

**β-GALAKTOZIDÁZ AKTIVITÁSOK VIZSGÁLATA JÁROMSPÓRÁS
GOMBÁKBAN**

PH.D. ÉRTEKEZÉS
VOLFORD BETTINA

TÉMAVEZETŐK:

DR. TAKÓ MIKLÓS

EGYETEMI ADJUNKTUS

DR. NAGY GÁBOR

TUDOMÁNYOS MUNKATÁRS

BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA



SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR
MIKROBIOLÓGIAI TANSZÉK

2023
SZEGED

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések jegyzéke	5
1. Bevezetés	7
2. Irodalmi áttekintés	8
2.1. A járomspórás gombák általános jellemzése	8
2.2. A Mucorales rend.....	8
2.2.1. A <i>Lichtheimia</i> nemzetség	9
2.2.2. A <i>Rhizomucor</i> nemzetség	10
2.2.3. A <i>Rhizopus</i> nemzetség.....	10
2.2.4. A <i>Mucor</i> nemzetség.....	11
2.2.5. Az <i>Umbelopsis</i> nemzetség.....	11
2.3. A Mortierellales rend	11
2.4. A galaktozidáz enzimek típusai és jellemzői	12
2.5. A β -galaktozidázok gyakorlati alkalmazása	13
2.6. A β -galaktozidázok mikrobiális előállítása.....	14
2.7. Tisztított mikrobiális β -galaktozidázok	15
2.8. Azonosított és termeltetett mikrobiális β -galaktozidáz gének	17
2.9. Járomspórás gombák β -galaktozidáz termelése.....	19
3. Célkitűzések	21
4. Anyagok és módszerek.....	22
4.1. Alkalmazott törzsek	22
4.2. Alkalmazott táptalajok és tápoldatok.....	22
4.3. Felhasznált pufferek, oldatok és reagensek	23
4.4. A β -galaktozidáz termelés vizsgálata szilárd táptalajon	25
4.5. Tenyésztési körülmények az enzimtermelés vizsgálatához.....	25
4.5.1. Süllyesztett fermentáció (SmF)	25
4.5.2. Szilárd fázisú fermentáció (SSF).....	26
4.6. A β -galaktozidáz hidrolitikus aktivitásának meghatározása.....	26
4.7. β -Galaktozidázok részleges tisztítása enzimatikus szintézis vizsgálatokhoz	27
4.8. Enzimatikus szintézis vizsgálatok.....	27
4.9. Szénhidrátok tömegspektrometriai vizsgálata	28
4.10. Probiotikumok növekedésére gyakorolt hatás tesztelése	28
4.11. β -Galaktozidázok nagy-léptékű tisztítása	29
4.12. Fehérjekoncentráció meghatározás	30

4.13. Denaturáló gélelektroforézis	30
4.14. Zimogram analízis	31
4.15. A tisztított enzimek biokémiai jellemzőinek meghatározása.....	31
4.15.1. Általános reakciófeltételek	31
4.15.2. Hőmérséklet optimum és tolerancia	32
4.15.3. pH optimum és tolerancia.....	32
4.15.4. Szubsztrátspecifitás vizsgálat	32
4.16. β -Galaktozidáz-kódoló gének vizsgálatához alkalmazott módszerek	33
4.16.1. Genomi DNS kinyerése gombasejtekből.....	33
4.16.2. Agaróz gélelektroforézis.....	33
4.16.3. DNS visszanyerése agaróz gélből	33
4.16.4. RNS tisztítás gombasejtekből.....	34
4.16.5. cDNS szintézis (reverz transzkripció)	34
4.16.6. Alkalmazott PCR technikák és reakciókörülmények	34
4.16.7. A <i>L. ramosa pyrG</i> gén elrontásához használt RNS molekulák.....	36
4.16.8. PEG-mediált protoplaszt transzformáció.....	36
4.16.9. Génklónozás során alkalmazott módszerek, vektorkonstrukciók létrehozása.	37
4.16.10. Baktérium transzformáció	37
4.16.11. <i>In silico</i> elemzések.....	37
4.17. Statisztikai vizsgálatok	38
5. Eredmények és értékelésük	39
5.1. A β -galaktozidáz aktivitás vizsgálata kromogén agaron	39
5.2. β -Galaktozidáz termelés fermentációkban.....	42
5.3. Oligoszacharidok szintézise.....	47
5.4. Szintetizált oligoszacharidok növekedést támogató hatása	52
5.5. β -Galaktozidáz enzimek izolálása	55
5.6. A tisztított β -galaktozidázok biokémiai jellemzése	59
5.6.1. A hőmérséklet optimum és stabilitás vizsgálata.....	59
5.6.2. A pH optimum és stabilitás vizsgálata	60
5.6.3. Szubsztrátspecifitás meghatározás.....	62
5.7. <i>Lichtheimia ramosa</i> β -galaktozidáz kódoló gének azonosítása.....	63
5.8. β -Galaktozidáz kódoló gének kifejeződésének vizsgálata	64
5.9. β -Galaktozidáz gének funkcionális vizsgálata.....	65
5.9.1. Uracil auxotróf törzs létrehozása CRISPR-Cas9 rendszerrel	65
5.9.2. Vektorkonstrukciók szerkesztése túltermelő törzs létrehozásához	68

6. Összefoglalás	71
7. Summary.....	77
8. Irodalomjegyzék	83
9. Köszönetnyilvánítás	98
10. Függelék	99

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

5-FOA	5-fluoroorotsav
BLAST	szekvencia-hasonlóság kereső programcsomag (<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>)
CMCáz	karboximetil-celluláz
CRISPR	halmozottan előforduló, szabályos közökkel elválasztott palindromikus ismétlődések (<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>)
crRNS	CRISPR RNS
DMSO	dimetil-szulfoxid
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
FOS	fruktooligoszacharid
gRNS	vezető RNS (<i>Guide RNA</i>)
GOS	galaktooligoszacharid
LB	lizogén tápleves (<i>Luria-Bertani</i> tápleves)
HPLC-MS/MS	nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia kapcsolt tandem tömegspektrometria (<i>High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry</i>)
MOPS	3-N-morfolin-propánszulfonsav
MRS	de Man, Rogosa és Sharpe tápközeg
natív-PAGE	natív poliakrilamid gélelektroforézis (<i>Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
NCBI	Nemzeti Biotechnológiai Információs Központ (<i>National Center for Biotechnology Information</i>)
NHEJ	„nem homológ végek” összekapcsolása (<i>Non-Homologous End Joining</i>)
<i>o</i>NPG	<i>o</i> -nitrofenil- β -D-galaktopiranozid
OsLu	laktulóz-eredetű GOS
PAM	protospacer melletti motívum (<i>Protospacer Adjacent Motif</i>)
PCR	polimeráz láncreakció (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PEG	polietilén-glikol
PMC	PEG - szorbitol - MOPS - kalciumklorid
<i>p</i>NPG	<i>p</i> -nitrofenil- β -D-galaktopiranozid
<i>pyrG</i>, <i>pyrF</i>	orotidin-5'-foszfát dekarboxiláz gén
qPCR	kvantitatív valós idejű PCR (<i>Quantitative Real-Time PCR</i>)
RT-PCR	reverz transzkripció PCR (<i>Reverse Transcription PCR</i>)

RT-qPCR	reverz transzkripció kapcsolt kvantitatív valós idejű PCR (<i>Reverse Transcription quantitative real-time PCR</i>)
SDS-PAGE	nátrium-lauril-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis (<i>Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
SMC	szorbitol - MOPS - kalciumklorid
SmF	süllyesztett fermentáció (<i>Submerged Fermentation</i>)
SRM	kiválasztott reakció figyelő (<i>Selected Reaction Monitoring</i>)
SSF	szilárd fázisú fermentáció (<i>Solid-State Fermentation</i>)
SZMC	Szeged Mikrobiológiai Gyűjtemény (<i>Szeged Microbiology Collection</i>)
TAE	tris-ecetsav-dinátrium EDTA
tracrNS	transzaktiváló crRNS (<i>Trans-Activating CRISPR RNA</i>)
X-gal	5-bromo-4-kloro-3-indol- β -D-galaktopiranozid
YEG	élesztőkivonat-glükóz (<i>Yeast Extract Glucose</i>)
YNB	élesztő nitrogénforrás (<i>Yeast Nitrogen Base</i>)

1. BEVEZETÉS

A járomspórás gombák talajban, állati és növényi bomló szerves anyagokon előforduló fonalas gombák. Számos orvosi, ipari, biotechnológiai és mezőgazdasági szempontból fontos fajt találunk közöttük. Az ide tartozó Mucoromycota csoport egyes tagjai különböző biotechnológiai folyamatokban alkalmazott extracelluláris enzimek (pl. lipázok, proteázok) termelőjeként ismertek. Habár a Mucoromycota gombák számos ipari enzim kiváló forrásai, galaktozidáz termelésüket, az enzimek tulajdonságait, valamint az enzimeket kódoló gének molekuláris és funkcionális jellemzőit kevésbé tanulmányozzák.

A β -galaktozidáz enzim a glikozidos kötést hidrolizálja a diszacharid laktóz molekulában. Az enzimet széles körben alkalmazzák az élelmiszeriparban tejtermékek laktóz tartalmának csökkentésére, illetve a sajtgyártás során melléktermékként keletkező tejsavó kezelésére. A mikrobiális eredetű β -galaktozidázok nagy ipari jelentőséggel bírnak, ugyanis egyszerűen kezelhetők és más enzimforrásokhoz képest a mikroorganizmusok nagyobb hozamot biztosítanak. A termofil mikroorganizmusokból származó enzimek nagyobb hőstabilitással rendelkeznek, ezáltal ipari alkalmazásuk előtérbe került kedvező tulajdonságaiknak köszönhetően.

Doktori munkámban fő célunk volt a Mucoromycota járomspórás gombacsoport Mortierellales és Mucorales rendjeibe tartozó fonalas gombák β -galaktozidáz aktivitásának felmérése és tanulmányozása. Ezen belül enzimtermelő törzsek azonosítását, az enzimtermelés különböző induktív körülményeken történő vizsgálatát, tisztított enzimek biokémiai tulajdonságainak feltárását kívántuk elvégezni. A jó termelőnek bizonyuló törzs/törzsek galaktozidázt kódoló génjeinek azonosítása és jellemzése szintén a terveink részét képezte. Célunk volt még a gének azonosítására kiválasztott törzs(ek)ben a galaktozidáz gének kifejeződésének vizsgálata, galaktozidáz génben diszruptív, illetve az enzimet túltermelő gombatörzs(ek) létrehozása, az enzimaktivitás heterológ rendszerben történő termeltetése. Egyes járomspórás gomba β -galaktozidáz aktivitások gyakorlati jelentőségének további megismeréséhez elemezni kívántuk azok oligoszacharid szintézist katalizáló potenciálját is, mellyel az egészséges bélflóra mikroorganizmusainak növekedését támogató laktóz-alapú molekulák állíthatók elő gazdaságosan.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A járomspórás gombák általános jellemzése

A járomspórás gombák a fonalas gombák egyik legjelentősebb csoportja. Közülük számos faj talajban, korhadékban, komposztban, zöldségeken vagy rothadó gyümölcsökön él, szaprotróf szervezet. Találunk köztük a gazdanövények gyökérszövetében arbuszkulumokat képző endomikorrhiza-gombákat, valamint rovarok, fonálférgek és egyéb gerinctelenek patogénjeit vagy parazitáit is. Ivaros szaporodásuk nem kötődik vízhez. Hifáik válaszfal nélküli cönocitikus szerveződésűek. Ivaros szaporodáskor a spóraalakjuk a két gametangium fúziójával létrejövő járomspóra. A járomspóra vastag falú, jellegzetes alakú képlet, gyakran rövid hifákból álló csomó alkotja. Ivartalanul sporangiosporákkal szaporodnak (Alexopoulos és mtsai., 1996; Spatafora és mtsai., 2016). A járomspórás gombák általában kozmopoliták, szubsztrát felhasználásuk széleskörű, számos szénforrás asszimilálására és különféle metabolitok előállítására egyaránt képesek (Benny és mtsai., 2001; Taherzadeh és Edebo, 2009). Néhány csoportra jellemző a morfológiai dimorfizmus, azaz nemcsak fonalasan, hanem élesztőszerűen is képesek növekedni. Ez főleg olyan környezetben fordul elő, ahol magas a hexóz tartalom és/vagy oxigénhiányos a környezet. Sejtfalukat elsősorban kitin és kitozán alkotja. A járomspórás gombák közé tartozó fajokat korábban polifiletikus, egységes törzsbe sorolták (Zygomycota) (Barr, 1992; Benny és mtsai., 2001), azonban részletesebb morfológiai és molekuláris vizsgálatok a gombacsoport rendszertani átalakítását tették szükségessé, melynek eredményeként a korábbi Zygomycota törzset a Mucoromycota és Zoopagomycota törzsekre bontották (Spatafora és mtsai., 2016). A munkánkba a Mucoromycota törzsbe tartozó Mucorales és Mortierellales rendek egyes nemzetségeinek gombáit vontuk be.

2.2. A Mucorales rend

A Mucorales rend a Mucoromycota törzs legtöbb fajt tartalmazó csoportja. A rendre jellemző a nem szeptált micélium, a nagy tömegű hifaképzés, valamint az intenzív növekedés. Többségük szaprotróf életmódot folytató, elsősorban talajban, korhadó növényi részekben, valamint komposztálódó szerves maradványokon előforduló szervezet. Magas a só- és cukorkoncentráció tűrő képességük; a legtöbb törzs a raktározott zöldségek és gyümölcsök kártevője, például konzervgyárakban is komoly károkat okozhatnak (Ray és

Ravi, 2005). Hőmérséklet szempontjából a fajok között pszichrofil és termofil fajok egyaránt megtalálhatóak, tehát változatos csoportnak mondható. Ipari alkalmazásuk jelentős; számos törzset használnak keményítő hidrolízisre, valamint oxálsav, fumársav, tejsav, ecetsav és citromsav előállításra (Gottfredsen, 1990; Outtrup és Boyce, 1990; Ferreira és mtsai., 2013). Az ide tartozó fajok között vannak mucormikózist okozó opportunistáknak is, például egyes *Lichtheimia corymbifera* és *Lichtheimia ramosa* törzsek (Alastruey-Izquierdo és mtsai., 2010). További patogén törzsek találhatóak még a *Rhizomucor miehei*, *Rhizopus delemar* és a *Mucor circinelloides* fajok között is. A harmadik leggyakoribb angioinvaszív gombafertőzés például mucormikózis eredetű (Petrikos és mtsai., 2012). Néhány Mucorales gomba növények kórokozójaként ismert, például a *M. circinelloides* gyümölcsök sebkórokozója lehet, a *Rhizopus microsporus* kukorica, napraforgó és rizs növényeket károsíthat, a *Rhizopus stolonifer* pedig az édesburgonya kórokozója lehet (Srivastava és Walker, 1959). A rend nemzetségei közül a *Lichtheimia*, *Rhizomucor*, *Rhizopus*, *Mucor* és *Umbelopsis* csoportból vontunk be törzseket a vizsgálatainkba.

2.2.1. A *Lichtheimia* nemzetség

A *Lichtheimia* nemzetség talajban és bomló növényi anyagokon élő szaprotróf fajokból áll. Számos termotoleráns törzs is található a nemzetségben belül, melyek optimális növekedési hőmérséklete 37 °C körül van (André és mtsai., 2014; Schwartze és mtsai., 2014). A mucormikózis fertőzések egy részéért is e nemzetség fajai felelősek főleg Európában (Schwartze és mtsai., 2014). A *L. ramosa* talajban is megtalálható és képes szénhidrát-bontó enzimeket termelni (Garcia és mtsai., 2015). Széles hőmérséklet tartományban (20-53 °C) képesek növekedni, ezért termotoleráns csoportnak számítanak, habár a legintenzívebb növekedést 37 °C-on mutatják. A *Lichtheimia* nemzetségbe tartozó fonalas gombák gyors növekedési képessége alkalmassá teszi őket a növényi anyagok lebontásában részt vevő enzimek tanulmányozására, és felveti a biotechnológiai alkalmazás lehetséges előnyeit. Kevés tanulmány készült a *Lichtheimia* nemzetségbe tartozó gombák szénhidrát-aktív enzimjeiről. Eddigi kutatásokban például a *Lichtheimia blakesleeana* gombát jelentős fitáz és xilanáz termelőként írták le, a *L. ramosa* β -glükozidáz, xilanáz és karboximetil-celluláz (CMCáz) termeléséről számoltak be búzakarpa-alapú közegben, továbbá gyümölcs-hulladék szilárd fázisú fermentációjával amilázok, β -glükozidázok, CMCáz és xilanázok termelését mutatták ki (Neves és mtsai., 2011; Gonçalves és mtsai., 2013; Silva és mtsai., 2013; Alvarez-Zúñiga és mtsai., 2017).

2.2.2. A *Rhizomucor* nemzetség

A *Rhizomucor* nemzetséget a *R. miehei* és *Rhizomucor pusillus* termofil fajok alkotják (Vastag és mtsai., 1998; Vágvölgyi és mtsai., 1999; Salar és Aneja, 2007). A *R. pusillus* homo- vagy heterotallikus, míg a *R. miehei* homotallikus organizmus. A nemzetség tagjaira jellemző a rhizoid és a stolon képzés (Vastag és mtsai., 2000). A termofil tulajdonság a *Rhizomucor* nemzetség fajainak régen felismert jellegzetes sajátossága. Az optimális hőmérséklet ezen gombák fejlődéséhez a 37-40 °C. Az extracelluláris enzimeiknek köszönhetően, mellyel képesek hatékonyan lebontani a szerves maradványokat, a komposztálásban részt vevő mikrobaközösségek jellemző tagjai (van Heerden és mtsai., 2002; Langarica-Fuentes és mtsai., 2014; Hüttner és mtsai., 2018). Egyes *Rhizomucor* törzsek biotechnológiai és élelmiszeripari alkalmazások során is nagy jelentőséggel bírnak, mint például proteáz és lipáz termelők. A tejet koaguláló mikrobiális eredetű proteázok között kiemelkedő fontosságú a *R. miehei* savas proteáza. A *Rhizomucor* proteáz a borjú oltóenzimnél hatékonyabb és nagyobb specifitású, használatával jobb minőségű sajt nyerhető (Alves és mtsai., 2005). Lipázaikat elsősorban a vegyiparban, változatos szintetikus és hidrolitikus reakciók katalizálásában hasznosítják (Rodrigues és Fernandez-Lafuente, 2010).

2.2.3. A *Rhizopus* nemzetség

A *Rhizopus* nemzetség fajainak többsége lebontó, azaz szaprotróf életmódot folytat. Tagjai közül számos felhasználható egyes élelmiszerek fermentációjának elindítójaként, illetve hidrolitikus enzimek előállításában. A *Rhizopus oligosporus* például egy indonéz fermentált étel, a tempeh készítésében tölt be fontos starter kultúra szerepet (Hesseltine, 1983). Néhány ide tartozó gombatörzs betakarítás utáni fertőzést okozhat, azaz raktári kártevőként károsíthatják a gyümölcsök és zöldségek lágy szöveteit, így gyakran ehetetlenné téve őket. Különösen ismert a *R. stolonifer* által okozott penészesedés megjelenése az eper felszínén. A *Rhizopus* fajok között több kiemelkedő extracelluláris enzimtermelő törzs is található. Többek között lipáz, proteáz, amiloglükózidáz és aminopeptidáz termelésük jelentős, emellett alkohol és biodízel előállítására is alkalmazzák őket (Papp és mtsai., 2016; Dzurendova és mtsai., 2022). A nemzetség egyes képviselői mucormikózist is okozhatnak immunszupresszált betegekben (Rabie és Althaqafi, 2012).

2.2.4. A *Mucor* nemzetség

A *Mucor* nemzetségen belül számos biotechnológiai jelentőségű faj ismert. Ipari alkalmazásuk köszönhető a gyors növekedésüknek, széles hőmérsékleti tartományon való tenyésztetőségüknek, az élesztőszerű növekedés indukálhatóságának, illetve a nagy extracelluláris enzimtermelő (pl. proteáz, lipáz, celluláz) képességüknek (Lebreton és mtsai., 2020; Dzurendova és mtsai., 2022). Több faj, például a *M. circinelloides* és a *Mucor plumbeus*, megtalálható fermentációval készülő távol-keleti ételekben (pl. ragi, tempeh), és egyes francia sajtok érleléséhez is használják őket (Morin-Sardin és mtsai., 2016). A *Mucor* fajok egy része szintén felelős mucormikózis betegség kialakulásáért (Morin-Sardin és mtsai., 2017).

2.2.5. Az *Umbelopsis* nemzetség

Az *Umbelopsis* nemzetség egy kevésbé jellemzett csoport, tagjai főként talajlakó organizmusok (Spatafora és mtsai., 2016). A csoport fajait általában lassú micélium-növekedés jellemzi, sporangiospóráik változatos alakúak, a kolumella rendszerint kicsi vagy hiányzik (Wang és mtsai., 2013). Egyes fajok γ -linolénsavat tartalmazó lipidek felhalmozására képesek, amelyeket szén- és nitrogénforrásként használnak fel (Bernat és mtsai., 2018).

2.3. A *Mortierellales* rend

A *Mortierellales* rend tagjai kozmopolita szervezetek, melyeket gyakran izolálnak a talajból vagy a gyökerekből. Egyes fajoknál (pl. *Mortierella elongata*) növények növekedését serkentő aktivitás is ismert (Zhang és mtsai., 2020). A nemzetség egyes tagjaira jellemző a szaprotróf életmód. Részt vehetnek bioremediációs folyamatok katalizálásában is (Cui és mtsai., 2017). Egyes *Mortierella* fajok többféle telítetlen zsírsav termelésére képesek, ezáltal nagy biotechnológiai jelentőséggel bírnak (Dyal és Narine, 2005; Wagner és mtsai., 2013). A *Mortierella alpina* különböző izolátumait például arachidonsav telítetlen zsírsav előállítására alkalmazzák a gyakorlatban (Higashiyama és mtsai., 2002). Különböző szerves molekulák biotranszformációját is katalizálhatják *Mortierella* gombák (Holland, 2001).

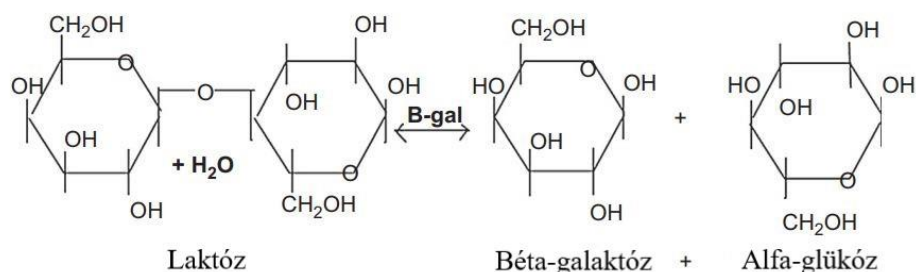
2.4. A galaktozidáz enzimek típusai és jellemzői

α -Galaktozidáz

Az α -galaktozidáz (EC 3.2.1.22) a hidrolázok csoportjába tartozó enzim, amely az oligoszacharidok és poliszacharidok terminális α -galaktozil-részeinek hidrolízisét katalizálja. Ezek a szacharidok bőségesen fordulnak elő a növényekben, különösen a hüvelyesekben és a zöldségekben, amelyek fontos élelmiszer- és takarmányforrások. Az α -galaktozidázt iparilag is előállítják (*Aspergillus niger*) és élelmiszer-/takarmányfeldolgozáshoz és étrend-kiegészítőkből használják (Ju és mtsai., 2019). α -Galaktozidázt írtak már le a *L. ramosa* járomspórás gombában is; az enzimet sikerrel termeltették *Pichia pastoris* élesztővel (Xie és mtsai., 2020).

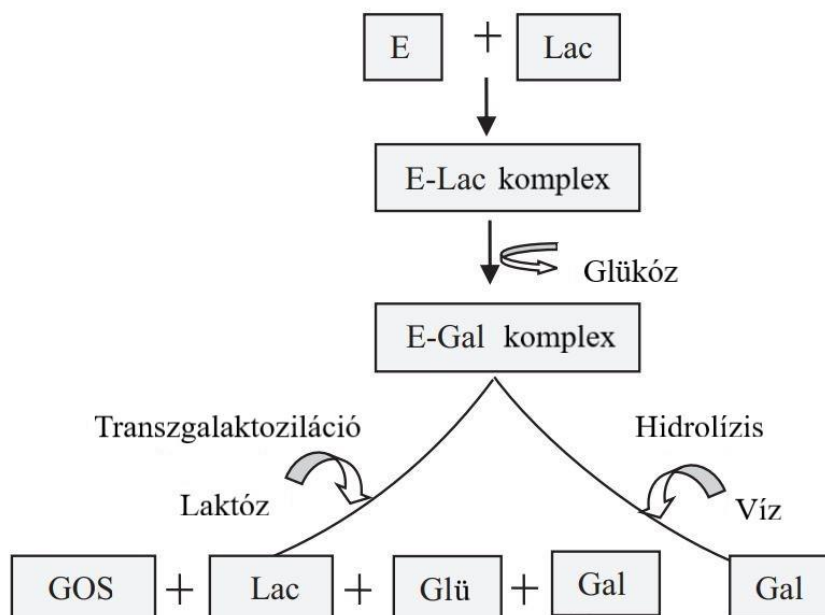
β -Galaktozidáz

A β -galaktozidáz (β -D-galaktozid-galaktohidroláz vagy laktáz, EC 3.2.1.23) a szacharid bontó hidrolázok családjába tartozik (Nath és mtsai., 2014), és fontos biokatalizátor számos élelmiszer- és gyógyszeripari folyamatban. A β -galaktozidáz katalizálja a glikozidos kötések hidrolízisét a β -galaktozidokban, például a laktózban, átalakítva ezzel a diszacharidot glükóz és galaktóz monoszacharidokká (Gomes és mtsai., 2018; De Jesus és Guimarães, 2021) (1. ábra). Az enzimaktivitás pH optimuma alapján beszélhetünk semleges és savas β -galaktozidázzal (Nivetha és Mohanasrinivasan, 2017). Az aminosav szekvenciájuk hasonlósága alapján a β -galaktozidázokat négy glikozid hidroláz (GH) családba sorolták: GH1, GH2, GH35 és GH42. Széles körben elterjedtek, számos biológiai rendszerben megtalálhatók, többek között mikroorganizmusokban, növényekben és állati szövetekben (Nath és mtsai., 2014).



1. ábra. A diszacharid laktóz β -galaktozidáz általi hidrolízise két monoszachariddá, azaz galaktózzá és glükózzá (Anisha, 2017).

A β -galaktozidázok bizonyos körülményeken galaktóz-alapú oligoszacharidok szintézisét is végzik (Li és mtsai., 2020). Ezen belül kiemelt jelentőségű a laktóz és a laktulóz transzgalaktozilációja eredményeként keletkező galaktooligoszacharid (GOS) (2. ábra) és laktulóz-eredetű GOS (OsLu) cukor molekulák előállítására irányuló képességük.



2. ábra. A transzgalaktoziláció és a hidrolízis reakcióútjai (Panesar és mtsai., 2018). E=Enzim, Lac=Laktóz, Gal=Galaktóz, Glü=Glükóz, GOS=Galaktooligoszacharid.

2.5. A β -galaktozidázok gyakorlati alkalmazása

A laktóz intoleranciában szenvedő, β -galaktozidáz hiányos egyének számára is fogyasztható élelmiszerek előállítására a tejiparban gyakran alkalmazzák a β -galaktozidáz enzimeket, amelyek képesek a laktóz hidrolízisére (Szilágyi és Ishayek, 2018). A β -galaktozidáz hidrolitikus aktivitása különféle más alkalmazásokban is használható, például a laktózzal kapcsolatos kristályosodás megelőzésére fagyasztott élelmiszerekben és sűrített tejben, vagy etanol és édes szirup tejsavóból történő előállítására (Saqib és mtsai., 2017).

A GOS és OsLu molekulák β -galaktozidázok általi bioszintézise mind egészségügyi, mind biotechnológiai szempontból kiemelt jelentőségű (Lu és mtsai., 2020). A GOS és az OsLu prebiotikus szénhidrátok, és fermentálható szubsztrátként szolgálnak az egészséges bélflóra mikroorganizmusai számára. A prebiotikumok olyan nem emészthető élelmiszer összetevők, melyek szelektíven stimulálják a normál mikroflóra növekedését és/vagy aktivitását, ezáltal kedvező hatást gyakorolnak a fogyasztó egészségére (Vera és mtsai.,

2016; Chanalía és mtsai., 2018). A GOS és OsLu molekulák serkenthetik probiotikumok, azaz bizonyos, táplálékkiegészítőkben is alkalmazott *Lactobacillus* és *Bifidobacterium* törzsek növekedését/aktivitását is (Cardelle-Cobas és mtsai., 2011; Davani-Davari és mtsai., 2019). A GOS molekulák felhasználhatók prebiotikus és bifidogén ételek és italok összetevőinek élelmiszeripari fejlesztésére, valamint egyes gyomor-bélrendszeri betegségek kezelésére (Vera és mtsai., 2016; Panesar és mtsai., 2018), amit alacsony kalóriaértékük és pH- és hőmérséklet stabilitásuk is támogat (Torres és mtsai., 2010). A β -galaktozidáz kisebb hatékonysággal fukozid és arabinozid molekulák hidrolízisére is képes (De Jesus és Guimarães, 2021). Ezen felül az enzim egyéb laktóz-alapú prebiotikumok szintézisét is katalizálhatja, úgymint a laktulóz és a laktoszkuróz, melyek szintén gyógyszer- és élelmiszeripari potenciállal rendelkeznek (Nath és mtsai., 2014; Cardoso és mtsai., 2017). Mindezek okán a természetes forrásokból és/vagy metagenomikai megközelítésekkel felfedezett új, hidrolitikus és szintetikus aktivitásukban jellemzett β -galaktozidázok értékes alapok lehetnek jövőbeli glikobiológiai kutatásokban alkalmazható katalizátorok fejlesztéséhez (Lu és mtsai., 2020).

