és a *Cellulomonas* sp. CelB7-t NCAIM {P} B 001204 (Fülöp és Felföldi, 1993) számokon helyeztük letétbe.

III.1.3. Az izolált baktériumok fermentálása

A baktérium által termelt O-glikozil hidrolázok ún. extracelluláris enzimek, azaz a sejt által az extracelluláris térbe transzportálódnak.

Vizsgáltuk a celluláz aktivitás változását az időben, valamint az aktivitás időfüggését a cellulóz mennyiségétől függően a fermentáció folyamán (16.ábra). A baktérium fermentálásakor a stacioner szakasz elején érték el a cellulózhoz kötött cellulázok a maximális aktivitást, míg a "szabad" cellulázok (sejtmentes fermentlé felülúszó) aktivitása a fermentálás folyamán végig növekedett (16.ábra A). A táptalaj cellulóztartalmának



16.ábra 'A': celluláz aktivitás változása a CelB7 jelű törzs szaporodása folyamán. A baktérium 0,5 % MN 300 cellulózt tartalmazó tápoldatban szaporodott, 30 °C-on, 600 rpm-mel kevertetve. 'B': különböző cellulóz mennyiség hatása a CelB7 fermentlében található "szabad" celluláz aktivitásra a fermentáció folyamán.

növelésével csökkent a "szabad" cellulázok specifikus aktivitása a fermentlében (16.ábra B).

A fermentálási vizsgálatok alátámasztják Stutzenberger (1989) megfigyelését, mely szerint a cellulózhoz kötött denaturálódott enzimek gátolják a cellulázok cellulózhoz kötődését. A 16.B ábrából kitűnik, hogy a cellulóz mennyiségének növelésével csökken a "szabad" cellulázok mennyisége, mert egyrészt a feleslegbe került cellulóz nem limitálja a kötődést, másrészt amint Langsford és *mtsi.* (1987) munkájából is kiderül, a cellulózhoz kötődött cellulázok ellenállnak a saját (baktérium) proteázok hasításának. Ezt a megfigyelést megerősíti a 16.A ábra is, melyből egyértelműen látszik, hogy a kötődött cellulázok csökkenésével növekszik a "szabad" cellulázok mennyisége a fermentálás folyamán (a sejthez kötött cellulázok mennyisége két nagyságrenddel kisebb, mint a cellulózhoz kötött ill. "szabad" cellulázoké, így gyakorlatilag elhanyagolható).

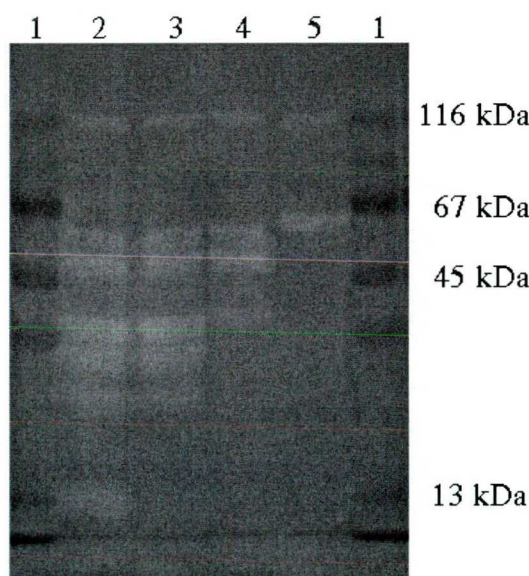
A celluláz termelést különböző szénforrást tartalmazó tápoldatokban is megvizsgáltuk. A fermentlé csak a cellulózt és a cellobiózt mint egyedüli szénforrást tartalmazó

tenyészetekben rendelkezett celluláz aktivitással, de β -glükózidáz-aktivitás egy esetben sem volt észlelhető (20.táblázat). A sejtekhez kötöten azonban minden esetben kimutatható volt mind celluláz-, mind β -glükózidáz-aktivitás (20.táblázat).

20.táblázat Különböző szénforráson tenyésztett CelB7 baktérium sejtekben a sejthez kötött és fermentáléban található celluláz és β -glükózidáz aktivitás detektálása.

Különböző szénforrás	Celluláz aktivitás (μ g glükóz/ml/perc)		β -glükózidáz aktivitás (μ mol p-nitrofenol/ml/perc)	
	Fermentlé	Sejthez kötött	Fermentlé	Sejthez kötött
Glükóz	–	15,0	–	2,1
Glicerín	–	39,0	–	3,0
Cellobióz	110,0	41,0	–	5,2
Cellulóz	230,0	44,0	–	5,7

A baktériumsejthez kötött aktivitás további vizsgálatához a táptalajról közvetlenül az elektroforézis kezelőlébe vitt baktérium inokulumot 60°C-on 10 percig inkubáltuk, majd az SDS PAGE után a II.4.4.1. pont szerint detektáltuk az aktivitást. Még a glicerint



17.ábra Különböző táptalajon szaporított CelB7 sejteiben található celluláz aktivitású fehérjék elválasztása SDS PAGE-vel. 1. Molekulatömeg standard, 2. 1% cellulózzal, 3. 1% cellobiózzal, 4. 1% glükózzal, 5. 1% glicerinnel kiegészített FF táptalajon szaporított CelB7 törzs.

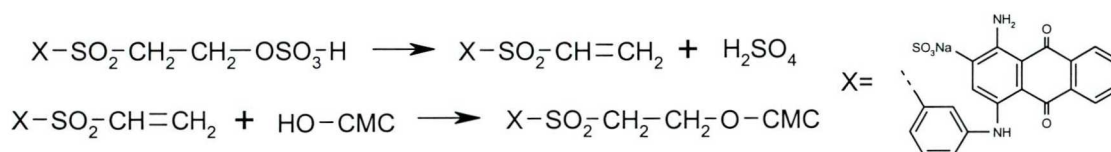
szénforrásként tartalmazó táptalajon történő tenyésztés folyamán is kimutatható volt egy kevés sejthez kötött celluláz aktivitás (17.ábra). Berg, (1975) a *Cellvibrio fulvus* és Yamane

és *mtsi.* (1971) a *Pseudomonas fluorescens* var. *cellulosa* esetében számoltak be arról, hogy cellobiózt vagy glükózt tartalmazó tenyészetekben szaporított sejtek esetében a sejthez kötöten ki lehet mutatni celluláz aktivitást. Moser és *mtsi.* (1989) a munkacsoportjuk által klónozott cellulázok közül is kimutatták, hogy az endoglükanáz A és endoglükanáz B glicerinen, valamint az endoglükanáz B még glükózon tenyésztett *C. fimi* sejtekben is átíródik. Hasonló eredményeket kaptunk a CelB2 törzzsel is.

III.2. A SZÍNES SZUBSZTRÁTOK

III.2.1. Színes szubsztátok készítése

A *Cellulomonas* sp. génkönyvtár gyors analízise érdekében, valamint a celluláz és mannanáz aktivitásának méréséhez, az "Anyagok és módszerek" részben foglaltak szerint készítettük az RBB-O-CMC-t és RBB-O-mannánt (18.ábra). Az optimális reakció körülményeinek megismeréséhez meghatároztuk az optimális szubsztát és festékkoncentráció, valamint a pH és hőmérséklet értékeket (az adatok nincsenek



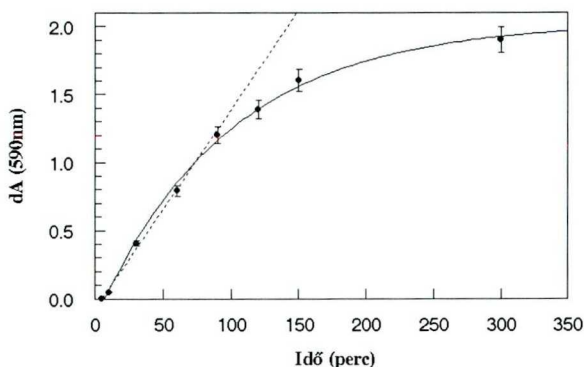
18.ábra RBB-O-CMC előállításának reakcióegyenlete.

feltüntetve). A kinyerés az RBB-O-CMC esetében 60-65%, az RBB-O-mannán esetében 65-70% volt, de kismértékben függött a reakció körülményeitől, valamint a tisztítás lépéseitől (hányszor csaptuk ki a színes szubsztátot). A kitermelést még a CMC karboxi-metiláltsága is befolyásolta (low viscosity, high viscosity CMC). A kétszeres oldás és kicsapás bizonyult a legeredményesebbnek, mely optimális kitermelést és tisztaságot eredményezett. A színes szubsztátok tömegegységre vonatkoztatva 10-11% festéket tartalmaztak. Ez szükségesnek és elégségesnek bizonyult mind a génkönyvtárak tesztelésénél, mind az enzimaktivitás meghatározásánál. Ha a festéktartalom több volt mint 15%, a színes szubsztát kevésbé oldódott, ha viszont kevesebb volt mint 10%, akkor halvány volt, alkalmatlan a tesztelésre és az aktivitás mérésére is. A színes szubsztátokból 1%-os oldatot lehetett készíteni 37°C-on. Az optimális festéktartalom 10-15% között mozog, mely összhangban van Biely és mtsi. (1985a) által közöltekkel, melyet blue-xylánra állapítottak meg. Az optimális szubsztát:festék arány 1:0,7 az RBB:CMC esetében és 1:0,5 az RBB:mannan esetében, ugyanis a mannánhoz a Remazol Brilliant Blue R festék jobban kötődik. Mindkét szubsztát stabilnak mutatkozott pH 4.0-10.0 között és autoklávozható volt (121°C; 1,5 atm; 30 min) anélkül, hogy a színes szubsztát elbomlott volna (szemben McCleary, 1988 munkájával) ezért alkalmas mikrobiológiai, molekuláris biológiai valamint biokémia munkákra is. A vizsgált pH-tartományon belül a látható fényabszorbancia maximuma 590nm körülinek adódott, így a fényelnyelés független a pH-tól.

III.2.2. Enzimaktivitás meghatározása színes szubsztráttal

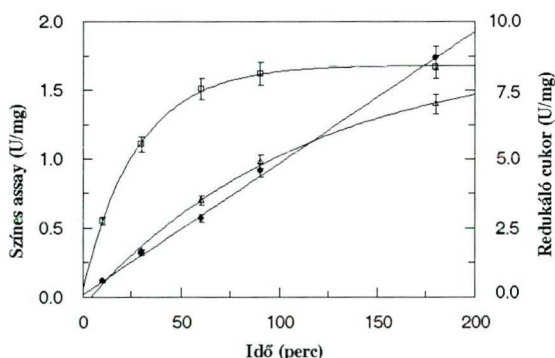
Elsőként azt kellett meghatározni, hogy az RBB-O-CMC és az RBB-O-mannán ugyanolyan jól használható-e az enzimaktivitás meghatározására, mint a DNSA reagens.

Az optimális reakció feltételeihez meg kell állapítani, mikor arányos az enzimaktivitás az idővel és a bemért enzim mennyiségével, mert csak ilyen körülmények között mérve kapunk helyes eredményt az enzim specifikus aktivitására. Az optimális szubsztrát koncentráció 0,55% színes szubsztrátnak bizonyult, amely megfelel 0,5%



19.ábra CelB7 mannanáz aktivitás mérése RBB-O-mannánnal. Reakció körülmények: 0,55% RBB-O-mannán, 0,125 mg/cm³ CFE a CelB7 törzsből (●) 37 °C.

CMC vagy mannán koncentrációnak, 10% festéktartalmat feltételezve. A 19.ábra mutatja az endo- β -1,4-mannanáz aktivitást RBB-O-mannán szubsztráton. A reakció 90 percig lineáris a reakció körülményei között. Hasonló a helyzet az RBB-O-CMC-vel is (az adatok



20.ábra A CEGA endo- β -1,4-glükanáz aktivitása RBB-O-CMC-vel és a keletkező redukáló cukor meghatározásával. A reakcióelegyben 0,55% az RBB-O-CMC és 0,5mg/cm³ a CEGA koncentráció (CFE), 37°C, pH 7,2. A reakció kétszeres térfogat etanol:aceton 1:1 eleggyel leállítva (●), a reakció kétszeres térfogat 96tf% etanollal leállítva (Δ) és a redukáló cukor a kétszeres térfogat etanol:aceton (1:1) eleggyel leállított reakcióból 3,5-dinitro-szalicilsavval meghatározva (□).

nem láthatók). A 21.táblázat összegzi a CelB7 enzimaktivitását színes szubsztráttal valamint DNSA reagenssel meghatározva.

Az etanol : aceton (1:1) kicsapással jobban karakterizálható az endo aktivitás, mint a 96%-os alkohollal történő kicsapással, a reakció tovább lineáris (20.ábra). Továbbá az etanol : aceton (1:1) kicsapás kevésbé függ a pH-tól és só koncentrációtól (Biely és mtsi., 1985a). A 20.ábráról jól látható, hogy a 3,5-dinitro-szalicilsavval történő meghatározás esetén a

reakció linearitása 30 perc után megszűnik, míg a színes szubsztráttal történő meghatározás

esetén akár 120 percig is lineáris a reakció. A kétszeres térfogat etanol:aceton (1:1) eleggyel leállított reakció még ennél is hosszabb ideig lineáris, valószínűleg ez az elegy, még a

21.táblázat CelB2 és CelB7 enzimaktivitás színes és hagyományos szubsztráton.

Enzim	endo- β -1,4-glükanáz aktivitás		endo- β -1,4-mannanáz aktivitás	
	CMC ^a	RBB-O-CMC ^b	mannan ^a	RBB-O-mannan ^b
<i>Cellulomonas</i> sp. CelB2 ^c	5,3	1,5	—	—
<i>Cellulomonas</i> sp. CelB7 ^d	—	—	25,6	8,1

^a DNSA reagenssel meghatározva

^b Színes szubsztráttal meghatározva

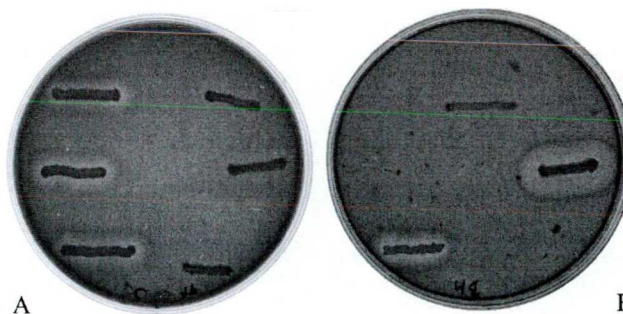
^c Cellulózzal kiegészített FF tápoldatban szaporítva

^d Galaktomannánnal kiegészített FF tápoldatban szaporítva

kisebb molekulatömegű, de már emésztett színes szubsztrát molekulákat is ki tudja csapni az oldatból, így hosszabb ideig követhető nyomon a reakció.

III.2.3. Tesztelés színes szubsztráttal

Megvizsgáltuk, hogy az RBB-O-CMC és az RBB-O-mannán használható-e enzimaktivitással rendelkező baktériumok, klónok tesztelésére. A színes szubsztráttal kiegészített táptalajon nagy mennyiségű baktérium vizsgálható meg. Az aktív (megfelelő enzimaktivitással rendelkező) baktériumok a színes szubsztrátot elbontják, a keletkező kis fragmentek a táptalajban gyorsan szétdiffundálnak, így fehér feltisztulási zónát hoznak létre maguk körül. A színes szubsztráttal kiegészített és a táptalajt felülöntött lágyagar réteg (mely a baktériumot is tartalmazta) megakadályozza a véletlen fertőzést és a klónok keveredését is, így a klónok könnyen



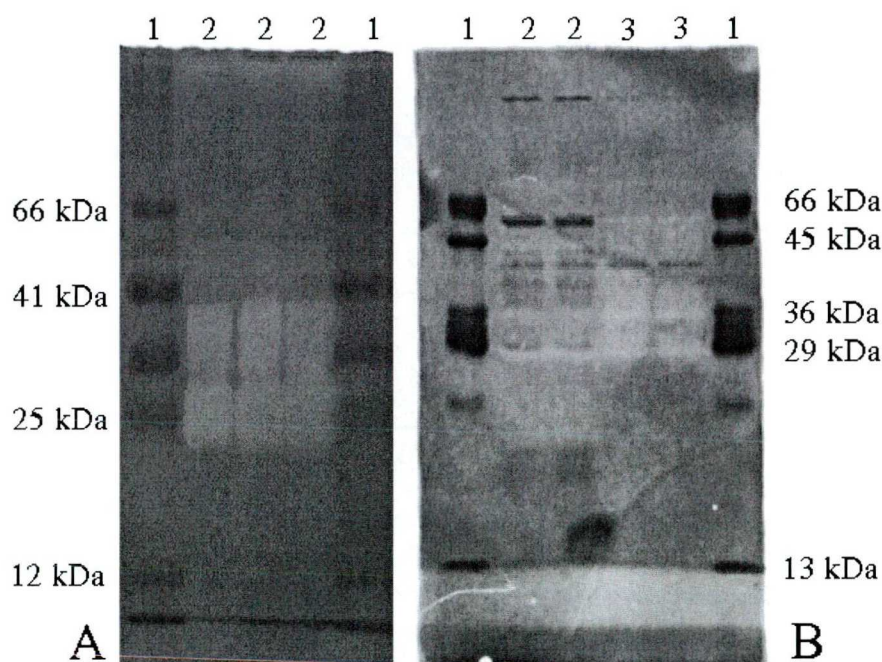
21.ábra Endo- β -1,4-glükanáz és endo- β -1,4-mannanáz aktivitás tesztelése RBB-O-CMC-vel (A) és RBB-O-mannánnal (B). Az 'A' lemez bal oldalán három glükanáz aktivitással rendelkező a jobb oldalán három glükanáz aktivitással nem rendelkező baktérium van. A 'B' lemez alsó részén két mannanáz aktivitással rendelkező, a felső részén egy mannanáz aktivitással nem rendelkező baktérium látható.

izolálhatók. A feltisztulási zóna alapján a baktériumok gyorsan és könnyedén szelektálhatók. Ilyen módon szelektáltuk a génkönyvtárunkat is (lásd III.4.1.). Ezt a módszert sikerrel alkalmaztuk λ fágba készített génkönyvtár tesztelésére is (az adatokat nem közöljük). Jól látható a 21. ábrán a baktérium telep körül kialakult feltisztulási zóna, mely a termelt enzim működésének következménye.

III.3. ENZIMEK KARAKTERIZÁLÁSA

III.3.1. Fehérje és enzimaktivitás detektálása gélelektroforézis után

Az enzimaktivitás detektálására SDS poliakrilamid gélelektroforézis után kidolgoztunk egy módszert, mely alkalmas a cellulázok, endoglükanázok, xylanázok, mannanázok és pektinázok detektálására is. Az endoglükanázokat aktivitásuk alapján detektáljuk, a fehérjéket pedig CBB R-250 vagy ezüsfestéssel tesszük láthatóvá ugyanabban a gélben.



