B 3624

Ph.D. értekezés tézisei

SZTE Egyetemi Könyvtár
SZEGED
13.

Bakteriális O-glikozil hidrolázok izolálása, tisztítása és jellemzése

Fülöp László

GÖDÖLLŐI AGRÁRTUDOMÁNYI EGYETEM
MEZŐGAZDASÁGTUDOMÁNYI KAR
Kémia és Biokémia Tanszék
Gödöllő, 1998

Ph.D. értekezés tézisei

Bakteriális O-glikozil hidrolázok izolálása, tisztítása és jellemzése

Fülöp László

GÖDÖLLŐI AGRÁRTUDOMÁNYI EGYETEM
MEZŐGAZDASÁGTUDOMÁNYI KAR
Kémia és Biokémia Tanszék
Gödöllő, 1998

I. Tudományos előzmények és a kutatás célkitűzése

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 poliszacharidok igen elterjedtek mind a növény- mind az állatvilágban. A felépítésükben résztvevő monoszacharidok vagy α-, vagy β-glikozidos kötésekkel kapcsolódnak össze. Az α-glikozidos kötéseket tartalmazó poliszacharidok elsősorban energiaraktározó szerepet töltenek be, a β-glikozidos kötéseket tartalmazók viszont szilárdító, védekező vázanyagok. A keményítő α-glikozidos kötéseket tartalmaz, amilózból és amilopektinből áll, előbbiben a glükóz molekulák között kizárólag α-1,4 kötések találhatók, míg az utóbbiban az α-1,4 kötéseken 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-1,6-glikozidos kötéseket tartalmaznak), a rovarok páncélját alkotó kitin (β-1,4 kötésekkel felépülő N-acetil-glükózamin) és a növényi inulinok (β-1,2 kötésekkel felépülő fruktóz) mellett elsősorban a növények sejtfalában találhatók.

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 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 haszna 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 (xylanáz, mannanáz)

ii) A baktérium jellemzése, meghatározása, azonosítása

iii) A baktérium által termelt 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

II. A vizsgálatok és az alkalmazott módszerek

Mikrobiológiai módszerek:

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. A vizsgálatok folyamán Stewart és Laetherwood (1976) által közölt táptalajt használtuk, a vizsgálatokhoz szükséges módosításokkal. A baktériumsejteket Gram módszerrel 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), foszfatáz és szulfatáz reakciót a JATE, mikrobiológia gyakorlati jegyzetben leírtak szerint vizsgáltuk. Az asszimilációs spektrumot hagyományos módszerrel határoztuk meg. Az antibiotikum érzékenységet és az oxidáz reakciót Gilardi (1971) módszerével teszteltük. A tesztekhez használt oldatokat szűréssel sterileztük. 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} típustörzseket referenciaként használtuk. Az elektronmikroszkópos vizsgálatokat Lickfeld (1976), a (G + C) mol% meghatározását Marmur és Doty (1962) szerint végeztük. Az enzimtermelést különböző szénforrásokon vizsgáltuk. A baktérium szaporodás és enzimtermelés optimalizálását Prasertsan és Doelle (1987) szerint végeztük.

Biokémiai módszerek:

Az izolált baktériumok által termelt enzimeket a fermentléből tisztítottuk ki. Elkülönítettük a "szabad" cellulázokat (a fermentlében szabadon lévő cellulózhoz és sejthez nem kötött cellulázok), a cellulózhoz kötött cellulázokat és a sejthez kötött cellulázokat (a baktérium sejtben lévő ill. a sejtfelszínhez kötött cellulázok).

A rekombináns *E. coli* által termelt enzimeket a sejtek szonikálással történő feltárása után tisztítottuk tovább.

Az enzimek további tisztításánál a gélkromatográfia az affinitás-kromatográfia, az ioncserélő kromatográfia, a reverz fázisú kromatográfia módszereit használtuk, amelyeket FPLC (Fast Protein Liquid Chromatograph) segítségével valósítottunk meg.

A fehérjetartalom meghatározásához Lowry és *mtsi.* (1951) és Bradford (1976) által leírt módszereket alkalmaztunk. Az SDS PAGE-t O'Farrel (1975) szerint végeztük.

A cellulázok detektálására egyrészt a PAGE utáni agar replika gél (mely tartalmazza a vizsgálandó enzim szubsztrátját) Kongó vörössel történő festését (Béguin, 1983), másrészt az általunk kidolgozott módszert használtuk a cellulázok kimutatására SDS PAGE után (Fülöp és Felföldi, 1990).

Az enzimaktivitás méréséhez, valamint az enzimaktivitással rendelkező klónok szelektálásához színes szubsztrátokat (blue-CMC, blue-mannán) készítettünk (Fülöp és Ponyi, 1997).

Az enzimaktivitásokat (celluláz, xylanáz, mannanáz) színes szubsztráttal (Fülöp és Ponyi, 1997) valamint a felszabadított redukáló cukor meghatározásával (Miller, 1959) állapítottuk meg. A β-glükozidáz aktivitást a p-nitrofenil-β-D-glükozidból felszabadított nitrofenol, a cellobiozidáz aktivitást a p-nitrofenil-β-D-cellobiozidból felszabadított nitrofenol meghatározásával mértük (Wood és Bhat, 1988). A celluláz (xylanáz) aktivitás félkvantitatív meghatározását (gyors teszt) szubsztrát tartalmú agar lemezen Kongó-vörös festéssel határoztuk meg.

Genetikai módszerek:

A DNS tisztítását, koncentrációjának mérését a laboratóriumi kézikönyvek szerint végeztük.