2.6. A β -galaktozidázok mikrobiális előállítása

A mikrobiális eredetű β -galaktozidázok nagy ipari jelentőséggel bírnak könnyű kezelhetőségüknek és nagy katalitikus aktivitásuknak köszönhetően, továbbá a mikrobiális úton szintetizált enzimek nagyobb hozamot biztosítanak szemben az állati és növényi forrásokkal, így csökkenhetnek az ipari előállítási költségek (Nath és mtsai., 2014; Cardoso és mtsai., 2017). A legtöbb kereskedelemben kapható β -galaktozidáz baktériumokból, élesztőgombákból és fonalas gombákból származik (Anisha, 2017). Az enzim termelődhet extracelluláris vagy intracelluláris úton is (Gomes és mtsai., 2018); míg élesztők és baktériumok esetében főként intracelluláris, addig a fonalas gombák által termelt enzim általában extracelluláris (Shaikh és mtsai., 1999). A nagy-léptékű tenyésztetőség, és a jól optimalizálható fermentációs körülmények miatt az enzimfehérje termelése egyszerűen és gazdaságosan végrehajtható baktériumok és gombák által. Ezen kívül számos mikroorganizmus – különösen a fonalas gombák – jól tenyésztető alacsony költségű táptalajokon. Mezőgazdasági melléktermékeken történő fermentáció például jól alkalmazható β -galaktozidázok termeltetésére is. A termelést és a szekretált β -galaktozidázok tulajdonságait egyes gombákban már alaposan tanulmányozták (Anisha, 2017; Saqib és mtsai., 2017), és még a GOS szintézist is elemezték néhány gomba enzim

esetében (Tokošová és mtsai., 2015; Vera és mtsai., 2016; Bassetto és mtsai., 2017; Silvério és mtsai., 2018).

A β -galaktozidáz gombákkal történő termeltetéséhez gyakran használnak süllyesztett, folyadék fázisú fermentációs (SmF) körülményeket. Folyadék tenyészetben történő nagy enzimhozam eléréséhez kiváló szubsztrátok a laktóz, a sovány tej és minden olyan alapanyag, melynek egyes molekulái β -galaktozil kötést tartalmaznak. A szilárd fázisú fermentáció (SSF) is jól alkalmazható megközelítés β -galaktozidázok gombák általi termeltetéséhez. SSF rendszerben történő hatékony enzimtermelést írtak le olyan mezőgazdasági melléktermékeken, mint a búzaborja és szár, rizskorpa és szár, cukornádbagasz és gránátalma héj (Raol és mtsai., 2015; Kazemi és mtsai., 2016; Panesar és mtsai., 2016; Kaur és mtsai., 2018). Napjainkban főleg *Kluyveromyces lactis*, *Aspergillus oryzae* és *A. niger* gombákkal termeltetnek β -galaktozidáz enzimet (Kazemi és mtsai., 2016; Xavier és mtsai., 2018; de Albuquerque és mtsai., 2021).

2.7. Tisztított mikrobiális β -galaktozidázok

A mikroorganizmusok a gyakorlati felhasználású β -galaktozidázok kiváló forrásai. Az alkalmazás körülményei ugyanakkor nagyban különbözhetnek, különösen a működéshez optimális hőmérséklet és pH tartomány tekintetében. Az enzim előállításának költsége függ a termelési hozamtól és az elvárt tisztaság eléréséhez szükséges metodikától. Napjainkban ezért egyre inkább előtérbe kerül a megfelelő tulajdonságokkal rendelkező mikroorganizmusok felkutatása, melyek nagyobb termelési kapacitással és olcsóbb tisztítási eljárással alkalmazhatók (Panesar és mtsai., 2010).

A mikrobiális β -galaktozidázokat számos hagyományos technológia kombinációjával tisztították már, mint például kisózással történő frakcionálás, ioncserélő kromatográfia, gélszűrés, hidroxipatit alkalmazása és hidrofób kölcsönhatáson alapuló kromatográfiás eljárások. Az enzim affinitáskromatográfiával történő tisztításához *p*-aminofenil (vagy *p*-aminobenzil)- β -D-tiogalaktopiranozid agarózt használnak, mely kereskedelmi forgalomban kapható (Nakayama és Amachi, 2002). Az enzimek kinyerését követően rendszerint meghatározzák azok alapvető biokémiai jellemzőit, mely információ a különböző potenciális alkalmazások kialakításához is fontos. Néhány tisztított mikrobiális β -galaktozidáz molekulatömegét, működésének pH és hőmérséklet optimumát az 1. táblázat tartalmazza.

1. táblázat. Néhány tisztított és jellemzett mikrobiális β -galaktozidáz.

Mikroorganizmus	Molekulatömeg (kDa)	pH optimum	Hőmérséklet optimum (°C)	Referencia
<i>Aspergillus aculeatus</i>	120	5,4	55-60	Nath és mtsai., 2014
<i>Aspergillus awamori</i>	118-125	5,0	60	Vidya és mtsai., 2020b
<i>Aspergillus niger</i>	124	2,5-4,0	55-60	Mahoney, 2002
<i>Aspergillus oryzae</i>	96	4,5-6,0	50	Mahoney, 2002
<i>Aspergillus uvarum</i>	-	3,0-4,5	45-60	Silvério és mtsai., 2018
<i>Bifidobacterium infantis</i> HL96	470	5-8	50	Hung és Lee, 2002
<i>Kluyveromyces lactis</i>	118	6,6-7,0	40	Zhou és Chen, 2001
<i>Kluyveromyces lactis</i>	-	7	37	Silva és Franco, 1999
<i>Mucor pusillus</i>	129	4,0	65	Ismail és mtsai., 1997
<i>Pediococcus pentosaceus</i> ID-7	72,2	7-7,5	50	Lee és mtsai., 2017
<i>Penicillium chrysogenum</i>	66	4,0	30	Nagy és mtsai., 2001
<i>Penicillium simplicissimum</i>	-	4,0-4,6	55-60	Cruz és mtsai., 1999
<i>Rhizomucor pusillus</i>	-	5,5	50	Kaur és mtsai., 2018
<i>Rhizomucor</i> sp.	120	4,5	60	Shaikh és mtsai., 1999
<i>Teratosphaeria acidotherma</i>	120	8,0	60	Yamada és mtsai., 2017

Egy *A. oryzae* izolátumból DEAE-Sephadex A-50 és Sephadex G-200 oszlopokon tisztítottak β -galaktozidázt, mely működésének pH optimuma pH 4,5 volt a szintetikus *o*-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid (*o*NPG) kromogén szubsztráttal mérve, míg laktóz diszacharid szubsztráton pH optimuma 4,8-nak bizonyult (Tanaka és mtsai., 1975). Az enzim pH 4,0 és 9,0 között bizonyult stabilnak, az aktivitáshoz optimális hőmérséklet 46 °C volt. Sephadex gélszűrőssel és szacharóz-sűrűség-gradiens centrifugálással körülbelül 105 kDa látszólagos molekulatömeget mértek (Tanaka és mtsai., 1975). Egy *A. niger* izolátumból származó β -galaktozidázt szűrést, ioncserét és oszlopkromatográfiát alkalmazva tisztítottak (Widmer és Leuba, 1979). Egy *Fusarium oxysporum* var. *lini* izolátum sejt kivonatából hősokk, majd egymást követő kromatográfiás eljárással, DEAE-cellulóz DE-52 és Sephadex G-100 oszlopok használatával tisztítottak β -galaktozidázt (Brandão és mtsai., 1987). β -Galaktozidázt ammónium-szulfátos kicsapással és CM-Sephadex kromatográfiával *Beauveria bassiana* sejtmentes kivonatából is nyertek ki (Panesar és mtsai., 2010). A termofil *Rhizomucor* sp. extracelluláris β -galaktozidázát egymást követő DEAE-cellulóz

kromatográfiát, majd Sephacryl S-300 gélszűrést alkalmazva tisztították (Shaikh és mtsai., 1999). A *Penicillium chrysogenum* NCAIM 00237 törzsből történő β -galaktozidáz tisztításhoz ammónium-szulfáttal történő kicsapást, ioncserélő kromatográfiát (DEAE-Sephadex), affinitáskromatográfiát és kromatofókuszálást is végeztek (Nagy és mtsai., 2001). *Mucor pusillus*-ból származó β -galaktozidázt etanolos, acetonos és ammónium-szulfátos kicsapással, gélszűréssel, majd ioncserélő kromatográfiával DEAE-Sepharose CL-6B és CM-Sepharose CL-6B oszlop használatával tisztították (Ismail és mtsai., 1997). A β -galaktozidázok tejsavbaktériumokból történő kinyerése szintén kiemelt gyakorlati jelentőséggel bír. Hung és Lee (2002) munkájában *Bifidobacterium infantis* HL96 baktériumból származó β -galaktozidázt izolált, mely 470 kDa molekulatömegűnek bizonyult, aktivitásának optimumát pedig pH 5,0 és 8,0 között és 50 °C hőmérsékleten határozták meg (1. táblázat).

2.8. Azonosított és termeltetett mikrobiális β -galaktozidáz gének

Néhány mikroorganizmusnál β -galaktozidázt kódoló géneket is jellemeztek és fejztettek ki homológ és heterológ rendszerekben. Ezzel együtt az elmúlt évtizedekben jelentős erőfeszítések történtek a heterológ expressziós rendszerek hatékonyságának növelése érdekében. Eddigi kutatásokban főként *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* és *Lactococcus lactis* baktériumokra, valamint élesztőkre fejlesztettek ki rendszereket (Movahedpour és mtsai., 2022). A *Pediococcus* tejsavbaktériumból származó heterodimer LacLM-típusú β -galaktozidáz esetén például kettő részlegesen átfedő kódoló gént (*lacL* és *lacM*) írtak le, melyek sorrendben 72,2 kDa és 35,4 kDa méretű fehérjéket kódolnak (Lee és mtsai., 2017). Az enzimfehérjék termeltetésére *E. coli* MM294-alapú heterológ rendszert alkalmaztak (Lee és mtsai., 2017). Halbmayr és mtsai. (2008) *Lactobacillus reuteri* LacLM-típusú β -galaktozidázt kódoló géneket (*lacL* és *lacM*) expresszáltattak az élelmiszeriparban általánosan elfogadott *L. plantarum* WCFS1 izolátumban. Későbbi kutatások a fermentációs pH és szubsztrát glükóz koncentráció meghatározó jelentőségét írták le a rekombináns *L. reuteri* β -galaktozidáz nagy-hozamú termeltetéséhez (Nguyen és mtsai., 2015). Bifidobaktérium tejsavbaktériumoknál a *Bifidobacterium longum* RD47 β -galaktozidázt kódoló gént írták le újabban, melyet különféle szabályozó szakaszokkal való kombinációt követően *Bifidobacterium bifidum* rendszerben fejztettek ki (Park és mtsai., 2019). A termeltetett rekombináns enzimmel kétórás reakcióidő alatt távolították el tejmintáktól a laktóztartalmának 51%-át. Yuan és mtsai. (2008) genom DNS szűrés útján egy termofil β -

galaktozidázt kódoló génszakaszt (2097 bp) azonosítottak az acidofil és termofil *Alicyclobacillus acidocaldarius* baktériumban. A kódoló gént *Pichia pastoris*-alapú heterológ rendszerben termeltették, és 90 mg/l rekombináns β -galaktozidáz hozamot értek el a rázatott tenyésztésben. A tisztított rekombináns enzimre pH 5,8-6,0 és 70 °C hőmérséklet optimumokat írtak le, aktivitásának 90%-át megőrizte 70 °C hőmérsékleten történő 30 perces inkubációt követően (Yuan és mtsai., 2008). Az *E. coli* β -galaktozidáz enzimet kódoló gén (*lacZ*) stabilitását és kifejeződését *Streptococcus lactis* baktériumban is vizsgálták (Kim és Batt, 1988).

Gomba β -galaktozidázt kódoló géneket leginkább élesztőben fejztettek ki sikerrel. Az alacsony expressziós hatékonyság, plazmid instabilitás, a toxikus hatású metanol alkalmazása a termeltetéshez, valamint a gazda genomban jelen levő antibiotikum rezisztencia markerek azonban problémákat okozhatnak az élesztőkben való termeltetési rendszerek kidolgozásában (Ren és mtsai., 2016). Eddig többek között *A. niger*, *Penicillium expansum*, *P. pastoris* és *K. lactis* gombákból származó β -galaktozidázokat termeltettek nagy hatékonysággal élesztő rendszerekben (Movahedpour és mtsai., 2022). Néhány gombákból származó rekombináns β -galaktozidáz szintézisére vonatkozó adatot a 2. táblázat foglalja össze.

2. táblázat. Termeltetett gomba rekombináns β -galaktozidázok (Saqib és mtsai., 2017; Movahedpour és mtsai., 2022).

β-Galaktozidáz forrása	Expressziós gazda	β-Galaktozidáz hozam
<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>	25000 U/ml (kád fermentáció), 150000 U/ml (folyamatos fermentáció)
<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20440 U/ml (rázatott tenyészet)
<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17000 U/ml (rázatott tenyészet)
<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40000 U/ml
<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	500 U/ml (rázatott tenyészet)
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5096 U/ml
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7350 U/ml (10 l-s bioreaktor)
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2754 U/ml (6 l-es bioreaktor)
<i>Paecilomyces aeruginus</i>	<i>Pichia pastoris</i>	9500 U/ml

Rekombináns *Aspergillus* β -galaktozidázokat *P. pastoris* rendszerben is állítottak elő. Dragosits és mtsai. (2014) kettő *Aspergillus nidulans* és egy *A. niger* β -galaktozidázt termeltettek sikerrel *Pichia*-alapú heterológ rendszerben. A rekombináns enzimek többféle szerves oldószerben és széles hőmérsékleti tartományokon stabilnak bizonyultak, valamint tri- és tetragalaktoooligoszacharid molekulák szintézisét is katalizálták. β -Galaktozidázokat kódoló géneket édesvízi *A. niger* és *A. oryzae* izolátumokból is írtak le újabb kutatásokban,

ahol a négy izolált génszakasz 2900-3000 bázispár méretűnek bizonyult (Bankefa és mtsai., 2022).

2.9. Járomspórás gombák β -galaktozidáz termelése

A járomspórás gombák β -galaktozidáz aktivitása kevésbé kutatott terület, noha számos törzs jó forrása ipari enzimeknek, például lipázoknak, hidroxilázoknak, fitázoknak és különféle szénhidrát-bontó biokatalizátoroknak (Papp és mtsai., 2016). Tudomásunk szerint csak néhány tanulmány foglalkozik e gombacsoport extracelluláris β -galaktozidáz termelésével, valamint az enzim vizsgálatával. Főként termofil *Rhizomucor* izolátumokból származó enzimaktivitásokat kutattak (Shaikh és mtsai., 1997, 1999; Panesar és mtsai., 2016; Kaur és mtsai., 2018), de jó termelőnek írtak már le *Mucor* sp. izolátumot is (Silvério és mtsai., 2018). A termofil mikroorganizmusokból származó enzimek nagyobb hőstabilitással rendelkeznek, ezáltal ipari alkalmazásuk előtérbe került kedvező tulajdonságaiknak köszönhetően (Shaikh és mtsai., 1997). A β -galaktozidáz termelés tekintetében eddig vizsgált járomspórás gombákat a 3. táblázat foglalja össze.

3. táblázat. Járomspórás gombák β -galaktozidáz termelése, a termeléshez alkalmazott fermentációs körülmények és szubsztrátok, a fermentációkban elért enzimaktivitások.

Járomspórás gomba	Fermentációs körülmény	Szubsztrát	Enzimaktivitás	Irodalom
<i>Mucor</i> sp.	SmF ¹	laktóz	228 U/l	Silvério és mtsai., 2018
<i>Rhizomucor</i> sp.	SmF	laktóz	0,55 U/ml (0,21 U/mg)	Shaikh és mtsai., 1997
	SSF	búzakorpa	5,5 U/ml (2,04 U/mg)	
<i>Rhizomucor pusillus</i>	SmF	laktóz	2,14 IU/ml	Panesar és mtsai., 2016
<i>Rhizomucor pusillus</i>	SSF	búzakorpa	101,89 U/g szubsztrát	Kaur és mtsai., 2018
<i>Rhizopus</i> sp.	SmF	laktóz	<10 U/ml	Seyis és Aksoz, 2004
<i>Rhizopus stolonifer</i>	SmF	laktóz	2250 IU	Vishwanataha és mtsai., 2012

¹ SmF: süllyesztett fermentáció, SSF: szilárd fázisú fermentáció

Shaikh és mtsai. (1997) *Rhizomucor* sp. extracelluláris β -galaktozidáz termeléséről számoltak be SSF tenyésztést alkalmazva (3. táblázat), majd egy későbbi munkájuk során az enzim tisztítását és jellemzését is elvégezték (Shaikh és mtsai., 1999). Egy *Mucor pusillus* törzs által termelt β -galaktozidáz vizsgálatakor Ismail és mtsai. (1997) az *A. niger* β -galaktozidázához hasonló szerkezeti és kinetikai tulajdonságról számoltak be, emellett megállapították, hogy az enzim potenciálisan alkalmazható a tejsavóban lévő laktóz hidrolízisére. Vishwanataha és mtsai. (2012) talajmintákból izolált törzsek β -galaktozidáz

aktivitását tanulmányozták; vizsgálataikban a *R. stolonifer* mutatta a legjelentősebb enzimaktivitást (3. táblázat). Panesar és mtsai. (2016) rothadó banánhéjból izoláltak nagy β -galaktozidáz aktivitást mutató gombatörzset, melyet fenotípusos és genotípusos jellemzés után *R. pusillus*-ként azonosítottak. Megállapították, hogy az azonosított törzs alkalmazható lehet különféle ipari folyamatok során prebiotikumok előállításához. Silvério és mtsai. (2018) egy *Mucor* sp. törzset írtak le hatékony β -galaktozidáz termelőként, mely potenciálisan felhasználható GOS és laktulóz szintéziséhez (3. táblázat). *Lichtheimia*, *Mortierella* és *Umbelopsis* nemzetségek gombatörzseinek β -galaktozidáz aktivitásáról még nem állnak rendelkezésre irodalmi adatok.

3. CÉLKITŰZÉSEK

Számos mikroorganizmusban azonosítottak és jellemeztek már β -galaktozidáz enzimeket és kódoló géneket. Néhány járomspórás gombát szintén jó β -galaktozidáz termelőként írtak le eddigi kutatásokban, ugyanakkor szélesebb körű, több izolátum bevonásával készült enzimtermelés vizsgálatokat eddig nem végeztek. A termelés körülményeiről, tisztított enzimek biokémiai jellemzőiről, az enzimek gyakorlati alkalmazás szempontjából lényeges tulajdonságairól ugyancsak kevés információval rendelkezünk.

A kutatási programunk célja az alapkutatásokban és egyes biotechnológiai folyamatokban felhasználható, jó extracelluláris β -galaktozidáz termelő járomspórás gombák azonosítása, az enzimaktivitás vizsgálata, valamint a nagy β -galaktozidáz aktivitással rendelkező törzsek által termelt enzimek izolálása és biokémiai jellemzése volt. Céljaink közé tartozott továbbá az enzimeket kódoló gének azonosítása, izolálása, valamint részletes molekuláris és funkcionális elemzése is.

Ennek érdekében az alábbi feladatok elvégzését fogalmazzuk meg:

- 1) A Szeged Mikrobiológiai Gyűjteményből kiválasztott járomspórás gombák β -galaktozidáz termelésének szűrése, összehasonlítása.
- 2) A legjobb aktivitású törzsek enzimtermelésének vizsgálata különféle induktív szubsztrátokat (pl. laktóz, búzakorpa) tartalmazó fermentációs feltételeken.
- 3) Jó enzimtermelő izolátumokból származó nyers β -galaktozidázok szintetikus aktivitásának jellemzése különböző reakciókörülményeken és galaktóz donor szubsztrátokon. A reakciókban nyerhető szintetizált oligoszacharidok hatásának vizsgálata probiotikus mikroorganizmusok növekedésére.
- 4) β -Galaktozidáz enzimek izolálása, homogenitásig történő tisztítása a kiválasztott jó termelő törzsekből. Az enzimek gyakorlati szempontból jelentős biokémiai tulajdonságainak feltárása.
- 5) Kódoló gének azonosítása, molekuláris és funkcionális jellemzése jó laktóz hidrolízist és oligoszacharid szintézist mutató törzsek β -galaktozidázaira vonatkozóan. Az azonosított gének kifejeződésének vizsgálata különböző fermentációs körülményeken.
- 6) Homológ és heterológ (pl. *Pichia*) rendszerekben történő termeltetés lehetőségének vizsgálata.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Alkalmazott törzsek

A munkánk során alkalmazott gombák és baktériumok a Szeged Mikrobiológiai Gyűjtemény (SZMC, Szeged, Magyarország, <http://szmc.hu/>) elhelyezett törzsei között megtalálhatók. A β -galaktozidáz enzim termelő törzsek kimutatási vizsgálatába összesen 99 gomba izolátumot vontunk be, melyek közül 18 a *Lichtheimia*, 16 a *Mortierella*, 17 a *Mucor*, 11 a *Rhizomucor*, 20 a *Rhizopus* és 17 az *Umbelopsis* nemzetség tagja (Függelék, F1. táblázat).

A szintetizált oligoszacharidok növekedést elősegítő hatásának vizsgálatához a *Lactobacillus casei* (SZMC 23430), a *Lactobacillus acidophilus* LA-5 (SZMC 23432), a *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 (SZMC 26956) valamint a *Saccharomyces boulardii* CNCM I745 (SZMC 26957) törzseket alkalmaztuk. A törzseket probiotikus mikroorganizmusok fenntartására alkalmas tápközegen tartottuk fenn 37 °C hőmérsékleten. A megfelelő kísérlet előtt minden esetben friss leoltást készítettünk az adott törzsből 30 ml probiotikus mikroorganizmusok fenntartására alkalmas táplevesben, majd a tenyészeteket 37 °C hőmérsékleten 24 órán át inkubáltuk tenyésztőedényben, ahol az oxigénhiányos környezetet Anaerocult C (Merck) rendszerrel biztosítottuk.

A β -galaktozidáz kódoló gének vizsgálatához és a kifejeződésük jellemzéséhez a *Lichtheimia ramosa* SZMC 11360 törzset használtuk. A génklónozási munkákhoz az *Escherichia coli* DH5 α törzset alkalmaztuk.

4.2. Alkalmazott táptalajok és tápoldatok

A felhasznált anyagok a VWR International Kft.-től származtak, ettől eltérő esetben a gyártó/forgalmazó külön feltüntetésre került.

Malátás táptalaj: 5% (v/v) 20%-os (v/v) maláta kivonat; 0,5% (m/v) élesztő kivonat; 0,5% (m/v) glükóz; 2% (m/v) agar

Kromogén teszt táptalaj: 2% (v/v) 20%-os (v/v) maláta kivonat; 2% (m/v) laktóz; 0,1% (m/v) pepton; 2% (m/v) agar. Hővel történő sterilizálást (121 °C, 25 perc) és hűtést követően a tápközeget 0,5% (v/v) 5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktopiranozid (X-gal, Thermo

Fisher Scientific) oldattal egészítettük ki. Az X-gal oldatot előzőleg 20 mg/ml koncentrációban készítettük el dimetil-szulfoxidban (DMSO).

SmF tápközeg: 0,4% (m/v) pepton; 0,4% (m/v) élesztő kivonat; 0,2% (m/v) KH_2PO_4 ; 0,8% (m/v) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; 0,025% (m/v) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 2% (m/v) laktóz vagy 2% (m/v) laktóz és 2% (m/v) búzakorpa

SSF tápközeg: 5 g búzakorpa (kereskedelmi forgalomban kapható) és 1 g szójaliszt 5 ml desztillált vízzel nedvesítve

SSF tápközeg β -galaktozidáz tisztításhoz: 25 g búzakorpa (kereskedelmi forgalomban kapható) és 5 g szójaliszt 25 ml ásványisó oldattal nedvesítve

Ásványisó oldat: 0,2% (m/v) KH_2PO_4 , 0,8% (m/v) Na_2HPO_4 , 0,025% (m/v) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Tápközeg probiotikus mikroorganizmusok fenntartásához: de Man, Rogosa és Sharpe (MRS) agar és tápleves

Élesztőkivonat-glükóz (YEG) táptalaj: 1% (m/v) glükóz; 0,5% (m/v) élesztőkivonat; 2% (m/v) agar

Élesztő nitrogénforrás (YNB) minimál táptalaj: 1% (m/v) glükóz; 0,15% (m/v) ammónium-szulfát; 0,15% (m/v) nátrium-L-glutamát; 0,05% (m/v) YNB (Sigma-Aldrich); 2% (m/v) agar; a tápközegét kísérlettől függően 0,05% (m/v) uracil, 0,8 M szorbitol vagy 1,5 mg/ml 5-fluoroorotsav (5-FOA) komponensekkel egészítettük ki.

Lizogén tápleves (LB): 1% (m/v) NaCl; 1% (m/v) tripton; 0,5% (m/v) élesztőkivonat; táptalaj esetén 2% (m/v) agar

4.3. Felhasznált pufferek, oldatok és reagensek

A felhasznált vegyületek a VWR International Kft.-től származtak, ettől eltérő esetben a gyártó/forgalmazó külön feltüntetésre került.

Enzimaktivitás mérésekhez, fehérje tisztításához használt oldatok

Nátrium-acetát puffer (50 mM, pH 6,0). A pH beállításához 96%-os ecetsavat alkalmaztunk.

Nátrium-karbonát puffer (100 mM).

1 M koncentrációjú NaCl oldat.

7 mM koncentrációjú *o*NPG (Sigma-Aldrich) szubsztrát oldat.

Poliakrilamid gél festéséhez használt oldatok

Coomassie-kék festés:

Festőoldat: 0,0025% (m/v) *Coomassie Brilliant Blue R-250*; 45% (v/v) metanol; 10% (v/v) ecetsav (96 %-os töménységű)

1. festékmentesítő oldat: 40% (v/v) metanol, 7% (v/v) ecetsav (96%-os töménységű)

2. festékmentesítő oldat: 5% (v/v) metanol, 3% (v/v) ecetsav (96%-os töménységű)

Ezüstfestés:

Fixáló oldat: 50% (v/v) metanol, 12% (v/v) ecetsav, 0,05% (v/v) formaldehid

Mosó oldat: 20% (v/v) etanol

Érzékenyítő oldat: 0,02% (m/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

Festő oldat: 0,2% (v/v) AgNO_3

Előhívó oldat: 0,0004% (m/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 6% (m/v) NaCO_3 , 0,05% (v/v) formaldehid

Enzimaktivitás natív gélen történő kimutatására használt oldatok

1. oldat (50 ml végtérfogatra):

1 ml 10 mg/ml X-gal DMSO-ban oldva

49 ml nátrium-acetát puffer (50 mM, pH 6,0).

2. oldat (50 ml végtérfogatra):

1 ml 12,5 mg/ml 6-bromo-2-naftil- β -D-galaktopiranozid (Sigma-Aldrich) DMSO-ban oldva

1 ml 12,5 mg/ml *Fast Red* DMSO-ban oldva

48 ml nátrium-acetát puffer (50 mM, pH 6,0)

Tömegspektrometria vizsgálatához felhasznált oldatok

„A” mozgófázis: 5 mM ammónium-acetát 0,1% hangyasavval kiegészítve

„B” mozgófázis: acetonitril és 0,1% hangyasav

Agaróz gélelektroforézishez felhasznált oldatok

Tris-ecetsav-dinátrium EDTA (TAE): 40 mM Tris-ecetsav (pH 7,6) 1 mM Na₂EDTA oldatban

Etídium-bromid (Sigma-Aldrich) törzsoldat: 10 mg/ml desztillált vízben oldva

Polietilén-glikol (PEG)-közvetített transzformáláshoz felhasznált oldatok

Protoplasztáló oldat: 10 mM nátrium-foszfát puffer, 0,8 M szorbitol, 1,5% (m/v) csigaenzim

Nátrium-foszfát-puffer (0,1 M): 25 mM Na₂HPO₄, 75 mM NaH₂PO₄

Szorbitol – MOPS – kalciumklorid (SMC) puffer: 50 mM CaCl₂, 10 mM 3-N-morfolin-propánszulfonsav (MOPS), 0,8 M szorbitol

PEG – szorbitol – MOPS – kalciumklorid (PMC) puffer: 60% PEG 4000, 10 mM MOPS, 0,6 M szorbitol, 50 mM CaCl₂

4.4. A β -galaktozidáz termelés vizsgálata szilárd táptalajon

Az egyes törzsek β -galaktozidáz aktivitását szilárd táptalaj környezetben kivitelezett kvalitatív kromogén tesztben vizsgáltuk. A tesztekhez kiválasztott izolátumokat előzetesen malátás táptalajon növesztettük fel, majd sporangiospóra szuszpenziót (10^6 db spóra/ml) készítettünk steril desztillált víz felhasználásával. Az elkészített spóraszuszpenzióból 20 μ l térfogatot vittünk fel egy pontban a kromogén teszt táptalaj közepére. A leoltást követően a tenyészeteket a tesztelt gomba optimális növekedési hőmérsékletén (20, 25 vagy 37 °C-on) 10 napig inkubáltuk. Az inkubációs idő alatt a csészéket naponta vizuálisan vizsgáltuk és a β -galaktozidáz enzimtermelés mértékét az X-gal bontás eredményeként megjelenő kék szín intenzitása alapján becsültük. Az értékeléshez a következő kategóriákat alkalmaztuk: halványkék (+), világoskék (++) , kék (+++), sötétkék (++++), mélysötétkék (+++++), NKS: nincs kék elszíneződés. A tesztek három biológiai párhuzamossal végeztük el.