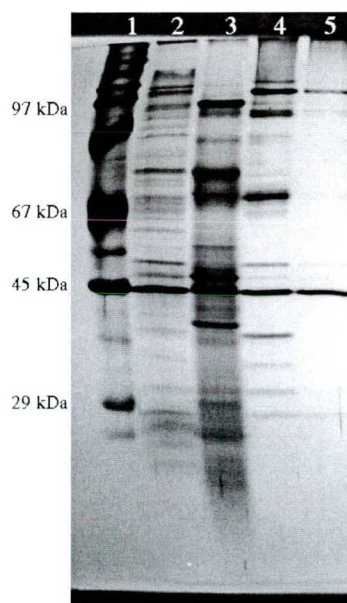
22.ábra SDS poliakrilamid gél fehérjére és endoglükanáz aktivitásra festve. 'A': Aktivításra és fehérjére festve CBB R-250-nel. A1. molekulatömeg standard, A2. fermentlé felülúszó. 'B': Aktivításra és ezüsstel fehérjére festve. B1. molekulatömeg standard, B2. fermentlé felülúszó, B3. fermentlé felülúszó 50% etanollal kicsapva.

Cellulomonas sp. CelB7 sejtjeit feltárva SDS gélelektroforézis alkalmazásával szétválasztottuk, majd az SDS eltávolítása után szubsztrátot (CMC) tartalmazó puffer oldatban történő inkubálás után a gél-t festettük előbb fehérjékre, majd aktivitásra (lásd II.4.4.1.). Ezzel a kettős festési módszerrel egyidejűleg lehet detektálni a fehérjéket és a CMCáz aktivitást. A szubsztráttal történő inkubáláskor az enzim elbontja a szubsztrátot, így festéskor az elbontott szubsztrát helyén és környékén világos folt keletkezik (22.ábra), mely könnyen észlelhető a fehérjecsíkok mellett. Ezzel a módszerrel (Fülöp és Felföldi, 1990)

sikeresen detektáltunk a cellulázokhoz hasonlóan xylanáz és mannanáz aktivitást is adekvát szubsztrát jelenlétében (az adatokat nem közöljük). Sokféle módszer ismeretes cellulázok (glükánázok) aktivitásának detektálására gélelektroforézis után. Az első módszerek egyike Béguin (1983) módszere, mely a gélelektroforézis után szubsztrát tartalmú replika gélét készített és a replika gélét festve tette láthatóvá az aktivitást. Hasonló módon Biely és *mtsi.* (1985b) a replika gélben színes szubsztrát alkalmazásával egyszerűbben és hatékonyabban detektálták az enzimaktivitást. Schwarz és *mtsi.* (1987) a gélbe keverték a szubsztrátot, majd az elektroforézis után aktivitásra festették a gélét. Az eredeti gélét elektroforézis után szubsztrát oldatban inkubálta és utána festette Mathew és Koteswara (1992). Az említett módszerek közül a replika gél alkalmazásának az előnye az egyszerűség, hátránya viszont, hogy a replika és az eredeti gél nehezen összevethető az eltérő méretek és két gél különbözősége miatt. A gélbe kevert szubsztrát és az enzim(ek) kölcsönhatásba léphetnek az elektroforézis folyamán, így a végeredmény bizonytalan lehet. Az általunk alkalmazott módszerrel viszont egy gélben az aktivitás és a fehérjék is detektálhatók, így a fehérje és a hozzátartozó aktivitás egyszerre látható.

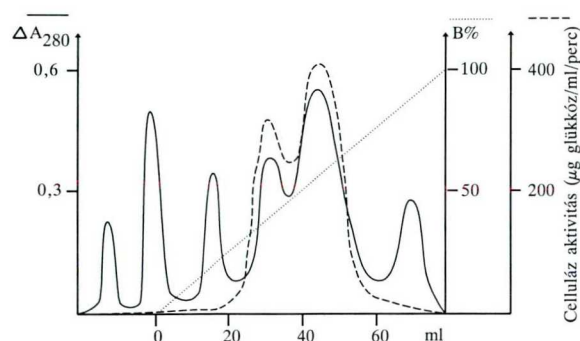
III.3.2. Az enzimek jellemzése

A cellulázokat *Cellulomonas* sp. CelB7 fermentálásával állítottuk elő. A "szabad" cellulázok preparálása a fermentléből történt, a felülúszóból 50% alkohollal történt kicsapás után cellulóz oszlopon történő affinitáskromatográfiával tisztítottuk az enzimet tovább. A fermentlé felülúszóban számos celluláz aktivitással rendelkező fehérje volt jelen. Affinitáskromatográfiával tovább tisztítva a preparátumot elsősorban egy 45 kDa molekulatömegű celluláz aktivitással rendelkező fehérjét nyertünk, de kis mennyiségben jelen volt még egy 115 kDa molekulatömegű fehérje is (23.ábra). A fermentléből preparált



23.ábra Cellulázok preparálása a fermentléből. 1. molekulatömeg standard: foszforiláz b (97 kDa); bovin szérum albumin (67 kDa); tojás albumin (45 kDa); karbon anhidratáz (29 kDa), 2. CelB7 fermentlé felülúszó, 3. CelB2 fermentlé felülúszó, 4. CelB7 fermentlé felülúszó 50% alkohollal kicsapva, 5. Cellulóz affinitásozlopon megkötődött frakció.

115 kDa és 45 kDa molekulatömegű cellulázok a vízdíszható cellulózhöz kötődve ellenállnak

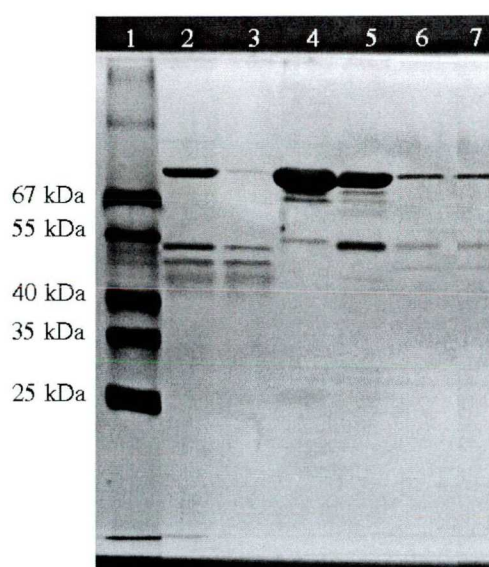


24. ábra Cellulózzal desztillált vízzel eluált fehérjék elválasztása DEAE-Sepharose anioncserélő oszlopon (25cm x 1,6cm oszlop; 5,4mg fehérje). Puffer A: 30mM TRIS-HCl pH 8,2; puffer B 30mM TRIS-HCl, 0,5M NaCl pH 8,2.

cellulózzal. Az így összegyűjtött fehérjéket DEAE-Sepharose oszlopon próbáltuk szétválasztani (24. ábra). A kromatogrammon jól látható, hogy a fehérjéket nem sikerült teljesen elválasztanunk egymástól, melyet a frakciókból készített SDS PAGE is bizonyít (25. ábra). Látható, hogy a frakciók egyike sem homogén, ezért az aktív frakciókat (25-52) összegyűjtve Mono Q FPLC oszlopon próbáltuk meg sikerebben elválasztani (26. ábra). Ezzel az elválasztással két celluláz aktivitással rendelkező frakciót kaptunk, melyek homogenitását SDS PAGE-vel vizsgáltuk meg (30. ábra 7,8,9). AZ SDS PAGE-ből látható, hogy a két aktivitással rendelkező csúcs (26. ábra), homogén, 85 kDa és 53 kDa molekulatömegű fehérjéknek felel meg.

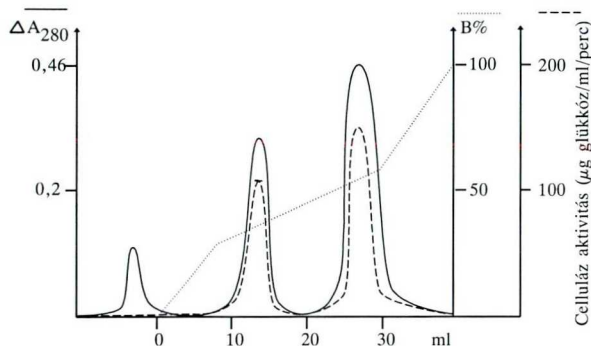
a proteolitikus hasításnak (Langsford és mtsi., 1987), ezért megtartják cellulózhöz kötődő képességüket. Ez a tulajdonságuk a fermentlé felülúszó tárolásával csökken, a cellulózhöz kötődő cellulázok eltűnnek a fermentléből. A proteolitikus hasítás következtében keletkező kis molekulatömegű cellulázok nem képesek kötődni a cellulózhöz, így a fermentlében jelenlévő proteázok hamarosan elbontják.

A cellulózhöz kötött cellulázok preparálása folyamán először desztillált vízzel eluáltuk a fehérjéket a



25. ábra Cellulázok elválasztása SDS poliakrilamid gélelektroforézissel (10%-os gél, ezüst festés). 1. Molekulatömeg marker: HSA (67 kDa), γ -globulin (55 és 25 kDa), ovalbumin (40 kDa), GAPD (35 kDa), 2. Cellulózzal desztillált vízzel eluált fehérjék, 3. 24. ábra 18. frakció, 4. 24. ábra 30. frakció, 5. 24. ábra 38. frakció, 6. 24. ábra 49. frakció, 7. 24. ábra 53. frakció.

A fehérjék Ag-PAS-ra is festődtek (Dubray és Bezard, 1982), így mindkét fehérje glikoprotein.



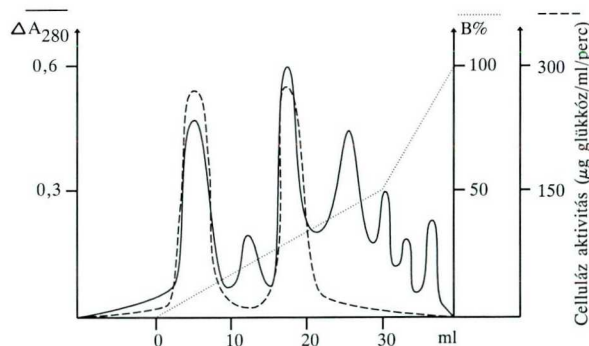
26.ábra DEAE-Sephadex 25-52 frakciójának (24.ábra) FPLC Mono Q anioncserélő oszlopon történt további szeparálása. Puffer A: 30mM TRIS-HCl pH 7,6; puffer B 30mM TRIS-HCl, 0,5M NaCl pH 7,6.

további tisztításnak vetettük alá. A frakciók FPLC Phenyl-Superose oszlopon csökkenő ammóniumsulfát gradienssel történő elválasztása esetén az elválasztás mellett még a fehérjék hidrofíli/hidrofób jellegére is következtetni lehet.

A Phenyl-Superose oszlopon történő elválasztások (28. és 29.ábra) megfelelő tisztaságú fehérjéket eredményeztek. A celluláz aktivitással rendelkező frakciók homogenitását SDS PAGE-vel vizsgáltuk meg (30.ábra 4,5,6). A cellulózzal Gu-HCl-dal történő elúció tisztítása során egy 125 kDa és egy 85 kDa molekulatömegű fehérjét sikerült izolálni, melyeknek celluláz (β -glükánáz) aktivitása volt.

Amint az irodalomból (Moser és *mtsi.*, 1989) és előzetes vizsgálatainkból kiderült, a cellulázok egy része kötődik a Sephadexhez, ezért kerültük a Sephadex alapú kromatográfiás oszlopokat a

Az irodalmi adatokból kitűnik, hogy a cellulózhoz kötődött cellulázok egy része, még 3,6M NaCl oldattal, vagy pH változtatásával sem távolítható el a cellulózzal (Langsford és *mtsi.*, 1984), ezért a cellulózhoz kötött cellulázok preparálása folyamán a desztillált vizes elúció után a cellulózt 8M Gu-HCl oldattal mostuk. Az eluált és membránszűrőn sómentesített fehérjéket FPLC-vel Mono Q oszlopon NaCl gradienssel választottuk el (27.ábra). Az elválasztás eredményes volt, de az aktivitással rendelkező frakciókat



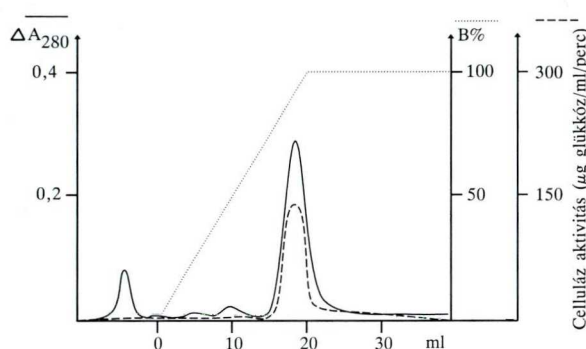
27.ábra Cellulózzal Gu-HCl-dal eluált fehérjék FPLC Mono Q anioncserélő oszlopon történő elválasztása. Puffer A: 30mM TRIS-HCl pH 7,6; puffer B 30mM TRIS-HCl, 0,5M NaCl pH 7,6.

cellulázok tisztítása folyamán. A DEAE-Sepharose anioncserélő kromatográfia nem eredményezett mindig megfelelő elválást a cellulózzal eluált cellulázok esetében, így Mono Q és Phenyl-Superose FPLC oszlopon lehetett az enzimeket megfelelően elkülöníteni.

Sok publikáció foglalkozik a cellulázok tisztításával, de nagy részük a fermentlében található "szabad" cellulázok alapján próbálja feltérképezni a baktériumok vagy gombák celluláz rendszerét. Azonban a fermentlé nagyszámú celluláz aktivitással rendelkező fehérjét tartalmaz (22.ábra), melyeknek csak igen kis része a mikroorganizmus által kiválasztott

eredeti épségű celluláz (Langsford és *mtsi.*, 1984), ezért megtevesztők az ilyen módon feltérképezett celluláz enzimrendszerek.

Az eddig ismert cellulázok két funkcionális régióra különíthetők el (Gilkes és *mtsi.*, 1991). A katalitikus régiót (CD) a *C. fimi* esetében egy Pro-Thr box (Warren és *mtsi.*, 1986), más baktériumok és a gombák esetében egy Ser-Thr box (Béguin, 1990) választja el a cellulózhoz történő kötődésért felelős régiótól (CBD). A mikroorganizmusok saját proteázai a Pro-Thr box vagy Ser-Thr box mellett hasítják el az



28.ábra Cellulózzal Gu-HCl-lel eluált fehérjék Mono Q 3-9.frakciójának (27.ábra) elválasztása FPLC Phenyl-Superose oszlopon. Puffer A: 20mM TRIS-HCl, 0,8M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 7,5; puffer B: 20mM TRIS-HCl pH 7,5.

enzimet, melynek katalitikus régiója megtartja cellulózbontó aktivitását. A katalitikus régió (elsősorban a glikoziláltság miatt) más proteázokkal (tripszin, kimotripszin, papain) szemben is ellenálló (Langsford és *mtsi.*, 1987). Így a fermentlében számos limitált proteolízisen átesett cellulolitikus aktivitással rendelkező celluláz található (22.ábra), amely cellulózkötő aktivitását elvesztette. Számos publikáció foglalkozik azonban a cellulózhoz kötődő cellulázok izolálásával is (Meinke és *mtsi.*, 1993; Din és *mtsi.*, 1994), de néhányukban a fermentléből izolálják ezeket a cellulázokat, cellulóz affinitáskromatográfiával (Shen és *mtsi.*, 1994), ezért nem tudják az összes cellulózhoz kötődő enzim izolálni vagy azokat teljesen más arányban izolálják, mint ahogy azok a celluláz enzimrendszert felépítik.

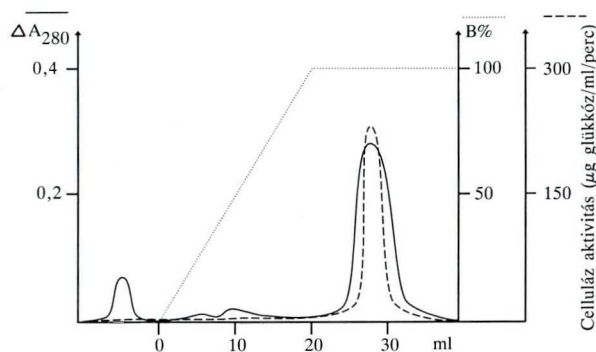
A cellulózhoz kötött cellulázok izolálásánál Langsford és *mtsi.* (1984) módszerét követtük és három celluláz aktivitással rendelkező fehérjét eluáltunk a cellulózzal (30.ábra). Igaz, a

Gu-HCl-dal történő eluálás igen drasztikus módszer, ezért más módszerrel is próbálkoztunk az enzimek eltávolítására a cellulózzól, de a Gu-HCl-os elúciónál eredményesebb módszert nem sikerült eddig kidolgozni. Először Gilkes és *mtsi.* (1988) a ngCex (*E. coli*-ban termeltetett és ezért nem glikozilált exoglükánáz) esetében számoltak be arról, hogy az enzimet a cellulózzól desztillált vízzel is lehet eluálni. Azóta számos esetben sikerrel alkalmazzák a cellulóz affinitáskromatográfiát cellulázok vagy cellulóz kötő fehérjék izolálására, híg foszfátpuffert vagy desztillált vizet alkalmazva eluensként (Moser és *mtsi.*, 1989).

Így a cellulázokat a cellulózzól a nonspecifikusan kötődő fehérjék eltávolítása után először desztillált vízzel, majd azt követően Gu-HCl-dal próbáltuk meg eluálni. A vizsgálatokból kiderült, a cellulózzól desztillált vízzel eluált enzimek közül a 85 kDa molekulatömegű cellulázt Gu-HCl-dal is lehet eluálni, amit az SDS PAGE-n kívül (30.ábra) az Phenyl-Sepharose kromatogrammok is megerősítettek, ugyanis a desztillált vízzel

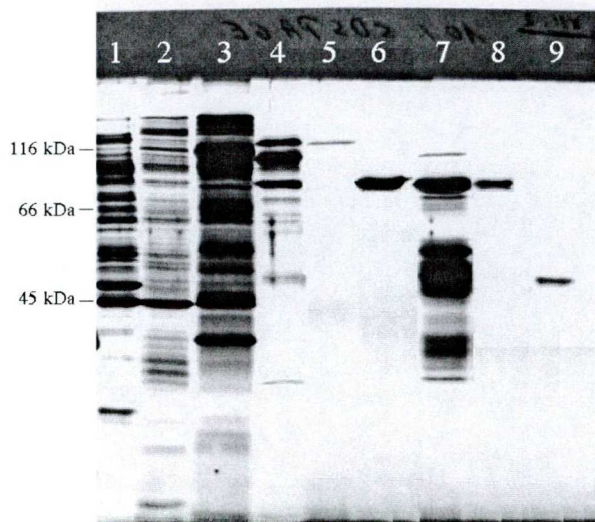
cellulózzól eluált 85 kDa molekulatömegű fehérje ugyanazt az elválasztási képet adta, mint a cellulózzól Gu-HCl-dal izolált hasonló molekulatömegű celluláz (29.ábra). A cellulózzól eluált cellulázok mindegyike glikoprotein, mivel a fehérjék Ag-PAS festéssel is festődtek. Ez összhangban van Langsford és *mtsi.* (1987) eredményeivel, miszerint a *C. fimi* cellulázai is mind glikoproteinek.