A *Cellulomonas* sp. génkönyvtárat pBluescript® II KS$^+$ vektorban készítettük el Zabarovsky és Allikmets (1986) szerint, apró módosításokkal.

A *Cellulomonas* génkönyvtárral transzformált *E. coli* sejtekből a celluláz (xylanáz) aktív klónokat színes szubsztráton szelektáltuk (Fülöp és Ponyi, 1997).

A celluláz és xylanáz aktív klónok restrikciós térképezését, a DNS elválasztását agaróz gélelektroforézissel a laboratóriumi kézikönyvek szerint végeztük el.

A DNS szekvenálást manuálisan a Sanger-féle láncterminációs módszerrel (Sanger és *mtsi.*, 1977) határoztuk meg. Másrészt a szubklónokból a DNS inszertet amplifikáltuk PCR segítségével (a magas G+C% miatt), amelyet gélből tisztítás után festék terminációs szekvenáló kit segítségével szekvenáltunk.

A fehérjeszekvencia összeállításában a GCG programcsomag volt segítségünkre. A szekvenciák összehasonlítására BLASTP 1.3.11 és BLASTP 1.4.10 (Altschul, és *mtsi.*, 1997) programokat használtunk. A másodlagos szerkezet előrejelzéséhez többféle programot használtunk.

A fehérjék homológia modellezéséhez a Swiss-PdbViewer v 3.0 (Guex és Peitsch, 1998) és a HyperChem™ 4.5 molekula modellező program volt segítségünkre.

III. Az elért eredmények

1. Két Gram pozitívan festődő, pálcika alakú cellulózbontó baktériumot izoláltunk (CelB2 és CelB7) szántóföldi talajból. A CelB2 DNS 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, melyet a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményénél nemzetközi ipari szabadalommal védve, *Cellulomonas* sp. CelB7 NCAIM {P} B 001204 számon helyeztünk letétbe (Fülöp és Felföldi, 1993).

2. A cellulázok közül a fermentlében található egy 45 kDa és egy 115 kDa molekulatömegű endoglükanáz aktivitással rendelkező fehérje. A cellulózhoz kötötten számos endoglükanáz 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 (Fülöp és *mtsi.*, 1995).
3. A biokémiai vizsgálatokhoz kidolgoztunk egy olyan detektálási módszert, mely alapján egy SDS PAGE után a fehérje és az enzimaktivitás is egyszerre látszik (Fülöp és Felföldi, 1990).
4. 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 (Fülöp és Ponyi, 1997).
5. 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 endoglükanáz gént az inszerten. A génterméket Mono Q anioncserélő oszlopon tisztítottuk. A rekombináns enzim pH optimuma 6,8 - 7,4 között van, a hőmérséklet optimuma 35°C. A *ceg*A gén olyan, a *Cellulomonas*-okban egyedülálló enzimet kódol, melynek endoglükanáz és xylanáz aktivitása is van (Fülöp és mtsi., 1996).
6. 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 előjeleztük a CEGA háromdimenziós szerkezetét. Két különálló régiót találtunk, egy cellulózkötő és egy katalitikus domént.

A dolgozat eredményeit tartalmazó publikációk

L. **Fülöp** and F. Felföldi, F. (1990) Detection of cellulase activity in polyacrylamide gels.
20th Meeting of the FEBS P-TU-229. Budapest, August. 19-24. 1990.

L. **Fülöp** and Felföldi, F. (1993). *Cellulomonas* sp. CelB7., National Collection of Agricultural and Industrial Microorganism. Hungary: NCAIM {P} B 001204 (Nemzetközi ipari szabadalom).

L. **Fülöp**, F. Felföldi and T. Ponyi (1995) Characterization and properties of bacterial β-1,4-Glucanases.
2nd International Conference of the Hungarian Biochemical Society Szeged 1995. Aug. 21-23. Abstract book PA21 36.oldal

L. **Fülöp**, S.L.P. Tran, Z. Prágai, F.Felföldi and T.Ponyi (1996) Cloning and expression of a ß-1,4-endoglucanase gene from *Cellulomonas* sp. CelB7 in *Escherichia coli*; purification and characterization of the recombinant enzyme.
FEMS Microbiol. Lett. **145**, 355-360.

L. **Fülöp** and T. Ponyi (1997) Rapid screening for endo-ß-1,4-glucanase and endo-ß-1,4-mannanase activities and specific measurement using soluble dye-labelled substrates.
J. Microbiol. Meth. **29**, 15-21.

További fontosabb közlemények jegyzéke

Fülöp László és Sajgó Mihály (1987) Intelligens adatgyűjtő egység analitikai folyamatok követésére. *Napjaink Biotechnológiája* OMFB tanulmányok (7.) 59-60 OMIKK Bp. 1987.

F. Felföldi and **L. Fülöp** (1993). *Cellulomonas* sp. CelB2., National Collection of Agricultural and Industrial Microorganism. Hungary: NCAIM {P} B 001203 (Nemzetközi ipari szabadalom).

Z. Prágai, S. Trân, T. Nagy, **L. Fülöp**, A. Holczinger, and T. Sík (1994) Transposon Tn917PF1 mutagenesis in *Bacillus licheniformis*. *Microbiol. UK* **140**, 3091-3097.

F. Fábián, **L. Fülöp**, and M. Sajgó (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.

L.S. Trân Phan, L. Szabó, **L. Fülöp**, L. Orosz, T. Sik, and A. Holczinger (1998) Isolation of a ß-galactosidase-encoding gene from *Bacillus licheniformis*: Purification and characterization of the recombinant enzyme expressed in *Escherichia coli*. *Cur. Microbiol.* **37**, 39-43.