4.5. Tenyésztési körülmények az enzimtermelés vizsgálatához

4.5.1. Süllyesztett fermentáció (SmF)

SmF alkalmazásával laktóz és búzakorpa enzimtermelésre gyakorolt hatását elemeztük. A vizsgálathoz 30 ml térfogatú laktózt vagy laktózt és búzakorpát tartalmazó tápoldatot állítottunk össze 100 ml-es Erlenmeyer-lombikokban. A sterilizálást követően a

lombikokat 20 μ l 10^6 spórárt tartalmazó spóraszuszpenzióval oltottunk be, majd a tenyésztést a tesztelt gomba optimális növekedési hőmérsékletén (20, 25 vagy 37 °C), a lombikokat 7 napig rázatva (200 rpm) végeztük. A tenyészetekből közvetlenül a leoltást követően, majd a tenyésztés 2., 4. és 7. inkubációs napjain 1 ml térfogatú mintát vettünk. A mintákat ezt követően centrifugáltuk (16200 \times g, 20 perc), majd a felülúszót a β -galaktozidáz aktivitás és fehérjekoncentráció mérésekig -20 °C hőmérsékleten tároltuk.

4.5.2. Szilárd fázisú fermentáció (SSF)

Az enzimtermelést búzakorpa-alapú SSF rendszerben is megvizsgáltuk. A 250 ml térfogatú Erlenmeyer-lombikokban összeállított tápközeget a sterilizálást követően 20 μ l térfogatú 10^6 spórárt tartalmazó spóraszuszpenzióval oltottuk be, majd 7 napig 20, 25 vagy 37 °C hőmérsékleten történő tenyésztést végeztünk. A tenyészetekből a folyadék fermentációknál tervezett napokon vettünk mintát. A mintavétel során a megfelelő napokon kivett tenyészetekre 30 ml nátrium-acetát puffert (50 mM, pH 6,0) mértünk, majd 4 órán át 4 °C-on tartottuk a lombikokat. A kivonáshoz gézlapon át történő durvaszűrést végeztünk, majd a kapott szűrletből 1 ml térfogatot 20 percig centrifugáltunk (16200 \times g). A felülúszót ezt követően enzimaktivitás és fehérje mennyiség mérésekig -20 °C hőmérsékleten tároltuk.

4.6. A β -galaktozidáz hidrolitikus aktivitásának meghatározása

Az enzimaktivitás méréséhez 180 μ l nátrium-acetát pufferben (50 mM, pH 6,0) hígított mintát vittünk fel mikrotiter lemez egyes mintahelyeire. A mintákhoz ezután 20 μ l nátrium-acetát pufferben (50 mM, pH 6,0) előkészített, 7 mM koncentrációjú *o*NPG kromogén szubsztrátot adtunk. A reakcióelegyeket 30 percen át 50 °C hőmérsékleten inkubáltuk, majd a reakciót 50 μ l 100 mM töménységű nátrium-karbonát oldattal állítottuk le. A felszabaduló *o*-nitrofenol vegyület abszorbanciáját 420 nm hullámhosszon, SPECTROstar Nano (BMG Labtech) mikrotiterlemez olvasóval mértük. Az inkubáció előtt minden esetben háttér mérést végeztünk. Az enzimaktivitás mértékének kiszámításához *o*-nitrofenol vegyületre előzetesen felvett kalibrációs egyenest alkalmaztunk, melyhez az *o*-nitrofenol oldatokat nátrium-acetát pufferben (50 mM, pH 6,0) 20-200 μ M koncentrációban készítettük elő, majd mértük azok abszorbanciáját. Egy unit (U) az az enzimmennyiség, amely percenként 1 μ mol *o*-nitrofenolt szabadít fel adott reakciókörülmények között.

4.7. β -Galaktozidázok részleges tisztítása enzimatiszintézis vizsgálatokhoz

Búzakorpa-alapú SSF 7 napos tenyészetére 30 ml nátrium-acetát puffert (50 mM, pH 6,0) mértünk, majd 4 °C hőmérsékleten 4 órán át történő inkubációt követően a kivonatot gézlapon szűrtük. A kivonatokból ezután 10 ml mennyiséget Bio-Gel P6 oszlopon (1-6 kDa; 50 mL; Bio-Rad) sómentesítettünk, mely során az alacsony molekulatömegű cukor és más kisebb molekulákat is eltávolítottuk a kivonatból. Az oszlopot előzetesen nátrium-acetát pufferrel (50 mM, pH 6,0) ekvilibráltuk, majd a mintát ugyancsak nátrium-acetát pufferrel (50 mM, pH 6,0) 9 ml/perc átfolyási sebesség mellett eluáltuk. Ezután β -galaktozidáz aktivitást mérést végeztünk a gyűjtött frakciókban, melyek közül az aktív mintákat felhasználásig -20 °C hőmérsékleten tároltuk.

4.8. Enzimatiszintézis vizsgálatok

Az egyes enzimek által katalizált oligoszacharid szintézist nátrium-acetát pufferben (50 mM, pH 6,0), 2 ml végtérfogatban összeállított reakcióelegyekkel vizsgáltuk. A reakcióelegyek i) 15% (m/v) laktóz, ii) 10% (m/v) sovány tejpor (48% m/m laktóz tartalom, Sigma-Aldrich), iii) 10% (m/v) laktóz + 10% (m/v) fruktóz vagy iv) 90 mM *o*NPG + 10% (m/v) szukróz kiindulási szubsztrátokat tartalmaztak. A kiindulási reakcióelegyben jelen levő szubsztrát koncentráció oligoszacharid szintézisre gyakorolt hatását 20% (m/v) laktózt és fruktózt tartalmazó reakcióelegyekben vizsgáltuk. Az elegyek összeállítását követően 2400 U mennyiségű nyers (részlegesen tisztított) β -galaktozidáz enzimet adtunk a rendszerhez, melyet ezután folyamatos rázatás mellett (200 rpm) 50 °C hőmérsékleten 12 órán át inkubáltunk. Kontroll mintaként enzimet nem tartalmazó elegyet alkalmaztunk az egyes reakció kondíciókból. A reakció leállításához az elegyeket 5 percre forrásban lévő vízben tartottuk. Ezután a mintákat szobahőmérsékleten hagytuk lehűlni, majd az egyes szintetizált szacharidok analitikai meghatározásáig, illetve probiotikumok növekedésére gyakorolt hatás tesztekig -20 °C-on tároltuk. Az egyes tesztek három biológiai párhuzamossal végeztük. Az oligoszacharid hozamot a következő egyenlettel számítottuk ki:

$$\text{Oligoszacharid hozam (\%)} = C_1/C_0 \times 100,$$

ahol a C_0 a kiindulási szubsztrátok (azaz laktóz, tejsavópor laktóz tartalma vagy szukróz) koncentrációját, míg C_1 a kapott oligoszacharidok koncentrációját jelenti.

4.9. Szénhidrátok tömegspektrometriai vizsgálata

A minták szénhidráttartalmának nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával kapcsolt tandem tömegspektrometria (HPLC-MS/MS) vizsgálatát H-ESI ionforrással felszerelt TSQ Quantum Access hármass kvadrupól tömegspektrométerrel (Thermo Fisher Scientific) és Nexera XR nagyhatékonyságú folyadékkromatográfal (Shimadzu) végeztük. A folyadékkromatográfiás elválasztás SeQuant ZIC-HILIC (20 x 2,1 mm) védőkolonnával felszerelt SeQuant ZIC-HILIC (3,5 μ m, 150 x 2,1 mm; Merck) oszlopon, 25 °C hőmérséklet mellett történt. A vizsgálatban kétféle mozgófázist alkalmaztunk: az „A” mozgófázis 5 mM ammónium-acetát 0,1% hangyasavval kiegészítve, míg a „B” mozgófázis acetonitrilből és 0,1% hangyasavból tevődött össze. A gradiens elúciót a következőképpen végeztük: 0 perc, 80% B; 0,5 perc, 80% B; 8,5 perc, 40% B; 10,5 perc, 40% B; 11 perc, 80% B; 20 perc, 80% B. A mozgófázis áramlási sebességét 200 μ l/perc értéken tartottuk, az injekciós térfogat 5 μ l volt.

Az általános tömegspektrometriás feltételek a következők voltak: ionforrás feszültsége, 4500 V; porlasztás hőmérséklet, 50 °C; köpenygáz (nitrogén) nyomás, 50 psi; segédgáz (nitrogén) áramlás, 10 tetszőleges egység; iontranszfer kapilláris hőmérséklet, 200 °C; ütközési gáz (argon) nyomás, 1,5 mTorr. Az elektroporlasztásos ionizációt negatív üzemmódban működtettük. A szénhidrátok tömegspektrometriai kimutatását kiválasztott reakció figyelő (SRM) módban végeztük. A mono-, di-, tri- és tetraszacharidokra vonatkozó SRM átmenetek 226,0 > 180,3, 387,5 > 180,19, 549,2 > 180,2 és 711,2 > 383,5 voltak. Az adatokat az Xcalibur™ (2.2.1. verzió) és Trace Finder (3.3. verzió) (Thermo Fisher Scientific) szoftverekkel dolgoztuk fel. A reakcióelegyekben található egyedi cukorvegyületek vizsgálatához szénhidrát standardokat (glükóz, fruktóz, galaktóz, szacharóz, laktóz, laktulóz, raffinóz, 1-kesztóz és nisztóz; Sigma-Aldrich) használtunk.

4.10. Probiotikumok növekedésére gyakorolt hatás tesztelése

Az oligoszacharid-dúsított minták kiválasztott probiotikumok (lásd 4.1. fejezet) növekedésére gyakorolt hatását folyadék tenyészetben vizsgáltuk. A növekedési tápközeg 4 ml 1% (m/v) sovány tejport, 900 μ l desztillált vizet és 100 μ l reakcióelegyet tartalmazott. A félkémcsőben előkészített tápoldatot 100 μ l MRS táplevesben elkészített friss probiotikum szuszpenzióval oltottuk be. A kontroll tenyészeteket 5 ml 1% (m/v) sovány tejpor és 100 μ l probiotikum szuszpenzió (kontroll 1), vagy 4 ml 1% (m/v) sovány tejpor, 900 μ l desztillált

víz, 100 µl enzimmentes reakcióelegy és 100 µl probiotikum szuszpenzió (kontroll 2) felhasználásával készítettük el. A tenyészeteket ezután oxigénhiányos környezetben 37 °C hőmérsékleten 24 órán át neveltük. Ezt követően az egyes tenyészetekből 10 µl térfogatot MRS agar felületére oltottunk egyenlő távolságban. Száradás után a csészéket anaerob tenyésztőedénybe helyeztük (Anaerocult C, Merck), majd 37 °C hőmérsékleten 48 órán át inkubáltuk. A telepeket megszámoztuk, majd a telepképző egységet (CFU) a következőképpen határoztuk meg:

$$\text{CFU/ml} = A \times 10^n \times 100,$$

ahol A a probiotikum telepek számát, míg n a hígítás mértékét jelenti. Minden tesztelt mintára három biológiai párhuzamos rendszert állítottunk elő.

4.11. β -Galaktozidázok nagy-léptékű tisztítása

A β -galaktozidáz termelés indukálásához búzakorpa-alapú SSF tenyésztési körülményt alkalmaztunk. Ötszáz ml térfogatú Erlenmeyer-lombikokba 25 g búzakorpa és 5 g szójaliszt keverékét tettük, majd minden lombikot 25 ml ásványisó oldattal nedvesítettünk. A lombikokat 500 µl 10^6 sejt/ml koncentrációra hígított spóraszuszpenzióval oltottuk be. A három párhuzamos rendszerben összeállított tenyészeteket 7 napon keresztül az izolátumoknak megfelelő növekedési hőmérsékleten inkubáltuk. A tenyészetekre kétnaponta 5 ml desztillált vizet mértünk. Az inkubáció után 150 ml nátrium-acetát puffert (50 mM, pH 6,0) mértünk a tenyészetekre, majd a puffer-fermentum homogenizálását követően 4 órán át 4 °C-on állni hagytuk a lombikokat. Az inkubálási idő lejártá után steril gézlapon durvaszűrést végeztünk, majd centrifugáltuk ($5040 \times g$, 15 perc, 4 °C) a kivonatot. A centrifugálást követően 2 ml mintát vettünk a kivonatból. A nyers kivonatban ezután többlépcsős kisózást (50%, 65% és 85%) végeztünk ammónium-szulfát oldatba vitelével, a kivonatot végig jeges vízfürdőben tartva. A só teljes feloldódása után az oldatokat 4 órán át 4 °C hőmérsékleten állni hagytuk. Az ammónium-szulfát pontos mennyiségének kiszámítása az EnCor Biotechnology Inc. ammónium-szulfát kalkulátorával történt (<https://www.encorbio.com/protocols/AM-SO4.htm>, elérhető: 2023.08.24.). A frakcionált kisózás egyes lépései között centrifugálással ($5040 \times g$, 15 perc, 4 °C) távolítottuk el a kicsapódott fehérjéket az oldatból, melyet ezután a lehető legkisebb térfogatú nátrium-acetát pufferben (50 mM, pH 6,0) vettünk fel. A kisózást követően a tömény enzimkivonatokat gélszűréssel tisztítottuk (Bio-Gel P-6 Desalting Cartridge, Bio-Rad), eltávolítva a

csapadékban esetlegesen jelen lévő szennyeződések és sókat. Az oszlopot előzetesen nátrium-acetát pufferrel (50 mM, pH 6,0) mostuk, majd ugyanezzel a pufferrel 9 ml/perc áramlási sebesség mellett eluáltunk. Ezt követően a sómentes frakciókat előzetesen nátrium-acetát pufferrel (50 mM, pH 6,0) átmosott anioncserélő oszlopra (Macro-Prep High Q, 12,6 x 40 mm, Bio-Rad) vittük fel. A felkötött enzimfehérjéket 2 ml/perc áramlási sebességgel, 0-1 M NaCl és nátrium-acetát puffer (50 mM, pH 6,0) lineáris grádiensében eluáltuk. A tisztítás utolsó lépésében Sephacryl S-200HR oszlopot (GE Healthcare, 16 x 60 mm, 5-250 kDa) alkalmaztunk. Az oszlopot előzetesen 0,15 M NaCl tartalmú nátrium-acetát pufferrel (50 mM, pH 6,0) mostuk, majd a mintafelvitelt követően 0,8 ml/perc áramlási sebességgel ugyanezen pufferrel végeztük az elúciót. A tisztítási folyamat során minden lépés után meghatároztuk az egyes frakciók β -galaktozidáz aktivitását a 4.6. fejezetben ismertetett módszernek megfelelően oNPG szubsztráttal.

4.12. Fehérjekoncentráció meghatározás

A fermentlevek, nyers kivonatok és a tisztítási lépések után kapott frakciók összfehérje-koncentrációjának meghatározását Qubit Fluorometer (Invitrogen) és Quant-iT Protein Assay Kit (Invitrogen) segítségével végeztünk a gyártó utasításainak megfelelően. A műszer kalibrálása 0 ng/ μ l, 200 ng/ μ l és 400 ng/ μ l koncentrációjú fehérje standard felhasználásával történt.

4.13. Denaturáló gélelektroforézis

A fehérjék nátrium-lauril-szulfát poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) történő elválasztását vertikális futtató kádban (Mini-PROTEAN Tetra System, Bio-Rad) elhelyezett 12%-os poliakrilamid gélen (Mini-PROTEAN TGX, Bio-Rad) végeztük, NuPAGE 2-N-morfolin-etánszulfonsav (MES) nátrium-lauril-szulfát (SDS) futtató puffer (20x, Life Technologies) felhasználásával. A részleges tisztítást követően a fehérjemintázat láthatóvá tételéhez a gélt *Coomassie Brilliant Blue R-250* festő oldatban egy órán át rázattuk (65 rpm), ezután egy desztillált vizes öblítést követően az 1. festékmentesítő oldatban, majd a 2. festékmentesítő oldatban mostuk 2x30 percig. A megfestett gélt 2. festékmentesítő oldatban tároltuk 4 °C-on.

A β -galaktozidázok nagy-léptékű tisztítása után az enzimfehérjék tisztulásának nyomon követését ezüstfestés módszer alkalmazásával végeztük. Az elválasztást követően

a gélt fixáló oldatban inkubáltuk két órán át, majd a fixáló oldat eltávolítása céljából háromszor 20 percig 20%-os etanollal öblítettük. Ezt követően érzékenyítő oldatban (0,02% nátrium-tioszulfát) inkubáltuk a gélt két percig, majd többszöri desztillált vizes mosást végeztünk. Ezután ezüst-nitrát oldatban (0,2% AgNO_3) 20 percig festettük a gélt, majd ismét desztillált vizes mosást végeztünk. Végül a gélt előhívó oldattal mostuk a megfelelő festődés eléréséig. Az előhívást 96%-os ecetsavval állítottuk le.

4.14. Zimogram analízis

A tisztított enzimfehérjék zimográfiai vizsgálatát natív poliakrilamid gélelektroforézissel (natív-PAGE) végeztük. A fehérjék elválasztásához vertikális futtató kádban (Mini-PROTEAN Tetra System, Bio-Rad) elhelyezett 4-15%-os poliakrilamid gélt (Mini-PROTEAN TGX, Bio-Rad) alkalmaztunk. Futtató pufferként 10x Trisz-glicin puffert (Bio-Rad) használtunk. Ezt követően a gélt 4 °C-os nátrium-acetát pufferben (50 mM, pH 6,0) mostuk 65 rpm fordulaton rázatva. A tisztított enzimek gélen történő elválasztása után, azok aktivitását kétféle módszerrel vizsgáltuk meg. Az első esetben X-gal tartalmú oldattal kezeltük (1. oldat, lásd 4.3. fejezet), emellett párhuzamosan egy másik oldatot is összeállítottunk, mely 6-bromo-2-naftil- β -D-galaktopiranozid és *Fast Red* kromogén szubsztrátokat tartalmazott (2. oldat, lásd 4.3. fejezet). A géleket a 30 perces mosási lépés után 50 °C-os inkubátorban 45 percen keresztül inkubáltuk, figyelve az enzimek aktivitásából adódó színreakciót és annak mértékét. A fehérjemintázat kimutatásához *Comassie Brilliant Blue R-250* festőoldatot alkalmaztunk.

4.15. A tisztított enzimek biokémiai jellemzőinek meghatározása

4.15.1. Általános reakciófeltételek

A tisztított β -galaktozidázok biokémiai jellemzéséhez az utolsó tisztítási lépés után kapott legnagyobb enzimaktivitást mutató frakciókat használtuk fel. Az enzimaktivitások meghatározásához *o*NPG szubsztrátot alkalmaztunk 0,7 mM végkoncentrációban. A reakcióelegyet mikrotiterlemez mintahelyeiben állítottuk össze, az inkubációt, amennyiben a kísérlet nem kívánta másként, 50 °C hőmérsékleten végeztük. A reakciót nátrium-karbonát (100 mM) oldattal állítottuk le, majd a felszabaduló *o*-nitrofenol mennyiségét 420 nm hullámhosszon mértük (SPECTROstar Nano mikrotiterlemez olvasó,

BMG Labtech). A vizsgálatokhoz 16441,8 $\mu\text{mol/ml/perc}$ *L. ramosa* és 181320,6 $\mu\text{mol/ml/perc}$ aktivitású *R. pusillus* enzimkivonatokat használtunk. Minden esetben kettő párhuzamos mérést végeztünk, majd az adatok átlagait ábráztuk.

4.15.2. Hőmérséklet optimum és tolerancia

A β -galaktozidáz aktivitások hőmérséklet optimumának és stabilitásának vizsgálatát 20 és 80 °C közötti hőmérsékleti tartományon végeztük. Az enzimaktivitás hőmérsékleti optimumának meghatározásához a standard reakcióelegyet (lásd 4.6. fejezet) 20, 30, 40, 50, 60, 70 vagy 80 °C hőmérsékleten inkubáltuk 30 percig. A hőmérséklet stabilitás vizsgálata során 180 μl enzimkivonatot 4 órán keresztül inkubáltunk 20, 30, 40, 50, 60, 70 vagy 80 °C hőmérsékleten, majd 20 μl *o*NPG szubsztrát hozzáadását követően további 30 percig a β -galaktozidáz aktivitásának optimális hőmérsékletén inkubáltuk a reakcióelegyet. Az inkubációt követően abszorbanciát mértünk 420 nm hullámhosszon.

4.15.3. pH optimum és tolerancia

Az enzimaktivitás pH optimumának meghatározásakor 40 μl enzimkivonatot és 360 μl adott pH-jú McIlvaine puffer oldatot (pH 2,2-8,0; McIlvaine, 1921) mértünk össze. Az elegyből 180 μl mennyiséget mikrotiterlemez mintahelyére vittünk fel, majd *o*NPG szubsztrát hozzáadását követően 30 percig 50 °C hőmérsékleten inkubáltuk a reakcióelegyet. Ezt követően 420 nm hullámhosszon elvégeztük a felszabaduló *o*-nitrofenol fotometriás mérését.

A pH stabilitás vizsgálatához szintén 40 μl enzimkivonatot és 360 μl adott pH-jú McIlvaine-féle pufferoldatot (pH 2,2-8,0) mértünk össze. Ezután a mintákat 24 óráig 4 °C hőmérsékleten tartottuk, majd belőlük 180 μl mennyiséget mikrotiterlemez mintahelyeire vittünk. Húsz μl *o*NPG szubsztrát hozzáadását követően 30 perces 50 °C hőmérsékleten történő inkubációt végeztünk, majd abszorbanciát mértünk 420 nm hullámhosszon.

4.15.4. Szubsztrátspecifitás vizsgálat

A tisztított enzim szubsztrátspecifitásának vizsgálatához *o*NPG, *p*-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid (*p*NPG), *p*-nitrofenil- α -D-galaktopiranozid, *p*-nitrofenil- β -D-glükopiranozid, *o*-nitrofenil- β -D-glükopiranozid, *p*-nitrofenil- α -D-glükopiranozid, *p*-

nitrofenil- β -D-cellobiozid, *p*-nitrofenil- α -D-mannopiranozid és *p*-nitrofenil- β -D-xilopiranozid aril szubsztrátokat (Sigma-Aldrich) alkalmaztuk 7 mM koncentrációjú oldat formájában, nátrium-acetát pufferben (50 mM, pH 6,0) feloldva. A méréshez 90 μ l enzimkivonatot vittünk fel mikrotiterlemez mintahelyeire, melyhez 10 μ l szubsztrát oldatot adtunk hozzá. Ezután a reakcióelegyet 50 °C hőmérsékleten inkubáltuk 30 percig, majd abszorbanciát mértünk 420 nm hullámhosszon. Az egyes kromogén szubsztrátokkal kapott optikai denzitás adatokat *p*NPG szubsztráttal mért értékekkel hasonlítottuk össze.

4.16. β -Galaktozidáz-kódoló gének vizsgálatához alkalmazott módszerek

4.16.1. Genomi DNS kinyerése gombasejtekből

A kísérletek során alkalmazott *L. ramosa* SZMC 11360 genomi DNS-ének izolálásához ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ (Zymo Research) kit-et használtunk a gyártó utasításainak megfelelően.

4.16.2. Agaróz gélelektroforézis

Az RNS és DNS fragmentek szeparálását és ellenőrzését agaróz gélelektroforézis segítségével végeztük. A mintánkhoz mintafelvivő puffert (6x LD puffer, Thermo Fisher Scientific) adtunk, majd 0,8% (m/v)-os agaróz (Lonza) gélen, 80-110 V-os feszültségen kb. 1-2,5 órán keresztül futtattuk. Az agaróz gél elkészítéséhez és futtató pufferként is TAE puffert használtunk. A fragmentumok láthatóvá tételéhez etídium-bromidos (0,5 μ g/ml, Sigma-Aldrich) festést alkalmazunk. A fragmentumok méretének meghatározásához 1 kb-os molekulásúly markert (Thermo Fisher Scientific) használtunk.

4.16.3. DNS visszanyerése agaróz gélből

A gélelektroforézist követően a DNS-t tartalmazó sávokat UV fényel tettük láthatóvá és steril szike segítségével kivágtuk a 0,8% (m/v) agarózt (Lonza) tartalmazó gélből. A DNS-t ezt követően Zymoclean Large Fragment DNA Recovery Kit (Zymo Research) segítségével nyertük vissza az agaróz gélből, a gyártó utasításainak megfelelően.

4.16.4. RNS tisztítás gombasejtekből

Gombasejtekből történő RNS tisztításhoz Quick-RNA MiniPrep Kit-et (Zymo Research) használtunk a gyártó utasításainak megfelelően. Az izolált RNS mennyiségét NanoDrop spektrofotométer (ND-1000 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific) segítségével határoztuk meg.

4.16.5. cDNS szintézis (reverz transzkripció)

DNáz kezelt RNS mintákból a reverz transzkripciót Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific) segítségével végeztük el a gyártó utasításai szerint. Egy reakcióhoz 0,25 µl oligo(dT)₁₈ és 0,25 µl random hexamer (10 µM) indítószekvenciákat használtunk fel.

4.16.6. Alkalmazott PCR technikák és reakciókörülmények

Kísérleteink során különböző PCR technikákat alkalmaztunk. A reakciókat T3 Thermocycler (Biometra) készülékben végeztük, a kvantitatív valós idejű PCR (qPCR) esetében C1000 Thermal Cycler készüléket és CFX96 Real-Time System (Bio-Rad) detektáló rendszert használtunk.

A β-galaktozidázt kódoló gének felszaporításához használt reakciókörülmények

A gének genomi DNS-ből történő felszaporításához Phusion Flash High-Fidelity Master Mixet (Thermo Fisher Scientific) használtuk a gyártó ajánlása szerint.

A reakciókat 25 µl végtérfogatban mértük össze a következők szerint:

20-50 ng genomi DNS

0,4-0,4 µM specifikus indítószekvencia (Függelék, F2. táblázat)

1X Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix

A felszaporítás körülményei a következők voltak:

95 °C	10 másodperc	elődenaturálás
95 °C	1 másodperc	denaturálás
58 °C	5 másodperc	indítószekvencia kötődés
72 °C	1 perc 45 másodperc	láncszintézis
72 °C	1 perc	végző láncszintézis

A β -galaktozidáz gének cDNS-ből való felszaporításához használt reakciókörülmények

A reverz transzkripciót követően a gének teljes cDNS-ből történő felszaporításához Phusion Flash High-Fidelity Master Mixet (Thermo Fisher Scientific) használtunk a gyártó ajánlásai szerint.

A reakciókat 25 μ l végtérfogatban mértük össze a következők szerint:

20-50 ng cDNS (reverz transzkripciót követően)

0,4-0,4 μ M specifikus indítószekvencia (Függelék, F2. táblázat)

1X Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix

A felszaporítás körülményei a következők voltak:

95 °C	10 másodperc	elődenaturálás
95 °C	1 másodperc	denaturálás
55 °C	5 másodperc	indítószekvencia kötődés
72 °C	1 perc 30 másodperc	láncszintézis
72 °C	1 perc	végző láncszintézis

Reverz transzkripció kapcsolt kvantitatív valós idejű PCR (RT-qPCR) reakciók a transzkripció szintek meghatározásához

A méréseket a *Lichtheimia* telepekből izolált RNS-ről reverz transzkripcióval előállított cDNS-ből végeztük el CFX96 Real Time System (Bio-Rad) berendezés és 2x Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) segítségével. A reakció első lépése egy 95 °C-os, 3 perces elődenaturáció, majd ezt követi 40 ciklus az alábbi paraméterekkel: 95 °C, 1 perc; 60 °C, 30 s; 72 °C, 30 s. Az így kapott eredményeket a $2^{-\Delta\Delta C_t}$ módszer segítségével értékeltük ki (Livak és Schmittgen, 2001). Belső kontrollként a *L. ramosa* aktin (ACT) génjét használtuk. Minden mérés legalább három technikai és két biológiai párhuzamossal történt. A reakciókban használt indítószekvenciák listáját a Függelék, F2. táblázat tartalmazza. A reakciók összeállítása 20 μ l végtérfogatban történt 96 lyukú mikrotiter lemezeken:

200-250 ng cDNS

10 μ M - 10 μ M specifikus indítószekvencia (Függelék, F2. táblázat)

1x Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific)

4.16.7. A *L. ramosa pyrG* gén elrontásához használt RNS molekulák

A protospacer szekvenciákkal kölcsönható Alt-R CRISPR RNS (crRNS) és Alt-R CRISPR-Cas9 transzaktiváló crRNS (tracrRNS) molekulákat kereskedelmi forgalomból (Integrated DNA Technologies) szereztük be. A crRNS:tracrRNS duplexek (gRNS) létrehozásához a Nuclease-Free Duplex Buffer-t (Integrated DNA Technologies) használtuk, a gyártó utasításainak megfelelően. A *pyrG* (orotidin-5-foszfát dekarboxiláz) gén diszrupciójához használt protospacer szekvencia a következő volt: 5' GCACGACTTTATGATTTTCG 3'.

4.16.8. PEG-mediált protoplaszt transzformáció

Az általunk alkalmazott módszer a van Heeswijck és Roncero (1984) által leírt PEG-mediált transzformáción alapult. A *L. ramosa* SZMC 11360 törzs malátás táptalajon, 4-5 napon keresztül, fényben nevelt tenyészetéről steril desztillált vízzel lemostuk a sporangiospórákat, majd a tömény spóraszuszpenzióból oltótűvel, celofánkoronggal fedett YEG táptalajra oltottunk. A tenyészeteket 37 °C-on, 16 órán keresztül neveltük, majd a micéliumkorongokat protoplasztáló oldatba helyeztük és 3 órán keresztül, szobahőmérsékleten rázatva inkubáltuk (50-60 rpm). A sejtfal oldásához saját készítésű, éticsiga (*Helix pomatia*) gyomorból preparált lítikus emésztőenzimet használtunk. SMC pufferrel átmosva a micéliumkorongokat a protoplasztokat tölcserbe helyeztük gézen keresztül sterilén átszűrtük. A centrifugálással ($2162 \times g$, 10 perc, 4 °C) összegyűjtött protoplasztokat 5 ml SMC pufferrel mostuk, majd újabb centrifugálás után 250 μ l SMC pufferben szuszpendáltuk.