A mikroorganizmusok cellulázainak lokalizációjával kapcsolatban a 17.ábrából látható, hogy glicerinen szaporítva a CelB7 törzset, a sejtekhez kötötten található celluláz aktivitás. A 22.táblázatból kiderül, hogy a szonikálás hatására nemcsak a felülúszóban (citoplazma frakció I.) található celluláz aktivitás, hanem a sejtfaltörmelékben is, de drasztikusabb lizozimos feltárás hatására (amikor a lizozim a sejtfalat teljesen elbontja) csak a citoplazma frakció (citoplazma frakció II.) rendelkezett celluláz aktivitással. Az eredmények jól szemléltetik, hogy a különböző táptalajokon tenyésztett baktérium által termelt celluláz a sejtfalhoz kötődve van jelen. Viszont a 17.ábrából kitűnik, hogy a sejtfalhoz kötötten jelenlevő 115 kDa és 85 kDa molekulatömegű cellulázok a cellulóztartalmú táptalajon



29.ábra Cellulózzól Gu-HCl-dal eluált fehérjék Mono Q 17-21.frakciójának (27.ábra) elválasztása Phenyl-Superose oszlopon. Puffer A: 20mM TRIS-HCl, 0,8M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 7,5; puffer B: 20mM TRIS-HCl pH 7,5.

tenyésztett baktériumok esetében is megtalálhatók a sejtfalhoz kötöttek. Az eredmények Beguin és Eisen (1977) feltevését igazolják, a baktériumok celluláz termelését a cellulózbontás termékei indukálják, amit a sejt felszínén kis mennyiségben megtalálható cellulázok termelnek a közegben jelenlevő cellulózból. Az egyik ilyen termék lehet a cellobióz, mely hatására a fermentációban megjelennek a cellulázok (20. táblázat).



30. ábra Cellulázok elválasztása SDS poliakrilamid gélelektroforézissel (12%-os gél, ezüst festés). *Cellulomonas* sp. CelB7 sejtek, 2. *C. fimi* sejtek, 3. *C. uda* sejtek, 4. Cellulózzal Gu-HCl-dal eluált fehérjék, 5. 28. ábra 19-20. frakció, 6. 29. ábra 28-29. frakció, 7. Cellulózzal desztillált vízzel eluált fehérjék, 8. 26. ábra 12-13. frakció, 9. 26. ábra 26-28. frakció.

A *C. fimi*-ből eddig hat celluláz enzimet (gént) izoláltak. Ebből egy exoglukanáz, a többi endoglukanáz. Az exoglukanáz (Cex) egy 56 kDa molekulatömegű enzim, amely cellulóz kötő doménnel is rendelkezik (O'Neil és *mtsi.*, 1986). Az endoglukanáz A (CenA) egy 58 kDa molekulatömegű fehérje, amely képes a cellulózhoz kötődni és optimális működéséhez pH 7,5 körüli érték szükséges (Wong és *mtsi.*, 1986). Az endoglukanáz B (CenB) egy 110 kDa molekulatömegű és pH 8,5 működési körülményeket igénylő enzim, szintén cellulóz kötő doménnel rendelkezik (Meinke és *mtsi.*, 1991ab). A harmadik az

endoglukanáz C (CenC), mely eredetileg 130 kDa molekulatömegű, de szinte inaktív, mely proteolitikus aktivitásra 120 kDa molekulatömegűre redukálódva, az eddig ismert *C. fimi* cellulázok közül a legaktívabb (Coutinho és *mtsi.*, 1991). Az endoglukanáz D gént (CenD) a *C. fimi*-ből készített génkönyvtár alkalmazásával, a génnek megfelelő 75 kDa molekulatömegű enzimet *E. coli* klónból izolálták (Meinke és *mtsi.*, 1993). Az ötödik, endoglukanáz E-t (CenE) szintén a géntechnológia segítségével izolálták, molekulatömege 120 kDa, katalitikus aktivitása kicsi, viszont igen erősen kötődik a cellulózhoz (Shen és *mtsi.*, 1994).

Ha az általunk, *Cellulomonas* sp. CelB7-ből izolált cellulázokat összevetjük a szakirodalomból ismert *C. fimi* cellulázokkal, akkor a cellulózzal Gu-HCl-dal eluált 125

kDa molekulatömegű celluláz (30.ábra), mely kötődik a cellulózhoz, talán a *C. fimi* endoglükanáz C-hez (CenC) áll a legközelebb. A cellulózzal desztillált vízzel eluált

22.táblázat Baktériumsejt feltárással felszabadított sejthez kötött celluláz és β -glükózidáz aktivitás.

Baktérium sejthez kötött enzim		Celluláz aktivitás (μ g glükóz/ml/perc)	β -glükózidáz aktivitás (μ mol p-nitrofenol/ml/perc)
Szonikált sejt	citoplazma frakció I.	12,0	2,1
	sejttörmelék frakció I.	28,0	3,6
Lizozimmal feltárt sejt	citoplazma frakció II.	39,0	5,4
	sejttörmelék frakció II.	—	—

cellulázok közül az 53 kDa molekulatömegű viszont a *C. fimi* endoglükanáz A-hoz (CenA) hasonló. A cellulózzal desztillált vízzel, valamint Gu-HCl-dal is izolált 85 kDa molekulatömegű celluláz viszont nem mutat hasonlóságot egyik *C. fimi* cellulázzal sem. Ez a tény is arra mutat, hogy az általunk izolált *Cellulomonas* sp. CelB7 nem azonos a *C. fimi*-vel (a következőkben tárgyalandó genetikai vizsgálatok is ezt igazolják). A fermentléből izolált 45 kDa és 115 kDa molekulatömegű cellulázok nagy valószínűség szerint proteolitikus hasításo(ko)n már átestek (hiszen elvesztették cellulóz kötő képességüket), így azonosításuk igen nehéz feladat. Mindezek figyelembevételével az általunk izolált *Cellulomonas* sp. CelB7 hasonlóan a *C. fimi*-hez többféle molekulatömegű celluláz enzimet termel, melyek között részben hasonló, részben különböző molekulatömegűek is akadnak.

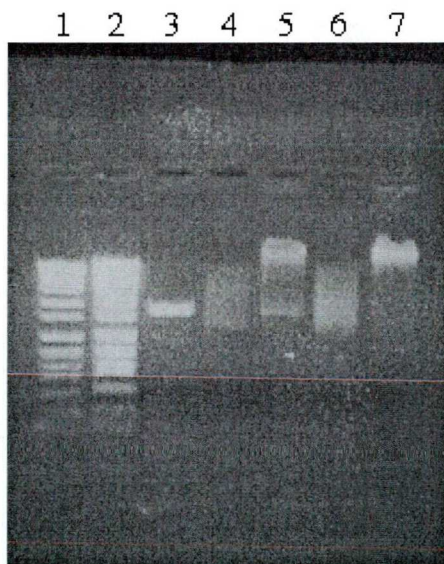
III.4. GENETIKAI MANIPULÁCIÓ

III.4.1. A génkönyvtár

A génkönyvtár készítés egyes fázisait a 31. ábra szemlélteti. A *Cellulomonas* sp. CelB2 és a *Cellulomonas* sp. CelB7 genom könyvtárat teszteltük celluláz, xylanáz aktivitásra, az LB agar táptalajt kiegészítve blue-CMC-vel és blue-xylánnal (Fülöp és Ponyi, 1997). A kapott klónokat a 23. táblázat szemlélteti. Az izolált aktív klónok száma, a rekombináns plazmidokban lévő inzert méret és azok restrikciós mintázata

23. táblázat A CelB2 és CelB7 génkönyvtárból izolált cellulázt és xylanázt termelő klónok.

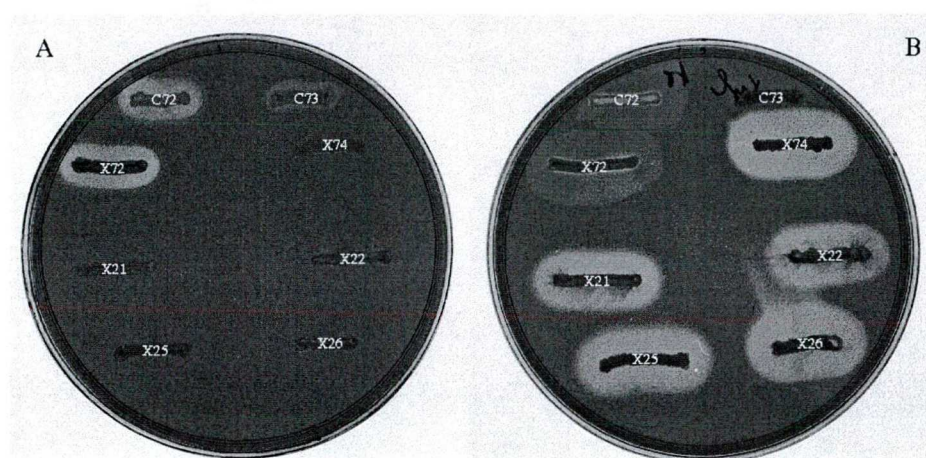
	<i>Cellulomonas</i> sp. CelB2	<i>Cellulomonas</i> sp. CelB7
Celluláz aktív klón	10 db/10 ⁵ telep	17 db/10 ⁵ telep
Xylanáz aktív klón	6 db/10 ⁴ telep	7 db/10 ⁴ telep



31. ábra A génkönyvtár készítése. 1. és 2. Molekulatömeg marker (SPP1 fág *Eco*RI emésztés), 3. pKS *Sal*I emésztés, 4. CelB2 genom DNS *Sau*3AI emésztésből a 2-8 kb tartomány, 5. a 4. tartalma *Sal*I emésztett pKS-be ligálva (CelB2 génkönyvtár), 6. CelB7 genom DNS *Sau*3AI emésztésből a 2-8 kb tartomány, 7. a 6. tartalma *Sal*I emésztett pKS-be ligálva (CelB7 génkönyvtár). A pKS és a kromoszóma is parciálisan feltöltve Zabarovskij és Allikmets, 1986 szerint.

alapján feltételezhető, hogy a *Cellulomonas* sp. CelB2 és a *Cellulomonas* sp. CelB7 törzs nem csak egy celluláz génnel rendelkezik. Ez összhangban van a baktériumokból izolált cellulázok számával.

A színes szubsztrátok alkalmazásával egyszerűen közvetlenül tesztelhető a könyvtár, anélkül, hogy replikát kellene készíteni, vagy festeni kellene az aktivitásra. Ugyanis azokat az *E. coli* telepeket, melyek a rekombináns plazmidban celluláz gént is tartalmaztak, a telep körül kialakult feltisztulási zóna jelezte. Az izolált klónok aktivitását valamint az inzertméretet a 24. táblázat tartalmazza. A klónok egy részéből nem sikerült plazmidot izolálni, mert vagy letális gént (is) hordozott, vagy a nagy expresszió elpusztította a gazda *E. coli* sejtet. A 32. ábrán látható a klónok egy része CMC-t és xylánt tartalmazó táptalajon



32.ábra A klónok aktivitásának vizsgálata különböző szubsztrátot tartalmazó táptalajon. 'A' CMC-vel, 'B' xylánnal kiegészített LB táptalaj, az aktivitást Kongó vörössel tettük láthatóvá.

Kongó vörössel festve. A C72, amelyet celluláz termelőként és az X72, melyet xylanáz termelőként izoláltunk (24.táblázat és 32.ábra) a cellulózt és xylánt is bontja, az inzertméretük és restrikciós mintázatuk alapján azonosnak tekinthetők (az adatok nem

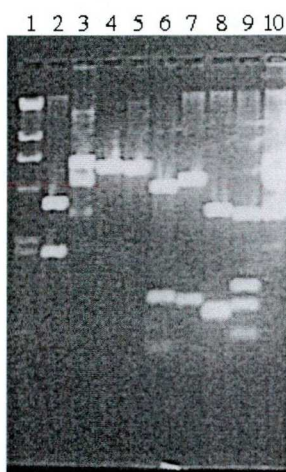
24.táblázat Az izolált klónok inzertmérete és aktivitásuk. Az aktivitás 1⁺-tól 3⁺-ig szemikvantitatív kiértékelés eredménye.

Klónok	Inzertméret (Kb)	Aktivitás	
		CMCáz	Xylanáz
C21	1,8	+	-
C28	2,2	+	-
C72	2,4	+++	+
C73	3,1	+	-
X21	2,5	-	++
X22	2,0	-	++
X25	4,0	-	++
X26	3,8	-	+++
X72	2,4	+++	+
X74	2,7	-	+++

láthatók). További vizsgálatokhoz a cellulázt legjobban termelő C72 jelű klónt választottuk ki. A C72 által hordozott pC72 plazmidon lévő celluláz gént *cegA*-nak a termelt enzimet CEGA-nak neveztük el.

III.4.2. A pC72 fizikai térképezése

Az általunk vizsgált restriktációs enzimek közül a *EcoRI*, *HindIII*, *BamHI* és *BglII*

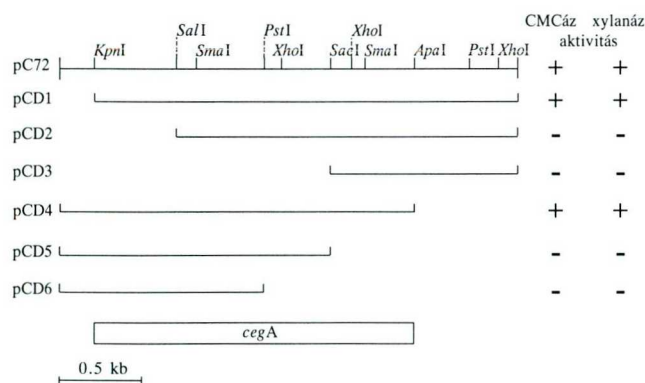


33.ábra A pC72 restriktációs endonukleázokkal történő emésztése. A1. Molekulatömeg marker (λ fág *HindIII* emésztése): 23,13kb, 9,42kb, 6,56kb, 4,36kb, 2,32kb, 2,00kb, 0,56kb, A2. C72 *ApaI*, A3. C72 *BglII*, A4. C72 *EcoRV*, A5. C72 *KpnI*, A6. C72 *PstI*, A7. C72 *SacI*, A8. C72 *SmaI*, A9. C72 *XhoI* emésztése, A10. C72 emésztetlen kontroll.



34.ábra A pC72 restriktációs endonukleázokkal történő kettős emésztése. A1. és B1. Molekulatömeg marker (λ fág *HindIII* emésztés), A2. C72 *XhoI* és *EcoRI*, A3. C72 *PstI* és *XhoI*, A4. C72 *SmaI* és *ApaI*, B2. C72 *PstI* és *BglII* kettős emésztése.

nem hasította az inzertet. A restriktációs térkép elkészítéséhez a következő restriktációs endonukleázokat használtuk fel: *ApaI*, *KpnI*, *PstI*, *SacI*, *SalI*, *SmaI* és *XhoI* (33.ábra). A



35.ábra A pC72 plazmidban lévő CelB7 genom inzert restriktációs térképe, a deléciók származékai aktivitása és a *cegA* gén feltételezhető pozíciója.

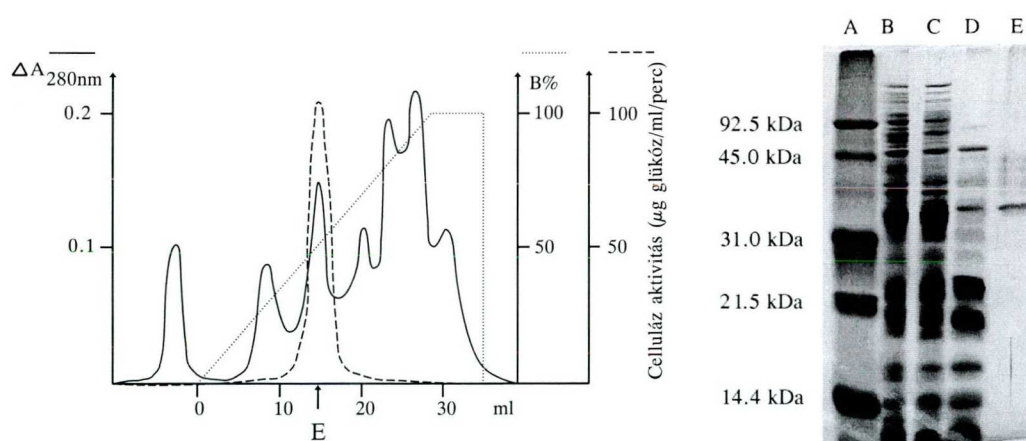
restriktációs endonukleázokkal és meghatároztuk ezek aktivitását CMC-n és xylánon (35.ábra, Fülöp és mtsi., 1996).

KpnI emésztésnél egy 100-200 bázispár hosszúságú fragmens keletkezett, amely a 33.ábrán nem látható. A fizikai térkép pontosítása érdekében *XhoI* és *EcoRI*, *PstI* és *XhoI*, *SmaI* és *ApaI*, *PstI* és *BglII* kettős emésztéseket is végeztünk (34.ábra). A gén (*cegA*) helyének megállapítására a genom inzerten belül, a pC72-ből deléciók származékait készítettünk *SalI*, *KpnI*, *SacI*, *ApaI* és *PstI*

A pC72 *KpnI* emésztéssel előállított pCD1 deléciós származék aktív CMCáz és xylanáz aktivitást mutat. A pCD1-hez képest a *KpnI* hasítási hely felől 0,5 kb kiesése (35. ábra pCD2) már mindkét aktivitás elvesztésével jár. Az *ApaI* hasítási hely felől egy szintén kb. 0,5 kb fragmens kiesése (35. ábra pCD4) még nem okozza a CMCáz és xylanáz aktivitás elvesztését. *SacI*-es hasítással mindkét (35. ábra pCD3, pCD5) keletkező deléciós származék inaktív volt. A deléciós származékok azt mutatják, hogy a *SalI* és *SacI* restrikciós hasítási helyek biztosan nincsenek a génben, így adódik, hogy a gén minimálisan 900 bp-nál nagyobb kell legyen, míg a *KpnI* - *ApaI* restrikciós hasítási helyek megadják, hogy a gén maximális 1900 bp. A 35. ábrán látható, hogy a gén (*cegA*) a körülbelül 1,9 kb-os *KpnI*-*ApaI* fragmenszen helyezkedik el valahol. A pC72 plazmid deléciós analíziséből látszik, hogy mind az endoglükanáz, mind a xylanáz aktivitás egyszerre van jelen vagy tűnik el (35. ábra). Ez azt sugallja, hogy a kétféle aktivitás egy doménen van.

III.4.3. A CEGA tisztítása, karakterizálása

A *cegA* gén által termelt CEGA endoglükanázt a pC72 plazmidot hordozó *E. coli*-ből, a szonikálással feltárt sejtörmelék mentes extraktumából (az *E. coli* az enzimet a



36. ábra A CEGA tisztítása FPLC elválasztással (bal) és az aktív frakció SDS-PAGE képe (jobb). Az FPLC Mono Q oszlopra 5mg fehérjét vittünk fel (puffer A: 50mM TRIS-HCl, pH 7.4; puffer B: 1M NaCl, 50mM TRIS-HCl, pH 7.4). SDS PAGE: A. Molekulatömeg standard: foszforiláz b (92.5 kDa), ovalbumin (45.0 kDa), szén-sav anhidratáz (31.0 kDa), tripszin inhibitor (21.5 kDa), lizozim (14.4 kDa), B. *E. coli* sejt a pBluescript® II KS⁺ vektorral, C. *E. coli* sejt a pC72 plazmiddal, D. A 'C' kicsapva 50% etanollal, E. endoglükanáz aktivitással rendelkező FPLC frakció (a kromatogrammon E-vel jelölve).

periplazmába választja ki), 50% alkohollal történő kicsapás után, a cellulázok tisztításánál

már jól bevált FPLC Mono Q anioncserélő oszlopon, lineáris NaCl grádiens alkalmazásával (36.ábra, Fülöp és *mtsi.*, 1996) tisztítottuk meg. A CMCáz aktivitás alapján az összegyűjtött enzimet SDS PAGE segítségével vizsgáltuk.

A *cegA* gén által *E. coli*-ban termelt és Mono Q anioncserélő oszlop segítségével izolált endoglukanáz molekulatömege 36 kDa (36.ábra). Ez összhangban van a gén méretével ($900\text{bp} < \text{CegA} \leq 1900\text{ bp}$).

Megvizsgáltuk a CEGA szubsztrát specifikását, a cellulózhoz való kötődését, valamint

25.táblázat A CEGA szubsztrát specifikása.

Szubsztrát	Relatív aktivitás (%)
Avicel PH 102	59,6
Szűrőpapír	4,5
Sigmacell	31,8
Cellulóz por (MN 300)	87,6
CMC	100,0 ^a
Lichenin	155,9
Laminarin	nincs aktivitás
Xylán	7,5
Galaktomannán	nincs aktivitás
Poligalakturonsav	nincs aktivitás

Az aktivitások redukáló cukor méréssel meghatározva.

^a aktivitás: 13,3 μg glükóz/perc/mg fehérje

a működéséhez szükséges optimális körülményeket.

A 25.táblázat a CEGA különböző szubsztrátokkal szembeni relatív aktivitását összegzi. A CEGA hidrolizálta a CMC-t, aktivitással rendelkezett a kristályos cellulózzal (Avicel), cellulózporral (Sigmacell, cellulóz por), és szűrőpapírral szemben is. Igen intenzíven bontja a lichenint, de a xylánnal szemben is aktivitással rendelkezik. Egyáltalán nem bontja a laminarint, a galaktomannánt és a poligalakturonsavat.

Az endoglukanáz aktivitás 90%-a a szűrőpapíron megkötődik. A CEGA bontja a CMC-t 25-40°C között, valamint pH 6,8-7,4 között van az aktivitás optimuma.

A mikrokristályos cellulóz bontásához feltétlenül szükséges, hogy az enzim cellulóz kötő doménnel is rendelkezzen (Gilkes és *mtsi.*, 1991). A CEGA tartalmaz cellulózkötő részt, így nem meglepő, hogy bontja a kristályos cellulózt (Avicel, Fülöp és *mtsi.*, 1995).

A CEGA tipikus endoglukanáz aktivitással rendelkezik, bontva a molekulán belüli β -1,4-glikozidos kötéseket. A β -1,4-glikozidos kötéseket jobban bontja, ha kevert, β -1,3 β -1,4 kötéseket tartalmazó szubsztrát van jelen (25.táblázat, lichenin), de nem bontja a laminarint (25.táblázat). Ez a tény azt mutatja, hogy az enzim nem képes hidrolizálni azokat a β -1,4

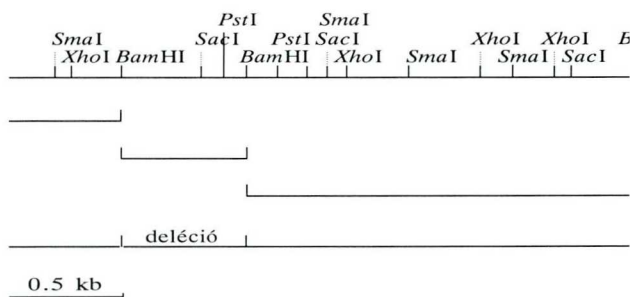
kötéseket ahol az 1. C-atom mellett a β -D-glükóz 3. szénatomja is szubsztituálva, vagy kötésben van.

A *C. fimi*-ből izolált exoglükánáz (Cex) rendelkezik cellobiohidroláz és xylanáz aktivitással is (Gilkes és *mtsi.*, 1984). Egy bifunkcionális exoglükánáz-endoglükánáz fúziós fehérjét is előállítottak (Warren és *mtsi.*, 1987). Egy anaerob bendőbaktériumból a *Ruminococcus flavefaciens*-ből sikerült egy bifunkcionális enzimet izolálni, mely külön-külön doménen tartalmazta a lichenináz és xylanáz aktivitást (Flint és *mtsi.*, 1993). A CEGA egyedülálló a *Cellulomonas* endoglükánázok között, melynek endoglükánáz és xylanáz aktivitása is van.

A rekombináns 36 kDa molekulatömegű endoglükánáz nem glikozilált, hasonlóan a *C. fimi*-ből klónozott hatféle glükánázhoz (Gilkes és *mtsi.*, 1991), viszont az eddig izolált legkisebb molekulatömegű (lásd III.3.2. fejezet).

III.4.4. A pX74 fizikai térképezése, a CEXA tisztítása, jellemzése

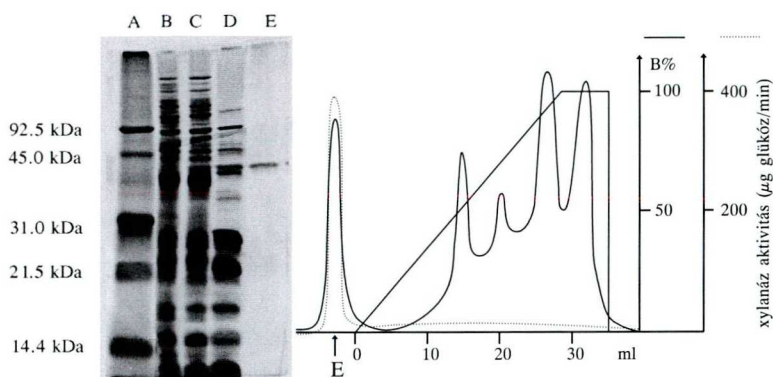
A génkönyvtárat blue-xylánt tartalmazó táptalajon teszteltük. A xylanázt termelő telepek körül a kék szubsztrát (blue-xylán) elbomlik és a belőle felszabaduló kék festék a táptalajban gyorsan szétdiffundál, így a telepek körül világos zóna (ún. feltisztulási zóna) alakul ki. 10⁴ tesztelt telep közül 7 xylanázt termelőt találtunk, melyekben az inzert mérete 2,1 - 3,0 kb-ig változott, amit a plazmidok *EcoRI* emésztésével határoztunk meg. A génkönyvtárból izolált klónok alapján legalább két különböző xylanázt lehet azonosítani, ami azt mutatja (más bakteriális xylanáz termelőkhöz hasonlóan), hogy a *Cellulomonas* sp. CelB7 genomjában több xylanáz gén is található. A xylanázt termelő telepek közül a legnagyobb feltisztulási zónát létrehozó klónt (X74, 32.ábra) vizsgáltuk tovább. A pX74 restrikciós térképét *ApaI*, *BglII*, *BamHI*, *PstI*, *SacI*, *SmaI* és *XhoI* restrikciós enzimek segítségével határoztuk meg (37.ábra). Ahhoz, hogy megállapítsuk a gén helyét az inzerten a *BamHI* fragmenseket klónoztuk és meghatároztuk azok aktivitását. A 2 kb-os fragmens (37.ábra, pXD3) aktív volt a plazmidban, de csak egy orientációban. Ez azt mutatja, hogy az ettől a fragmenstől 3'-felé eső másik fragmens valószínűleg tartalmazza a gén promóterét és esetleg a gén szabályzó régióját is.



37.ábra A pX74 plazmidban lévő CelB7 genom inzert restrikciós térképe.

hasonlóan), hogy a *Cellulomonas* sp. CelB7 genomjában több xylanáz gén is található. A xylanázt termelő telepek közül a legnagyobb feltisztulási zónát létrehozó klónt (X74, 32.ábra) vizsgáltuk tovább. A pX74 restrikciós térképét *ApaI*, *BglII*, *BamHI*, *PstI*, *SacI*, *SmaI* és *XhoI* restrikciós enzimek segítségével határoztuk meg (37.ábra). Ahhoz, hogy megállapítsuk a gén helyét az inzerten a *BamHI* fragmenseket klónoztuk és meghatároztuk azok aktivitását. A 2 kb-os fragmens (37.ábra, pXD3) aktív volt a plazmidban, de csak egy orientációban. Ez azt mutatja, hogy az ettől a fragmenstől 3'-felé eső másik fragmens valószínűleg tartalmazza a gén promóterét és esetleg a gén szabályzó régióját is.

A restrikciós térkép alapján a xylanáz termeléséért felelős gén maximális mérete 2 kb körül adódik, mely egy max. 80 kDa molekulatömegű fehérjének felel meg. Az enzim



38.ábra A CEXA tisztítása FPLC elválasztással (jobb) és az aktív frakció SDS-PAGE képe (bal). Az FPLC Mono Q oszlopra 5mg fehérjét vittünk fel (puffer A: 50mM TRIS-HCl, pH 7,4; puffer B: 1M NaCl, 50mM TRIS-HCl, pH 7,4). SDS PAGE: A. Molekulatömeg standard: foszforiláz b (92.5 kDa), ovalbumin (45.0 kDa), szénsav anhidrát (31.0 kDa), tripszin inhibitor (21.5 kDa), lizozim (14.4 kDa), B. *E. coli* sejt a pBluescript® II KS⁺ vektorral, C. *E. coli* sejt a pX74 plazmiddal, D. A 'C' kicsapva 50% etanollal, E. a xylanáz aktivitással rendelkező FPLC frakció.

tisztítása és gélelektroforézise során (38.ábra) a xylanáz molekulatömegére 41 kDa adódott. Ez adódhat abból is, hogy az *E. coli*-ban történő expresszió során a termelődő enzim a citoplazmában esetleg proteolitikus folyamaton megy keresztül. A termelt enzim hidrolizálta a zabpelyva xylánt, de nem bontott egyetlen más poliszacharidot sem (lásd 25.táblázat szubsztrátjai). A xylanáz enzim nem kötődött a cellulózhoz sem, ezért valószínűleg cellulózkötő domént (CBD) nem, csak egy katalízisért felelős domént tartalmaz.

Manuálisan a gén egy

```

CACCGCGGCG CGCAACGCGA AGCTCAACCA
CGTTCACGCA GGTTCGCGACG CACTACAAGG
GGCAAGACTA CGCCTGGGAC GCGTGAACGA
GGCGTTCCGC GGACGGGCTC GCGGGXXYCG
GGACTCCAAC TGCAGCGCAC CGGGCAACGA
CTGGACGAGG CCGCGTCGCG GCACGCGACC
GGCGCCAAGC CTGCACACAC C

```

39.ábra Szekvencia részlet a pX74 xylanázt termelő klónból.

részletét szekvenálva a 39.ábrában foglalt szekvenciát kaptuk. A szekvenciát BLAST szekvencia összehasonlító programmal (Altschul és *mtsi.*, 1997) vizsgáltuk. Az aminosav hasonlóság alapján elsősorban az *Actinomadura* sp. FC7 xylanáz II génre valamint a *Streptomyces thermoviolaceus* stxI xylanáz génre hasonlított. Fehérje szinten az első hét leghasonlóbb szintén xylanáz volt elsősorban *Streptomyces* és *Actinomadura* fajok.

A CEXA működésének optimális hőmérséklete 30°C, pH optimuma 6,8 - 7,2 között található.

III.4.5. A CEGA szekvenciája

Az elsők között izolált C73 klónból (24.táblázat), mely gyengén bontotta a CMC-t, tájékozódás végett a T7 primer felől - manuálisan - rövid szakaszt szekvenáltunk. A szekvencia részlet adatbázisban (BLAST) történő összehasonlítása is hasonló eredményre vezetett. A C73 szekvencia részlete (40.ábra) hasonlóságot mutat számos enzimmel, többek között igen nagy a hasonlóság a *C. fimi*-ből meghatározott β -1,4-cellobiohidroláz (CbhB) génnel (90%), viszont a későbbiekben tárgyalandó CEGA szekvenciájával a hasonlóság minimális (40%). Ezek a tények is megerősítik (az izolált aktív klónok száma, az inzertek

```
GATCACCGGC AGCGGCGTCA CGGCGGCGAG
CATGCCGCAG GTGGGCGGCT CCCCCGGCCC
CCGCGACGAG CACGCGCAGC CGCGCGCCGC
CGCGTCGCGC CGTAGCGACC ATCTTGTCGG
GCTGGCGGTG CGCCGAGACG ACGTCGACCT
CGACCGGCAC GTCGAACTCC GCGAGGG
```

40.ábra Szekvencia részlet a pC73 cellulázt termelő klónból.

mérete, restriktációs mintázata és szekvenciája alapján), hogy többféle gént is sikerült izolálnunk, így a *Cellulomonas* sp. CelB7 törzs sejtfalbontó képességéért több gén is felelős. Ez a kép összhangban van a baktériumok és a *C. fimi*-ről eddig leírt ismeretekkel (Gilkes és *mtsi.*,

1991), mert a szubsztrát felépítéséből adódóan több enzim is szükséges a hatékony bontáshoz.

A szekvencia részletekből a C73 klónra 77% (G+C) arány adódott, ami igen magas érték és jól egyezik a *Cellulomonas* nemzetségre megállapított 71-76% értékkel (Sneath és *mtsi.*, 1986). Ez is arra utal, hogy az izolált CelB7 törzs valóban a *Cellulomonas* genusba tartozik.

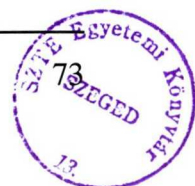
A *Cellulomonas* sp. CelB7 cega gén fehérjekódoló részének (CEGA) nukleotidsorrendjét illetve a keletkező fehérje elsődleges szerkezetét a 41.ábra mutatja be. A CEGA szekvenciájának valamint a cellulázokra vonatkozó irodalmi adatok (Gilkes és *mtsi.*, 1991) ismeretében kerestük, vajon a CEGA is moduláris felépítésű? Rendelkezik a többi cellulázra jellemző cellulózkötő és katalitikus doménekkel, melyeket egy linker rész köt össze?

A linker szekvencia. A CEGA elsődleges szerkezetének vizsgálatakor szembeötlő, hogy a szekvencia első harmadában található egy ismétlődő rész, mely négy aminosav hétszeres ismétlődésével áll elő. Az ismétlődő QPTT (glutamin, prolin, treonin, treonin) box nagyon hasonlít a cellulázok linker szekvenciájára. Hasonló TP-ben (treonin, prolin) gazdag box található a *C. fimi* CenA (endoglukanáz) valamint Cex (exoglukanáz) génjében, de a *Clostridium thermocellum* CelB (endoglukanáz), CelE (endoglukanáz) és XynZ (endoxylanáz) génjeinek linker részei, valamint a *Trichoderma reesei* EglI (endoglukanáz) EglIII (endoglukanáz) génjei is igen gazdagok ebben a két aminosavban (Gilkes és *mtsi.*, 1991).

1	ATG	TCC	CCC	CGA	TCG	AAC	GTG	TCG	CGC	CTG	CGG	CGC	ACG	GTC	GTC	
	Met	Ser	Pro	Arg	Ser	Asn	Val	Ser	Arg	Leu	Arg	Arg	Thr	Val	Val	15
	M	S	P	R	S	N	V	S	R	L	R	R	T	V	V	
46	GCG	GCC	ACC	GCC	GCC	GCG	GCG	GTC	GCG	ACC	GCC	GGC	CTC	AGC	GCG	
	Ala	Ala	Thr	Ala	Ala	Ala	Ala	Val	Ala	Thr	Ala	Gly	Leu	Ser	Ala	30
	A	A	T	A	A	A	A	V	A	T	A	G	L	S	A	
91	CTC	ACG	GCG	ACC	GCC	GCG	CAG	GCC	GCA	GCC	GGC	TGC	CGC	GTC	GAC	
	Leu	Thr	Ala	Thr	Ala	Ala	Gln	Ala	Ala	Ala	Gly	Cys	Arg	Val	Asp	45
	L	T	A	T	A	A	Q	A	A	A	G	C	R	V	D	
136	TAC	GCC	GTG	TCG	AGC	CAG	TGG	TCC	GGC	GGG	TTC	GGC	GCC	ACC	GTC	
	Tyr	Ala	Val	Ser	Ser	Gln	Trp	Ser	Gly	Gly	Phe	Gly	Ala	Thr	Val	60
	Y	A	V	S	S	Q	W	S	G	G	F	G	A	T	V	
181	ACC	GTC	ACC	AAC	CTC	GGC	GAC	CCG	GTG	TCG	TCG	TGG	GAC	CTG	CGC	
	Thr	Val	Thr	Asn	Leu	Gly	Asp	Pro	Val	Ser	Ser	Trp	Asp	Leu	Arg	75
	T	V	T	N	L	G	D	P	V	S	S	W	D	L	R	
226	TGG	ACC	TTC	CCG	AAC	GGC	CAG	AGC	GTC	CAC	CAG	GCG	TGG	AAC	GCC	
	Trp	Thr	Phe	Pro	Asn	Gly	Gln	Ser	Val	His	Gln	Ala	Trp	Asn	Ala	90
	W	T	F	P	N	G	Q	S	V	H	Q	A	W	N	A	
271	ACC	GTC	TCG	ACC	ACC	GGC	TCG	CAG	GTC	TCC	GCC	AAG	AAC	GTC	GGG	
	Thr	Val	Ser	Thr	Thr	Gly	Ser	Gln	Val	Ser	Ala	Lys	Asn	Val	Gly	105
	T	V	S	T	T	G	S	Q	V	S	A	K	N	V	G	
316	TGG	AAC	GGC	AGC	CTC	GGC	ACC	GGC	GCC	TCG	GCG	CAG	TTC	GGC	TTC	
	Trp	Asn	Gly	Ser	Leu	Gly	Thr	Gly	Ala	Ser	Ala	Gln	Phe	Gly	Phe	120
	W	N	G	S	L	G	T	G	A	S	A	Q	F	G	F	
361	AAC	GGC	TCG	TGG	AGC	GGC	AGC	AAC	GGC	GTG	CCC	GCG	TCG	TTC	ACG	
	Asn	Gly	Ser	Trp	Ser	Gly	Ser	Asn	Gly	Val	Pro	Ala	Ser	Phe	Thr	135
	N	G	S	W	S	G	S	N	G	V	P	A	S	F	T	
406	CTC	AAC	GGC	ACC	ACC	TGC	ACG	GGC	GGC	GTC	ACC	CAG	CCG	ACG	ACC	
	Leu	Asn	Gly	Thr	Thr	Cys	Thr	Gly	Gly	Val	Thr	Gln	Pro	Thr	Thr	150
	L	N	G	T	T	C	T	G	G	V	T	Q	P	T	T	
451	CAG	CCC	ACC	ACC	CAG	CCG	ACG	ACG	CAG	CCC	ACG	ACC	CAG	CCC	ACC	
	Gln	Pro	Thr	Thr	Gln	Pro	Thr	Thr	Gln	Pro	Thr	Thr	Gln	Pro	Thr	165
	Q	P	T	T	Q	P	T	T	Q	P	T	T	Q	P	T	
496	ACG	CAG	CCG	ACG	ACG	CAG	CCG	ACC	ACG	CCC	CCG	GTG	TCG	AGC	AGC	
	Thr	Gln	Pro	Thr	Thr	Gln	Pro	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Ser	Ser	Ser	180
	T	Q	P	T	T	Q	P	T	T	P	P	V	S	S	S	
541	CAG	TTG	TAC	GTC	GAC	CCC	GAG	ACC	GCC	GCC	TAC	GCC	GCG	TGG	CAG	
	Gln	Leu	Tyr	Val	Asp	Pro	Glu	Thr	Ala	Ala	Tyr	Ala	Ala	Trp	Gln	195
	Q	L	Y	V	D	P	E	T	A	A	Y	A	A	W	Q	
586	GCC	GCG	TCC	GGC	AAG	GAC	AAG	GAC	CTG	CTG	GCC	AAG	ATG	GCC	CTC	
	Ala	Ala	Ser	Gly	Lys	Asp	Lys	Asp	Leu	Leu	Ala	Lys	Met	Ala	Leu	210
	A	A	S	G	K	D	K	D	L	L	A	K	M	A	L	
631	ACG	CCG	CAG	GCG	CTG	TGG	ATC	GGC	GAC	TGG	GCC	AGC	GCC	TCC	GAG	
	Thr	Pro	Gln	Ala	Leu	Trp	Ile	Gly	Asp	Trp	Ala	Ser	Ala	Ser	Glu	225
	T	P	Q	A	L	W	I	G	D	W	A	S	A	S	E	

41.ábra A *Cellulomonas* sp. CelB7 *cegA* gén fehérje kódoló részének nukleotid és aminosavsorrendje.