A 250 μ l SMC pufferbe felvett protoplasztokhoz a *pyrG* génre specifikus 10 μ M gRNS-t, 10 μ M Cas9 endonukleázt és 20 μ l PMC puffert adtunk. Ezután a mintákat fél órán keresztül jégen inkubáltuk. Az inkubálást követően a mintákhoz további 2,5 ml PMC puffert adtunk, majd 25 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, és 25 ml SMC pufferrel hígítva centrifugáltuk ($2162 \times g$, 10 perc, 4 °C). Húsz ml SMC pufferrel mostuk a sejteket, majd centrifugálási lépést ($2162 \times g$, 10 perc, 4 °C) követően 200 μ l SMC-ben szuszpendáltuk a kiülepített sejteket, és szorbitollal (0,8 M) kiegészített YNB csészékre szélesztettük (kiegészítve 0,05% uracillal és 1,5 mg/ml 5-FOA-val). A csészéket 4-10 napig 37 °C-on, a transzformáns telepek megjelenéséig inkubáltuk.

4.16.9. Génklónozás során alkalmazott módszerek, vektorkonstrukciók létrehozása

Restriktációs emésztések, ligálás

A restriktációs emésztéseket, ligálásokat az általánosan használt módszerek szerint végeztük (Sambrook és mtsai., 1989) követve a gyártók utasításait, valamint optimalizálva az adott kísérleti körülményekhez. A DNS fragmentumokat a CloneJet PCR Cloning Kit csomagban található pJET1.2 (Thermo Fisher Scientific) klónozó vektorba építettük a gyártó utasításait követve.

Plazmid DNS tisztítás

A plazmid DNS tisztításhoz ZymoPURE Plasmid Miniprep Kitet (Zymo Research) használtunk a gyártó utasításainak megfelelően.

4.16.10. Baktérium transzformáció

A baktérium transzformációhoz Zymo Research Mix & Go *Escherichia coli* DH5 α (Zymo Research) kompetens sejtet használtunk a gyártó utasításainak megfelelően. A transzformációt követően a baktériumokat ampicillin tartalmú (100 μ g/ml) LB táptalajra szélesztettük. A Petri-csészéket 16 órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk.

4.16.11. *In silico* elemzések

A vizsgált DNS fragmentumok szekvenálását az LGC Genomics vállalat végezte. A DNS szekvenciák ellenőrzése a BioEdit (7.2.5 verzió) program (Hall, 1999) segítségével történt, míg a nukleotid szekvenciák analízisét a Nemzeti Biotechnológiai Információs Központ (NCBI) adatbázis (NCBI) szekvencia-hasonlóság kereső programcsomag (BLAST) használatával végeztük (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A feltételezett β -galaktozidáz fehérjék szekvenciájának elemzéséhez a Swiss Expasy Server (<http://www.expasy.ch>) programjait használtuk (Hulo és mtsai., 2008). A molekulatömegek és izolektromos pont meghatározásához a ProtParam (Gasteiger és mtsai., 2005), a transzmembrán domének kereséséhez pedig a HMMTOP (Tusnády és Simon, 2001) és TMPred (Hofmann és Stoffel, 1993) programokat alkalmaztuk. A fehérjékben található motívumok és domének keresését a Motif Scan (MyHits) program (Pagni és mtsai., 2004) segítségével végeztük. A β -galaktozidáz fehérjék hosszát a Peptide Properties Calculator

(<http://biotools.nubic.northwestern.edu/proteincalc.html>) és szignál szekvenciáinak jelenlétét a SignalP 4.1 Server (Nielsen, 2017) segítségével határoztuk meg.

4.17. Statisztikai vizsgálatok

Amennyiben másként nem jelöltük, az eredményeket legalább kettő biológiai és három technikai párhuzamos kísérletből nyert adatok felhasználásával számítottuk ki. A szignifikancia vizsgálatokat egyutas ANOVA analízist követő Tukey-féle többszörös összehasonlítás vagy párosított *t*-teszt tesztekkel, GraphPad Prism 7.00 szoftver (GraphPad Software Inc.) alkalmazásával végeztük. Statisztikailag jelentős eltérésnek a kisebb, mint 0,05 *p* érték esetén kapott eredményeket tekintettük. Az oligoszacharid koncentráció és a probiotikum növekedést-támogató aktivitás összefüggésének vizsgálatához Microsoft 365 Excel szoftverrel végzett Pearson korrelációs tesztet alkalmaztunk.

5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

5.1. A β -galaktozidáz aktivitás vizsgálata kromogén agaron

A Szeged Mikrobiológiai Gyűjteményben rendelkezésre álló *Lichtheimia*, *Mortierella*, *Mucor*, *Rhizomucor*, *Rhizopus* és *Umbelopsis* járomspórás gomba gyűjteményből 99 izolátumot választottunk ki a tesztekhez. Az X-gal tartalmú táptalajon történő tenyésztés során az enzimet termelő fajok telepei körül kékeszöld szín jelent meg, mely az enzim kromogén szubsztrátra gyakorolt hidrolitikus hatásának köszönhető.

A tesztelt gombáknak eltérő volt a β -galaktozidáz termelő képességük, és az egyes nemzetségek tagjainak enzimaktivitása között is lényeges különbségek mutatkoztak. A vizsgált gombatörzsek közül összesen 66 izolátumnál tapasztaltunk kék elszíneződést a kromogén agaron. A legjobb enzintermelő törzsek a *Lichtheimia*, *Rhizomucor* és *Umbelopsis* nemzetség tagjai közül kerültek ki (Függelék, F1. táblázat). A *Mortierella*, *Mucor* és *Rhizopus* nemzetségek izolátumainak kisebb hányada mutatott erős kék elszíneződést. Ezek közül a *Mortierella echinosphaera* SZMC 11251, a *Mortierella globulifera* SZMC 11209, a *Mucor plumbeus* SZMC 12023, a *Mucor circinelloides* SZMC 12028 és az összes vizsgált *Rhizopus microsporus* törzs bizonyult kiemelkedő enzintermelőnek (Függelék, F1. táblázat). Érdeemes megemlíteni, hogy előzetes vizsgálatokban az *M. echinosphaera* SZMC 11251 törzs kiváló termelője volt átészterező aktivitással bíró lipáz enzimnek is (Kotogán és mtsai., 2018). A lipáz és β -galaktozidáz enzimek együttes alkalmazása megfelelő körülményen cukor-laktát kopolimer biológiai anyagok képződését eredményezheti (Jia és Wang, 2007). A folyamatot különösen gazdaságossá teheti az egy organizmus által termelt két enzim alkalmazásának lehetősége is.

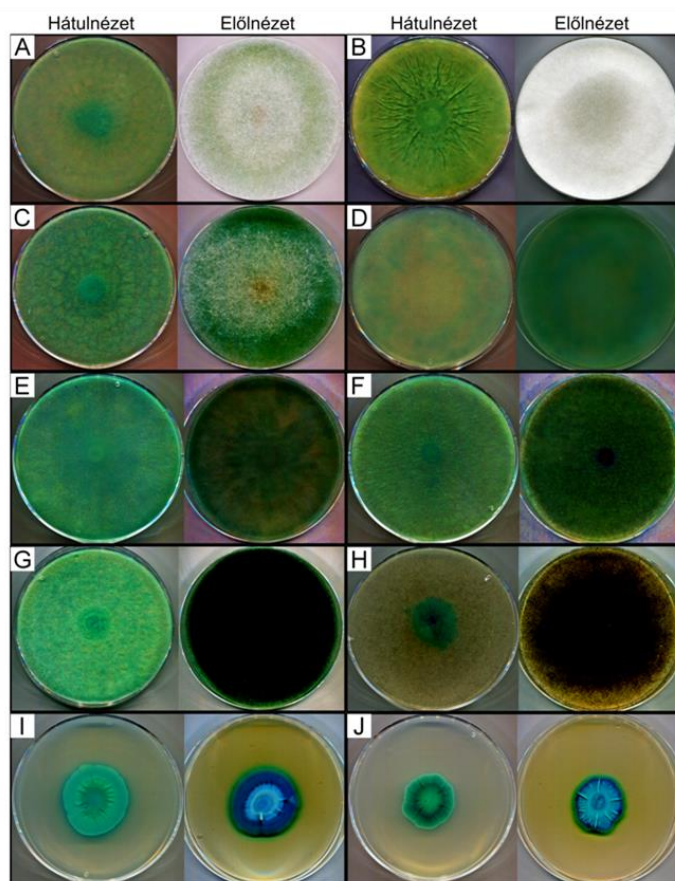
Legjobb β -galaktozidáz termelőként a következő járomspórás gombatörzseket azonosítottuk: *Lichtheimia ramosa* SZMC 11360, *Lichtheimia corymbifera* SZMC 11361, *Lichtheimia hyalospora* SZMC 11364, *Rhizomucor miehei* SZMC 11005, *R. miehei* SZMC 11014, *Rhizomucor pusillus* SZMC 11025, *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* SZMC 13619, *M. echinosphaera* SZMC 11251, *Umbelopsis longicollis* SZMC 11208 és *Umbelopsis ramanniana* var. *angulispora* SZMC 11234 (4. táblázat).

4. táblázat. Az X-gal tartalmú tápközegen legjobb β -galaktozidáz termelőként azonosított járomspórás gomba izolátumok enzimaktivitása, a tenyésztés hőmérséklete és az egyes törzsek eredete. A kapott kék szín intenzitás egyenesen arányos a törzsek β -galaktozidáz aktivitásával.

Törzs	β -Galaktozidáz aktivitás ¹						Hőmérséklet (°C)	Izolálás helye
	t(inkubáció)/nap							
	1	2	4	6	8	10		
<i>Lichtheimia ramosa</i> SZMC 11360	+++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	37	talaj / ismeretlen
<i>Lichtheimia corymbifera</i> SZMC 11361	++	++++	++++	+++++	+++++	+++++	37	talaj / Afganisztán
<i>Lichtheimia hyalospora</i> SZMC 11364	++	++++	++++	+++++	+++++	+++++	37	<i>Manihot esculenta</i> szár / Ghána
<i>Rhizomucor miehei</i> SZMC 11005	++	+++	++++	++++	++++	+++++	37	borsmenta / India
<i>Rhizomucor miehei</i> SZMC 11014	++	++++	+++++	+++++	+++++	+++++	37	komposzt / Svájc
<i>Rhizomucor pusillus</i> SZMC 11025	+	+++	+++	++++	++++	+++++	37	őszi falevél / Kalifornia, USA
<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>oligosporus</i> SZMC 13619	NKS	+	+++	++++	++++	+++++	37	tempeh / Indonézia
<i>Mortierella</i> <i>echinosphaera</i> SZMC 11251	+	+	+++	++++	++++	+++++	20	begónia / Hollandia
<i>Umbelopsis longicollis</i> SZMC 11208	+	+++	++++	+++++	+++++	+++++	25	talaj / Ausztrália
<i>Umbelopsis ramanniana</i> var. <i>angulispota</i> SZMC 11234	+	+++	+++++	+++++	+++++	+++++	25	ismeretlen / Oroszország

¹ halványkék (+), világoskék (++) , kék (+++), sötétkék (++++), mélysötétkék (+++++), NKS: nincs kék elszíneződés

Többségüknél már az inkubációs idő korai fázisában tapasztaltunk kékeszöld színreakciót a telepek körül (3. ábra). A *R. miehei* SZMC 11014 izolátum esetében például a többi vizsgált gombával összehasonlítva erősebb kék elszíneződést tapasztaltunk már egy nap inkubációt követően is. Ugyanakkor minden jó termelőnek azonosított törzs az inkubáció előrehaladtával erős kék elszíneződést mutatott a kromogén lemezen (4. táblázat), az inkubáció 10. napján mutatva legnagyobb intenzitást (3. ábra).



3. ábra. *L. corymbifera* SZMC 11361 (A), *L. hyalospora* SZMC 11364 (B), *L. ramosa* SZMC 11360 (C), *M. echinosphaera* SZMC 11251 (D), *R. miehei* SZMC 11005 (E), *R. miehei* SZMC 11014 (F), *R. pusillus* SZMC 11025 (G), *R. microsporus* var. *oligosporus* SZMC 13619 (H), *U. longicollis* SZMC 11028 (I) és *U. ramanniana* var. *angulispora* SZMC 11234 (J) telepek X-gal tartalmú táptalajon való 10 napos tenyésztést követően.

A *Rhizopus*, *Rhizomucor* és *Mucor* nemzetségek között már azonosítottak néhány, β -galaktozidázt hatékonyan termelő törzset (Ismail és mtsai., 1997; Vishwanataha és mtsai., 2012; Silvério és mtsai., 2018), ugyanakkor a *Lichtheimia*, *Mortierella* és *Umbelopsis* fajokra vonatkozóan nem áll rendelkezésünkre előzetes adat. Fonális gombákban ezen kívül *Aspergillus*, *Penicillium* és *Trichoderma* fajok β -galaktozidáz termelését vizsgálták részletesen, mely kutatásokban számos aktív izolátumot azonosítottak (Silvério és mtsai.,

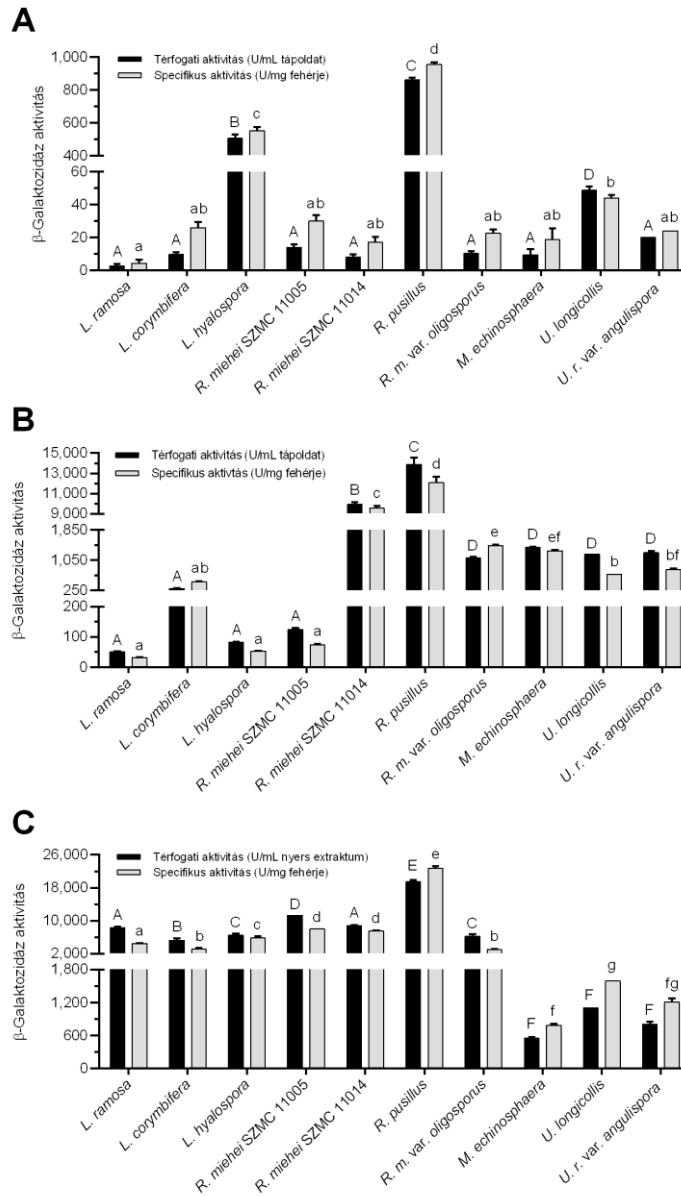
2018; Martarello és mtsai., 2019; Abd El-Salam és mtsai., 2020; Vidya és mtsai., 2020a, 2020b; De Jesus és Guimarães, 2021). Fonalas gombákból, különösen az *Aspergillus* nemzetség tagjai közül, kereskedelmi forgalomba került β -galaktozidázokat is nyertek már ki (Zolnere és Ciprovica, 2017).

5.2. β -Galaktozidáz termelés fermentációkban

A mikrobiális β -galaktozidáz termelés induktorokkal kiegészített fermentációs tápközegekben fokozható. Enzimtermelést fokozó induktorként alkalmaztak már például sovány tejport, laktózt, tejsavót és számos mezőgazdasági melléktermék szubsztrátot (Kaur és mtsai., 2015; Kazemi és mtsai., 2016; Martarello és mtsai., 2019; Abd El-Salam és mtsai., 2020). Kísérleteinkben a kromogén teszt alapján kiválasztott 10 legjobb β -galaktozidáz termelő gomba enzimaktivitását vizsgáltuk induktív fermentációs körülményeken. A teszthez SmF és SSF rendszereket alkalmaztunk. Az SmF rendszerben laktóz, illetve laktóz és búzakorpa szubsztrátok jelenléte mellett vizsgáltuk az enzimtermelést. Az SSF rendszer desztillált vízzel kiegészített búzakorpa és szójaliszt keverékből állt.

A fermentációk során elért legnagyobb térfogati (U/ml tápközeg vagy kivonat) és specifikus (U/mg fehérje) aktivitás adatokat a 4. ábrán szemléltettük. A gomba biomassza tömegét a búzakorpa-alapú rendszerekben a micélium tenyésztőkörnyezetből történő elválasztásának nehézsége miatt nem tudtuk meghatározni. A kapott enzimhozamok összehasonlításához a specifikus aktivitás adatokat alkalmaztuk, melynek számítása a fermentlevekben és a nyers kivonatban található fehérjemennyiségen alapul.

A háromféle fermentációban a kiválasztott járomspórás gombákra változatos β -galaktozidáz aktivitás értékek jellemzőek. A laktóz-alapú tápoldatban például az *U. longicollis*, a *L. hyalospora* és a *R. pusillus* termelte a legnagyobb mennyiségben az enzimet, a számolt térfogati aktivitás értékek sorrendben a következők: 48, 505 és 860 U/ml (4.A ábra). A *R. miehei* SZMC 11005 (14 U/ml) és az *U. ramanniana* var. *angulispora* (20 U/ml) térfogati aktivitás értékei ennél mérsékeltőbbek voltak. A többi izolátumnál a laktóz-alapú SmF rendszerben még kisebb mértékű enzimtermelést állapítottunk meg. A specifikus aktivitást tekintve a legkiemelkedőbb eredményt ($p < 0,05$) a *L. hyalospora* (551 U/mg fehérje) és a *R. pusillus* (954 U/mg fehérje) gombák érték el a β -galaktozidáz termelésben (4.A ábra). Az *U. longicollis* kisebb specifikus aktivitást mutatott (44 U/mg fehérje), ami azonban nem tért el szignifikánsan ($p > 0,05$) a többi vizsgált gombánál tapasztalt értéktől (4.A ábra).



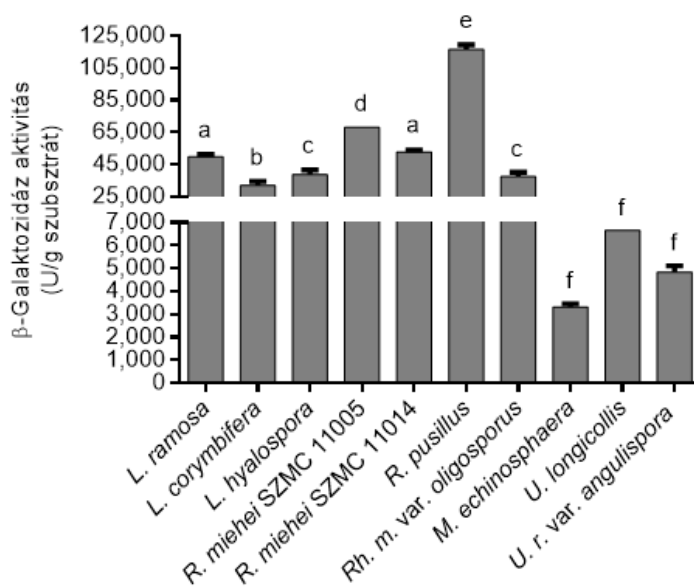
4. ábra. β -Galaktozidáz termelő izolátumok különböző fermentációs körülményeken elért legnagyobb β -galaktozidáz hozamainak (térfogati és specifikus aktivitás) összehasonlítása. **(A)** Laktózt 20 g/l koncentrációban tartalmazó sülyesztett fermentáció (SmF). A bemutatott adatokat *L. ramosa*, *L. corymbifera*, *R. miehei*, *R. microsporus* var. *oligosporus* és *U. ramanniana* var. *angulispóra* esetén a 2. napon, *R. pusillus* gombánál a 4. napon, míg *L. hyalospóra*, *M. echinosphaera* és *U. longicollis* izolátumoknál a 7. napon mértük. **(B)** Laktózt és búzakorpát 20 g/l koncentrációban tartalmazó sülyesztett fermentáció (SmF). A *R. microsporus* var. *oligosporus* (2. nap), illetve a *L. corymbifera*, *L. hyalospóra*, *M. echinosphaera* és az *U. longicollis* (4. nap) izolátumok enzimaktivitás adatain kívül a bemutatott értékek a fermentáció 7. napján mért adatok. **(C)** Búzakorpa-alapú szilárd fázisú fermentáció (SSF). A *M. echinosphaera*, *U. longicollis* és *U. ramanniana* var. *angulispóra* enzimaktivitás értékeit a 4. fermentációs napon, míg a többi gombára vonatkozó adatokat a 7. napon határoztuk meg. A tenyésztési hőmérséklet *M. echinosphaera* esetén 20 °C, *U. longicollis* és *U. ramanniana* var. *angulispóra* izolátumoknál 25 °C, míg *L. ramosa*, *L. corymbifera*, *L. hyalospóra*, *R. miehei*, *R. pusillus* és *R. microsporus* var. *oligosporus* gombáknál 37 °C volt. A feltüntetett értékeket három párhuzamosan végzett kísérlet adataiból számítottuk; a hibásávok az átlagtól való eltérést jelölik. Az egyes oszlopok feletti különböző nagy (térfogati aktivitás) vagy kisbetűk (specifikus aktivitás) a Tukey-féle többszörös összehasonlító teszttel kombinált egyutas ANOVA vizsgálat szerinti szignifikáns különbségeket jelölik ($p < 0,05$).

Abban az esetben, ha búzakorpával egészítettük ki a laktóz tartalmú tápoldatot, az enzimtermelés mértéke jóval nagyobb volt, mint a búzakorpa hiányában. Általánosságban a térfogati és specifikus aktivitás mértéke 10-100-szor nagyobb volt a csak laktózt, mint induktort tartalmazóhoz képest. Említésre méltó a *R. miehei* SZMC 11014 izolátum, melynél ez az érték 1000-szeresre nőtt (4.A és B ábrák). Ugyanakkor az *L. hyalospora* esetén a termelés négyszer kisebb mértékűnek bizonyult a búzakorpa tartalmú SmF tápközegben a csak laktóz tartalmúhoz viszonyítva. A *Lichtheimia* és *R. miehei* SZMC 11005 izolátumok enzimaktivitása mérsékelt maradt búzakorpa és laktóz tartalmú tápoldatban a többi vizsgált gombához viszonyítva ($p < 0,05$). E törzsek β -galaktozidáz hozama 50 és 303 U/ml közötti tartományba esett, melyből ugyanakkor megállapítható, hogy a búzakorpa hozzáadása hatékonyan növelte az enzimtermelést (4.B ábra). A búzakorpa-laktóz tápoldatban a *R. miehei* SZMC 11014 (9926 U/ml) és a *R. pusillus* (13874 U/ml) izolátumoknál kaptuk a legnagyobb enzimaktivitás hozamot (4.B ábra).

A *R. miehei* SZMC 11014 törzs enzimtermelése az induktorként egyedül laktózt tartalmazó SmF tápközegben a legkisebb aktivitást mutató izolátumok közé illeszkedett. A *R. pusillus* esetén nagy enzimhozamot értünk el laktózon is (4.A ábra). A vizsgált *R. microsporus* var. *oligosporus*, *M. echinosphaera* és a két *Umbelopsis* izolátum által elért térfogati aktivitás adatokban nem volt jelentős különbség. Ezzel szemben a *R. microsporus* var. *oligosporus* és a *M. echinosphaera* gombáknál az *Umbelopsis* izolátumok esetén mért adatokhoz képest szignifikánsan nagyobb ($p < 0,05$) specifikus aktivitást mértünk. Az ezen törzsekhez tartozó legnagyobb β -galaktozidáz térfogati aktivitás 1109 és 1387 U/ml tápoldat között, a specifikus aktivitás 675 és 1436 U/mg fehérje között volt (4.B ábra).

A legtöbb vizsgált járomspórás gomba búzakorpa-alapú SSF rendszerben történő tenyésztése tovább növelte a β -galaktozidáz hozamot az SmF tápközegekben tapasztaltakhoz képest. A búzakorpával kiegészített SmF tenyészetben mért aktivitás értékekhez képest több, mint 50, illetve és 100-szoros növekedés volt megfigyelhető a térfogati és a specifikus aktivitásokban az *L. ramosa*, *L. hyalospora* és *R. miehei* SZMC 11005 izolátumoknál SSF rendszerben tenyésztve (lásd 4.B és C ábrák). A búzakorpa-alapú SSF rendszerben emelkedett specifikus aktivitást tapasztaltunk a többi vizsgált törzsnél is, kivéve a *M. echinosphaera* és *R. miehei* SZMC 11014 izolátumokat, ugyanakkor a növekedés az *L. ramosa*, *L. hyalospora* és *R. miehei* SZMC 11005 gombák esetén megfigyeltnél kisebb mértékű volt. Az *U. longicollis* és az *U. ramanniana* var. *angulispora* gombáknál elért térfogati aktivitás kismértékben nagyobb volt búzakorpával kiegészített SmF tápközegben (1202 és 1248 U/ml), mint SSF rendszerben (1109 és 806 U/ml). SSF

rendszerben a *Lichtheimia*, *Rhizomucor* és *Rhizopus* gombák jobb enzimtermelőnek bizonyultak, mint az *Umbelopsis* és *Mortierella* izolátumok. Ahogy a kétféle SmF tápközegben, úgy az SSF esetében is a *R. pusillus* adta a legnagyobb β -galaktozidáz hozamot, 19448 U/ml nyers kivonat és 22720 U/mg fehérje maximális térfogati és specifikus aktivitás értékekkel (4.C ábra). Az SSF tenyésztésben felhasznált búzakorpa mennyiségére vonatkoztatva a maximális β -galaktozidáz aktivitás értékek 3308 és 116690 U/g szubsztrát között voltak (5. ábra).



5. ábra. Mucoromycota gombák β -galaktozidáz aktivitása búzakorpa-alapú szilárd fázisú fermentációban (SSF) (U/g szubsztrát). A *M. echinosphaera*, *U. longicollis* és *U. ramanniana* var. *angulispora* esetén feltüntetett aktivitás adatokat a 4., míg a többi gombánál mért értékeket a 7. fermentációs napon határoztuk meg. A *M. echinosphaera* izolátumot 20 °C, az *U. longicollis* és az *U. ramanniana* var. *angulispora* gombákat 25 °C, míg a *L. ramosa*, *L. corymbifera*, *L. hyalospora*, *R. miehei*, *R. pusillus* és a *R. microsporus* var. *oligosporus* tenyészeteket 37 °C hőmérsékleten inkubáltuk. A feltüntetett értékeket három párhuzamosan végzett kísérlet adataiból számítottuk; a hibaszávok az átlagtól való eltérést jelölik. Az egyes oszlopok feletti különböző betűk a Tukey-féle többszörös összehasonlító teszttel kombinált egyutas ANOVA vizsgálat szerinti szignifikáns különbségeket jelölik ($p < 0,05$).

Összességében az egyes gombák β -galaktozidáz aktivitása közötti különbségek jobban kimutathatók voltak SmF és SSF tenyésztésben, mint az X-gal tartalmú tápközegben. Mindhárom fermentációs rendszerben a *R. pusillus* mutatta a legnagyobb térfogati és specifikus aktivitás értéket, ugyanakkor figyelemre méltó aktivitáshozamok voltak SSF rendszerben a *Lichtheimia* izolátumoknál (3088-5793 U/mg fehérje), valamint búzakorpával kiegészített SmF tenyésztésben a *R. microsporus* var. *oligosporus*, *M. echinosphaera* és a két vizsgált *Umbelopsis* izolátumnál (675-1436 U/mg fehérje) is. Emellett mindkét *R. miehei*

törzs jó termelőnek bizonyult (kb. 7800 U/mg protein) a búzakorpa-alapú SSF rendszerben. A búzakorpa-alapú fermentációk eredményeit összehasonlítva látható, hogy a maximális enzimhozamok többségét SSF rendszerben értük el. Ugyanakkor a *M. echinosporea* és *R. miehei* SZMC 11014 kissé erősebb enzimaktivitást mutatott a búzakorpával kiegészített SmF közegben, mint SSF rendszerben. Az *Umbelopsis* gombák esetén is nagyobb térfogati aktivitást mértünk SmF tápközegben, mint szilárd fázison (SSF). Az SmF tápközegben és az SSF rendszerben kapott eltérő β -galaktozidáz aktivitásoknak több oka is lehet. Például az enzim rögzülhet a sejtfalhoz SmF környezetben, míg az SSF rendszerekben a tápközegbe szekretálódik, ahogy az tapasztalható egyéb gomba hidrolázoknál is (Oda és mtsai., 2006). Az alkalmazott termelési környezettől függően az enzim hőstabilitása is eltérő lehet (Mateos Diaz és mtsai., 2006). Emellett az SSF rendszerben való tenyésztés közel áll a fonalas gombák természetes növekedési feltételeihez, ahol a hidrolitikus enzimek expressziója általában jobban támogatott (Manan és Webb, 2018).

A búzakorpa tartalmú tápközegekben mért nagyobb β -galaktozidáz aktivitásért a búzakorpa fonalas gombák növekedését és extracelluláris enzimtermelését indukáló tulajdonsága is felelős lehet (Javed és mtsai., 2012). A búzakorpa β -galaktozidáz termelés hozamot fokozó tulajdonságát más fonalas gombáknál is leírták. Optimalizált enzimhozamokat értek el például *Aspergillus tubingensis* (15936 U/g szubsztrát; Raol és mtsai., 2015), *Penicillium canescens* (5292 U/g szubsztrát; Assamoi és mtsai., 2015) és *Trichoderma* sp. (2,67 U/g szubsztrát; De Jesus és Guimarães, 2021) gombáknál SSF rendszerekben. Búzakorpát tartalmazó SmF tápközegben *Trichoderma reesei* (25,43 U/ml; Adalberto és mtsai., 2006), *Aspergillus niger* (0,279-0,764 U/ml; Saburi és mtsai., 2014) és *Aspergillus flavus* (843,75 U/mg fehérje; Patel és mtsai., 2018) gombáknál mutattak ki nagy hozamú β -galaktozidáz termelést.