676	ACG	CAG	GCG	ACG	GTG	CGC	GAC	TAC	ACC	GGG	CGC	GCC	CGC	GCG	GCC	
	Thr	Gln	Ala	Thr	Val	Arg	Asp	Tyr	Thr	Gly	Arg	Ala	Arg	Ala	Ala	240
	T	Q	A	T	V	R	D	Y	T	G	R	A	R	A	A	
721	GGC	AAG	ACC	GCG	CAG	ATC	GTG	GTG	TAC	GCC	ATC	CCG	GGG	CGC	GAC	
	Gly	Lys	Thr	Ala	Gln	Ile	Val	Val	Tyr	Ala	Ile	Pro	Gly	Arg	Asp	255
	G	K	T	A	Q	I	V	V	Y	A	I	P	G	R	D	
766	TGC	GGC	TCG	TAC	TCC	GGC	GGC	GGC	GTC	GCG	ACC	TCC	GAG	TAC	GCG	
	Cys	Gly	Ser	Tyr	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Ala	Thr	Ser	Glu	Tyr	Ala	270
	C	G	S	Y	S	G	G	G	V	A	T	S	E	Y	A	
811	CGC	TGG	GTC	GAC	ACG	GTC	GCG	GCC	GGC	ATC	CAG	GGC	AAC	CCG	TGG	
	Arg	Trp	Val	Asp	Thr	Val	Ala	Ala	Gly	Ile	Gln	Gly	Asn	Pro	Trp	285
	R	W	V	D	T	V	A	A	G	I	Q	G	N	P	W	
856	GTC	GTC	CTC	GAG	CCC	GAC	GCG	CTC	GCA	CAG	CTC	GGT	GAC	TGC	GCC	
	Val	Val	Leu	Glu	Pro	Asp	Ala	Leu	Ala	Gln	Leu	Gly	Asp	Cys	Ala	300
	V	V	L	E	P	D	A	L	A	Q	L	G	D	C	A	
901	GGG	CAG	GGC	GAC	CGC	GTC	GGC	TTC	CTG	CAG	TAC	GCC	GCG	AAG	TCG	
	Gly	Gln	Gly	Asp	Arg	Val	Gly	Phe	Leu	Gln	Tyr	Ala	Ala	Lys	Ser	315
	G	Q	G	D	R	V	G	F	L	Q	Y	A	A	K	S	
946	GCT	GAC	CGC	CAA	GGC	GCC	GGC	GTC	TAC	CTC	GAC	GCC	GGC	AAT	CCG	
	Ala	Asp	Arg	Gln	Gly	Ala	Gly	Val	Tyr	Leu	Asp	Ala	Gly	Asn	Pro	330
	A	D	R	Q	G	A	G	V	Y	L	D	A	G	N	P	
991	GCG	TGG	CTC	TCG	CTC	CGA	GCC	GCC	AAC	CGG	CTC	AAC	CGG	ATC	GGC	
	Ala	Trp	Leu	Ser	Leu	Arg	Ala	Ala	Asn	Arg	Leu	Asn	Arg	Ile	Gly	345
	A	W	L	S	L	R	A	A	N	R	L	N	R	I	G	
1036	TTC	GGC	GAC	GCC	GTC	GGG	TTC	TCG	CTC	AAC	GTC	TCC	AAC	TAC	CGC	
	Phe	Gly	Asp	Ala	Val	Gly	Phe	Ser	Leu	Asn	Val	Ser	Asn	Tyr	Arg	360
	F	G	D	A	V	G	F	S	L	N	V	S	N	Y	R	
1081	ACC	ACC	GCC	GAG	GCC	AAG	GCG	TAC	GGG	CAG	GAG	GTC	TCG	CGG	CTC	
	Thr	Thr	Ala	Glu	Ala	Lys	Ala	Tyr	Gly	Gln	Glu	Val	Ser	Arg	Leu	375
	T	T	A	E	A	K	A	Y	G	Q	E	V	S	R	L	
1126	ACG	GGC	GGC	AAG	AAG	TTC	GTC	ATC	GAC	ACG	TCG	CGC	AAC	GGC	AAC	
	Thr	Gly	Gly	Lys	Lys	Phe	Val	Ile	Asp	Thr	Ser	Arg	Asn	Gly	Asn	390
	T	G	G	K	K	F	V	I	D	T	S	R	N	G	N	
1171	GGC	GCG	AGC	GGC	ACC	GAG	TGG	TGC	AAC	CCG	CGC	GGT	CGT	GCG	CTG	
	Gly	Ala	Ser	Gly	Thr	Glu	Trp	Cys	Asn	Pro	Arg	Gly	Arg	Ala	Leu	405
	G	A	S	G	T	E	W	C	N	P	R	G	R	A	L	
1216	GGC	GAC	AAG	CCC	GTC	GCG	GTG	AAC	GAC	GGC	TCC	GGC	CTC	GAC	GCG	
	Gly	Asp	Lys	Pro	Val	Ala	Val	Asn	Asp	Gly	Ser	Gly	Leu	Asp	Ala	420
	G	D	K	P	V	A	V	N	D	G	S	G	L	D	A	
1261	CTG	GTG	GGG	ATC	AAG	CGC	CCC	GGC	GAG	TCC	GAC	GGC	ACG	TGC	AAC	
	Leu	Val	Gly	Ile	Lys	Arg	Pro	Gly	Glu	Ser	Asp	Gly	Thr	Cys	Asn	435
	L	V	G	I	K	R	P	G	E	S	D	G	T	C	N	
1306	GGC	GGC	CCG	TCC	GCT	GGT	GCC	AGG	TGG	CAG	GAG	ATC	GCG	CTC	GAG	
	Gly	Gly	Pro	Ser	Ala	Gly	Ala	Arg	Trp	Gln	Glu	Ile	Ala	Leu	Glu	450
	G	G	P	S	A	G	A	R	W	Q	E	I	A	L	E	
1351	CTC	GCG	CGC	AAC	GCC	AGG	TGG	TGA								
	Leu	Ala	Arg	Asn	Ala	Arg	Trp	---								
	L	A	R	N	A	R	W	-								457



		1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	147																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
CEGA_CBD		MSPRSNVSRLLRTTVVAAATAAAVATAGLSALTATAAAQAAGCRVDYAVSSQWSGGFGATVTVTNLGPVSSWDLRWTFPNGQSVHQAWNATVSTTSGQVSAKNVGNWGLSGTGASAQFGFNGSWSGSNGVPASFTLNGTTCGGVT																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
GUNA_CELFI	4				+			++++		+			+	++	++++		+		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++		++++	

GUNA_CELFI Endoglucanase A Precursor (EC 3.2.1.4) *Cellulomonas fimi* Length = 449
 Score:505 Identities = 93/135 (68%), Positives = 105/135 (77%)
 GUNA_STRLI Endoglucanase CELA Precursor (EC 3.2.1.4) *Streptomyces lividans* Length = 459
 Score:202 Identities = 39/66 (59%), 34/64 (53%) Positives = 47/66 (71%), 43/64 (67%)
 GUNA_MICBI Endoglucanase A Precursor (EC 3.2.1.4) *Microbispora bispora* Length = 456
 Score:184 Identities = 15/29 (51%), 29/59 (49%) Positives = 17/29 (58%), 42/59 (71%)
 GUX_CELFI Exoglucanase Precursor (EC 3.2.1.91) *Cellulomonas fimi* Length = 484
 Score:268 Identities = 50/113 (44%), Positives = 69/113 (61%)
 GUN2_THEFU Endoglucanase E-2 Precursor (EC 3.2.1.4) *Thermomonospora fusca* Length = 441
 Score:197 Identities = 35/63 (55%), Positives = 46/63 (73%)
 GUXA_CELFI Exoglucanase A Precursor (EC 3.2.1.91) *Cellulomonas fimi* Length = 872
 Score:259 Identities = 53/132 (40%), Positives = 73/132 (55%)
 GUNB_CELFI Endoglucanase B Precursor (EC 3.2.1.4) *Cellulomonas fimi* Length = 1045

Score:233 Identities = 43/93 (46%), Positives = 58/93 (62%)
 GUN4_THEFU Endoglucanase E-4 Precursor (EC 3.2.1.4) *Thermomonospora fusca* Length = 880
 Score:242 Identities = 49/118 (41%), Positives = 63/118 (53%)
 CHIT_STRLI Chitinase C Precursor (EC 3.2.1.14) *Streptomyces lividans* Length = 619
 Score:221 Identities = 48/119 (40%), Positives = 60/119 (50%)
 GUXB_CELFI Exoglucanase B Precursor (EC 3.2.1.91) *Cellulomonas fimi* Length = 1090
 Score:220 Identities = 46/119 (38%), Positives = 61/119 (51%)
 CHIT_STRPL Chitinase 63 Precursor (EC 3.2.1.14) *Streptomyces plicatus* Length = 610
 Score:215 Identities = 47/119 (39%), Positives = 59/119 (49%)
 GUND_CELFI Endoglucanase D Precursor (EC 3.2.1.4) *Cellulomonas fimi* Length = 747
 Score:205 Identities = 40/112 (35%), Positives = 58/112 (51%)
 XYND_CELFI Endo-1,4-beta-xylanase D Precursor (EC 3.2.1.8) *Cellulomonas fimi* Length = 644
 Score:70 Identities = 19/91 (20%), Positives = 30/91 (32%)

42.ábra A CEGA cellulóz kötő domén (CBD) szekvenciájának összehasonlítása.

A QPTT (Gln, Pro, Thr, Thr) box a CEGA szekvenciájában a 147. - 174. aminosavig tart, ami összesen 28 aminosav. A 43.ábra a CEGA linker szekvenciájának összehasonlításának eredményét tartalmazza. Összesen három olyan hasonló szekvencia van, ami 50% feletti hasonlósági értékkel rendelkezik. Ezek közül igen érdekesnek bizonyul az emberi plazma proteáz inhibitor. A változó hosszúságú linker szekvenciák (6 - 59 aminosav, Gilkes és *mtsi.*, 1991) nem csak a mikroorganizmusokra jellemzők, hanem megtalálhatók

		1	10	20	28	
CEGA-linker		QPTTQPTTQPTTQPTTQPTTQPTTQPTT				
Y662_HAEIN	30	QPTNQPTNQPTNQPTNQPTNQPTNQPT-				56
		+ +				
IC1_HUMAN	85	EPTTQPTTEPTTQPTTQPTTQPTTQLPT-				111
		+				
GUNA_CELFI	154	-PTPTPTPTPTPTVTPQPTSGFYVDPTT				180

Y662_HAEIN Hypothetical Protein Hi0662 Precursor. *Haemophilus influenzae* Length = 64
Score = 119 Identities = 21/27 (77%), Positives = 21/27 (77%)
IC1_HUMAN Plasma Protease C1 Inhibitor Precursor *Homo sapiens* Length = 500
Score = 104 Identities = 19/27 (70%), Positives = 21/27 (77%)
GUNA_CELFI Endoglucanase a Precursor (EC 3.2.1.4) *Cellulomonas fimi* Length = 449
Score = 59 Identities = 13/27 (48%), Positives = 14/27 (51%)

43.ábra A CEGA linker szekvenciájának összehasonlítása.

számos magasabbrendű élőlény enzimjeiben is (immunoglobulin A, riboszóma fehérjék). Az O-glikozil hidrolázok között gyakorlatilag alig van hasonló szekvencia, vagy prolin (P) és valamilyen hidrox-aminosav (T, S), vagy glutamin (Q), glutaminsav (E) és szintén valamilyen hidrox-aminosav (T, S) szerepel az ismétlődő boxban. A *Cellulomonas* CelB7 CEGA endoglukanázhoz még leginkább a *C. fimi* CenA ismétlődő (PT)₂S(P)₄T(P)₇ szekvenciája hasonlít (43.ábra), de ez is igencsak eltér a (QPTT)₇ szekvenciától.

A Cellulózkötő domén. A CEGA szekvenciáját a linker szekvencia két részre osztja. Egy kisebb (1/3) és nagyobb (2/3) részre. A kisebbik rész szekvenciája igen nagy hasonlóságot mutat az O-glikozil hidrolázok cellulózkötő doménjéhez (CBD, 42.ábra). A CBD-re jellemző, hogy igen sok a töltéssel nem rendelkező apoláris oldallánccal rendelkező aminosavak aránya (Gly, Ala, stb.), míg a töltéssel rendelkezők igen kevesen vannak. A mikrobiális CBD-k két fő csoportra oszthatók. Az első csoportba tartozók (elsősorban baktériumok) 100 körüli aminosavat, míg a második csoportban lévők (elsősorban gombák) 30 körüli aminosavat tartalmaznak. A CEGA N-terminális felőli részén található CBD a szekvencia 1. - 146. aminosavig helyezkedik el. Az irodalmi adatok azt mutatják, hogy a bakteriális CBD-k N és C terminálisát cisztein (Cys) zárja le. A szekvenciát vizsgálva (41.ábra) a 42. és a 141. aminosav cisztein.

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	145		
CEGA-CD	PPVSSSQLYVDP	PETAAYA	WQAASG	KDKDLLAKMAL	TPQALWIGD	WASASE	TQATVRDY	TGRARA	AGKTAQI	VVYAI	PGRDCGS	YSGGGVAT	SEYAR	WVD	VAAGIQGN	PWVVL	EPDALAQLGDCAGQGGDRVGLQYAAKSAD	RQ
		+																+
GUNA_CELFI 168	-PQPTSGFYVDPT	TQGYRAWQAASG	TDKALLEKIAL	TPQAYWVG	NWADASHAQAEV	ADYTGRAVAAG	KTPMLV	VYAI	PGRDCGS	SHSGGVSESEYAR	WVD	VAAGIQGN	PVILEP	DAL	LAQLGDCSGQGGDRVGLKYAAKS	TLK		
		+																+
GUNA_MICBI 82	-----	STVRAEVD	AYVGA	AAAAAGKIP	IMV	VYAMPNR	DCGGPSAGG	-----										121
GUN2_THEFU 92	-----	AQAAGKIP	ILV	VYNAPGRDC	GNHSGGAP	SHSAYR	SWIDEFAAGL	KNRPAYII	VEPDLISL	-----								152
GUN1_STRSQ 111	-----	PQAVWFAGAY	NFGTITQ	QVAEVT	SAAAAAGQLP	VVVPYMI	PFPRDC	GNHSGGAP	SFAAYA	EWGSLFAAGL	GSEPVV	VVLEPDAI	PLIDCL	DNQQAER	LAALAGLAE	-----		217
		+	+		+	+		+					+		+			+
GUXA_CELFI 229	-----	YIDIGHSG	WLGWDSNAG	PSATLFAE	AVAKSTTA	-----												260
	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	270	283				
CEGA-CD	GAGVYLDAGN	PAWLSL	RAANRLN	RIGFGD	AVGFS	LNVSNYRT	TAEAKAYG	QEVSR	LTGGKKF	VIDTSR	NGNGASGTEWCN	PRGRALG	DKPVA	VNDGSG	LDALVG	IKRPGESD	GTCNGG	PSAGARWQEIALELARNARW
GUNA_CELFI	GARVYIDAG	HAKWLSV	-----															
GUNA_CELFI 370	-----	GGKKFVID	TSRNGN	SGNGEWCN	PRGRALG	ERPVA	VNDGSG	LDALLWVK	LPGESD	GACNGG	PAAGQWQ	QWQIALE	EMARNARW	-----				449
GUNA_CELFI 332	-----	NRLNQVG	FAYAVG	FALNTS	NYQT	TADSKAYG	QQISQRL	GKKFVID	TSRNGN	SGNG	-----							387
GUNA_MICBI 251	-----	VIDTSR	NGNGLP	GSEWCD	PPGRAT	GTWST	TDGDP	PAIDAF	LWIKPP	GGEADG	-----							301
GUN2_THEFU 247	-----	VIDTSR	NGNGLP	GSEWCD	PPGRAT	GTWST	TDGDP	PAIDAF	LWIKPP	GGEADG	-----							301
GUN1_STRSQ 269	-----	TTDETAYAS	AVIAEL	GGGLG	AVVD	TSRNGN	GLP	GSEWCD	PPGR	LVGNN	PTVNP	GVPGV	DAFLWIK	LP	GELDG	-----		340
GUXA_CELFI 359	-----	VDANR	VDRVR	HARGA	WCNPL	GAGIG	RFPEAT	PSG	-----									391
GUXA_CELFI 433	-----	VSPKLNN	QLTGAT	PNAP	LQAGW	FEEQ	FVTL	VKNA	-----									466

GUNA_CELFI Endoglucanase A Precursor (EC 3.2.1.4) *Cellulomonas fimi* Length = 449

Score = 614 Identities = 116/160 (72%), Positives = 131/160 (81%)

Score = 298 Identities = 54/80 (67%), Positives = 62/80 (77%)

Score = 220 Identities = 40/56 (71%), Positives = 51/56 (91%)

GUNA_MICBI Endoglucanase A Precursor (EC 3.2.1.4) *Microbispora bispora* Length = 456

Score = 103 Identities = 22/40 (55%), Positives = 25/40 (62%)

Score = 145 Identities = 28/51 (54%), Positives = 33/51 (64%)

GUN2_THEFU Endoglucanase E-2 Precursor (EC 3.2.1.4) *Thermomonospora fusca* Length = 441

Score = 91 Identities = 17/27 (62%), Positives = 21/27 (77%)

Score = 152 Identities = 29/55 (52%), Positives = 35/55 (63%)

GUN1_STRSQ Endoglucanase I Precursor (EC 3.2.1.4) *Streptomyces sp.* Length = 359

Score = 109 Identities = 22/52 (42%), Positives = 29/52 (55%)

Score = 169 Identities = 34/72 (47%), Positives = 43/72 (59%)

GUXA_CELFI Exoglucanase A Precursor (EC 3.2.1.91) *Cellulomonas fimi* Length = 872

Score = 40 Identities = 8/32 (25%), Positives = 16/32 (50%)

Score = 55 Identities = 11/33 (33%), Positives = 14/33 (42%)

Score = 34 Identities = 10/34 (29%), Positives = 15/34 (44%)

44.ábra A CEGA katalitikus domén (CD) szekvenciájának összehasonlítása.