Járomspórás gombáknál eddig leginkább laktóz szubsztrátot alkalmazva vizsgálták a β -galaktozidáz termelést, ugyanakkor az enzimtermelés hozamok összevethetők az általunk elért enzimaktivitás adatokkal (lásd 3. táblázat és 4.A ábra). Búzakorpa-alapú SSF rendszerben a *Rhizomucor* enzimaktivitását tesztelték (3. táblázat); tudomásunk szerint azonban eddig nem végeztek olyan SmF tenyésztési vizsgálatokat, amelyekben laktózt és búzakorpát együtt alkalmaztak β -galaktozidáz induktorként. Összességében megállapítható, hogy a búzakorpa ideális szubsztrát a β -galaktozidáz termelés indukálására Mucoromycota gombák esetén is. Az általunk elért térfogati és specifikus aktivitás adatok (4.B és C ábra) jelentősek az eddig vizsgált Mucoromycota β -galaktozidázokhoz viszonyítva (3. táblázat).

Érdemes megemlíteni ugyanakkor, hogy a β -galaktozidáz aktivitás méréshez alkalmazott inkubációs hőmérséklet (50 °C) nem feltétlenül lehetett optimális körülmény minden enzimműködéshez, melyet a fermentációk után teszteltünk; azaz az egyes tenyésztett gombák eltérő hőmérsékleti optimummal rendelkező enzimeket is termelhettek. Mindazonáltal a *M. echinosphaera*, *U. longicollis* és *U. ramanniana* var. *angulispora* (növekedés 20 vagy 25 °C hőmérsékleten) gombák által adott β -galaktozidáz aktivitások többsége összevethető a többi vizsgált gombánál mért aktivitási adatokkal (növekedés 37 °C hőmérsékleten) (lásd 4. ábra).

5.3. Oligoszacharidok szintézise

A glikozidáz enzimek többsége transzglykozilációs reakciókon keresztül különböző oligoszacharidok szintézisére képes. Számos ilyen szacharid vegyület prebiotikus aktivitással jellemezhető, azaz pozitív hatással van az egészséges bélflórában jelen levő, egészségvédő hatású mikroorganizmusok növekedésére. β -Galaktozidázokkal laktóz-alapú GOS és laktulóz-eredetű OsLu cukor molekulák állíthatók elő. Munkánkban a *L. ramosa* és *R. pusillus* gombákból búzakorpa-alapú SSF tenyésztésben nyert, β -galaktozidáz aktivitással rendelkező kivonatok oligoszacharid szintetizáló képességét vizsgáltuk. A *L. ramosa* és *R. pusillus* izolátumokkal nagy β -galaktozidáz aktivitású kivonatokot kaptunk. Emellett a gombákkal ipari szempontól fontos biokatalizátorok állíthatók elő, ezért a termelt enzimek gyakorlati tulajdonságainak vizsgálata kiemelt jelentőségű (Papp és mtsai., 2016; Robledo és mtsai., 2016; Garcia és mtsai., 2018; De Andrade Silva és mtsai., 2020). A tesztekhez párhuzamos kísérletekben négyféle körülményt alkalmaztunk, melyek különböző vegyületeket tartalmaztak glikozil donorként és/vagy akceptorként. Laktóz, sovány tejpor, laktóz-fruktóz és *o*NPG-szukróz-alapú reakcióelegyet állítottunk össze, melyeket standard reakciókörülményen (50 °C, 12 óra) inkubáltunk a megfelelő enzimmal, vagy anélkül (kontroll). A kísérlet megkezdése előtt a β -galaktozidáz aktív nyers kivonatokot részlegesen tisztítottuk, melynek elsődleges célja a termékek kimutatását esetlegesen zavaró szacharidok és az egyéb komponensek eltávolítása volt. A gélszűréssel történt tisztítást követően *L. ramosa* és *R. pusillus* esetén rendre 6233 ± 139 U és 11954 ± 113 U β -galaktozidáz aktivitású fehérje elegyeket kaptunk. Az elegyek fehérje összetételét SDS-PAGE vizsgálattal ellenőriztük, ami komplex fehérjemintázatot tárt fel mind az *L. ramosa*, mind a *R. pusillus* nyers enzim esetében. A *L. ramosa* mintában 15 és 90 kDa, míg a *R. pusillus* mintában 27 és 90 kDa közötti molekulatömeg-tartományban azonosítottunk fehérjéket (Függelék, F1.

ábra). Az oligoszacharid szintézis vizsgálatokhoz összeállított egyes reakcióelegyekbe 2400 U β -galaktozidáz aktivitást vittünk be a részlegesen tisztított nyers kivonatokból. Az inkubációt követően HPLC-MS/MS módszerrel vizsgáltuk a keletkező oligoszacharidok minőségét és mennyiségét.

Az eredmények alapján a nyers *L. ramosa* és *R. pusillus* β -galaktozidázok rendelkeznek szintetikus aktivitással, ugyanis az analitikai vizsgálatban mindegyik reakcióelegynél azonosítottunk oligoszacharidokat. A kapott tri- és tetraszacharidok mennyiségét és az oligoszacharid hozamot az 5. táblázatban foglaltuk össze. A legnagyobb oligoszacharid koncentrációt az *o*NPG-szukróz kiindulási vegyületet tartalmazó reakcióelegy eredményezte. A *R. pusillus* nyers β -galaktozidáz teljes szintetikus kapacitása a *L. ramosa* enzim esetén tapasztaltnál nagyobbak bizonyult (5. táblázat).

A Mucoromycota β -galaktozidázok oligoszacharid szintézis képessége nagymértékben feltáratlan terület. Irodalmi adatok csak egy *Mucor* sp. enzimről érhetők el, amelyben a szerzők laktóz-fruktóz szubsztráton 2 g/l, míg laktóz-szukróz cukrokon 2,6 g/l GOS koncentrációt írtak le 20-30 órás inkubáció után (Silvério és mtsai., 2018). Az általunk vizsgált enzimeknél a különböző kiindulási cukrokon elért maximális oligoszacharid koncentráció 0,0158 és 2,236 g/l között változott 12 órás inkubációs idővel kivitelezett nem optimalizált reakciókörülményeken (5. táblázat).

5. táblázat. A *L. ramosa* és *R. pusillus* β -galaktozidáz kivonatokkal (~2400 U) különböző kiindulási cukrokon elért oligoszacharid koncentrációk és hozam.

Kiindulási anyagok	Alkalmazott nyers β -galaktozidáz	Oligoszacharid koncentráció (mg/l) ¹		Oligoszacharid hozam (%) ²
		Triszacharid	Tetraszacharid	
Laktóz	<i>L. ramosa</i>	129,5 \pm 10,7	34,5 \pm 1,1	0,11
	<i>R. pusillus</i>	197,2 \pm 2,5	60,4 \pm 3,8	0,17
Sovány tejpor	<i>L. ramosa</i>	14,4 \pm 0,5	1,4 \pm 0,03	0,032
	<i>R. pusillus</i>	20,1 \pm 0,02	2,62 \pm 0,02	0,047
Laktóz-fruktóz	<i>L. ramosa</i>	88,6 \pm 5,9	18,7 \pm 0,4	0,11
	<i>R. pusillus</i>	187,6 \pm 5,4	52,2 \pm 3,1	0,24
<i>o</i> NPG-szukróz	<i>L. ramosa</i>	856,5 \pm 16,5	48,1 \pm 2,1	0,91
	<i>R. pusillus</i>	2040,1 \pm 36,8	196,2 \pm 3,4	2,24

¹ A reakciókat 50 °C-on 12 órán át 15% (m/v) laktóz, 10% (m/v) sovány tejpor, 10% (m/v) laktóz+10% (m/v) fruktóz vagy 90 mM *o*NPG+10% (m/v) szukróz tartalmú nátrium-acetát pufferben (50 mM, pH 6,0) kiviteleztek. Az adatok három párhuzamosan végzett kísérleti rendszerből származnak; \pm , átlagtól való eltérés.

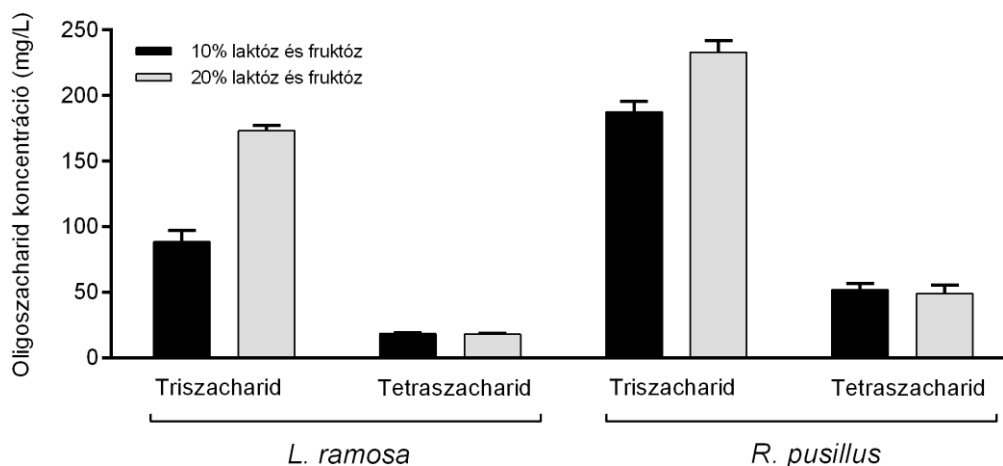
² Az oligoszacharid hozamot a 4.8. fejezetben leírt egyenlet alapján számítottuk.

A laktóz és sovány tejpor szubsztrátokon végzett oligoszacharid szintézis reakciókkal GOS vegyületek keletkezését, azaz a transzgalaktozidáz aktivitást elemeztük. Mivel a reakciókban tri- és tetraszacharid termékeket azonosítottunk (5. táblázat),

feltételezhető a *L. ramosa* és *R. pusillus* nyers β -galaktozidázok transzgalaktozilációs aktivitása. A sovány tejpor (48 g/l laktóz tartalom) tartalmú reakcióközeg 12 órán keresztül, 50 °C-on való inkubációját követően a *L. ramosa* és *R. pusillus* enzimek rendre 15,8 és 22,7 mg/l GOS hozamot eredményeztek. Amennyiben kiindulási anyagként 150 g/l laktózt alkalmaztunk és a reakciókörülmények azonosak voltak a sovány tejjel végzett mérésekkel, rendre 164 és 257,6 mg/l maximális GOS koncentrációt értünk el a *L. ramosa* és *R. pusillus* β -galaktozidázokra. A sovány tejjel elért kisebb oligoszacharid hozam annak laktóz tartalmával magyarázható. A sovány tejpor tartalmazhat olyan komponenseket is (pl. kationok), amelyek befolyásolhatják a β -galaktozidáz aktivitását a reakció alatt (Fischer és Kleinschmidt, 2018). A reakciók fő terméke triszacharid volt, hasonlóan Rodriguez-Colinas és mtsai. (2012) sovány tejpor és laktóz kiindulási szubsztrátokon *Bacillus circulans* β -galaktozidázzal (Biolactase) elért eredményekhez. A sovány tejpor szubsztráton megjelenő oligoszacharid hozam a *L. ramosa* és *R. pusillus* β -galaktozidázok GOS-dúsított tejtermékek tejjel előállítására való alkalmazhatóságát mutatja.

A vizsgált nyers β -galaktozidázokkal laktóz-fruktóz kiindulási szubsztrátokat (10%, m/v) tartalmazó elegyekben is végeztünk reakciókat, ahol a laktulóz és GOS szintézist vizsgáltuk. A laktulóz a probiotikumok növekedését szintén erősen támogató OsLu vegyületek felépítésében jelentős molekula. Ebben a rendszerben a fruktóz, mint galaktóz akceptor volt jelen és laktulóz diszacharidok keletkezését is vártuk. Az inkubációs idő után oligoszacharidok jelenlétét ugyan ki tudtuk mutatni, laktulóz megjelenését viszont nem tapasztaltuk az általunk alkalmazott reakciókörülményen. A teszteket 20% (m/v) kezdeti laktóz és fruktóz koncentrációnál is elvégeztük, de kimutatható laktulóz szintézist ebben a rendszerben sem tapasztaltunk. Fontos azonban megjegyezni, hogy a nagy-hozamú laktulóz szintézist eredményező eddigi tanulmányok a kísérletünkben alkalmazott kiindulási szubsztrát koncentrációknál még nagyobb donor/akceptor cukor mennyiséget vittek a reakcióelegybe (Hua és mtsai., 2010; Song és mtsai., 2013; Guerrero és mtsai., 2017; Aburto és mtsai., 2020). Kiindulási szubsztrátként 20% laktózt-fruktózt alkalmazva ugyanakkor rendre 2- és 1,2-szeres növekedést értünk el a keletkező triszacharid koncentrációban *L. ramosa* és *R. pusillus* nyers β -galaktozidázoknál, összehasonlítva a 10% kiindulási cukrot tartalmazó mintával (6. ábra). A keletkező tetraszacharidok koncentrációjában nem volt lényeges eltérés 10 és 20% kiindulási laktóz-fruktóz alkalmazásakor (6. ábra). A kezdeti cukor koncentráció növelése a képződő triszacharidok mennyiségében okozott csak növekedést. Különböző fruktooligoszacharid (FOS) vegyületek, azaz 1-kestóz és nisztóz esetleges megjelenését is követtük a reakcióelegyekben. Ilyen szacharidokat azonban nem

tudtunk azonosítani 10 és 20% kezdeti cukor mennyiség esetén sem, azaz a reakciók során keletkező tri- és tetraszacharidok valószínűleg a laktóz transzgalaktozilációjának termékei. Az általunk kivitelezett reakciókban a *R. pusillus* β -galaktozidáz több oligoszacharidot eredményezett, mint az *L. ramosa* enzim. Az utóbbi enzim esetében viszont a kezdeti szubsztrátkoncentrációtól való jelentős függést tapasztaltunk. A kezdeti cukor koncentráció és a keletkező GOS molekulák mennyisége közötti korrelációt számos más β -galaktozidáz esetében is megfigyelték. Ez a kapcsolat azonban enzimenként eltérő lehet, valamint a reakció paraméterei (pl. inkubációs hőmérséklet) is befolyásolhatják (Torres és mtsai., 2010; Vera és mtsai., 2016).



6. ábra. A *L. ramosa* és *R. pusillus* nyers β -galaktozidázokkal 10 és 20% (m/v) kiindulási cukor koncentráció mellett elért oligoszacharid koncentrációk összehasonlítása. A reakcióelegy laktóz és fruktóz kiindulási cukrokat tartalmazott. A reakciókat 2 ml végtérfogatban állítottuk össze, majd 50 °C hőmérsékleten 12 órán át inkubáltuk. A feltüntetett értékek három ismétlésből számított átlagok; a hibasávok az átlagtól való eltérést jelölik.

Intermolekuláris transzgalaktozidáz reakciókat is vizsgáltunk szukróz akceptor és *o*NPG galaktóz donor molekulákon. A kiindulási cukroknak ezen kombinációja is eredményezett tri- és tetraszacharidokat (5. táblázat). Az elegyben FOS vegyületeket mutattunk ki, ami különféle enzimaktivitások szimultán működését feltételezi a nyers enzimkivonatban. Az előállított reakcióelegyek 1-kesztóz (C18) és nisztóz (C24) FOS molekulákat tartalmaztak, *L. ramosa* esetén sorrendben $6,5 \pm 0,3$ és $28,2 \pm 1,1$ mg/l, míg *R. pusillus* esetén sorrendben $100,9 \pm 1,1$ és $114,2 \pm 1,7$ mg/l koncentrációkban. Járomspórás gombák esetében egyedül egy *Mucor* sp. izolátumnál vizsgáltuk eddig FOS szintézist, az általunk követett megközelítéshez hasonlóan nem optimalizált kísérletben. A laktóz-szukróz kiindulási cukrokon elvégzett tesztben nem figyeltek meg *Mucor* sp. általi FOS molekula

szintézist, ugyanakkor a kísérletbe bevont egyéb gomba enzimek (pl. *Aspergillus*, *Penicillium* és *Trametes*) esetén mutattak ki ilyen vegyületeket (Silvério és mtsai., 2018). A legtöbb esetben az 1-kesztőzt azonosították a kapott FOS hozam fő összetevőjeként. A kesztőz szintén egy fontos prebiotikum (Tochio és mtsai., 2018), és a β -fruktofuranozidáz vagy fruktoziltranszferáz enzimek transzfruktozilációs aktivitásával szintetizálható (Lorenzoni és mtsai., 2014; Veana és mtsai., 2018). Ennek megfelelően a vizsgálatunkban tisztított nyers β -galaktozidáz-aktív koktélok transzfruktozilációs aktivitással is rendelkezhetnek, amely felelős lehet az *o*NPG-szacharóz keverékkel végzett reakciókban megjelent FOS komponensekért. A nisztóz a transzfruktozilációs aktivitás gyakori indikátora (Lorenzoni és mtsai., 2014; Cunha és mtsai., 2019; Chaisuwan és mtsai., 2020), ezért e vegyület *o*NPG-szacharóz rendszerben való jelenléte szintén alátámasztja a reakció lezajlását. Mindazonáltal eredményeink mind a *L. ramosa*, mind a *R. pusillus* enzimkoktélok ígéretes transzfruktozilációs aktivitását mutatták, ami - habár az aktivitást az enzimkivonatokban nem vizsgáltuk - vélhetően a jelen lévő β -fruktofuranozidáz és/vagy fruktoziltranszferáz enzimeknek tulajdonítható. β -Fruktofuranozidáz vagy fruktoziltranszferáz aktivitásokat *Rhizopus stolonifer* (Lateef és mtsai., 2008), *Rhizopus delemar*, *Amylomyces rouxii* (Orikasa és Oda, 2013), *R. microsporus* (Orikasa és mtsai., 2018) és *M. circinelloides* (Ojwach és mtsai., 2020) járomspórás gombákban írtak már le.

Az *o*NPG-szukróz kiindulási cukrokkal összeállított reakcióelegyekben egy 503,3 tömeg/töltés arányú (*m/z*) triszacharid terméket is azonosítottunk. Ennek a vegyületnek a koncentrációja rendre $90,3 \pm 5,4$ és $199,3 \pm 12,7$ mg/l volt a *L. ramosa* és *R. pusillus* nyers β -galaktozidáz-aktív kivonatoknál. Ismert, hogy a transzfruktozilációs aktivitás kiindulási cukortól függő módon további FOS vegyületek szintézisét is katalizálhatja. Ilyen vegyület például a laktoszukróz (4^G - β -D-galaktozilszukróz; Chen és mtsai., 2020), amely bizonyos β -galaktozidázokkal is előállítható (Villamiel és mtsai., 2014; Duarte és mtsai., 2017; Liao és mtsai., 2017). Az analitikai vizsgálatokban megállapítottuk, hogy az *o*NPG-szukróz tartalmú reakcióelegyben azonosított triszacharid molekula retenciósideje és tömeg/töltés aránya a raffinóz molekulának megfelelő adatokkal megegyezik. A részletes elemzés folyamatban van, ugyanakkor nagyon valószínű, hogy a kapott triszacharid egy laktoszukróz, vagy egy izoraffinóz (6^G - β -D-galaktozilszukróz), vagy e két vegyület keveréke. Ezeket a molekulákat azonban nem tudtuk elválasztani a vizsgálatban használt HPLC-MS/MS technikával. Érdeemes viszont megemlíteni, hogy bizonyos tanulmányok szerint a gomba β -galaktozidázok nem képesek transzgalaktoziláció reakcióval laktoszukróz szintézisre (Cardoso és mtsai., 2017; Silvério és mtsai., 2018). Transzgalaktoziláció útján történő

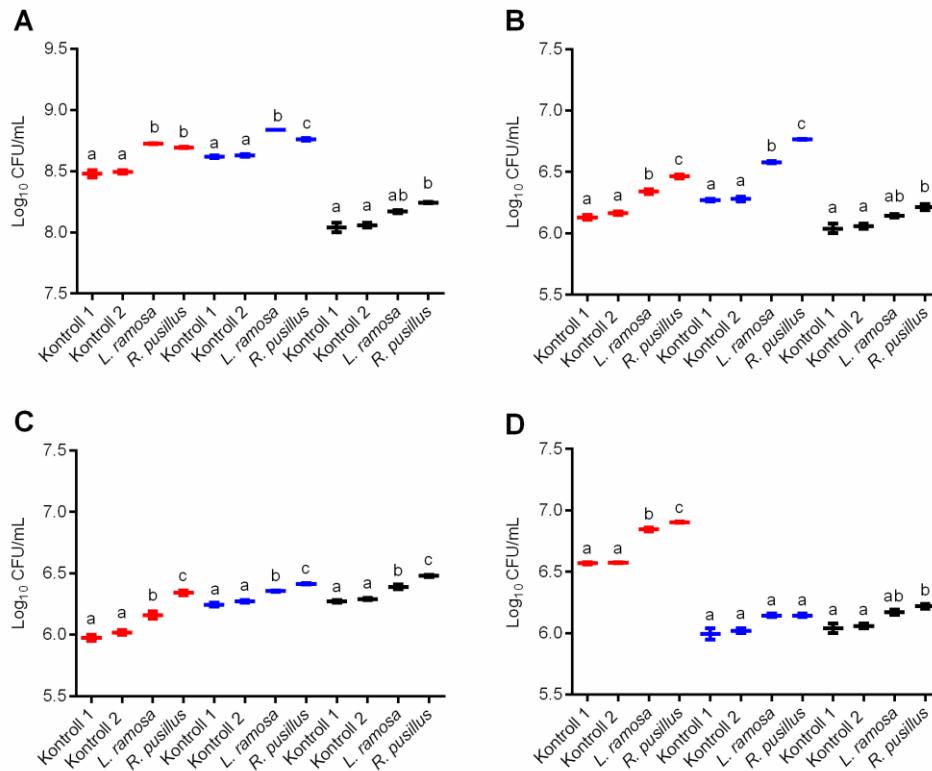
izoraffinóz szintézist Suyama és mtsai. (1986) írtak le *o*NPG-szukróz rendszerben, katalizátorként egy *Escherichia coli* baktériumból származó β -galaktozidázt alkalmazva. Végül, összehasonlítva a laktoszukróz szintézisben általánosan használt laktóz-szukróz-alapú rendszerekkel, a vizsgálatunkban alkalmazott *o*NPG-szukróz megközelítésekben a glükóz csak a szukrózból szabadulhat fel. Ezáltal a reakcióelegyben lévő alacsonyabb glükóz mennyiség csökkentheti annak gátló hatását a FOS szintézisért felelős karbohidráz aktivitásokra.

5.4. Szintetizált oligoszacharidok növekedést támogató hatása

A GOS és FOS molekulák prebiotikus cukrokként használhatók felnőtteknél és csecsemőknél egyaránt, elősegítve a jótékony hatású bélflóra aktivitását (Davani-Davari és mtsai., 2019; Verkhnyatskaya és mtsai., 2019). Ezzel összefüggésben megvizsgáltuk a *L. ramosa* és *R. pusillus* nyers β -galaktozidázokkal előállított és oligoszacharidban dúsított elegyek hatását kiválasztott probiotikus mikroorganizmusok növekedésére. A kísérletben a *L. casei*, *L. acidophilus* LA-5, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 és *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 CFU adatait elemeztük laktóz-fruktóz, sovány tejpor és laktóz kiindulási szacharidokat tartalmazó reakcióelegyek jelenlétében és hiányában. A tesztbe bevont mikroorganizmusok az emésztőrendszer egészségét támogató táplálékkiegészítő készítmények gyakori alkotói; számos, az emberi egészségre előnyös tulajdonsággal rendelkeznek (Sheikhi és mtsai., 2016; Szajewska és mtsai., 2016; Hill és mtsai., 2018), beleértve kórokozók (pl. *Candida* spp., *Helicobacter pylori*, *Clostridium difficile*, *Borellia* spp., *Treponema* spp., *Spirillum* spp., parodontális betegségeket okozó baktériumok) elleni hatást is (Silva és mtsai., 2016; Invernici és mtsai., 2020; Pais és mtsai., 2020). A glikozil donorként *o*NPG vegyületet tartalmazó reakcióelegyet a felszabaduló *o*-nitrofenol lehetséges növekedésgátló hatása miatt kizártuk a kísérletből. A kapott telepszámot reakcióelegy nélkül (Kontroll 1) és a megfelelő kiindulási cukrokat tartalmazó enzimmentes mintával (Kontroll 2) inkubált tenyészetek telepszám adataival vetettük össze. Kontroll mintát minden egyes tenyésztési rendszerhez külön készítettünk. A 24 órás inkubáció után nem tapasztaltunk jelentős eltérést a Kontroll 1 és Kontroll 2 telepszámai között (7.A-D ábrák), ami azt jelenti, hogy az enzim nélküli reakcióelegyekben található kiindulási cukrok egyike sem volt hatással a kiválasztott mikroorganizmusok növekedésére.

A megfelelő kontroll adatokkal való összehasonlítás alapján megállapítható, hogy a legtöbb tesztben az oligoszacharid dúsított minták stimulálták a baktériumok növekedését.

L. casei esetén például 1,02-1,03-szoros CFU-növekedést mutatott a telepszám-elemzés az enzimmel kezelt mintákkal végzett inkubáció után ($p<0,05$) (7.A ábra). A *L. casei* baktériumra a legnagyobb növekedést elősegítő hatást a laktóz-fruktóz kiindulási cukrokon nyert oligoszacharid-tartalmú mintáknál tapasztaltuk. Az oligoszacharid-dús eleggyel kezelt tenyészetekben 8,73 log CFU/ml volt a telepszám, ami a kontrolloknál körülbelül 8,48 log CFU/ml értéknek bizonyult (7.A ábra).



7. ábra. Oligoszacharid-dúsított elegyek *L. casei* (A), *L. acidophilus* LA-5 (B), *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 (C) és *S. boulardii* CNCM I-745 (D) probiotikus mikroorganizmusok növekedésére gyakorolt hatása. Az elegyek *L. ramosa* és *R. pusillus* gombákból származó részlegesen tisztított β -galaktozidáz aktív koktélokkal készültek laktóz-fruktóz (piros), sovány tejpor (kék) vagy laktóz (fekete) kiindulási cukor szubsztrátokon. Kontroll 1: oligoszacharid dúsított elegy nélkül inkubált tenyészet telepszáma. Kontroll 2: enzimentes reakcióelegy jelenlétében inkubált tenyészet telepszáma. A feltüntetett értékek három ismétlésből számított átlagok; a hibásávok az átlagtól való eltérést jelölik. Az eltérő betűk a kontroll minták és a megfelelő kezelések közötti szignifikáns különbségeket jelölik (egyutas ANOVA, Tukey-féle többszörös összehasonlító teszt, $p<0,05$).

L. acidophilus esetén a kiindulási cukorforrásként sovány tejpport tartalmazó enzimkezelt mintáknál tapasztaltuk a legnagyobb telepszám növekedés a kontrollhoz képest (1,08-szoros; 6,28 log CFU/ml-ről 6,77 log CFU/ml-re; $p<0,05$) (7.B ábra). A *L. ramosa* vagy *R. pusillus* β -galaktozidáz-aktív enzimkivonatokkal kezelt laktóz-fruktóz keverék

rendszerek, valamint a *R. pusillus* enzimmel kiegészített laktóz-alapú oldat ugyancsak szignifikánsan támogatták a *L. acidophilus* növekedését ($p < 0,05$). A *B. animalis* subsp. *lactis* telepszámát minden enzimtartalmú minta szignifikánsan ($p < 0,05$) növelte a kontrollokhöz képest (7.C ábra). A *S. boulardii* növekedését a sovány tejporon előállított GOS-dús elegy hozzáadása nem befolyásolta a kontroll mintákkal összehasonlítva (7.D ábra). Telepszám növekedést tapasztaltuk viszont laktóz vagy laktóz-fruktóz kiindulási cukrokat tartalmazó enzimkezelt minták tenyésztési környezetben való jelenlétekor (7.D ábra). A vizsgált reakcióelegyek közül a *R. pusillus* nyers β -galaktozidázzal laktóz-fruktóz kiindulási cukrokon előállított oligoszacharid elegynél tapasztaltuk a legnagyobb *S. boulardii* növekedést támogató aktivitást (6,57 log CFU/ml-ről 6,91 log CFU/ml-re; $p < 0,05$) (7.D ábra).

Megvizsgáltuk a telepszám adatok és az egyes szacharid szintézis tesztekben keletkező tri- és tetraszacharid koncentrációk (lásd 5.3. fejezet) közötti kapcsolatot is. Az elemzés során korrelációt azonosítottunk a reakcióelegyek növekedést-támogató aktivitása és a nyers β -galaktozidázokkal végzett reakciókban képződő tri- és tetraszacharid molekulák mennyisége között. *L. acidophilus* és *B. animalis* subsp. *lactis* esetében a mintákban található mindkét típusú vizsgált oligoszacharidra erősen pozitív korrelációt ($r > 0,900$) figyeltünk meg (6. táblázat). Hasonló összefüggést ($r > 0,900$) figyeltünk meg a laktózon nyert tri- és tetraszacharid mennyiségek vonatkozásában *L. casei* és *S. boulardii* probiotikumoknál, valamint a *S. boulardii* esetén sovány tejpor és laktóz-fruktóz kiindulási anyagokon keletkező triszacharid tartalomra. Emellett egyes vizsgált változók pozitív ($0,800 < r < 0,900$) és mérsékelt ($0,600 < r < 0,800$) összefüggését azonosítottuk *S. boulardii* és *L. casei* probiotikumok esetében (6. táblázat).

6. táblázat. A különböző probiotikumokkal szembeni növekedésserkentő aktivitás és az egyes kiindulási anyagokon végzett nyers β -galaktozidáz kezelések után elért tri- vagy tetraszacharid-tartalom közötti korrelációs koefficiensek (Pearson r).