Így a *Cellulomonas* sp. CelB7 CEGA CBD pontosan 100 aminosav hosszú, ami igencsak egyezik a bakteriális CBD-k hosszával (97-111 aminosav, Gilkes és *mtsi.*, 1991). A CBD-k konzervatív szekvenciái elsősorban triptofánt, aszparagint és glicint tartalmaznak. Négy triptofán található a bakteriális CBD-kben, ami minden egyes tagban megtalálható. A CEGA szempontjából ez a négy triptofán az 52., a 72., a 89. és a 107. aminosav (42.ábra). A CBD-khez igen hasonlóak a keményítőkötő domének az amilázokban, valamint a lektinek szénhidrát-felismerő részei (Gilkes és *mtsi.*, 1991). A CEGA CBD-hez leginkább hasonlító enzim a *C. fimi* endoglükánáz A, az azonosság a két szekvencia között részleges (68%). Az első 13 leghasonlóbb szekvencia (42.ábra) között a *C. fimi* glükánázokon kívül, a *Streptomyces lividans* endoglükánáz CelA, *Microbispora bispora* endoglükánáz A, *Thermomonospora fusca* endoglükánáz E-2 is megtalálható. Érdekesség, hogy a glükánázokon kívül a *Streptomyces lividans* kitináz és a *C. fimi* endoxylanáz is szerepel, igaz igen kevés hasonlósággal. A CEGA-hoz hasonlóan a *C. fimi* endoglükánáz A is az N-terminálison helyezkedik el.

A katalitikus domén. A katalitikus domén (CD) szekvenciák igen ismertek, 100 körül jár a szekvenciák száma, mely a cellulázokon kívül a xylanázokat is magában foglalja. Természetesen a katalitikus domén szükséges az enzimaktivitáshoz, viszont a cellulózkötő domén és a linker szekvencia nem, így nem meglepő, ha találunk olyan cellulázokat, melyek csak katalitikus doménnel rendelkeznek (*Clostridium thermocellum*, *Cellulomonas uda*, Gilkes és *mtsi.*, 1991). A *Cellulomonas* sp. CelB7 CEGA CD a szekvencia 175. aminosavától a szekvencia végéig, a 457. aminosavig tart, így a CD a CEGA C-terminálisán helyezkedik el (41.ábra). A CEGA CD-hez leginkább hasonlító enzim (a cellulózkötő doménhez hasonlóan) a *C. fimi* endoglükánáz A, az azonosság a két szekvencia között átlagosan 70% körüli. Ennek ellenére a szekvenciák között különbségek is nagy számban előfordulnak (44.ábra). Igen jól egyezik viszont, hogy a CEGA CD 282 aminosavat, a *C. fimi* endoglükánáz A CD 284 aminosavat tartalmaz. Az összehasonlítás szerint a *Microbispora bispora* endoglükánáz A, *Thermomonospora fusca* endoglükánáz E-2 szintén hasonlatos, mint a CBD-k esetében is. Ami igen fontos, hogy a CEGA CD és a *C. fimi* exoglükánáz A CD között is van hasonlóság, ami azért fontos, mert ez magyarázhatja azt a tényt, hogy a CEGA rendelkezik xylanáz aktivitással is. A katalitikus domén alapján a *Cellulomonas* sp. CelB7 CEGA a CD alapján a "B" családba (Family B) sorolható. Ebben a családban a *C. fimi* CenA-n kívül, *Microbispora bispora* CelA, *Streptomyces* sp. KSM-9 CasA és a *Trichoderma reesei* CbhII található csak (Gilkes és *mtsi.*, 1991).

Az újabb osztályozás szerint (lásd I.2.2. O-glikozil hidrolázok) a *Cellulomonas* sp. CelB7 CEGA a 6.családba tartozik, de rokonságot mutat az 5., 9., 10., 11., és 18. családokkal is.

A CEGA-nak a szekvencia alapján számított molekulatömege 47124,44 (1374 bp = 457

aminosav) ami ellentmondásban van a rekombináns *E. coli*-ban termelt 36 kDa molekulatömegű endoglükánázzal (CD: 39574,1 kDa, CBD: 14576,13 kDa, linker szekvencia: 3010,24 kDa). A magyarázat valószínűleg ott keresendő, hogy az *E. coli* a periplazmába választja ki az enzimet, melyet preparáláskor szonikáltunk. Így a termelt endoglükánáz a *E. coli* sejtekben lévő proteázok könnyen emészthették, lehasítva egy kb 11 kDa-os darabot, ami még nem eredményezte az enzim inaktiválódását. Hasonló eredményekről számolt be Robson és Chambliss (1986). A limitált proteolízis csak a C-terminális vég felől lehetett, mert az izolált endoglükánáz megtartotta cellulózkötő képességét.

A *cegA* gén szekvenciájából számolt (G+C) mol% 73,6-nek adódott. Ez az érték jó egyezést mutat más *Cellulomonas* fajokból izolált és szekvenált glükánáz (xylanáz) génekkel.

(Gilkes és *mtsi.*, 1991)

Összességében megállapítható, hogy a *Cellulomonas* sp. CelB7 *cegA* génjének CEGA endoglükánáz enzimje a szekvencia alapján nem egyezik egyik ismert enzimmel sem elsősorban a *C. fimi* endoglükánáz A-ra hasonlít, azonban attól lényegesen eltér. A CEGA linker szekvenciája ezeddig ismeretlen. Mindezek és az eddig leírtak alapján igen valószínű, hogy a *Cellulomonas* sp. CelB7 a *Cellulomonas* genus egy új faja.

III.5. A CEGA MÁSODLAGOS SZERKEZETE, MODELLEZÉSE

A CEGA szekvenciája az elsődleges szerkezet, melynek segítségével előre lehet jósolni bizonyos másodlagos szerkezeti elemeket. Tíz különböző programmal próbáltuk a CEGA szekvencia alapján a másodlagos szerkezetet előre jelezni. A következő programokat használtuk:

Gibrat (Gibrat és *mtsi.*, 1987)
 GOR IV (Garnier és *mtsi.*, 1996)
 Predator (Frishman és Argos, 1996)
 SOPMA3 (Geourjon és Deléage, 1995)
 Double prediction (Deléage és Roux, 1987)
 Garnier (Garnier és *mtsi.*, 1978)
 Homologue (Levin és Garnier, 1988)
 SOPM (Geourjon és Deléage, 1994)
 SOPMA4 (Geourjon és Deléage, 1994)
 GOR (Garnier és *mtsi.*, 1996)

A programok közül az első négy (Gibrat, GOR IV, Predator, SOPMA3) csak az α -hélixet (helix), a β -lemezszerkezetet (sheet) és a coil szerkezetet, míg a továbbiak (Double prediction, Garnier, Hologue, SOPM, SOPMA4, GOR) az α -hélixen, a β -lemezszerkezeten és a coilon kívül a turn (turn) szerkezeteket is előre jelzi.

A másodlagos szerkezet előrejelzés eredményeit a 45. és a 46. ábra mutatja be. Az ábrák kétféle előre jelzett szerkezetet tartalmaznak. Az első (valószínű1) csak háromféle szerkezetet jelez előre (helix, sheet, coil) és az első négy program (Gibrat, GOR IV, Predator, SOPMA3) által kalkulált értékek átlagát tartalmazza. A második (valószínű2) négyféle szerkezetet jelez előre (helix, sheet, coil, turn) és a további programok (Double prediction, Garnier, Hologue, SOPM, SOPMA4, GOR) által kalkulált értékek átlagát tartalmazza.

A másodlagos szerkezet vizsgálatakor szembetűnő, hogy a CEGA cellulózkötő doménje (1. - 146. aminosav) szinte egyáltalán nem tartalmaz α -hélixet, elsősorban inkább β -lemezszerkezetet és coil-t. A szekvencia összehasonlításokból kiderült, hogy igazából a cellulózkötő domén a 42. és a 141. aminosav közötti rész (41. ábra). Igen jól megfigyelhető, hogy a másodlagos szerkezet előrejelzés (45. ábra) az első negyven aminosavra β -lemezszerkezetet jelez, ami el is tér a CBD szerkezettől ezzel is jelezve, hogy nem tartozik hozzá. Így jól kiegészíti és alátámasztja egymást ez a két független információ.

A linker szekvencia (147. - 174. aminosav) csupa coil struktúrát tartalmaz, ami a limitált proteolízis fő támadási helye (Gilkes és *mtsi.*, 1989). Hasonló a struktúra a 140. - 185. aminosavig, mely nem tartozik sem a cellulózkötő, sem a katalitikus doménhez.

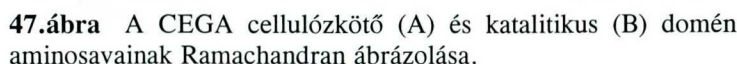
	helix (h)	sheet (e)	turns (t)	coil (c)				
	10	20	30	40	50	60	70	80
CEGA szekvencia	MSPRSNVSRRLRTVVAATAAAAVATAGLSALTATAQAAGCRVDYAVSSQWSGGFGATVTVTNLGDVPSWDLRWTFPN							
Gibrat	cc							
GOR IV	cc							
Predator	cc							
SOPMA3	cc							
Valószínűs1	cc							
Double prediction	ccttctcteeheehhh							
Garnier	eectcc							
Homologue	cccthh							
SOPM	cc							
SOPMA4	cc							
GOR	ccctcc							
Valószínűs2	cc							
	90	100	110	120	130	140	150	160
CEGA szekvencia	GQSVHQAWNATVSTTGSQVSAKNGVNGSLGTGASAQFGNGSWSGNSGVPAFTLNGTCTCTGGVTPQPTTQPTTQPTTQPTTQPT							
Gibrat	cheee							
GOR IV	ceee							
Predator	ccchhhhhhhheee							
SOPMA3	cccehheee							
Valószínűs1	ceee							
Double prediction	cccehheee							
Garnier	tccc							
Homologue	cccehheee							
SOPM	cccehheee							
SOPMA4	cccehheee							
GOR	tccc							
Valószínűs2	cccehheee							
	170	180	190	200	210	220	230	240
CEGA szekvencia	TTQPTTQPTTQPTTTPVSSSQLYVDFETAYAAWQAASGKDKDLAKMALTPQALWIGDWASASETQATVRDVTGRARAA							
Gibrat	cc							
GOR IV	cc							
Predator	cc							
SOPMA3	cc							
Valószínűs1	cc							
Double prediction	cc							
Garnier	teecteeeteeeeecc							
Homologue	cc							
SOPM	cc							
SOPMA4	cc							
GOR	tccctccttctcttcttcc							
Valószínűs2	cc							
	250	260	270	280	290	300	310	320
CEGA szekvencia	GKTAQIVVYAIPIGRDCGSGGVATSEYARWVDVTAAGIQGNPWVLEPDALQALGDCAGQGDRVGFGLQYAAKSADRQG							
Gibrat	chhheeeeeeeeecc							
GOR IV	cc							
Predator	cc							
SOPMA3	cc							
Valószínűs1	cc							
Double prediction	cchheeeeeeeecttttttttccccceehhhhhheeeeeehhctctceeeehchhhhhhtctcttccccceehhhhhhtct							
Garnier	hhheeeeeeeettttttttccccceehhhhhheeeeeehhctctceeeehchhhhhhtctcttccccceehhhhhhtct							
Homologue	ecccccccccecttcechhh							
SOPM	tccccccccccccccccceettccchhh							
SOPMA4	tccccccccccccccccceettccchhh							
GOR	chheeeeeeeettttttttccccceehhh							
Valószínűs2	cccccccccecttccccctttccccceehhh							

45.ábra A CEGA másodlagos szerkezetének előrejelzése I.

46.ábra A CEGA másodlagos szerkezetének előrejelzése II.

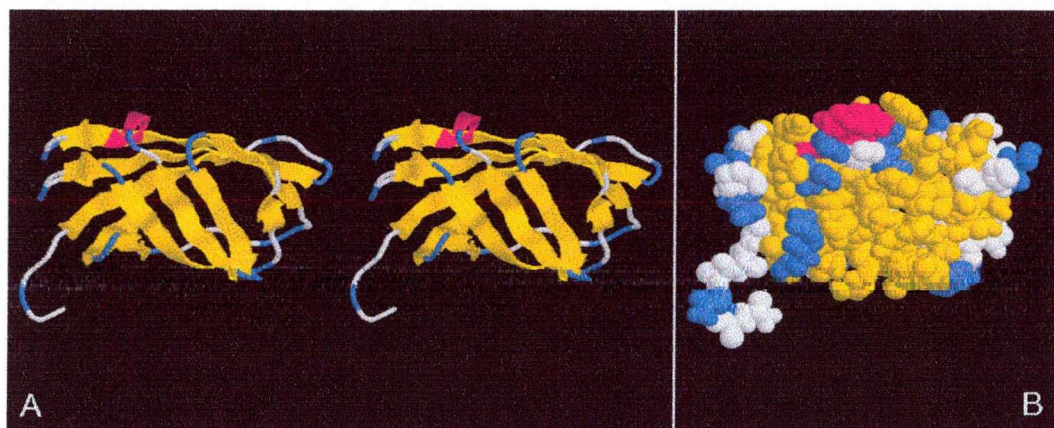
A katalitikus domén (190. - 457. aminosav) másodlagos szerkezetére elsősorban a α -hélix és coil a jellemző, kis mennyiségben fordul elő β -lemezszerkezet. A hélix és coil

A katalitikus domén (190. - 457. aminosav) másodlagos szerkezetére elsősorban a α -helix és β -lamez jellemző, kis mennyiségben fordul elő β -lemezszerkezet. A hélix és coil



Bakteriális hidrolázok

Az elsődleges és a másodlagos szerkezet felhasználásával valamint a Swiss-PdbViewer program segítségével homológia modellezést végeztünk, mind a cellulózkötő, mind a



48.ábra A CECA cellulózkötő doménjének háromdimenziós modellje. 'A': a CBD szerkezete cartoon (stereo) formában. 'B': a CBD szerkezete spacefill formában. Az α -hélix piros, a β -lemezszerkezet sárga, a turn kék és az egyéb másodlagos szerkezetek fehérek.

katalitikus doménnel. A kialakított modellt a HyperChemTM 4.5 molekula modellező program segítségével tovább optimalizáltuk. A két doménre kapott modell eredményeit tükrözi a 47., 48. és 49.ábra. A 47.ábra a két domén Ramachandran ábrázolásában az N - α C-atom Phi (Φ) és az α C - C-atom Psi (Ψ) torziós szögeit mutatja be. A 47.ábrán látható, hogy igen sok aminosav az ún. tiltott zónába esik, ami azt jelzi, hogy sok a molekulában



49.ábra A CECA katalitikus doménjének háromdimenziós modellje. 'A': a CD szerkezete cartoon (stereo) formában. 'B': a CD szerkezete spacefill formában. Az α -hélix piros, a β -lemezszerkezet sárga, a turn kék és az egyéb másodlagos szerkezetek fehérek.

a β -turn és a coil. A tiltott zónába eső aminosavak elsősorban a katalitikus doménnél

fordulnak elő sűrűn.

A 48.ábrán a *Cellulomonas* sp. CelB7-ből klónozott *cegA* gén fehérje termékének (CEGA) cellulózkötő, a 49.ábrán a katalitikus doménjének háromdimenziós szerkezete látható. A homológia modellezés, a már ismert térszerkezetű fehérjékkel szekvencia hasonlóság alapján történő modellezés, ami inkább előrejelzésnek, teoretikus modellnek nevezhető.

A CEGA az eddig ismert térszerkezetű fehérjék közül a *Thermomonospora fusca* endo-1,4- β -D-glükánázzal 34,97%-ban azonos (11TML.pdb), a *Cellulomonas fimi* exo-1,4- β -D-glükánázzal (celluláz, xylanáz) 49,13%-ban azonos (11EXG.pdb) és a *Trichoderma reesei* cellobiohidroláz II katalitikus doménjével 36,75%-ban azonos. Ennek alapján a program automatikusan két modellt generált, egy cellulózkötő domén homológot (a 11EXG.pdb-t használva templátként) és egy katalitikus domén homológot (a 11CB2.pdb-t és a 11TML.pdb-t használva templátként). Így az eredeti szekvencia 30. - 149. aminosava alkotja a CEGA CBD-t, míg a 202. - 444. aminosav pedig a katalitikus domént.

A cellulózkötő domén egy diszulfid hidat (az eredeti CEGA szekvenciában a 42. és a 141. cisztein között), míg a katalitikus domén két diszulfid hidat tartalmaz (az eredeti CEGA szekvenciában a 256. és a 299. cisztein között és a 398. és a 434. cisztein között, 41. ábra).

A CEGA CBD háromdimenziós szerkezete hasonló más bakteriális CBD-hez, míg a CD igen hasonlatos a *C. fimi* β -1,4-glükánáz (Cex) katalitikus doménjéhez (White és *mtsi.*, 1994).

További terveink:

- i) A génkönyvtárból szelektált klónok további vizsgálata, tekintettel a celluláz és a xylanáz aktivitásra
- ii) A meglévő klónok teljes szekvenciájának a megállapítása
- iii) A szekvenciák alapján további háromdimenziós modellezés, az aktív centrum felderítése
- iv) A klónozott enzimek felhasználásával ellenanyag előállítása és immunaffinitás kromatográfiával az eredeti enzimek tisztítása
- v) Az eredeti (glikozilált) enzimek további biokémiai vizsgálata

IV. ÖSSZEFOGLALÁS

Izoláltunk két Gram pozitívan festődő, pálcika alakú cellulózbontó baktériumot (CelB2 és CelB7) szántóföldi talajból. A CelB2 74,5%, a CelB7 74,3% (G+C)-t tartalmaz. Jól nőnek különböző szénforrásokat tartalmazó táptalajon, tápoldatban. Az elvégzett mikrobiológiai, biokémiai és genetikai vizsgálatok alapján a *Cellulomonas* genusba sorolhatók, de egyik *Cellulomonas* fajjal sem azonosak. A *Cellulomonas* sp. CelB7 a genus új faja.

Az izolált törzseket a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményénél nemzetközi ipari szabadalommal védve, a *Cellulomonas* sp. CelB2-t NCAIM {P} B 001203 (Felföldi és Fülöp, 1993) és a *Cellulomonas* sp. CelB7-t NCAIM {P} B 001204 (Fülöp és Felföldi, 1993) számokon helyeztük letétbe.

A baktériumok számos, a sejtfal bontásához szükséges enzimet termelnek, melyek közül a cellulázokat (xylanázokat) vizsgáltuk.

A cellulázok közül a fermentlében található egy 45 kDa és egy 115 kDa molekulatömegű endoglükánáz aktivitással rendelkező fehérje. A cellulózhoz kötötten számos endoglükánáz aktivitással rendelkező fehérje található: egy 53 kDa molekulatömegű, mely desztillált vízzel eluálható, egy 125 kDa molekulatömegű, mely csak guanidin-hidrokloriddal eluálható és egy 85 kDa molekulatömegű, mely desztillált vízzel és guanidin-hidrokloriddal is eluálható.

A biokémiai vizsgálatokhoz kidolgoztunk egy olyan detektálási módszert, mely alapján egy SDS PAGE után a fehérje és az enzimaktivitás is egyszerre látszik.

A molekuláris biológiai és enzimológiai vizsgálatokhoz előállítottunk RBB-O-CMC-t és RBB-O-mannánt, melyek segítségével kidolgoztunk egy hatékony enzimaktivitás mérési módszert. A színes szubsztrátok alkalmazásával kidolgoztunk egy gyors és egyszerű módszert a celluláz és mannanáz aktivitás szűrésére.

A CelB2 és CelB7 törzsből genom könyvtárat készítettünk, melyekből celluláz és xylanáz termelő klónokat izoláltunk. Elkészítettük a legnagyobb aktivitással rendelkező C72 klón fizikai térképét és azonosítottuk az endoglükánáz gént az inzerten. A génterméket Mono Q anioncserélő oszlopon tisztítottuk. A rekombináns enzim pH optimuma 6,8 - 7,4 között van, a hőmérséklet optimuma 35°C. A *cegA* gén olyan, a *Cellulomonas*-okban egyedülálló enzimet kódol, melynek endoglükánáz és xylanáz aktivitása is van.

Egy xylanázt termelő klónból (X74) FPLC segítségével kitisztítottunk egy 41 kDa molekulatömegű xylanázt, melynek hőoptimuma 30°C, pH optimuma 7,2.

Meghatároztuk a CEGA szekvenciáját, mely összehasonlítva különböző szekvenciákkal, elsősorban a *C. fimi* CenA-hoz és GuxA-hoz hasonló, de nem azonos vele.

A CEGA szekvenciája alapján megállapítható, hogy az újonnan izolált enzim ezidáig ismeretlen linker szekvenciát tartalmaz, mely szintén azt támasztja alá, hogy a *Cellulomonas* sp. CelB7 új faj.

Számos módszer segítségével a másodlagos szerkezetet valószínűsítettük. A homológia modellezés alapján meghatároztuk a CEGA háromdimenziós szerkezetét. Két különálló régiót találtunk, egy cellulózkötő és egy katalitikus domént.

SUMMARY

The microbial conversion of cellulose to soluble products requires several types of enzymes. The most important are endoglucanases (endo-1,4- β -D-glucanase, 1,4- β -D-glucan glucohydrolase; EC 3.2.1.4) and exoglucanases (cellulose 1,4- β -cellobiosidase; EC 3.2.1.91).

Two new cellulolytic microorganisms were isolated from soil (meadow chernozems). The isolation of bacteria were performed under aerobic conditions, but they growth were similar under both anaerobic and aerobic conditions. These gram-positive, motile, rods, with high (74.5 mol%, 74.3 mol%, CelB2, CelB7, respectively) guanine-plus-cytosine in deoxyribonucleic acid (DNA), can grow on numerous carbon source. The taxonomic position of these organisms as a member of the genus *Cellulomonas* are confirmed on the basic of microbial, biochemical and genetic characteristics. These information, in addition to other data, suggests that one of these organisms (CelB7) is a new species, *Cellulomonas* sp. CelB7 nov.

The *Cellulomonas* sp. CelB2 and *Cellulomonas* sp. CelB7 are patented, deposited in the National Collection of Agricultural and Industrial Microorganism under NCAIM {P} B 001203 (by Felföldi and Fülöp, 1993) and NCAIM {P} B 001204 (by Fülöp and Felföldi, 1993), respectively.

The CelB2 and CelB7 are produced xylanase, mannanase, pectinase, amylase, gelatinase, and the most important the glucanase activities.

The endoglucanases, endoxylanases and other protein of *Cellulomonas* sp. can be detected after polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS). The activity of glucanases or xylanases can also be detected after electrophoresis in the same gel then protein. Postelectrophoretic slab gels were directly incubated in a solution of carboxymethylcellulose (CMC) or xylan at adequate pH and temperature for half an hour, than staining the proteins with modified silver staining method. After the protein detection can be detected the endoglucanase or endoxylanase activities. This double staining method is the best solution possible, in order to detect the proteins and their activities in the same slab gel.

Purification and characterization of *Cellulomonas* sp. CelB7 cellulase. The cellulases activities of culture supernatants were purified by cellulose affinity chromatography and SDS-PAGE. The gel contained two cellulases, $M_r=115000$ and $M_r=45000$, respectively. The cellulose-bound cellulase activities were isolated from cellulose. First, the substrate-bound cellulases were eluted from cellulose with water and separated by FPCL on MONO Q anion exchange column in 30 mM TRIS-HCl pH 8.2 (buffer A) with buffer A plus 0.5

M NaCl (buffer B) linear gradient elution. The activities of fractions were determined with 3,5-dinitrosalicylate using CMC as substrate and the molecular weight of proteins were determined by SDS PAGE. Two endoglucanases were described $M_r=53000$ and $M_r=85000$. Second, the substrate-bound cellulases were eluted with 6M Gu-HCl and separated by FPCL too. The molecular weights of endoglucanases were $M_r=125000$ and $M_r=85000$.

Soluble dye-labelled substrates were prepared for the specific and rapid screening and the measurement of endo- β -1,4-glucanase and endo β -1,4-mannanase activities. Soluble carboxymethyl-cellulose and locust bean galactomannan were dyed with Remazol Brilliant Blue R. A specific screening procedure was developed to isolate genes coding for cellulolytic and hemicellulolytic enzymes from a *Cellulomonas* sp. CelB7 library. The assay is advantageous for the simple, rapid and direct detection of cellulase and hemicellulase activities in a large number of clones as found in gene libraries without replica plating or blotting techniques. The prepared dye-labelled substrates can also be used for the quantitative measurement of specific endo activities of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes because the undigested substrate can be precipitated and the amount of soluble dye, determined spectrophotometrically, is proportional to enzyme activity.

A gene library of a newly isolated *Cellulomonas* sp. CelB7 strain was constructed in *Escherichia coli* and screened for endoglucanase and endoxylanase activity using dye-labelled carboxymethyl-cellulose. Seventeen and seven clones were isolated that carried DNA inserts coding for endoglucanase and xylanase enzymes, respectively. Of the 17 clones, one carrying the gene *cegA*, was further characterized. *E. coli* harboring the plasmid pC72 which carries the gene coding for CEGA was grown overnight of LB broth supplemented with Ap at 37°C. Cells were centrifuged, suspended and sonicated. Sonicated cells were centrifuged, cell-free extract (CFE), was used for the enzyme assays. The recombinant endo-glucanase (CEGA) was purified by FPLC on Mono Q HR 5/5 (Pharmacia) anion exchange column in 50 mM TRIS-HCl pH 7.4 (buffer A) with buffer A plus 1 M NaCl (buffer B) linear gradient elution and the activity of fractions were determined with 3,5-dinitrosalicylate using CMC as substrate. The endoglucanase was active against carboxymethyl-cellulose, lichenin and also degraded crystalline cellulose and birchwood xylan. Its pH (7.4) and temperature (35°C) optima were determined. One of the clone carrying the gene *cexA*, was characterized. The recombinant endoxylanase (CEXA) was purified by FPLC as the endoglucanase. The endoxylanase was active only against birchwood xylan. The molecular weight of CEXA (41 kDa), pH (7.2) and temperature (30°C) were determined.

The sequence of *cegA* was determined by dye-labelled dideoxy-chain termination

procedure. After the sequence determination, the CEGA was compared by SWISS-PROT protein sequence database. The *Cellulomonas* sp. CelB7 CEGA endoglucanase has three domain. The cellulose binding domain, the catalytic domain and the linker sequence (region). The sequence of the cellulose binding domain showed the CEGA CBD is similar to CenA of *C. fimi*. The sequence of the catalytic domain is similar a CenA and GuxA of *C. fimi*. The linker sequence contains a new linker region (QPTT)₇ (Gln, Pro, Thr, Thr) box is a unique among bacterial O-glycosil-hydrolases.

Some methods were used for determination of secondary structure of CegA. The cellulose binding domain rich in β -sheet and catalytic domain rich in α -helix. We looked for the best available templates for determination of CEGA 3D. The program found 2 regions to modell separately. The homology modelling of CEGA results two domains, cellulose binding and catalytic domains.

V. IRODALOM

- Akino, T., Kato, C. and Horikoshi, K. (1989) Two *Bacillus* beta-mannanase having different COOH termini are produced in *Escherichia coli* carrying pMAH5. *Appl. Envir. Microbiol.* **55**, 3178-3183.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-10.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* **25**, 3389-3402.
- Arcand, N., Kluepfel, D., Paradis, F.W., Morosoli, R. and Schareck, F. (1993) Beta-mannanase of *Streptomyces lividans* 66: cloning and DNA sequence of the *manA* gene and characterization of the enzyme. *Biochem. J.* **290**, 857-863.
- Bagnara, C., Gaudin, R.T.C. and Belaich, J. P. (1985) Isolation and characterization of a cellulolytic microorganism, *Cellulomonas fermentans* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **35**, 502-507.
- Béguin, P. and Eisen, H. (1977) Free and Cellulose-bound cellulase in a *Cellulomonas* species. *J. Gen. Microbiol.* **101**, 191-196.
- Béguin, P. (1983) Detection of cellulase activity in polyacrylamide gels using Congo red-stained agar replicas. *Anal. Biochem.* **131**, 333-336.
- Béguin, P., Gilkes, N.R., Kilburn, D.G., Miller, R.C., O'Neill, G.P. and Warren, R.A.J. (1987) Cloning of cellulase genes. *Crit. Rev. Biotechnol.* **6**, 129-162.
- Béguin, P. (1990) Molecular biology of cellulose degradation. *Ann. Rev. Microbiol.* **44**, 219-248.
- Berg, B. (1975) Cellulase location in *Cellvibrio fulvus*. *Can. J. Microbiol.* **21**, 51-57.
- Bergey, D.H., Breed, R.S., Hammer, R.W., Harrison, F.C. and Huntoon, F.M. (1923) *Bergey's Manual® of Determinative Bacteriology*. 1st ed., Williams & Wilkins, Baltimore

- Biely, P., Mislovicova, D. and Toman, R.** (1985a) Soluble chromogenic substrates for the assay of endo-1,4-beta-xylanases and endo-1,4,beta-glucanases. *Anal. Biochem.* **144**, 142-146.
- Biely, P., Markovic, O. and Mislovicova, D.** (1985b) Sensitive detection of endo-1,4-beta-glucanases and endo-1,4-beta-xylanases in gels. *Anal. Biochem.* **144**, 147-151.
- Blackall, L.L., Hayward, A.C. and Sly, L.I.** (1985) Cellulolytic and dextranolytic Gram-negative bacteria: revival of the genus *Cellvibrio*. *J. Appl. Bacteriol.* **59**, 81-97.
- Blanchette, R.A., Arad, A.R., Farrel, R.L. and Leathers, T.D.** (1989) Detection of lignin peroxidase and xylanase by immunocytochemical labeling in wood decayed by basidiomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 1457-1465.
- Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Braithwaite, K.L., Black, G.W., Hazlewood, G.P., Ali, B.R.S. and Gilbert, H.J.** (1995) A non-modular endo-beta-1,4-mannanase from *Pseudomonas fluorescens* subspecies *cellulosa*. *Biochem. J.* **305**, 1005-1010.
- Brett, C. and Waldron, K.** (1990) Cell wall structure and the skeletal structure of the wall., in *Physiology and biochemistry of plant cell walls*. (Black, M. and Chapman, J., Eds.), Chapter II., pp. 4-57, Unwin Hyman, London.
- Carpita, N.C. and Gilbeaut, D.M.** (1993) Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal* **3**, 1-30.
- Chen, H.Y., Cheng, H. and Bjerknes, M.** (1993) One-step coomassie brilliant blue R-250 staining of proteins in polyacrylamide gel. *Anal. Biochem.* **212**, 295-296.
- Clark, T.A., McDonald, A.G., Senior, D.J. and Mayers, P.R.** (1989) Mannanase and xylanase treatment of softwood chemical pulps: effects on pulp properties and bleachability., in *Proceedings of the 4th International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry.*, pp. 39-40, TAPPI Press, Atlanta.

- Clarke, J.H., Laurie, J.I., Gilbert, H.J. and Hazlewood, G.P. (1991) Multiple xylanases of *Cellulomonas fimi* are encoded by distinct genes. *FEMS Microbiol. Lett.* **83**, 305-310.
- Coughlan, M.P. (1985) Cellulases: production, properties and applications. *Biochem. Soc. Transact.* **13**, 405-406.
- Coughlan, M.P. and Hazlewood, G.P. (1993) Beta-1,4-xylan degrading enzyme system: biochemistry, molecular biology and applications. *Biotech. Appl. Biochem.* **17**, 259-289.
- Coutinho, J.B., Moser, B., Kilburn, D.G., Warren, R.A.J. and Miller, R.C. (1991) Nucleotide sequence of the endoglucanase-C gene (CenC) of *Cellulomonas fimi*, its high-level expression in *Escherichia coli*, and characterization of its products. *Mol. Microbiol.* **5**, 1221-1233.
- Damude, H.G., Ferro, V., Withers, S.G., Warren, R.A.J. (1996) Substrate specificity of endoglucanase A from *Cellulomonas fimi*: Fundamental differences between endoglucanases and exoglucanases from family 6. *Biochem. J.* **315**, 467-472.
- Davies G., Henrissat B. (1995) Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* **3**, 853-859.
- Dekker, R.F.H. and Richard, G.N. (1976) Hemicellulases: their occurrence, purification, properties and mode of action. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **32**.
- Deléage, G. and Roux, B. (1987). An algorithm for protein secondary structure prediction based on class prediction. *Prot Eng.* **1**, 289-294.
- Din, N., Forsythe, I.J., Burtnick, L.D., Gilkes, N.R., Miller, R.C., Warren, R.A.J. and Kilburn, D.G. (1994) The Cellulose-Binding Domain of endoglucanase a (Cena) from *Cellulomonas fimi* - evidence for the involvement of tryptophan residues in binding. *Mol. Microbiol.* **11**, 747-755.
- Dubray, G. and Bezard, G. (1982) A highly sensitive periodic acid-silver stain for 1,2-diol groups of glycoproteins and polysaccharides in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* **119**, 325-329.

- Fanutti, C., Ponyi, T., Black, G.W., Hazlewood, G.P. and Gilbert, H.J.** (1995) The conserved noncatalytic 40-residue sequence in cellulases and hemicellulases from anaerobic fungi functions as a protein docking domain. *J. Biol. Chem.* **270**, 29314-29322.
- Fábián, F., Fülöp, L. and Sajgó, M.** (1995) The limited proteolysis as a potential tool for screening and detection of special antinutritive factors. *Bull. Univ. Agric. Sci. 75th Anniversary Edition* **1**, 87-93.
- Felföldi, F. and Fülöp, L.** (1993). *Cellulomonas* sp. CelB2., National Collection of Agricultural and Industrial Microorganism. Hungary: NCAIM {P} B 001203.
- Felix, C. and Ljungdahl, L.** (1993) The cellulosome - the exocellular organelle of *Clostridium*. *Ann. Rev. Microbiol.* **47**, 791-819.
- Ferreira, L., Wood, T., Williamson, G., Faulds, C., Hazlewood, G., Black, G. and Gilbert, H.** (1993) A modular esterase from *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa* contains a non-catalytic cellulose-binding domain. *Biochem. J.* **294**, 349-355.
- Frishman D. and Argos P.** (1996) Incorporation of non-local interactions in protein secondary structure prediction from the amino acid sequence. *Protein Eng.* **9**, 133-142.
- Flint, H.J., Martin, J., Mcpherson, C.A., Daniel, A.S. and Zhang, J.X.** (1993) A bifunctional enzyme, with separate xylanase and beta(1,3- 1,4)-glucanase domains, encoded by the xynD gene of *Ruminococcus flavefaciens*. *J. Bacteriol.* **175**, 2943-2951.
- Funke, G., Ramos, C. P. and Collins, M.D.** (1995) Identification of some clinical strains of CDC coryneform group A-3 and A-4 bacteria as *Cellulomonas* species and proposal of *Cellulomonas hominis* sp. nov. for some group A-3 strains. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 2091-2097.
- Fülöp, L. and Felföldi, F.** (1990) Detection of cellulase activity in polyacrylamide gels. *20th FEBS Meeting Budapest*, P-tu 229.
- Fülöp, L. and Felföldi, F.** (1993). *Cellulomonas* sp. CelB7., National Collection of Agricultural and Industrial Microorganism. Hungary: NCAIM {P} B 001204.
- Fülöp, L., Felföldi, F. and Ponyi, T.** (1995) Characterization and properties of bacterial beta-1,4-Glucanases. *2nd International Conference of the Hungarian Biochemical Society Szeged*, 1995. Aug. 21-23. Abstract book PA21 pp36.

- Fülöp, L. and Ponyi, T.** (1997) Rapid screening for endo- β -1,4-glucanase and endo- β -1,4-mannanase activities and specific measurement using soluble dye-labelled substrates. *J. Microbiol. Meth.* **29**, 15-21.
- Fülöp, L., Tr  n, S.L.P., Prágai, Z., Felföldi, F. and Ponyi, T.** (1996) Cloning and expression of a β -1,4-endoglucanase gene from *Cellulomonas* sp. CelB7 in *Escherichia coli*; purification and characterization of the recombinant enzyme. *FEMS Microbiol. Lett.* **145**, 355-360.
- Garnier, J., Gibrat, J.F. and Robson B.** (1996) GOR secondary structure prediction method version IV, *Methods in Enzymology*. R.F. Doolittle Ed., **266**, 540-553.
- Garnier, J., Osguthorpe, D.J. and Robson, B.** (1978) Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. *J. Mol. Biol.* **120**, 97-120.
- Geourjon, C. and Deléage, G.** (1994) SOPM: a self-optimised method for protein secondary structure prediction. *Protein Eng.* **7**, 157-164
- Geourjon, C. and Deléage, G.** (1995) SOPMA: Significant improvement in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Cabios.* **11**, 681-684.
- Gibbs, M.D., Saul, D.J., L  thi, E. and Bergquist, P.L.** (1992) The beta-mannanase from *Caldocellum saccharolyticum* is part of multidomain enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 3864-3867.
- Gibrat, J.F., Garnier, J. and Robson, B.** (1987) Further developpments of protein secondary structure prediction using information theory. *J. Mol. Biol.* **198**, 425-443.
- Gilardi, G.L.** (1971) Characterization of nonfermentative nonfastidious Gram negative bacteria encountered in medical bacteriology. *J. Appl. Bacteriol.* **34**, 623-644.
- Gilbert, H.J. and Hazlewood, G.P.** (1991) Genetic modification of fibre digestion. *Proc. Nutr. Soc.* **50**, 173-186.
- Gilbert, H.J., Hazlewood, G.P., Laurie, J.I., Orpin, C.G. and Xue, G.P.** (1992) Homologous catalytic domains in a rumen fungal xylanase: evidence for gene duplication and prokaryotic origin. *Mol. Microbiol.* **6**, 2065-2076.