Kiindulási anyagok	<i>L. casei</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>S. boulardii</i>
Laktóz				
Triszacharid	0,991	0,985	0,979	0,999
Tetraszacharid	0,998	0,999	0,999	0,988
Sovány tejpor				
Triszacharid	0,791	0,995	0,994	0,961
Tetraszacharid	0,635	0,992	0,993	0,875
Laktóz-fruktóz				
Triszacharid	0,785	0,986	0,999	0,926
Tetraszacharid	0,698	0,957	0,989	0,869

A probiotikus mikroorganizmusok eltérően reagáltak az oligoszachariddal dúsított keverékekre. A legtöbb esetben azonban jelentős növekedést támogató hatást sikerült kimutatni, ami prebiotikus aktivitású oligoszacharidok képződését mutatja a kialakított reakciórendszerekben. A probiotikumokra mutatott hatás (7. ábra) ugyanakkor nem függött a különféle reakciórendszerek oligoszacharid-tartalmától (5. táblázat). A *S. boulardii* élesztőt kivéve például a sovány tejpor-alapú reakcióközeg növekedést támogató hatása hasonló volt a laktóz-fruktóz és laktóz rendszereknél tapasztaltnak. A sovány tejpor Oh és mtsai. (2019) munkájában is kiváló kiindulási cukorforrásnak bizonyult prebiotikus oligoszacharidok enzimátikus (Maxilact β -galaktozidáz koktél) előállítására. A *R. pusillus* enzimkoktéllal készített reakcióelegyek általában nagyobb telepszámot eredményeztek, mint a *L. ramosa* minták. Az ezzel összefüggésben végzett korreláció analízis kapcsolatot tárt fel a növekedést támogató aktivitás és egy adott minta oligoszacharid-tartalma között. Azaz minél nagyobb volt egy reakcióminta oligoszacharid-tartalma az enzimkezelés után, annál jobbnak bizonyult a vizsgálatainkba bevont probiotikus mikroorganizmusok szaporodása. Ez azt feltételezi, hogy a képződött oligoszacharidok felelősek a minták növekedést támogató aktivitásáért. A keletkező oligoszacharidok prebiotikus aktivitását ugyanakkor vizsgálataink nem feltétlenül támasztják alá. Ennek bizonyítására a keletkező oligoszacharidok tisztítása és a tenyésztésekben egyedüli szénforrásként történő felhasználása szükséges jövőbeli vizsgálatokban. A hatásvizsgálatokat ezen kívül érdemes kiterjeszteni normál emésztőrendszeri és élelmiszer-eredetű patogén mikroorganizmusok bevonására is.

5.5. β -Galaktozidáz enzimek izolálása

Gombák által termelt β -galaktozidázok fermentumból történő tisztításáról és jellemzéséről már számos irodalmi adat érhető el, azonban a járomspórás gombacsoportra vonatkozóan korlátozottak az ismereteink e tekintetben; tudomásunk szerint eddig egy *M. pusillus* (Ismail és mtsai., 1997) és egy *Rhizomucor* sp. (Shaikh és mtsai., 1999) izolátumból tisztítottak és jellemeztek enzimeket. β -Galaktozidázok izolálására és egyes biokémiai tulajdonságainak feltárására irányuló kutatásainkhoz a *L. ramosa* SZMC 11360 és a *R. pusillus* SZMC 11025 törzseket választottuk, mivel e gombákra kiemelkedő β -galaktozidáz aktivitást azonosítottunk, részlegesen tisztított fermentumaikkal pedig nagy hozamban szintetizálthatók probiotikus növekedést támogató oligoszacharidok.

Előzetes kísérleteinkben a búzakorpa hatékony tenyésztési szubsztrátnak bizonyult nagy mennyiségű β -galaktozidáz termeléshez (lásd 5.2. fejezet). A lehető legnagyobb tisztítási kihozatal érdekében ezért búzakorpa-alapú SSF rendszert alkalmaztunk az enzimtermelés indukálásához. Az SSF tenyésztést hét napig végeztük, majd a tisztítási folyamatot a fermentumból történő nátrium-acetát pufferes nyers kivonat elkészítésével kezdtük meg. A kivonat szűrése és centrifugálása után ammónium-szulfáttal történő fracionált kisózást végeztünk a szűrlet 50, 65, majd 85%-os telítettségi szintjének eléréséig. A kisózást követően mindkét izolátum esetében a 65-85% kisózási tartományból származó csapadékban mértük a legnagyobb β -galaktozidáz aktivitást, így a további tisztítást ebből a frakcióból végeztük. Az enzim tisztítására méretkizárásos és ioncserélő kromatográfiai módszereket kombináltunk. A gélszűrést (Bio-Gel P-6 Desalting Cartridge, Bio-Rad) követően anioncserélő kromatográfia (Macro-Prep High Q, 12,6 x 40 mm, Bio-Rad), majd polírozó lépésként méretkizárásos kromatográfia (Sephacryl S-200HR, 16 x 60 mm, 5-250 kDa, GE Healthcare) technikákat alkalmaztunk. A tisztítás megkezdése előtt, illetve minden tisztítási lépést követően elvégeztük a minták fehérjekoncentrációjának és enzimaktivitásának meghatározását.

A nyers kivonatokban, a csapadékokban és a felülúszókban kimutatott β -galaktozidáz aktivitás értékeit és a tisztítás egyéb adatait a 7. és 8. táblázatok részletezik. A *L. ramosa* és a *R. pusillus* β -galaktozidázoknál rendre 25,59 és 49,87-szeres tisztulást értük el 1,33% és 4,07% kihozatal mellett. Korábbi tanulmányokban leírt gomba β -galaktozidázok aktivitásával összevetve (5,84 U/mg-56 U/mg; Ismail és mtsai., 1997; Nagy és mtsai., 2001; Seyis és Aksoz, 2004; Silvério és mtsai., 2018) a *L. ramosa* és *R. pusillus* enzim kiemelkedő specifikus aktivitását mutattuk ki (537314,9 U/mg és 4029345,6 U/mg) a tisztítási lépéseket követően (7. és 8. táblázatok).

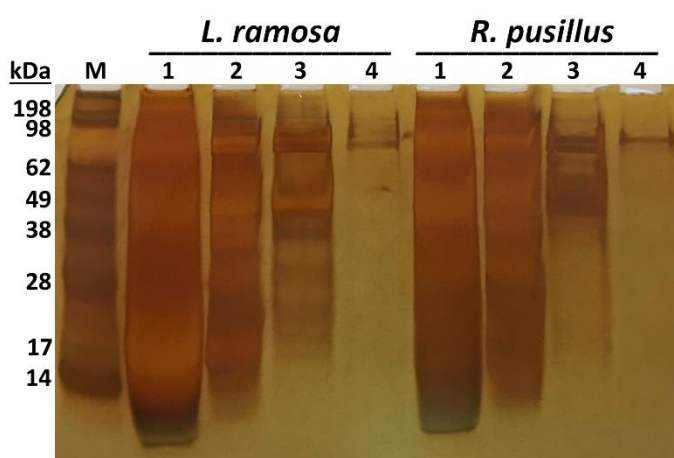
7. táblázat. A *L. ramosa* SZMC 11360 izolátumból származó extracelluláris β -galaktozidáz aktivitás tisztításának eredményei.

	Térfogat (ml)	Fehérje (mg/ml)	Összfehérje (mg)	Térfogati aktivitás ($\mu\text{mol/ml/perc}$)	Összaktivitás ($\mu\text{mol/perc}$)	Specifikus aktivitás (U/ mg)	Tisztulás mértéke	Hozam (%)
Nyers kivonat	452	0,786	353,7	16504,8	7427159,9	20998,5	1	100
Ammónium- szulfát (65- 85%)	5	4,34	21,7	82643,9	413219,6	19042,4	0,91	5,56
Bio-Gel P-6	10	0,454	4,5	37560,8	375608,5	82733,1	3,94	5,06
Macro-Prep HQ	6	0,131	0,8	19267,5	115604,8	147079,9	7,00	1,56
Sephacryl S200HR	6	0,0306	0,2	16441,8	98651,0	537314,9	25,59	1,33

8. táblázat. A *R. pusillus* SZMC 11025 izolátumból származó extracelluláris β -galaktozidáz aktivitás tisztításának eredményei.

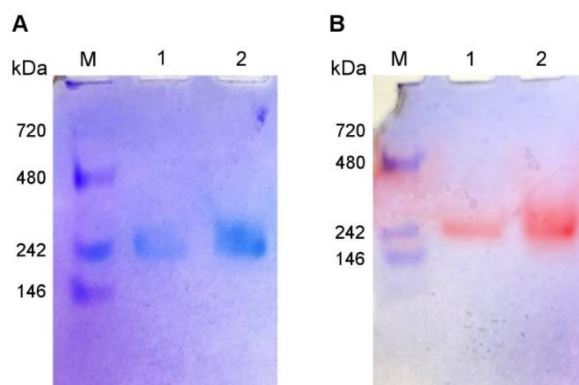
	Térfogat (ml)	Fehérje (mg/ml)	Összfehérje (mg)	Térfogati aktivitás ($\mu\text{mol/ml/perc}$)	Összaktivitás ($\mu\text{mol/perc}$)	Specifikus aktivitás (U/ mg)	Tisztulás mértéke	Hozam (%)
Nyers kivonat	450	0,736	331,2	59469,9	26761464,4	80801,5	1	100
Ammónium- szulfát (65- 85%)	5	4,98	24,9	427331,9	2136659,3	85809,6	1,06	7,98
Bio-Gel P-6	10	0,486	4,9	172185,6	1721856,3	354291,4	4,38	6,43
Macro-Prep HQ	6	0,1674	1,0	210867,1	1265202,8	1259660,3	15,59	4,73
Sephacryl S200HR	6	0,045	0,3	181320,6	1087923,3	4029345,6	49,87	4,07

A nyers kivonatokban és az egyes tisztítási lépések során nyert legnagyobb enzimaktivitású frakciókban található fehérjéket SDS-PAGE segítségével választottuk el, követve a β -galaktozidáz aktivitást mutató fehérjék tisztulását (8. ábra). A méretkizárásos kromatográfia utáni legnagyobb aktivitású frakciók zimográfiai analízisét is elvégeztük nem denaturáló körülmények között (natív-PAGE); az aktivitást X-gal és 6-bromo-2-naftil β -D-galaktopiranozid kromogén szubsztrátokkal jelenítettük meg (9. ábra). A denaturáló gélelektroforézis és az ezüsfestés után 90 kDa körülként állapítottuk meg a tisztított enzimek molekulatömegét (8. ábra). Martarello és mtsai. (2019) hozzávetőlegesen 76 kDa molekulatömegűnek határozták meg a tisztított *A. niger* β -galaktozidázát.



8. ábra. A *L. ramosa* és *R. pusillus* β -galaktozidázok tisztulása denaturáló gélelektroforézissel követve. SeeBlue Plus2 Prestained Standard, Invitrogen (M), Nyers kivonat (1), P6 géliszűrést követő minta (2), Macro-Prep HQ anioncserélő után (3), Sephacryl S-200HR után (4).

A natív-PAGE zimográfia mindkét vizsgált gombatorzs β -galaktozidáz aktív fehérjeje esetén körülbelül 242 kDa natív molekulaméretet mutatott (9. ábra).



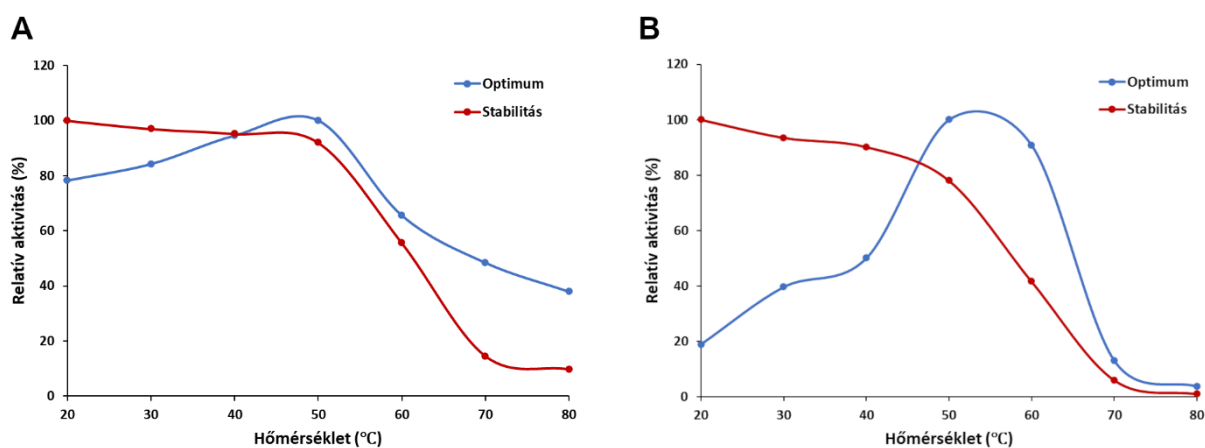
9. ábra. A tisztított β -galaktozidáz enzimek zimográfiai vizsgálata natív gélen X-gal (A) és 6-bromo-2-naftil β -D-galaktopiranozid szubsztráttal (B) történő festéssel. NativeMark Unstained Protein Standard, Invitrogen (M), *L. ramosa* enzim (1), *R. pusillus* enzim (2).

A Shaikh és mtsai. (1999) által egy *Rhizomucor* sp. izolátumból nyert β -galaktozidáz natív molekulamérete ugyancsak 250 kDa értéknek bizonyult. A tisztítást követően megvizsgáltuk a *L. ramosa* és *R. pusillus* járomspórás gomba β -galaktozidázok néhány biokémiai jellemzőjét.

5.6. A tisztított β -galaktozidázok biokémiai jellemzése

5.6.1. A hőmérséklet optimum és stabilitás vizsgálata

A *L. ramosa* β -galaktozidáz aktivitásának hőmérséklet optimumát 50 °C körül állapítottuk meg (10.A ábra). Az enzimműködéshez optimális hőmérséklet eléréséig fokozatos növekedés figyelhető meg a relatív aktivitásban, sőt 60 és 70 °C hőmérsékleteken is az aktivitásának legalább 50%-át mutatta az enzim. *L. ramosa* β -galaktozidáz működésének hőmérsékleti profilját eddig még nem vizsgálták, ugyanakkor egy részlegesen tisztított *A. niger* enzim aktivitásának hőmérséklet optimumát szintén 50 °C-on állapították meg (Martarello és mtsai., 2019). A *L. ramosa* β -galaktozidáz 50 °C hőmérsékletig aktivitásának legalább 90%-át megőrizte a négy órás inkubáció alatt, ami az enzim nagyfokú stabilitását mutatja a működéshez optimális hőmérsékleten (10.A ábra). 60 °C hőmérsékleten aktivitásának több, mint a felét, míg 70 és 80 °C hőmérsékleteken rendre 15 és 10%-át mutatta az enzim a stabilitási tesztekben.



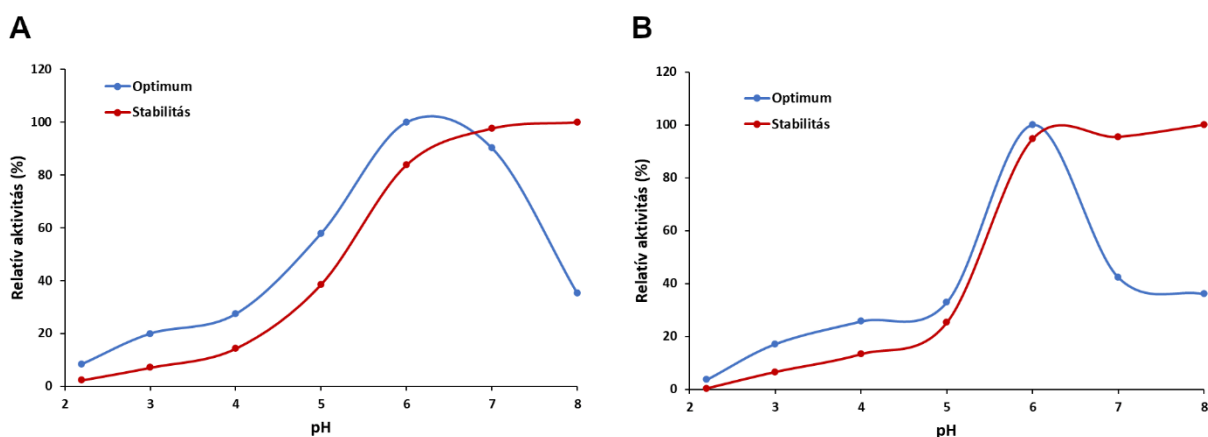
10. ábra. A *L. ramosa* SZMC 11360 (A) és *R. pusillus* SZMC 11025 (B) extracelluláris β -galaktozidázok hidrolitikus aktivitásának hőmérséklet optimuma és stabilitása. A relatív aktivitás az enzimműködés optimális hőmérsékletén 30 perc inkubációt követően mért aktivitáshoz (100%) viszonyított adat. A feltüntetett adatok kettő párhuzamos mérés átlagai.

A *R. pusillus* izolátum által termelt β -galaktozidáz enzim működésének hőmérsékleti optimumát 55 °C körül határoztuk meg (10.B ábra). Az általunk kapott eredmények alapján a *R. pusillus* β -galaktozidáz aktivitás az optimum 50%-át mutatta 40 °C hőmérsékleten történő inkubációt követően, majd a relatív aktivitás markáns növekedése figyelhető meg az aktivitásnak optimális hőmérsékletig (55 °C) (10.B ábra). A *L. ramosa* β -galaktozidázához hasonló hőmérséklet stabilitási profilt állapítottunk meg *R. pusillus* enzim esetén is, azaz 50 °C hőmérséklet felett már jelentős aktivitás csökkenést tapasztaltunk négy óra inkubációt követően (10.B ábra). A Shaikh és mtsai. (1997, 1999) által jellemzett *Rhizomucor* sp. β -galaktozidáz aktivitásának hőmérséklet optimuma 60 °C volt. A részlegesen tisztított enzim 50 percig maradt stabil ezen a hőmérsékleten, illetve 120 perc elteltével az eredeti aktivitás 67%-át figyelték meg. Magasabb hőmérsékleten (70 °C) már 60 perc inkubációt követően is a relatív aktivitásának mindössze 20%-át őrizte meg az enzim (Shaikh és mtsai., 1997). Tovább tisztítva az enzimet 60 °C hőmérsékleten négy órán át történő stabilitást mutattak ki, valamint az enzim aktivitása 2,5 óra elteltével csökkent 50%-ra 70 °C hőmérsékleten (Shaikh és mtsai., 1999). Az Ismail és mtsai. (1997) által tisztított *M. pusillus* β -galaktozidáz esetén 65 °C hőmérsékleten állapították meg az enzimműködés hőmérsékleti optimumát; 75 °C-on még maximális aktivitásának 79%-át mutatta az enzim. Negyedórás 65 °C hőmérsékleten történő inkubációt követően az enzim aktivitásának mindössze 5%-át veszítette, majd markáns csökkenés után az aktivitás 95%-a elveszett 75 °C hőmérsékletnél (Ismail és mtsai., 1997). Az általunk vizsgált *R. pusillus* β -galaktozidáz ugyanakkor aktivitásának 42%-át mutatta 60 °C hőmérsékleten az alkalmazott négy óra inkubációt követően. Az enzimek hőstabilitásának fokozására számos módszer ismert. Ilyen eljárás például az enzim szilárd hordozóhoz való rögzítése, vagy mátrixba zárása. Elterjedt immobilizálási stratégia az enzimfehérjék adszorpciója, kovalens kötése, kereszt kötése különféle hordozó anyagokkal, például üveggyöngyökkel, agarózzal, anioncserélő gyantával (Lu és mtsai., 2020). Enzim-hordozó komplexekkel az ipari léptékű szintézis gazdaságosabbá tehető, mivel az enzimek ismételten felhasználhatók, stabilitásuk nagyobb és a termékek könnyebben elválaszthatók a biokatalizátortól (Sen és mtsai., 2012; Lu és mtsai., 2020).

5.6.2. A pH optimum és stabilitás vizsgálata

A *L. ramosa* és *R. pusillus* β -galaktozidáz aktivitások esetén egyaránt pH 6,0 körüli működési optimumot azonosítottunk (11. ábra). Az eddig vizsgált járomspórás gomba β -galaktozidázoknál a tisztított *Rhizomucor* sp. aktivitásra pH 4,5 (Shaikh és mtsai., 1999),

míg a *M. pusillus* enzimre pH 4,0 (Ismail és mtsai., 1997) optimumot írtak le. A legtöbb gomba β -galaktozidáz működésének pH optimuma a pH 4,0-6,0 tartományban található (Nath és mtsai., 2014). A *L. ramosa* enzim pH optimum vizsgálatakor pH 3,0 és 4,0 között 20-35% maradék aktivitást figyeltünk meg, majd egyenletes növekedést tapasztaltunk az optimum érték eléréséig (11.A ábra). A *R. pusillus* β -galaktozidáz relatív aktivitása pH 4,0-5,0 tartományban 25-32% körül volt, ezt követően meredek emelkedést tapasztaltunk pH 6,0 értékig (11.B ábra). A két vizsgált enzim közül a *L. ramosa* β -galaktozidáz aktivitása rendelkezett szélesebb pH optimummal; az aktivitás 58%-a volt azonosítható pH 5,0 körülményen való inkubációt követően, míg pH 7,0 reakciókörnyezetben 90% relatív aktivitást mértünk (11.A ábra). A *R. pusillus* enzim mindössze 32 és 42% relatív aktivitást mutatott pH 5,0 és 7,0 körülményeken (11.B ábra).



11. ábra. A *L. ramosa* SZMC 11360 (A) és *R. pusillus* SZMC 11025 (B) extracelluláris β -galaktozidázok hidrolitikus aktivitásának pH optimuma és stabilitása. A relatív aktivitás az enzimműködéshez optimális hőmérséklet és pH körülményen 30 perc inkubációt követően mért aktivitáshoz (100%) viszonyított adat. A feltüntetett adatok kettő párhuzamos mérés átlagai.

A *L. ramosa* és *R. pusillus* β -galaktozidázok pH 6,0 feletti inkubációs körülményeken nagymértékű stabilitást mutattak, előbbi enzimnél több, mint 80%, míg az utóbbi esetén több, mint 90% relatív aktivitással (11. ábra). Shaikh és mtsai. (1997, 1999) pH 3,5-7,5 tartományban jellemezték a legnagyobb stabilitással a *Rhizomucor* sp. β -galaktozidázát 24 óra előinkubációt követően. A tisztított *M. pusillus* β -galaktozidáz pH 3,5 feletti reakciókörnyezetben mutatott 80%-nál nagyobb relatív aktivitást 15 perc előinkubációt alkalmazva (Ismail és mtsai., 1997). Az általunk vizsgált gombák β -galaktozidázai kevésbé voltak stabilak savas környezetben (pH 2,2-5,0), aktivitásuknak 0,3-38%-át őrizték meg átlagosan 24 órás előinkubációt követően (11. ábra). A pH 3,0 alatti erőteljes relatív aktivitás csökkenés konformációs instabilitásnak tudható be ebben a pH-tartományban (Ismail és

mtsai., 1997). A pH 4,0-5,0 érték körüli inkubáció alatt tapasztalt aktivitás csökkenés a savanyú környezet enzimeiben lévő katalitikus csoportok ionizációjára gyakorolt hatásának tulajdonítható (Ismail és mtsai., 1997). Viszont érdemes megemlíteni, hogy az *L. ramosa* és *R. pusillus* β -galaktozidázok viszonylagos toleranciával rendelkeznek a környezet enyhén savanyú kémhatásával (pH 4,0-5,0) szemben (11. ábra), melynek köszönhetően potenciálisan felhasználhatók tejsavó, illetve tejcukor hidrolízisére ipari folyamatok során (Shaikh és mtsai., 1999; De Jesus és Guimarães, 2021).

5.6.3. Szubsztrátspecifitás meghatározás

A tisztított *L. ramosa* és *R. pusillus* β -galaktozidázok szubsztrátspecifitását többféle kromogén szubsztrát hidrolízisével vizsgáltuk. A szubsztrátokat 0,7 mM koncentrációban alkalmaztuk a reakcióelegyekben. Kísérleteinkben mindkét enzim hatékonyabban hidrolizálta a *p*NPG szubsztrátot az *o*NPG szubsztráthoz viszonyítva. Az *o*NPG szubsztrátra alacsony affinitást azonosítottak egy *A. niger* törzsből származó β -galaktozidáz esetén is (O'Connell és Walsh, 2010). A *p*NPG ugyancsak kiváló szubsztrát a β -galaktozidáz aktivitás kimutatására (O'Connell és Walsh, 2007; Carneiro és mtsai., 2018), így az adatok elemzésében a *p*NPG alkalmazásánál kapott optikai denzitás értéket tekintettük 100%-nak. Az eddig vizsgált járomspórás gomba β -galaktozidázok az *o*NPG mellett szintén hatékonyan bontották a *p*NPG szubsztrátot is (Ismail és mtsai., 1997; Saikh és mtsai., 1997, 1999); ráadásul Saikh és mtsai. (1997) nagyobb szubsztrát preferenciát írtak le *p*NPG szubsztrátra *Rhizomucor* sp. enzim esetében.

9. táblázat. Különböző aril-glikozidok hidrolízisének mértéke a tisztított *L. ramosa* és *R. pusillus* β -galaktozidázokkal.

Szubsztrát	Kötés típusa	Hidrolízis mértéke (%)	
		<i>L. ramosa</i>	<i>R. pusillus</i>
<i>p</i> -nitrofenil- β -D-galaktopiranozid	β -galaktozid	100	100
<i>o</i> -nitrofenil- β -D-galaktopiranozid	β -galaktozid	22	24
<i>p</i> -nitrofenil- α -D-galaktopiranozid	α -galaktozid	81	86
<i>p</i> -nitrofenil- β -D-glükopiranozid	β -glükózid	27	24
<i>o</i> -nitrofenil- β -D-glükopiranozid	β -glükózid	9	6
<i>p</i> -nitrofenil- α -D-glükopiranozid	α -glükózid	3	2
<i>p</i> -nitrofenil- β -D-cellobiozid	β -glükózid	3	1
<i>p</i> -nitrofenil- α -D-mannopiranozid	α -mannozid	3	1
<i>p</i> -nitrofenil- β -D-xilopiranozid	β -xilozid	6	1

Mindkét vizsgált β -galaktozidáz széles szubsztrátspecifitást mutatott kísérleteinkben. A β -galaktozidáz aktivitásokra alkalmazott szubsztrátok mellett kiemelkedő bontást figyeltünk meg *p*-nitrofenil- α -D-galaktopiranozid szubsztráton, továbbá a *p*NPG kontroll aktivitásának 27%-a (*L. ramosa* enzim) és 24%-a (*R. pusillus* enzim) volt megfigyelhető a *p*-nitrofenil- β -D-glükopiranozid szubsztrát esetén (9. táblázat).

Vidya és mtsai. (2020b) egy *Aspergillus awamori* galaktozidáz vizsgálatakor ugyancsak széles szubsztrátspecifitást figyeltek meg, az enzimre jellemzően kiemelkedő α - és β -galaktozidáz aktivitással. Az O'Connell és Walsh (2010) által tanulmányozott *A. niger* β -galaktozidáz szintén erős affinitást mutatott az α -galaktozid kötést tartalmazó aril szubsztrát felé. α -Galaktozidáz aktivitást ezen kívül más *Aspergillus* β -galaktozidáznál is dokumentáltak (Sykes és mtsai., 1983). A többi vizsgált α - és β -glükózid, α -mannozid és β -xilozid kötést tartalmazó szubsztrátokat kis hatékonysággal bontották az általunk tesztelt enzimek (9. táblázat).

5.7. *Lichtheimia ramosa* β -galaktozidáz kódoló gének azonosítása

Vizsgálataink során a *L. ramosa* SZMC 11360 izolátum kiváló β -galaktozidáz termelőnek bizonyult, ezért az enzim tisztításával és jellemzésével párhuzamosan célul tűztük ki a *L. ramosa* genomjában található β -galaktozidáz enzimeket kódoló gének azonosítását és kifejeződésének vizsgálatát különböző tenyésztési körülmények mellett.

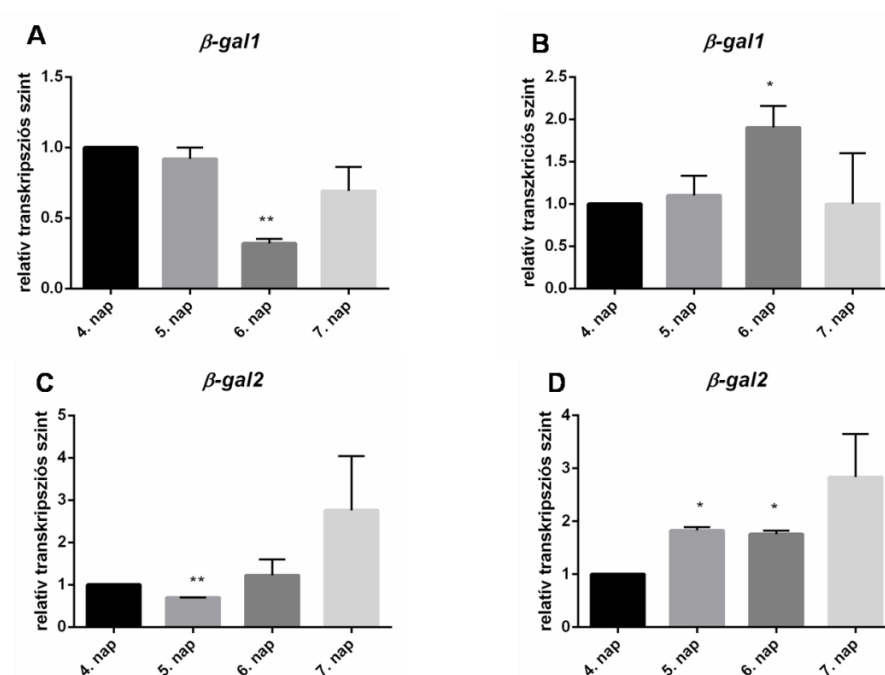
A *L. ramosa* teljes genomjának meghatározása 2014-ben fejeződött be (<https://mycocosm.jgi.doe.gov/Licra1/Licra1.home.html>), ami nagymértékben elősegítette az egyes gének keresését és azonosítását. Munkánk elején a már előzetesen azonosított *Trichoderma atroviride* β -galaktozidáz (XP_013945605.1, Kubicek és mtsai., 2011) aminosav szekvenciájával homológ szekvencia keresést hajtottunk végre a *Lichtheimia* genom adatbázisban. Két olyan aminosav szekvencia szakaszt azonosítottunk (β Gal1 és β Gal2), melyek nagyfokú hasonlóságot mutattak a *Trichoderma* β -galaktozidáz aminosav szekvenciával. A feltételezett β -galaktozidáz fehérjék legfontosabb jellemzőit a 10. táblázat tartalmazza. A feltételezett β -galaktozidáz fehérjék méretükben, aminosav hosszúságukban és izoelektromos pontjukban is különböznek. Mind a két fehérjében azonosítottuk a glikozid hidroláz 35 családra jellemző domént (PF01301).

10. táblázat. A *L. ramosa* genom adatbázisban azonosított feltételezett β -galaktozidáz fehérjék fontosabb tulajdonságai.

Jellemzők	β Gal1	β Gal2
Protein ID	48	6150
Genomi lokalizáció	LK_23313:158404-161791 (+)	LK_23329:331142-334525 (+)
Aminosav hossz	949 as	1034 as
Számolt molekulatömeg (kDa)	106,42	118,71
Számolt pI	4,61	6,27
Szignál szekvencia	16 és 17. as között	23 és 24. as között

5.8. β -Galaktozidázt kódoló gének kifejeződésének vizsgálata

A feltételezett *L. ramosa* β -galaktozidázokat kódoló gének kifejeződésének vizsgálatához RT-qPCR technikát alkalmaztunk. Az indítószekvenciák megtervezése után optimalizáltuk a felszaporítás körülményeit. Referencia génként a *L. ramosa* aktin génjét választottuk (LK_23346:2074178-2075251 (+); protein ID: 8725). Az RNS kivonáshoz a gombát maláta kivonatot vagy búzakorpát tartalmazó tápközegre oltottuk. A tenyésztést hét napig végeztük 37 °C-on. A gének kifejeződésének vizsgálatát a 4. naptól kezdődően végeztük el. A 12. ábrán látható, hogy maláta kivonatot tartalmazó táptalajon a β -gal1 gén kifejeződése szignifikánsan ($p < 0,05$) csökkent a 6. napon (12.A ábra), míg a β -gal2 kifejeződése az 5. napon csökkent (12.C ábra).



12. ábra. Génkifejeződés vizsgálata malátás (A és C) és búzakorpát tartalmazó fermentációs közegben (B és D).

A búzakorpát tartalmazó táptalajon a β -gal1 kifejeződése szignifikánsan ($p < 0,05$) nőtt a 6. napon (12.B ábra), míg a β -gal2 kifejeződése szignifikánsan ($p < 0,05$) megemelkedett mind az 5., mind pedig a 6. napon (12.D ábra). A korábban elvégzett fermentációs tesztekben a legnagyobb β -galaktozidáz aktivitást a leoltástól számított 5-6. napon mértük búzakorpát tartalmazó közegben történő tenyésztést követően (lásd 5.2. fejezet).

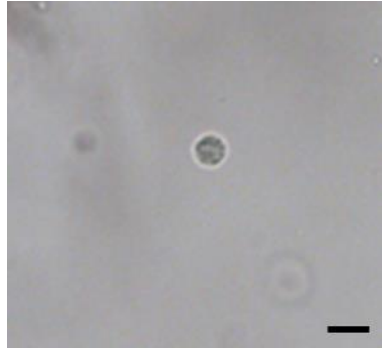
5.9. β -Galaktozidáz gének funkcionális vizsgálata

5.9.1. Uracil auxotróf törzs létrehozása CRISPR-Cas9 rendszerrel

A gének funkcionális vizsgálatához szükségünk van egy megbízható és könnyen alkalmazható génmanipulációs eszközre, valamint egy jól működő transzformációs rendszerre. Járomspórás gombák esetén a hagyományos transzformációs módszerekkel meglehetősen nehéz stabil integratív mutánsokat előállítani, azonban az elmúlt években sikeresen alkalmazták a CRISPR-Cas9 rendszert e gombacsoport bizonyos tagjainak, azaz *Mucor lusitanicus* (Nagy és mtsai., 2017), *L. corymbifera* (Ibragimova és mtsai., 2020) és *R. delemar* (Bruni és mtsai., 2019) gombák genetikai módosítására.

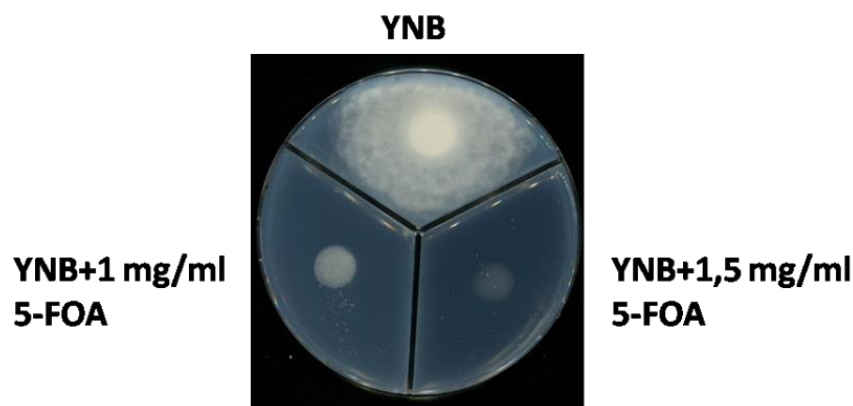
A transzformációs kísérletekhez szükségünk van egy megfelelő szelekciós markerre. Járomspórás gombák esetében gyakran alkalmaznak uracil auxotróf törzset a transzformációs kísérletekhez. Uracil auxotróf törzset többféle módon lehet létre hozni; 1. klasszikus mutagenézissel (kémiai vagy fizikai módszerekkel), vagy 2. az uracil bioszintézisben szerepet játszó orotidin-5'-foszfát dekarboxiláz gének (*pyrG* vagy *pyrF*) elrontásával.

L. ramosa esetében nem rendelkezünk hatékony transzformációs rendszerrel, ezért a kísérleteink megkezdésekor optimalizáltuk és adaptáltuk a járomspórás gombák esetén alkalmazott PEG mediált protoplaszt transzformációt. A protoplasztok képzéséhez fiatal telepeket, úgynevezett paránytenyészeteket használtunk. A paránytenyészeteket éti csiga gyomrából preparált enzimet tartalmazó pufferbe helyeztük és állandó rázatás (60 rpm) mellett szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ozmotikus közegnek 0,8 M szorbitolt alkalmaztunk. A mintákat 1-1,5-2-2,5 óra után mikroszkóppal ellenőriztük és figyeltük a protoplasztok megjelenését (13. ábra). Két óra elteltével a képződő protoplasztok száma nem emelkedett jelentősen, így a további transzformációs kísérletekhez két órán keresztül inkubáltuk a paránytenyészeteket a protoplasztáló oldatban.



13. ábra. *L. ramosa* protoplasztja. A méretskála 20 μm -nek felel meg.

Ahhoz, hogy egy uracil auxotróf mutáns törzset hozzunk létre, szükséges az uracil bioszintézisben szerepet játszó *pyrG* gén elrontása. A gén elrontását 5-FOA segítségével tudjuk ellenőrizni. A funkció képes PyrG az 5-FOA-t 5-fluorouridin-monofoszfáttá alakítja, mely toxikus a sejt számára (Boeke és mtsai., 1987; Liu és mtsai., 2015). Először megvizsgáltuk, hogy az 5-FOA milyen koncentrációban képes a *Lichtheimia*-t gátolni. Ehhez a törzset 1 mg/ml, illetve 1,5 mg/ml 5-FOA-t tartalmazó minimál táptalajra oltottuk és figyeltük a megjelenő telepek morfológiáját. A 14. ábrán látható, hogy mind az 1 mg/ml, mind pedig az 1,5 mg/ml 5-FOA képes volt gátolni a gomba növekedését. A továbbiakban a transzformációs kísérletekhez 1,5 mg/ml 5-FOA koncentrációt alkalmaztunk.



14. ábra. *L. ramosa* tenyészet morfológiája 5-FOA-val kiegészített minimál táptalajon.

Az 5-FOA érzékenység megállapítást követően a *L. ramosa pyrG* génjére specifikus crRNS-t terveztünk és megkezdtük a gén elrontását célzó kísérleteket. A protoplasztok képzését követően a protoplasztokat szűrtük és hozzájuk adtuk a *pyrG* specifikus crRNS-t, tracrRNS-t és a Cas9 endonukleázt. Homológ végeket tartalmazó templát DNS nélkül a Cas9 által kiváltott duplaszálú DNS törést a „nem homológ végek” összekapcsolását (NHEJ) végző mechanizmusok javítják. A transzformálás után a sejteket 1,5 mg/ml 5-FOA-val és

0,05% uracillal (m/v) kiegészített minimál táptalajra szélesztettük. A csészéket 37 °C-on 4-10 napig inkubáltuk a telepek megjelenéséig. Összesen 20 transzformáns telepet izoláltunk, melyeket tovább oltottunk uracillal kiegészített minimál táptalajra. Mindegyik telepből genomi DNS-t vontunk ki, majd PCR segítségével felszaporítottuk a *pyrG* gént. A PCR termékeket szekvenálással ellenőriztük és összehasonlítottuk a szülői törzs szekvenciájával (15. ábra). Tizenhat mutáns izolátum esetében sikerült bizonyítanunk a *pyrG* elrontását. Mind a 16 törzs esetében deléció keletkezett a protospacer melletti motívum (PAM) szekvencia előtti protospacer szekvenciában. A 15. ábrán látható, hogy a mutációk hossza az egyes izolátumok esetében eltérő volt. A leghosszabb deléciót – négy nukleotid kiesése – az M15-ös izolátum esetében tapasztaltuk.

	<i>pyrG</i> target – protospacer	PAM
<i>L. ramosa</i> SZMC11360	5' AAAAAAGCAGCACTTTATGATTTTCG	AGGATCGCA 3'
<i>L. ramosa</i> M1	5' AAAAAAGCAGCACTTTATGATT*TCG	AGGATCGCA 3'
<i>L. ramosa</i> M2	5' AAAAAAGCAGCACTTTATGATT*TCG	AGGATCGCA 3'
<i>L. ramosa</i> M4	5' AAAAAAGCAGCACTTTATGATT*TCG	AGGATCGCA 3'
<i>L. ramosa</i> M7	5' AAAAAAGCAGCACTTTATGATT*TCG	AGGATCGCA 3'
<i>L. ramosa</i> M9	5' AAAAAAGCAGCACTTTATGATT*TCG	AGGATCGCA 3'
<i>L. ramosa</i> M10	5' AAAAAAGCAGCACTTTATGATT*TCG	AGGATCGCA 3'
<i>L. ramosa</i> M11	5' AAAAAAGCAGCACTTTATGATT*TCG	AGGATCGCA 3'
<i>L. ramosa</i> M12	5' AAAAAAGCAGCACTTTATGATT*TCG	AGGATCGCA 3'
<i>L. ramosa</i> M13	5' AAAAAAGCAGCACTTTATGA***TCG	AGGATCGCA 3'
<i>L. ramosa</i> M14	5' AAAAAAGCAGCACTTTATGATT*TCG	AGGATCGCA 3'
<i>L. ramosa</i> M15	5' AAAAAAGCAGCACTTTATGATT****	AGGATCGCA 3'
<i>L. ramosa</i> M16	5' AAAAAAGCAGCACTTTATGATT*TCG	AGGATCGCA 3'
<i>L. ramosa</i> M17	5' AAAAAAGCAGCACTTTATGATT*TCG	AGGATCGCA 3'
<i>L. ramosa</i> M18	5' AAAAAAGCAGCACTTTATGATT*TCG	AGGATCGCA 3'
<i>L. ramosa</i> M19	5' AAAAAAGCAGCACTTTATGA***TCG	AGGATCGCA 3'
<i>L. ramosa</i> M20	5' AAAAAAGCAGCACTTTATGATT*TCG	AGGATCGCA 3'

15. ábra. A CRISPR-Cas9 deléciót indukál a *L. ramosa pyrG* gén megcélzott helyein. Az LrpyrGer protospacer segítségével megcélzott *pyrG* gén helyének szekvenciája és az indukált mutációk helye (csillag) a 16 eredményül kapott törzsben.

Tanszékünkön korábban sikeresen alkalmazták a CRISPR-Cas9 rendszert a járomspórás gombák genomjának a módosítására. Nagy és mtsai. (2017) sikeresen használta a rendszert a fitoén-dehidrogenázt kódoló *carB* gén elrontására. A *carB* gén elrontását követően azonban a NHEJ hibajavító mechanizmus egy, a szomszédos géneket is érintő, 2,5 kb hosszúságú deléciót eredményezett. A közeli rokon *L. corymbifera* gombában is sikeresen alkalmazták a CRISPR-Cas9 rendszert a *pyrG* gén elrontására (Ibragimova és mtsai., 2020). *L. corymbifera* esetében a deléciók hossza egy és öt nukleotid közé esett. Ugyancsak

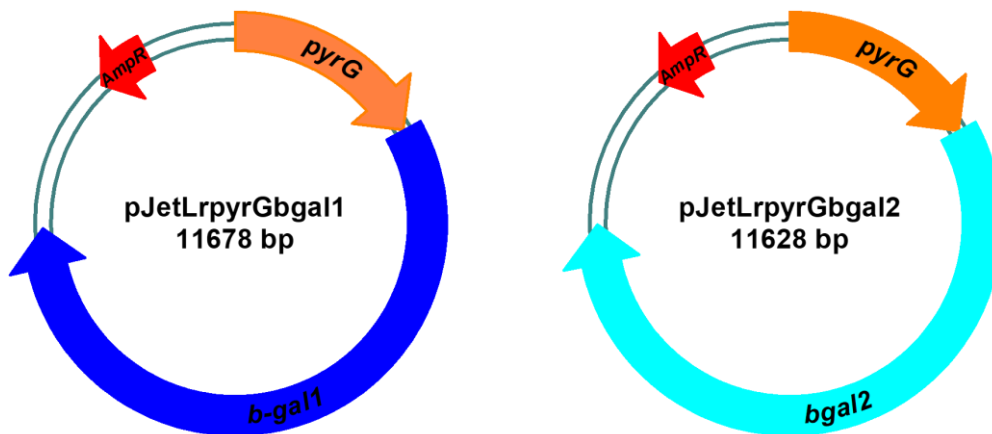
sikeresen használták a rendszert *R. delemar* esetében is, ahol a *pyrF* gént rontották el CRISPR-Cas9 segítségével (Bruni és mtsai., 2019). A *pyrF* génben egy nukleotidot érintő pontmutációt tudtak kimutatni a protospacer szekvenciákban. Tekintettel arra, hogy a *Mucor* esetében a NHEJ egy igen kiterjedt deléciót eredményezett, a CRISPR-Cas9 által kiváltott NHEJ okán minden esetben szükséges a létrehozott mutánsok molekuláris jellemzése.

Ahogy a 15. ábrán látható, az M15-ös izolátum esetében négy nukleotidot érintő deléciót tudtunk kimutatni. Egy esetleges mutáció revertálódás elkerülése érdekében a további vizsgálatokhoz az M15 jelű izolátumot választottuk ki. Megvizsgáltuk az izolátum növekedését és enzimaktivitását. A *pyrG* gén elrontásának hatására az M15 jelű gombatörzs növekedése lelassult a szülői törzshöz képest. Azonban a mutáns törzs β -galaktozidáz aktivitása nem változott a szülői törzshöz képest. A közeli rokon *M. lusitanicus* esetében az uracil auxotrófia kihat a gombatörzs növekedésére és virulenciájára (Binder és mtsai., 2018). Hasonló fenotípust találtak *L. corymbifera* esetében is (Ibragimova és mtsai., 2020). Úgy tűnik, hogy a pirimidin bioszintézis befolyással bír ezen folyamatokra.

5.9.2. Vektorkonstrukciók szerkesztése túltermelő törzs létrehozásához

A *L. ramosa* genomja kettő β -galaktozidáz enzimet kódoló gént (*β -gal1* és *β -gal2*) tartalmaz. A gének molekuláris biológiai jellemzésének céljából olyan vektorkonstrukciókat terveztünk, melyek lehetővé teszik az egyes gének túlműködését. Jelen vizsgálatok célja, hogy a létrehozott plazmidokat a *L. ramosa* M15 uracil auxotróf mutáns törzsbe juttassuk és megvizsgáljuk, hogy a gének kópiaszámának növelése (géndózis hatás) hatással lenne-e - és ha igen, akkor milyen mértékben - a gomba β -galaktozidáz termelésére.

A *L. ramosa* SZMC 11360 genomjából PCR segítségével felszaporítottuk a funkcióképes *pyrG* gént saját promóter és terminális szekvenciával. A felszaporított *pyrG* gént ezután pJet1.2blunt vektorba vittük be, létrehozva a pJetLrpyrG plazmidot. A plazmid ellenőrzését követően elvégeztük annak *XbaI* endonukleázzal való hasítását. Második lépésként PCR segítségével felszaporítottuk a *β -gal1* és *β -gal2* géneket saját promóter és terminális szekvenciákkal. A PCR reakciót követően a géneket egyenként a pJetLrpyrG plazmidba klónoztuk *XbaI* enzim segítségével, így létrehozva a pJetLrpyrGbgal1 és pJetLrpyrGbgal2 vektorokat. A létrehozott vektorok hordozzák a bakteriális szelekcióhoz szükséges ampicillin rezisztenciát biztosító gént, a *Lichtheimia pyrG* gént és a *Lichtheimia* β -galaktozidázt kódoló gént (16. ábra). A létrehozott vektor konstrukciókkal megkezdtük a transzformációs kísérleteket.

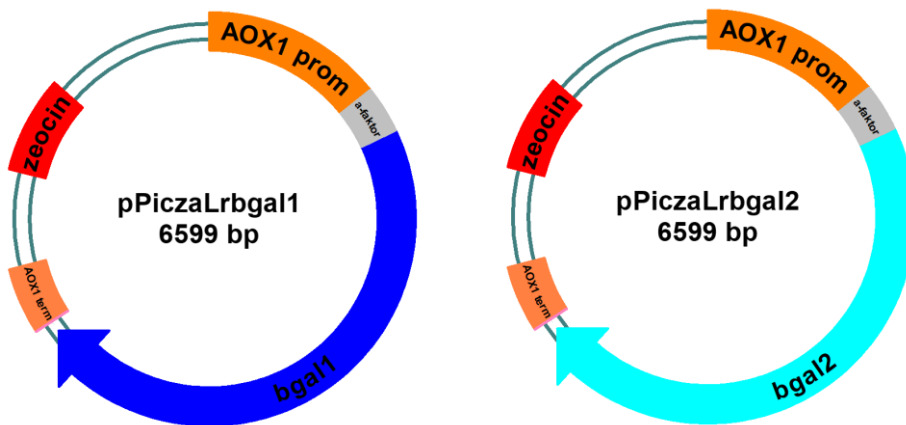


16. ábra. A *L. ramosa* β -galaktozidázt kódoló gének túlműködtetéséhez készített expressziós vektorok.

5.9.3. Vektorkonstrukciók szerkesztése heterológ termeltetéshez

Megkezdjük vektorkonstrukciók létrehozását a *L. ramosa* β -galaktozidáz fehérjék heterológ rendszerben történő termeltetéséhez is. A *Pichia pastoris* egy metilotróf élesztő, és képes a metanolt egyedüli szénforrásként hasznosítani. Széles körben alkalmazzák fehérjék heterológ rendszerben való termeltetésére (Juturu és Wu, 2018). Munkánk során olyan vektorkonstrukciókat hoztunk létre, melyekkel terveink szerint nagy hozamban termeltethetők a *Lichtheimia* β -galaktozidázok *Pichia* rendszerben. Kísérleteinkhez a *P. pastoris* KM71H törzset választottuk. A heterológ expresszióhoz a pPicza vektort választottuk, mely tartalmazza a bakteriális és élesztő szelekcióhoz szükséges Zeocin rezisztenciát biztosító gént, az AOX1 (alkohol oxidáz 1) gén promóter és terminális szekvenciáját, valamint a fehérje szekréciónak szükséges élesztő α -faktor szignál szekvenciát. A promótert indukálni lehet metanollal, így nagymértékű fehérjetermelést tudunk elérni az élesztővel.

Reverz transzkripció PCR (RT-PCR) segítségével felszaporítottuk a *Lichtheimia* β -galaktozidázt kódoló gének cDNS szekvenciáját, melyeket *XhoI-XbaI* hasító enzimek segítségével a pPicza vektorba klónoztunk (17. ábra). A klónozás során a cDNS szekvenciák 3' végéről eltávolítottuk a STOP kodont és ügyelve a leolvasási keretre hat hisztidint (HIS) kódoló szakasszal toldottuk meg a szekvenciákat. A HIS-toldalék lehetővé teszi a gyorsabb és egyszerűbb tisztítást a fermentációt követően. A létrehozott vektorkonstrukciókkal ezt követően megkezdjük a transzformációs kísérleteket. A transzformánsok ellenőrzése, majd a termeltetési rendszer kialakítása és optimalizálása jelenleg folyamatban van.



17. ábra. A *L. ramosa* β -galaktozidázt kódoló gének heterológ rendszerben történő termeltetését lehetővé tevő vektorkonstrukciók.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A β -galaktozidáz enzim a glikozidos kötést hidrolizálja a diszacharid laktóz molekulában. Hidrolitikus aktivitása mellett transzgalaktozilációs reakciók katalizálására is képes, melynek eredményeként prebiotikus hatású oligoszacharidok (GOS, OsLu) keletkezhetnek. Biológiai jelentőségükön kívül fontos szerepet töltenek be egyes élelmiszeripari folyamatokban is. Fontosak például laktózzal kapcsolatos kikristályosodás megelőzésében tejtermékekben és fagyasztott élelmiszerekben, ezáltal megakadályozva a termék minőségének leromlását. Hidrolitikus aktivitását ezen kívül laktózmentes termékek előállítására alkalmazzák. Napjainkban a legtöbb kereskedelmi forgalomban elérhető β -galaktozidáz mikrobiális forrásból származik. Az ipari és biotechnológiai fejlesztésekhez ugyanakkor szükség van a hidrolitikus és/vagy szintetikus reakciók katalizálása szempontjából előnyös tulajdonságokkal rendelkező új enzimek azonosítására. A járomspórás gombák között sok kiváló enzimtermelő (pl. celluláz, lipáz), törzs található, e gombák β -galaktozidáz termelése azonban egy kevésbé kutatott terület. Az enzimek szintetikus és hidrolitikus aktivitásáról, biokémiai jellemzőiről, gyakorlati szempontból fontos funkcionális tulajdonságairól szintén kevés információval rendelkezünk.

A doktori munkám során célul tűztük ki a Mucorales és Mortierellales rendekbe tartozó járomspórás gombák β -galaktozidáz aktivitásának részletes vizsgálatát. Terveink között szerepelt enzimtermelő törzsek azonosítása, az enzimtermelés különböző induktív körülményeken történő elemzése, enzimek prebiotikus oligoszacharid szintézist katalizáló potenciáljának vizsgálata, tisztított enzimek biokémiai tulajdonságainak feltárása, valamint galaktozidáz kódoló gének azonosítása és jellemzése. Célunk volt a galaktozidáz enzimet kódoló gének kifejeződésének vizsgálata, galaktozidáz génben diszruptív, illetve az enzimet túltermelő gombatörzs(ek) létrehozása és az enzim heterológ rendszerben történő termeltetése is. A kutatási program során az alábbi eredményeket sikerült elérnünk:

1. Azonosítottunk β -galaktozidáz termelő járomspórás gombatörzseket.

A *Lichtheimia*, *Mortierella*, *Mucor*, *Rhizomucor*, *Rhizopus* és *Umbelopsis* nemzetségekből 99 izolátum enzimtermelését teszteltük kromogén táptalajon. Összesen 66, főként *Lichtheimia*, *Rhizomucor* és *Umbelopsis* törzs esetén tapasztaltunk detektálható enzimtermelést. Eredményeink alapján a *Lichtheimia ramosa* SZMC 11360, *Lichtheimia corymbifera* SZMC 11361, *Lichtheimia hyalospora* SZMC 11364, *Rhizomucor miehei* SZMC 11005, *R. miehei* SZMC 11014, *Rhizomucor pusillus* SZMC 11025, *Rhizopus*

microsporus var. *oligosporus* SZMC 13619, *Mortierella echinosphaera* SZMC 11251, *Umbelopsis longicollis* SZMC 11208 és *Umbelopsis ramanniana* var. *angulispora* SZMC 11234 törzsek bizonyultak legjobb β -galaktozidáz termelőnek az alkalmazott tenyésztési körülményen.

2. Egyes izolátumoknál fokozott β -galaktozidáz termelést azonosítottunk laktózt és/vagy búzakupát tartalmazó fermentációs körülményeken.

A legjobb termelőket SmF és SSF körülményeken tenyésztve teszteltük a laktóz és a búzakupá β -galaktozidáz termelésre gyakorolt hatását. A laktózt tartalmazó tápoldatban az *U. longicollis*, a *L. hyalospóra* és a *R. pusillus* termelte legnagyobb hozamban az enzimet. Mérsékelt hozamot tapasztaltunk a *R. miehei* SZMC 11005 és *U. ramanniana* var. *angulispora* izolátumoknál. Búzakupával kiegészített laktóz tartalmú tápoldatban az enzimettermelés mértéke jóval nagyobb volt, mint búzakupá nélkül. A búzakupá-laktóz tápoldatban a *R. miehei* SZMC 11014 és a *R. pusillus* izolátumoknál kaptuk a legnagyobb enzimaktivitás hozamot. Az SSF rendszerben a búzakupá tovább növelte az enzimhozamot több vizsgálatra kiválasztott fonalas gombánál az SmF tápközeghez képest. A *Lichtheimia*, *Rhizomucor* és *Rhizopus* gombák jobb enzimtermelők voltak szilárd fázison (SSF), mint az *Umbelopsis* és *Mortierella* izolátumok. Ahogy a kétféle SmF tápközegben, úgy az SSF esetében is a *R. pusillus* adta a legnagyobb β -galaktozidáz hozamot, habár említésre méltó a *Lichtheimia* gombánál tapasztalt aktivitás hozam is. A búzakupá-alapú fermentációk eredményeit összehasonlítva látható, hogy a maximális enzimhozamok többségét SSF rendszerben érték el. Eredményeink szerint a búzakupá ideális szubsztrát β -galaktozidáz termelés indukálására Mucoromycota gombák esetén.

3. Prebiotikus oligoszacharidokat állítottunk elő nyers β -galaktozidázokkal többféle reakciókörülményen.

Részleges tisztítást követően vizsgáltuk a *L. ramosa* és *R. pusillus* gombákból búzakupá-alapú SSF rendszerben nyert, β -galaktozidáz-aktív kivonatok transzgalaktozidáz aktivitását. A tesztekben négyféle reakciókörülménybe vittünk be különböző, glikozil donorként és/vagy akzeptorként funkcionáló vegyületeket. Laktóz, sovány tejpor, laktóz-fruktóz és oNPG-szukróz-alapú reakcióelegyeket állítottunk össze, majd az inkubációt követően HPLC-MS/MS módszerrel vizsgáltuk az oligoszacharidok minőségét és mennyiségét enzimet tartalmazó és enzimmentes mintákban. Tri- és tetraszacharidokat egyaránt tudtunk kimutatni a reakcióelegyekben, azaz a részlegesen tisztított

enzimkivonatok képesek oligoszacharid szintézis katalizálására. Szubsztráttól függően GOS és különböző FOS, például laktoszukróz vagy izoraffinóz, jelenlétét mutattuk ki. Megállapítottuk, hogy mindkét vizsgált enzim jelentős transzgalaktozidáz aktivitással rendelkezik, és a *R. pusillus* nyers β -galaktozidáz teljes szintetikus kapacitása a *L. ramosa* enzim esetén tapasztaltnál nagyobb. Eredményeink alapján feltételezzük, hogy a vizsgálatunkban tisztított nyers β -galaktozidáz-aktív koktélok transzfruktozilációs aktivitással is rendelkezhetnek, amely felelős lehet az *o*NPG-szacharóz keverékkel végzett reakciókban megjelenő egyes FOS komponensekért.

A GOS és FOS molekulák prebiotikus cukrokként használhatók, ezért megvizsgáltuk egyes előállított oligoszacharid-dús keverékek *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* és *Saccharomyces boulardii* probiotikumok növekedésre gyakorolt aktivitását. A felszabaduló *o*-nitrofenol lehetséges növekedés gátló hatása miatt csak a laktóz-fruktóz, sovány tejpor és laktóz kiindulási szacharidokat tartalmazó reakcióelegyet vizsgáltuk. A legtöbb esetben az oligoszachariddal dúsított minták stimulálták a probiotikumok növekedését. A probiotikumokra mutatott hatás nem függött a különféle reakciórendszerek oligoszacharid-tartalmától, azonban a korreláció analízis kapcsolatot tárt fel a növekedést támogató aktivitás és egy adott minta oligoszacharid-tartalmának változása között. Minél nagyobb volt egy adott reakcióminta oligoszacharid-tartalma az enzimkezelés után, annál jobbnak bizonyult a vizsgálatunkba bevont probiotikus mikroorganizmusok szaporodása.