- Gilkes, N.R., Langsford, M.L., Kilburn, D.G., Miller, R.C. and Warren, R.A.J. (1984) Mode of action and substrate specificities of cellulases from cloned bacterial genes. *J. Biol. Chem.* **259**, 10455-10459.
- Gilkes, N.R., Warren, R.A.J., Miller, R.C. and Kilburn, D.G. (1988) Precise excision of the cellulose binding domains from two *Cellulomonas fimi* cellulases by a homologous protease and the effect on catalysis. *J. Biol. Chem.* **263**, 10401-10407.
- Gilkes, N.R., Kilburn, D.G., Miller, R.C. and Warren, R.A.J. (1989) Structural and functional analysis of a bacterial cellulase by proteolysis. *J. Biol. Chem.* **264**, 17802-17808.
- Gilkes, N.R., Henrissat, B., Kilburn, D.G., Miller, R.C. and Warren, R.A.J. (1991) Domains in microbial beta-1,4-glycanases - sequence conservation, function, and enzyme families. *Microbiol. Rev.* **55**, 303-315.
- Giorda, R., Ohmachi, T., Shaw, D.R. and Ennis, R.C. (1990) A shared internal threonine-glutamic acid - threonine-proline repeat defines a family of *Dictyostellium discoideum* spore germination specific proteins. *Biochemistry* **29**, 7264-7269.
- Guex, N. and Peitsch, M.C. (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling. *Electrophoresis* **18**, 2714-2723.
- Hall, J., Hazlewood, G.P., Huskisson, N.S., Durrant, A.J. and Gilbert, H.J. (1989) Conserved serine-rich sequences in xylanase and cellulase from *Pseudomonas fluorescens* subspecies *cellulosa*: internal signal sequence and unusual protein processing. *Mol. Microbiol.* **3**, 1211-1219.
- Han, Y.W. and Srinivasan, V.R. (1968) Isolation and characterization of a cellulose-utilizing bacterium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **16**, 1140-1145.
- Hazlewood, G.P., Romaniec, M.P.M., Davidson, K., Grépinet, O., Béguin, P., Millet, J., Raynaud, O. and Aubert, J.P. (1988) A catalogue of *Clostridium thermocellum* endoglucanase, beta-xylosidase and xylanase genes cloned in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **51**, 231-236.
- Hazlewood, G.P. and Gilbert, H.J. (1993). Molecular biology of hemicellulases. London: Portland Press.

- Henrissat B.** (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities. *Biochem. J.* **280**, 309-316.
- Henrissat B., Bairoch A.** (1993) New families in the classification of glycosyl hydrolases based on aminoacid sequence similarities. *Biochem. J.* **293**, 781-788.
- Henrissat B., Bairoch A.** (1996) Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem. J.* **316**, 695-696.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. and Williams, S.T.** (1994) *Bergey's Manual® of Determinative Bacteriology*. Ninth Ed., Williams & Wilkins, Baltimore.
- Hopwood, D.A., Bibb, M.J., Chater, K.F., Kieser, T., Bruton, C.J., Kieser, H.M., Lydiate, D.J., Smith, C.P., Ward, J.M. and Schrempf, H.** (1985) Genetic manipulation of *Streptomyces*. A laboratory manual., The Jonh Innes Foundation, Norwich.
- Kim, B.H. and Wimpenny, J.W.T.** (1981) Growth and cellulolytic activity of *Cellulomonas flavigena*. *Can. J. Microbiol.* **27**, 1260-1266.
- Kim, D.W., Jeong, Y.K., Jang, Y.H. and Lee, J.K.** (1994) Purification and characterization of endoglucanase and exoglucanase components from *Trichoderma viride*. *J. Ferment. Bioeng.* **77**, 363-369.
- Koch, A., Weigel, C.T.O. and Schulz, G.** (1993) Cloning, sequencing, and heterologous expression of a cellulase-encoding cDNA (CBHI) from *Penicillium janthinellum*. *Gene* **124**, 57-65.
- Kohring, S., Wiegel, J. and Mayer, F.** (1990) Subunit composition and glycosidic activities of the cellulase complex from *Clostridium termocellum* JW20. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 3798-3804.
- Krüger, S., Stulke, J. and Hecker, M.** (1993) Catabolite repression of beta-glucanase synthesis in *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* **139**, 2047-2054.
- Langsford, M.L., Gilkes, N.R., Wakarchuk, W.W., Kilburn, D.G., Miller, R.C. and Warren, R.A.J.** (1984) The cellulase system of *Cellulomonas fimi*. *J. Gen. Microbiol.* **130**, 1367-1376.

- Langsford, M.L., Gilkes, N.R., Singh, B., Moser, B., Miller, R.C., Warren, R.A.J. and Kilburn, D.G.** (1987) Glycosylation of bacterial cellulases prevents proteolytic cleavage between functional domains. *FEBS Lett.* **225**, 163-167.
- Lau, J.M., McNeil, M., Darvill, A.G. and Albersheim, P.** (1985) Structure of the backbone of rhamnogalacturonan I, a pectic polysaccharide in the primary walls of plants. *Carbohydr. Res.* **137**, 111-125.
- Lawson, S.L., Warren, R.A.J. and Withers, G.** (1998) Mechanistic consequences of replacing the active-site nucleophile Glu-358 in *Agrobacterium* sp. beta-glucosidase with a cysteine residue. *Biochem. J.* **330**, 203-209.
- Levin J.M. and Garnier J.** (1988) Improvements in a secondary structure prediction method based on a search for local sequence homologies and its use as a building tool. *Biochim. Biophys. Acta* **955**, 283-295
- Lickfeld, K. G.** (1976) Transmission Elektron Microscopy of Bacteria., in *Methods in Microbiology* (Ed. J. R. Norris) Vol.9., pp: 127-176, Academic Press, London.
- Liu, Y., Chatterjee, A. and Chatterjee, A.K.** (1994) Nucleotide sequence and expression of a novel pectate lyase gene (pel-3) and a closely linked endopolygalacturonase gene (peh-1) of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 71. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 2545-2552.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.** (1951) Protein measurement with the phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Macarron, R., Acebal, C., Castillon, M.P., Dominguez, J.M., Delamata, I., Pettersson, G., Tomme, P. and Claeysens, M.** (1993) Mode of action of endoglucanase-III from *Trichoderma reesei*. *Biochem. J.* **289**, 867-873.
- Mathew, R. and Koteswara, R.** (1992) Activity staining of endoglucanases in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **206**, 50-52.
- Marmur, J. and Doty, P.** (1962) Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *J. Mol. Biol.* **5**, 109-118.

- McCleary, B.V.** (1988) Soluble, dye-labelled polysaccharides for assay of endohydrolases. *Meth. Enzymol.* **160**, 74-86.
- McGinnis, K. and Wilson, D.** (1993) Disulfide arrangement and chemical modification of beta-1,4- endoglucanase-E2 from *Thermomonospora fusca*. *Biochemistry* **32**, 8151-8156.
- Medve, J., Stahlberg, J. and Tjerneld, F.** (1994) Adsorption and synergism of cellobiohydrolase I and II of *Trichoderma reesei* during hydrolysis of microcrystalline cellulose. *Biotech. Bioeng.* **44**, 1064-1073.
- Meinke, A., Gilkes, N., Kilburn, D., Miller, R. and Warren, R.** (1991a) Multiple domains in endoglucanase-B (CenB) from *Cellulomonas fimi* - functions and relatedness to domains in other polypeptides. *J. Bacteriol.* **173**, 7126-7135.
- Meinke, A., Braun, C., Gilkes, N.R., Kilburn, D.G., Miller, R.C. and Warren, R.A.J.** (1991b) Unusual sequence organization in CenB, an inverting endoglucanase from *Cellulomonas fimi*. *J. Bacteriol.* **171**, 308-314.
- Meinke, A., Gilkes, N.R., Kilburn, D.G., Miller, R.C. and Warren, R.A.J.** (1993) Cellulose binding polypeptides from *Cellulomonas fimi* - Endoglucanase-D (CenD), a family A beta-1,4-Glucanase. *J. Bacteriol.* **175**, 1910-1918.
- Merril, C.R., Harrington, M. and Alley, V.** (1984) A photodevelopment silver stain for the rapid visualization of proteins separated on polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **5**, 189-297.
- Miller, G.L.** (1959) Use of dinitrosalicylic reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.* **31**, 426-428.
- Montgomery, L. and Fu, Y.K.** (1988) Detection of cellulose-binding proteins in electrophoresis gels by filter paper affinity blotting. *Anal. Biochem.* **174**, 204-208.
- Moser, B., Gilkes, N.R., Kilburn, D.G., Warren, R.A.J. and Miller, R.C.** (1989) Purification and characterization of endoglucanase C of *Cellulomonas fimi*, cloning of the gene and analysis of in vivo transcripts of the gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 2480-2487.

- Nakamura, K. and Kitamura, K.** (1988) Cellulases of *Cellulomonas uda*. *Meth. Enzymol.* **160**, 211-216.
- Nidetzky, B., Steiner, W., Hayn, M. and Claeyssens, M.** (1994a) Cellulose hydrolysis by the cellulases from *Trichoderma reesei* - a new model for synergistic interaction. *Biochem. J.* **298**, 705-710.
- Nidetzky, B., Steiner, W. and Claeyssens, M.** (1994b) Cellulose hydrolysis by the cellulases from *Trichoderma reesei*: Adsorptions of two cellobiohydrolases, two endocellulases and their core proteins on filter paper and their relation to hydrolysis. *Biochem. J.* **303**, 817-823.
- O'Farrell, P.H.** (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**, 4007-4021.
- O'Neil, G.P., Kilburn, D.G., Warren, R.A.J. and Miller Jr, R.C.** (1986) Overproduction from a cellulase gene with a high guanosine-plus cytosine content in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**, 737-743.
- Ong, E., Gilkes, N.R., Miller, R.C., Warren, R.A.J. and Kilburn, D.G.** (1993) The Cellulose-Binding Domain (CBDCex) of an exoglucanase from *Cellulomonas fimi* - production in *Escherichia coli* and characterization of the polypeptide. *Biotech. Bioeng.* **42**, 401-409.
- Peitsch, M.C.** (1995) Protein modeling by E-mail. *Bio/Technology* **13**, 658-660.
- Peitsch, M.C.** (1996) ProMod and Swiss-Model: Internet-based tools for automated comparative protein modelling. *Biochem. Soc. Trans.* **24**, 274-279.
- Polizeli, M.d.L.T.M., Jorge, J. and Terenzi, H.** (1991) Pectinase production by *Neurospora crassa* - purification and biochemical characterization of extracellular polygalacturonase activity. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 1815-1823.
- Prasertsan, P. and Doelle, H.W.** (1987) Nutrient optimization for cellulase biosynthesis by a newly isolated *Cellulomonas* sp. *Mircen J.* **3**, 33-44.
- Prágai, Z., Holczinger, A. and Sík, T.** (1994a) Transformation of *Bacillus licheniformis* protoplasts by plasmid DNA. *Microbiol. UK* **140**, 305-310.

- Prágai, Z., Tran, S., Nagy, T., Fülöp, L., Holczinger, A. and Sík, T. (1994b) Transposon Tn917PF1 mutagenesis in *Bacillus licheniformis*. *Microbiol. UK* **140**, 3091-3097.
- Robson, L.M. and Chambliss, G.H. (1986) Cloning of the *Bacillus subtilis* DLG β -1,4-glucanase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **165**, 612-619.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. (Cold Spring Harbor Laboratory ed.). New York: Cold Spring Harbor.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **4**, 5463-5467.
- Schwarz, W.H., Bronnenmeier, K., Grabnitz, F. and Staudenbauer, W.L. (1987) Activity staining of cellulases in polyacrylamide gels containing mixed linkage beta-glucans. *Anal. Biochem.* **164**, 72-77.
- Shen, H., Tomme, P., Meinke, A., Gilkes, N.R., Kilburn, D.G., Warren, R.A.J. and Miller, R.C. (1994) Stereochemical course of hydrolysis catalysed by *Cellulomonas fimi* CenE, a member of a new family of beta-1,4-glucanases. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **199**, 1223-1228.
- Silva, J., Saloheimo, M., Montanez, C., Knowles, J.K.C. and Teeri, T.T. (1988) Molecular cloning of cellulolytic enzymes genes from *Cellulomonas flavigena* in *E. coli*. *J. Biotechnol.* **8**, 249-256.
- Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., Holt, J.G. (1986) Irregular, nonsporing Gram-positive rods., in *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. (Jones, D. and Collins, M.D., Eds.), Vol 2, Williams & Wilkins, Baltimore.
- Stackebrandt, E. and Kandler, O. (1979) Taxonomy of the genus *Cellulomonas*, based on phenotypic characters and deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid homology, and proposal of seven neotype strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **29**, 273-282.
- Stackebrandt, E. and Kandler, O. (1980) *Cellolomonas cartea* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **30**, 186-188.

- Stackebrandt E., Seiler H. and Schleifer K.H.** (1983). Validation of the Publication of New Names and New Combination Previously Effectively Published Outside the IJSB. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **33**, 438-440.
- Stackebrandt, E. and Kiedde, R.M.** (1988). Validation of the Publication of New Names and New Combination Previously Effectively Published Outside the IJSB. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**, 220-222.
- Stahmann, K., Schimz, K. and Sahm, H.** (1993) Purification and characterization of four extracellular 1,3- beta-glucanases of *Botrytis cinerea*. *J. Gen. Microbiol.* **139**, 2833-2840.
- Stewart , B.J. and Leatherwood , J.M.** (1976) Depressed synthesis of cellulase by *Cellulomonas*. *J. Bacteriol.* **128**, 609-615.
- Stutzenberger, F.J.** (1989) A note on the inhibition of cellulase binding to protein-extracted lucerne fibre by denatured enzyme. *J. Appl. Bacteriol.* **67**, 87-90.
- Teather, R.M. and Wood, P.J.** (1982) Use of Congo red polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovin rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**, 777-780.
- Törrönen, A. and Rouvinen, J.** (1995) Structural comparison of two major endo-1,4-xylanases from *Trichoderma reesei*. *Biochemistry* **34**, 847-856.
- Wang, S.L., Chen, L.G., Chen, C.S. and Chen, L.F.** (1994) Cellulase and xylanase production by *Aspergillus* sp. G-393. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **45-6**, 655-662.
- Warren, R.A.J., Beck, C.F., Gilkes, N.R., Kilburn, D.G., Langsford, M.L., Miller, R.C., O'Neil, G.P., Scheufens, M. and Wong, W.K.R.** (1986) Sequence conservation and region shuffling in an endoglucanase and exoglucanase from *Cellulomonas fimi*. *Protein* **1**, 335-341.
- Warren, R.A.J., Gerhard, B., Gilkes, N.R., Owolabi, J.B., Kilburn, D.G. and Miller, R.C.** (1987) A bifunctional exoglucanase-endoglucanase fusion protein. *Gene* **61**, 421-427.

- White, A., Withers, S.G., Gilkes, N.R. and Rose, D.R. (1994) Crystal structure of the catalytic domain of the β -1,4-glycanase Cex from *Cellulomonas fimi*. *Biochemistry* **33**(42), 12546-12552.
- Wong, W.K.R., Gerhard, B., Guo, Z.M., Kilburn, D.G., Warren, R.A.J. and Miller, R.C. (1986) Characterization and structure of an endoglucanase gene *cenA* of *Cellulomonas fimi*. *Gene* **44**, 315-324.
- Wood, T.M. and Bhat, K.M. (1988) Methods for measuring cellulase activities. *Meth. Enzymol.* **160**, 87-112.
- Woodward, J., Brown, J.P., Evans, B.R. and Affholter, K.A. (1994) Papain digestion of crude *Trichoderma reesei* cellulase - purification and properties of cellobiohydrolase I and II core proteins. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **19**, 141-153.
- Wray, W., Bouliskas, T., Wray, V.P. and Hancock, R. (1981) Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **118**, 197-203.
- Wynne, E.C. and Pemberton, J.M. (1986) Cloning of a gene cluster from *Cellvibrio mixtus* which codes for cellulase, chitinase, amylase, and pectinase. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**, 1362-1367.
- Yaguchi, M., Roy, C., Ujjie, M., Watson, D.C. and Wakarchuk, W. (1992) Amino acid sequence of the low-molecular weight xylanase from *Trichoderma viride*., in *Xylan and xylanases*. (Visser, J., Beldman, G., Kusters van Sommeren, M.A. and A.G.J., V., Eds.), 149-154, Elsevier, Amsterdam.
- Yague, E., Béguin, P. and Aubert, J.P. (1990) Nucleotide sequence and deletions analysis of the cellulase-encoding gene *celH* of *Clostridium thermocellum*. *Gene* **89**, 61-67.
- Yamane, K., Yoshikawa, T., Suzuki, H. and Nisizawa, K. (1971) Localization of cellulase components in *Pseudomonas fluorescens* var. cellulosa. *J. Biol. Chem.* **69**, 771-780.
- Zabarovsky, E.R. and Allikmets, R.L. (1986) An improved technique for the efficient construction of gene libraries by partial filling-in of cohesive ends. *Gene* **42**, 119-123.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki Dr. Sajgó Mihály tanszékvezető egyetemi tanár, a biológiai tudomány doktorának azért, hogy lehetővé tette és hasznos tanácsaival mindvégig segítséget nyújtott a munkám elvégzéséhez.

Külön köszönöm Dr. Fábián Ferenc egyetemi docens, a biológiai tudomány kandidátusának a munkám során tanúsított segítőkészségét valamint a dolgozat kéziratának rendkívül alapos bírálatát.

Hálás köszönetemet fejezem ki Felföldi Ferenc, az SZBK Enzimológiai Intézet munkatársának, volt tanítványomnak, akivel ezt a munkát elkezdtük és a közös munkáink eredményeivel nagymértékben hozzájárult a dolgozat elkészültéhez.

Köszönettel tartozom Ponyi Tamás és Prágai Zoltán barátaimnak, a GATE Biotechnológia Tanszék munkatársainak a géntechnológiai munkákban nyújtott kimagasló segítségükért, valamint a dolgozat bírálatáért.

Külön köszönöm Dlauchy Dénes barátomnak, valamint a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteménye (Kertészeti és Élelmiszeripari Egyetem) munkatársainak segítőkész munkáját.

A GATE Kémia és Biokémia Tanszék "Biolabor" dolgozóinak, Kiss Péternek és Ács Lajosnének az önzetlen segítségükért, valamint a Tanszék összes dolgozójának segítségéért tartozom köszönettel.

A dolgozatban vázolt munka egy része az ifjúsági OTKA (F-5453) támogatásával valósult meg.

Végül, de nem utolsó sorban feleségemnek tartozom köszönettel a nyelvtani hibák feltárásáért és családomnak türelmükért.

1998. szeptember