4. Izoláltunk β -galaktozidáz enzimeket, és elemeztük néhány gyakorlati szempontból jelentős biokémiai tulajdonságukat.

A *L. ramosa* és *R. pusillus* gombákból extracelluláris β -galaktozidáz tisztítást végeztünk. Az enzimek nagy mennyiségű termeltetéséhez búzaborpa-alapú SSF tápközeget alkalmaztunk. A nyers kivonatokból való enzimfehérje tisztítást ammónium-szulfát frakcionálással, majd kromatográfiás elválasztással végeztük. A *L. ramosa* és *R. pusillus* β -galaktozidázok 25,59 és 49,87-szeres tisztulását értük el 1,33% és 4,07% kihozatal mellett. Denaturáló gélelektroforézissel 90 kDa körül állapítottuk meg a tisztított enzimek molekulatömegét. Zimográfiai analízissel β -galaktozidáz aktivitást, és körülbelül 242 kDa natív molekulaméretet mutattunk ki a tisztított enzimfehérjékre.

Meghatároztuk a tisztított *L. ramosa* és *R. pusillus* enzimaktivitások néhány biokémiai jellemzőjét. A *L. ramosa* enzim működésének optimális hőmérsékletet 50 °C, míg a *R. pusillus* β -galaktozidázét 55 °C körül állapítottuk meg. Érdeemes kiemelni, hogy a *L.*

ramosa β -galaktozidáz 60 °C és 70 °C hőmérsékleteken is az aktivitásának legalább 50%-át mutatta. Négy órás előinkubációt követően mindkét enzim nagyfokú stabilitást mutatott a működési optimum hőmérsékletig. Mindkét vizsgált β -galaktozidáz aktivitás esetén pH 6,0 körüli működési optimumot azonosítottunk. A *L. ramosa* és *R. pusillus* β -galaktozidázok pH 6,0 feletti inkubációs körülményeken nagymértékű stabilitást mutattak, előbbi enzimmél több, mint 80%, míg az utóbbi esetén több, mint 90% relatív aktivitással. Az enzimek mérsékelt toleranciával rendelkeztek a környezet enyhén savanyú (pH 4,0-5,0) kémhatásával szemben.

Az enzimek szubsztrátspecificitását is meghatároztuk, melyhez többféle kromogén szubsztrátot alkalmaztunk. A vizsgálat során mindkét vizsgált β -galaktozidáz széles szubsztrátspecificitást mutatott, és hatékonyabban hidrolizálta a *p*NPG szubsztrátot az *o*NPG szubsztráthoz viszonyítva. α -Galaktozid kötést tartalmazó szubsztrátra és egyes β -glükozidok esetében kiemelkedő bontást figyeltünk meg.

5. Azonosítottunk β -galaktozidáz kódoló géneket, jellemeztük a kódolt fehérjéket. Génkifejeződés vizsgálatokat végeztünk különböző fermentációs körülményeken.

A kiváló β -galaktozidáz termelőnek bizonyult *L. ramosa* gombát vontuk be a vizsgálatokba. A *Lichtheimia* genom adatbázisban homológ szekvencia keresést hajtottunk végre *Trichoderma atroviride* β -galaktozidáz aminosav szekvencia felhasználásával. Két olyan feltételezett fehérjét azonosítottunk (β Gal1 és β Gal2), melyek nagyfokú hasonlóságot mutattak a *Trichoderma* β -galaktozidázzal. A két feltételezett β -galaktozidáz fehérje méretben, aminosav hosszúságban és izoelektromos pontban is eltér. Mindkettőben azonosítottuk a glikozid hidroláz 35 családra jellemző domént. Az azonosított *L. ramosa* β -galaktozidáz gének kifejeződésének vizsgálatához RT-qPCR technikát alkalmaztunk. A búzakorpát tartalmazó táptalajon a β -gal1 kifejeződése a 6. napon, míg a β -gal2 kifejeződése az 5. és a 6. napokon emelkedett; fermentációs tesztekben az 5-6. napokon mértünk legnagyobb enzimaktivitást.

6. Transzformációs rendszert állítottunk be β -galaktozidáz kódoló gének funkcionális vizsgálatához.

Gének funkcionális vizsgálatok járomspórás gombákban gyakran alkalmaznak uracil auxotróf törzseket a transzformációs kísérletekhez, melyhez előzetesen szükség van az uracil bioszintézisben szerepet játszó *pyrG* gén elrontására. *L. ramosa* esetében ugyanakkor nem rendelkezünk hatékony transzformációs rendszerrel. Munkánkban

optimalizáltuk és adaptáltuk a PEG-mediált protoplaszt transzformációt *L. ramosa* fonalas gombára, majd sikerrel létrehoztunk 16 *L. ramosa* uracil auxotróf mutáns törzset. Jellemeztük a további vizsgálatokhoz kiválasztott törzs növekedését és β -galaktozidáz aktivitását. A *pyrG* gén elrontásának hatására a gomba növekedése lelassult a szülői törzshöz képest, azonban a β -galaktozidáz aktivitása nem változott.

7. Vektorkonstrukciókat szerkesztettünk β -galaktozidáz túltermelő törzs létrehozásához és az enzimek heterológ termeltetéséhez.

A kísérletekben olyan vektorkonstrukciókat hoztunk létre, melyek lehetővé teszik az egyes *L. ramosa* β -galaktozidáz gének túlműködését, azaz annak vizsgálatát, hogy a gének kópiaszámának növelése hatással van-e a gomba β -galaktozidáz termelésére. A vektorok a bakteriális szelekcióhoz szükséges ampicillin rezisztenciát biztosító gént, a *Lichtheimia pyrG* gént és a *Lichtheimia* β -galaktozidáz kódoló gént egyaránt hordozzák. A létrehozott vektorkonstrukciókkal megkezdjük a transzformációs kísérleteket.

Munkánk során *L. ramosa* β -galaktozidáz fehérjék heterológ rendszerben történő termeltetését lehetővé tevő vektorkonstrukciókat is létrehoztunk. A vektorok segítségével reményeink szerint nagy hozamban termeltethetők a *Lichtheimia* β -galaktozidázok *Pichia pastoris*-alapú rendszerben. A transzformációs kísérleteket megkezdjük, jelenleg a transzformánsok ellenőrzése, majd a termeltetési rendszer kialakítása és optimalizálása van folyamatban.

Eredményeink értékes adatokkal szolgálnak a *Mucoromycota* gombák, köztük az eddig még nem vizsgált *Lichtheimia*, *Mortierella* és *Umbelopsis* csoportok, β -galaktozidáz termelő képességéről. A nagy hidrolitikus aktivitású izolátumok az élelmiszeriparban hasznosítható β -galaktozidázok kiváló forrásai lehetnek. Bővültek ismereteink induktorok jelenlétében történő enzimhozamokról, az enzimek folyadék és szilárd fázisú termeltetési lehetőségeiről. Tudomásunk szerint elsőként végeztünk olyan süllyesztett fermentációs vizsgálatokat, amelyekben laktózt és búzakorpát együtt alkalmaznak β -galaktozidáz termelés induktorként. Azonosítottuk a *L. ramosa* és *R. pusillus* gombák β -galaktozidázainak transzgalaktozilációs aktivitását, valamint transzfruktozilációt katalizálni képes enzimek termelését is igazoltuk. Az azonosított szintetikus aktivitások magas prebiotikus indexű funkcionális oligoszacharid keverékek előállításához járulhatnak hozzá, melyek egészségvédő adalékok lehetnek bizonyos termékekben. Elsőként izoláltunk β -galaktozidáz enzimet *L. ramosa*

gombából, gyakorlati jelentőségű információkat szereztünk enzimek biokémiai tulajdonságairól. Kutatásaink elsőként mutattak rá β -galaktozidáz kódoló genetikai elemekre és fermentációs körülményeken való kifejeződésükre járomspórás gombákban. Általánosan alkalmazható transzformációs rendszert dolgoztunk ki *L. ramosa* gombában, valamint β -galaktozidáz homológ és heterológ termeltetésére alkalmas vektorkonstrukciókat is szerkesztettünk. A jellemzett enzimek és az eddig elért termeltetési eredmények ugyancsak kiváló alapul szolgálhatnak későbbi gyakorlati fejlesztésekhez.

7. SUMMARY

The β -galactosidase enzyme hydrolyzes the glycosidic bond in the disaccharide lactose molecule. The enzyme is also capable of catalyzing transgalactosylation reactions, resulting in the potential formation of prebiotic oligosaccharides (e.g., galacto-oligosaccharides, lactulose derived galacto-oligosaccharides). The β -galactosidase plays an important role in some food industry processes. For instance, they are used to prevent the lactose-related crystallization in dairy products and frozen foods. Its hydrolytic activity is also used to produce lactose-free products. Nowadays, most commercially available β -galactosidases are derived from microbial sources. The industrial and biotechnological developments require the identification of new enzymes with beneficial and exploitable hydrolytic and/or synthetic properties. There are many excellent enzyme-producing (e.g., cellulase, lipase) strains among zygomycetes, but their β -galactosidase production is still an understudied area. Little information is also available on the synthetic and hydrolytic activities, biochemical characteristics, as well as on the industrially important functional properties of the produced enzymes.

In this work, we aimed to conduct a detailed investigation of the β -galactosidase activity of zygomycete fungi belonging to the orders Mucorales and Mortierellales. We planned to perform the identification of enzyme-producing strains, the assay of enzyme production under inductive conditions, the analysis of the catalyzing potential of enzymes for prebiotic oligosaccharide synthesis, the exploration of the biochemical properties of purified enzymes, and the identification and characterization of genes encoding galactosidase enzyme. Our goals also included the investigation of the expression of genes encoding galactosidase enzyme, the set-up of fungal strain(s) that have disruption in their galactosidase gene or capable of overproducing the enzyme, as well as the production of the enzyme in a heterologous system. The following results have been achieved during the research program:

1. β -Galactosidase-producing zygomycetes strains have been identified.

The enzyme production of 99 isolates from the genera *Lichtheimia*, *Mortierella*, *Mucor*, *Rhizomucor*, *Rhizopus* and *Umbelopsis* was tested on chromogenic medium. A total of 66 strains, mainly in the groups of *Lichtheimia*, *Rhizomucor* and *Umbelopsis*, showed detectable enzyme production. The *Lichtheimia ramosa* SZMC 11360, *Lichtheimia corymbifera* SZMC 11361, *Lichtheimia hyalospora* SZMC 11364, *Rhizomucor miehei*

SZMC 11005, *R. miehei* SZMC 11014, *Rhizomucor pusillus* SZMC 11025, *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* SZMC 13619, *Mortierella echinosphaera* SZMC 11251, *Umbelopsis longicollis* SZMC 11208 and *Umbelopsis ramanniana* var. *angulispora* SZMC 11234 isolates proved to be the best β -galactosidase producers.

2. Increased β -galactosidase production was identified in some isolates under fermentation conditions containing lactose and/or wheat bran.

The effect of lactose and wheat bran on β -galactosidase production was tested by cultivating the best producers under submerged and solid-state fermentation conditions. The *U. longicollis*, *L. hyalosporea* and *R. pusillus* resulted in the highest enzyme yield in lactose-containing broth medium. A moderate yield was observed in *R. miehei* SZMC 11005 and *U. ramanniana* var. *angulispora* isolates. The level of enzyme production in the lactose-containing medium supplemented with wheat bran was better than in the environment without wheat bran. The *R. miehei* SZMC 11014 and *R. pusillus* isolates had the highest enzyme yield in wheat bran-lactose broth medium. For most fungi tested, cultivation in wheat bran-based solid-state fermentation further improved the β -galactosidase yields obtained during the two submerged fermentations. In solid system, the enzyme production of *Lichtheimia*, *Rhizomucor* and *Rhizopus* fungi was superior to those of the *Umbelopsis* and *Mortierella* isolates. As in the two submerged fermentation tests, *R. pusillus* exhibited the best β -galactosidase yield during solid-state fermentation, but the activity yields of *Lichtheimia* fungi are also worth mentioning. Comparing the results of wheat bran-based fermentations, most of the maximal enzyme yields were achieved under the solid culture condition. Collectively, it can be concluded that wheat bran is an ideal substrate to induce the β -galactosidase production in Mucoromycota.

3. Prebiotic oligosaccharides were produced with crude β -galactosidases under various reaction conditions.

Transgalactosylation activity of partially purified β -galactosidase-active cocktails from *L. ramosa* and *R. pusillus* obtained on wheat bran-based solid fermentation was also studied. Four sets of conditions were applied in a parallel experiment, each containing different compounds as the glycosyl donor and/or acceptor. Lactose, skim milk, lactose-fructose and *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside-sucrose-based mixtures were prepared, and after the incubation, the formation of oligosaccharides in enzyme-containing and enzyme-free samples was examined by mass spectrometry. Both tri- and tetrasaccharides

were also detected in the reaction mixtures, i.e., the partially purified enzyme extracts were able to catalyze oligosaccharide synthesis. Presence of galacto-oligosaccharides and different fructo-oligosaccharides, such as lactosucrose or isoraffinose, was detected depending on the galactose donor/acceptor substrate used. It was found that both tested enzymes have significant transgalactosylation activity, and the total synthetic capacity of crude β -galactosidase from *R. pusillus* is higher than that found in the case of the *L. ramosa* enzyme. According to the results, it is assumed that the crude β -galactosidase-active cocktails purified in our study may also have transfructosylation activity, which may be responsible for some fructo-oligosaccharide components formed in reactions with the *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside-sucrose mixture.

The galacto- and fructo-oligosaccharide molecules can be used as prebiotic sugars, therefore, the effect of some oligosaccharide-enriched mixtures produced on the growth of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* and *Saccharomyces boulardii* probiotics was investigated. Due to the potential growth inhibitory effect of the released *o*-nitrophenol, only the reaction mixtures containing lactose-fructose, skim milk and lactose initial saccharides were examined. For most tests, the oligosaccharide-enriched samples stimulated the microbial growth. The activity towards probiotics was not altered according to the oligosaccharide content of the different reaction systems, but correlation analysis revealed the association between the growth-promoting activity and the oligosaccharide content of a given sample. The higher the oligosaccharide content in a sample after the enzyme treatment, the better the growth of probiotics tested.

4. β -Galactosidase enzymes have been isolated, and some of their practically important biochemical properties have been studied.

Extracellular β -galactosidases were purified from *L. ramosa* and *R. pusillus*. Wheat bran-based solid-state fermentation was used to produce the enzymes in high yield, and the enzyme purification from crude extracts was performed by ammonium sulfate fractionation followed by chromatographic separation. Purifications of 25.59-fold and 49.87-fold with yields of 1.33% and 4.07% were achieved for *L. ramosa* and *R. pusillus* β -galactosidases, respectively. Molecular weight of the purified enzymes was estimated to be about 90 kDa by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. Zymogram analysis of the purified enzymes showed active β -galactosidases with a native molecular weight of 242 kDa.

Some biochemical properties of the purified *L. ramosa* and *R. pusillus* β -galactosidases were determined. The optimal temperatures for maximum activity of the *L.*

ramosa and *R. pusillus* β -galactosidases were found to be 50 °C and 55 °C, respectively. It is worth highlighting that the *L. ramosa* β -galactosidase showed at least 50% of its activity also at temperatures of 60 °C and 70 °C. Both enzymes were highly stable up to their optimum temperature after a four-hours preincubation. The optimum pH for the action of tested enzymes was about pH 6.0. The *L. ramosa* and *R. pusillus* β -galactosidases showed a high degree of stability under incubation conditions above pH 6.0, with a relative activity of more than 80% for the former enzyme, and more than 90% for the latter one. The enzymes had a moderate tolerance to the slightly acidic environment (pH 4.0-5.0).

Substrate specificity of the enzymes was also determined using various chromogenic substrates. During the analysis, both tested β -galactosidases showed broad substrate specificity, and hydrolyzed the *p*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside more efficiently than the *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside substrate. Efficient hydrolysis was also observed towards *p*-nitrophenyl- α -D-galactopyranoside and some β -glucosides.

5. β -Galactosidase coding genes have been identified, and the encoded proteins have been characterized. Gene expression studies were also performed under various fermentation conditions.

The excellent β -galactosidase producer *L. ramosa* was included in the tests. A homology blast was performed in the *Lichtheimia* genome database using a *Trichoderma atroviride* β -galactosidase amino acid sequence. Two putative proteins (β Gal1 and β Gal2) showing a high degree of similarity with the *Trichoderma* β -galactosidase were identified. *In silico* analysis revealed a difference in molecular weight, amino acid length and isoelectric point for the two putative β -galactosidase proteins. A domain characteristic for the Glycoside Hydrolase Family 35 has been identified in both amino acid sequences. The RT-qPCR technique was used to examine the expression of the identified *L. ramosa* β -galactosidase genes. The expression of *β -gal1* increased on the 6th day, while the expression of *β -gal2* increased on the 5th and 6th days when wheat bran-containing medium was used for cultivation; for comparison, the highest enzyme activity was measured on days 5-6 in the fermentation tests.

6. A transformation system was set up for functional analysis of genes encoding β -galactosidase.

Uracil auxotrophic strains are frequently used in the transformation experiments to be performed for functional analysis of genes in zygomycetes fungi. These experiments

require a disruption in the *pyrG* gene involved in uracil biosynthesis. However, there was no efficient transformation system for *L. ramosa*. In this work, the PEG-mediated protoplast transformation has been optimized and adapted, and 16 uracil auxotrophic mutant strains in *L. ramosa* have successfully been created. The growth and β -galactosidase activity of the mutant strain selected for further studies were characterized. Results showed that the mutant strain grew slowly compared to the parental isolate, which could be attributed to the damage of the *pyrG* gene. However, β -galactosidase activity of the two strains remained comparable.

7. Plasmids have been constructed for the creation of a β -galactosidase overproducing strain and for the heterologous production of the enzyme protein.

Plasmid constructions were set up enabling the overactivation of the *L. ramosa* β -galactosidase genes, i.e., the investigation of whether an increase in the copy number of genes could affect the β -galactosidase production of the fungus. The vectors contained both the ampicillin resistance gene required for the bacterial selection, the *Lichtheimia pyrG* gene, and the gene encoding *Lichtheimia* β -galactosidase. The transformation experiments have been started using the created vector constructions.

In this work, vector constructs were also created enabling the production of *L. ramosa* β -galactosidase proteins in a heterologous system. By using these vectors, it is expected that the *Lichtheimia* β -galactosidases can be produced with high yield in *Pichia pastoris* systems. The transformation experiments have been started; verification of the transformants and designing and optimizing the production system are currently in progress.

In conclusion, our results provide useful data on the β -galactosidase production of Mucoromycota fungi, including the groups of *Lichtheimia*, *Mortierella* and *Umbelopsis* that have not yet been investigated. The isolates with high hydrolytic activity can be reliable sources of β -galactosidases utilizable in the food industry. Our knowledge has expanded about enzyme yields achieved in the presence of inducers, and on the possibilities of liquid and solid-state production of the enzymes. As we know, this study is the first that has performed submerged fermentation experiments using lactose and wheat bran together as a β -galactosidase production inducer. Transgalactosylation activity of the *L. ramosa* and *R. pusillus* β -galactosidases was identified, and the production of enzymes capable of catalyzing transfructosylation was also confirmed. The synthetic activities identified may contribute to the production of functional oligosaccharide mixtures with a high prebiotic index, which then can be used

as health-protective additives in certain products. This is the first report on a β -galactosidase isolated from *Lichtheimia* fungi, providing practical information about the biochemical properties of the enzyme. This research revealed β -galactosidase coding genetic elements in zygomycetes and investigated of their expression under fermentation conditions. A generally applicable transformation system was developed in *L. ramosa*, and plasmids suitable for both homologous and heterologous productions of β -galactosidase were also constructed. The characterized enzymes and the enzyme production results achieved so far can also serve as an excellent basis for future practical developments.

8. IRODALOMJEGYZÉK

- Abd El-Salam, B.A., Ibrahim, O.A., Amer, A.E. (2020) Efficient enzymatic conversion of lactose in milk using fungal β -galactosidase. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 29, 101813.
- Aburto, C., Guerrero, C., Vera, C., Illanes, A. (2020) Improvement in the yield and selectivity of lactulose synthesis with *Bacillus circulans* β -galactosidase. *LWT-Food Sci. Technol.* 118, 108746.
- Adalberto, P.R., Massabni, A.C., Goulart, A.J., Contiero, J., Carmona, E.C., Cardello, L., Monti, R. (2006) Production of β -galactosidase by *Trichoderma reesei* FTKO-39 in wheat bran. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 133, 163-170.
- Alastruey-Izquierdo, A., Hoffmann, K., de Hoog, G.S., Rodriguez-Tudela, J.L., Voigt, K., Bibashi, E., Walther, G. (2010) Species recognition and clinical relevance of the zygomycetous genus *Lichtheimia* (syn. *Absidia* Pro Parte, Mycocladus). *J. Clin. Microbiol.* 48, 2154-2170.
- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., Blackwell, M. (1996) *Introductory Mycology*. 4th ed., John Wiley and Sons, New York, pp. 127-171.
- Alvarez-Zúñiga, M.T., Santiago-Hernández, A., Rodríguez-Mendoza, J., Campos, J.E., Pavón-Orozco, P., Trejo-Estrada, S., Hidalgo-Lara, M.E. (2017) Taxonomic identification of the thermotolerant and fast-growing fungus *Lichtheimia ramosa* H71D and biochemical characterization of the thermophilic xylanase Lr XynA. *AMB Express* 7, 194.
- Alves, M.H., Campos-Takaki, G.M., Okada, K., Pessoa, F., Milanez, A.I. (2005) Detection of extracellular protease in *Mucor* species. *Rev. Iberoam. Micol.* 22, 114-117.
- André, A.L.C.M., Hoffmann, K., Lima, D.X., de Oliveira, R.J.V., Vieira, H.E.E., Malosso, E., Maia, L.C., da Silva, G.A. (2014) A new species of *Lichtheimia* (Mucoromycotina, Mucorales) isolated from Brazilian soil. *Mycol. Prog.* 13, 343-352.
- Anisha, G.S. (2017) β -Galactosidases, in: Pandey, A., Negi, S., Soccol, C.R. (eds.), *Current developments in biotechnology and bioengineering: Production, isolation and purification of industrial products*, 1st ed. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 395-421.
- Assamoi, A.A., Bedikou, M.E., Soro-Yao, A.A., Niamke, L.S., Destain, J., Thonart, P. (2015) β -Galactosidase production by solid state fermentation of wheat bran/whole wheat without any supplement. *World J. Pharm. Pharma. Sci.* 4, 196-207.

- Bankefa, O.E., Gabriel-Ajobiwe, R.A., Akinyele, H.A., Oladeji, S.J., Oke, E.A., Ilori, O.M. (2022) Improved β -galactosidase secretion in fresh water fungi through cultural optimization. *Trends Sci.* 19, 2871.
- Barr, D.J.S. (1992) Evolution and kingdoms of organisms from the perspective of a mycologist. *Mycologia* 84, 1-11.
- Bassetto, R.Z., Cabral, P.S., Silveira, M.H.L., Almeida, M.M., Chiquetto, N.C. (2017) Optimization of β -galactosidase production from *Penicillium* sp. for synthesis of galactooligosaccharides. *Int. Food Res. J.* 24, 1793-1798.
- Benny, G.L., Humber, R.A., Morton, J.B. (2001) Zygomycota: Zygomycetes, in: McLaughlin, D.J., McLaughlin, E.G., Lemke, P.A. (eds.), Systematics and Evolution. Springer Berlin Heidelberg, pp. 113-146.
- Bernat, P., Nykiel-Szymańska, J., Stolarek, P., Słaba, M., Szewczyk, R., Różalska, S. (2018) 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid-induced oxidative stress: Metabolome and membrane modifications in *Umbelopsis isabellina*, a herbicide degrader. *PLoS ONE* 13, e0199677.
- Binder, U., Navarro-Mendoza, M.I., Naschberger, V., Bauer, I., Nicolas, F.E., Pallua, J.D., Lass-Flörl, C., Garre, V. (2018) Generation of a *Mucor circinelloides* reporter strain- A promising new tool to study antifungal drug efficacy and mucormycosis. *Genes* 9, 613.
- Boeke, J.D., Trueheart, J., Natsoulis, G., Fink, G.R. (1987) 5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Methods Enzymol.* 154, 164-175.
- Brandão, R.L., Nicoli, J.R., de Souza Figueiredo, A.F. (1987) Purification and characterization of a β -galactosidase from *Fusarium oxysporum* var. *lini*. *J. Dairy Sci.* 70, 1331-1337.
- Bruni, G.O., Zhong, K., Lee, S.C., Wang, P. (2019) CRISPR-Cas9 induces point mutation in the mucormycosis fungus *Rhizopus delemar*. *Fungal Genet. Biol.* 124, 1-7.
- Cardelle-Cobas, A., Corzo, N., Olano, A., Peláez, C., Requena, T., Ávila, M. (2011) Galactooligosaccharides derived from lactose and lactulose: Influence of structure on *Lactobacillus*, *Streptococcus* and *Bifidobacterium* growth. *Int. J. Food Microbiol.* 149, 81-87.
- Cardoso, B.B., Silvério, S.C., Abrunhosa, L., Teixeira, J.A., Rodrigues, L.R. (2017) β -Galactosidase from *Aspergillus lacticoffeatus*: A promising biocatalyst for the synthesis of novel prebiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 257, 67-74.

- Carneiro, L.A., Yu, L., Dupree, P., Ward, R.J. (2018) Characterization of a β -galactosidase from *Bacillus subtilis* with transgalactosylation activity. *Int. J. Biol. Macromol.* 120, 279-287.
- Chaisuwan, W., Manassa, A., Phimolsiripol, Y., Jantanasakulwong, K., Chaiyaso, T., Pathom-aree, W., You, S., Seesuriyachan, P. (2020) Integrated ultrasonication and microbubble-assisted enzymatic synthesis of fructooligosaccharides from brown sugar. *Foods* 9, 1833.
- Chanalia, P., Gandhi, D., Attri, P., Dhanda, S. (2018) Purification and characterization of β -galactosidase from probiotic *Pediococcus acidilactici* and its use in milk lactose hydrolysis and galactooligosaccharide synthesis. *Bioorg. Chem.* 77, 176-189.
- Chen, C., Deng, J., Lv, X., Li, J., Du, G., Li, H., Liu, L. (2020) Biocatalytic synthesis of lactosucrose using a recombinant thermostable β -fructofuranosidase from *Arthrobacter* sp. 10138. *Bioengineered* 11, 416-427.
- Cruz, R., Cruz, V.D., Belote, J.G., Khenayfes, M. de O., Dorta, C., Oliveira, L.H. dos S. (1999) Properties of a new fungal β -galactosidase with potential application in the dairy industry. *Rev. Microbiol.* 30, 265-271.
- Cui, Z., Zhang, X., Yang, H., Sun, L. (2017) Bioremediation of heavy metal pollution utilizing composite microbial agent of *Mucor circinelloides*, *Actinomucor* sp. and *Mortierella* sp. *J. Environ. Chem. Eng.* 5, 3616-3621.
- Cunha, J.S., Ottoni, C.A., Morales, S.A.V., Silva, E.S., Maiorano, A.E., Perna, R.F. (2019) Synthesis and characterization of fructosyltransferase from *Aspergillus oryzae* IPT-301 for high fructooligosaccharides production. *Braz. J. Chem. Eng.* 36, 657-668.
- Davani-Davari, D., Negahdaripour, M., Karimzadeh, I., Seifan, M., Mohkam, M., Masoumi, S.J., Berenjjan, A., Ghasemi, Y. (2019) Prebiotics: Definition, types, sources, mechanisms, and clinical applications. *Foods* 8, 92.
- de Albuquerque, T.L., de Sousa, M., e Silva, N.C.G., Neto, C.A.C.G., Gonçalves, L.R.B., Fernandez-Lafuente, R., Rocha, M.V.P. (2021) β -Galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: Characterization, production, immobilization and applications - A review. *Int. J. Biol. Macromol.* 191, 881-898.
- De Andrade Silva, C.A., da Silva, P.G.P., da Silva, G.F.A., Dantas, D.P., Leite, R.S.R., Fonseca, G.G. (2020) Biotransformation of fruit residues via solid state bioprocess using *Lichtheimia ramosa*. *SN Appl. Sci.* 2, 861.

- De Jesus, L.F.M.C., Guimarães, L.H.S. (2021) Production of β -galactosidase by *Trichoderma* sp. through solid-state fermentation targeting the recovery of galactooligosaccharides from whey cheese. *J. Appl. Microbiol.* 130, 865-877.
- Dragosits, M., Pflügl, S., Kurz, S., Razzazi-Fazeli, E., Wilson, I.B., Rendic, D. (2014) Recombinant *Aspergillus* β -galactosidases as a robust glycomic and biotechnological tool. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 3553-3567.
- Duarte, L.S., da Natividade Schöffner, J., Lorenzoni, A.S.G., Rodrigues, R.C., Rodrigues, E., Hertz, P.F. (2017) A new bioprocess for the production of prebiotic lactosucrose by an immobilized β -galactosidase. *Process Biochem.* 55, 96-103.
- Dyal, S.D., Narine, S.S. (2005) Implications for the use of *Mortierella* fungi in the industrial production of essential fatty acids. *Food Res. Int.* 38, 445-467.
- Dzurendova, S., Losada, C.B., Dupuy-Galet, B.X., Fjær, K., Shapaval, V. (2022) Mucoromycota fungi as powerful cell factories for modern biorefinery. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 106, 101-115.
- Ferreira, J.A., Lennartsson, P.R., Edebo, L., Taherzadeh, M.J. (2013) Zygomycetes-based biorefinery: Present status and future prospects. *Bioresour. Technol.* 135, 523-532.
- Fischer, C., Kleinschmidt, T. (2018) Synthesis of galactooligosaccharides in milk and whey: A review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 17, 678-697.
- Garcia, N.F.L., da Silva Santos, F.R., Gonçalves, F.A., da Paz, M.F., Fonseca, G.G., Leite, R.S.R. (2015) Production of β -glucosidase on solid-state fermentation by *Lichtheimia ramosa* in agroindustrial residues: Characterization and catalytic properties of the enzymatic extract. *Electron. J. Biotechnol.* 18, 314-319.
- Garcia, N.F.L., da Silva Santos, F.R., Bocchini, D.A., da Paz, M.F., Fonseca, G.G., Leite, R.S.R. (2018) Catalytic properties of cellulases and hemicellulases produced by *Lichtheimia ramosa*: Potential for sugarcane bagasse saccharification. *Ind. Crops Prod.* 122, 49-56.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D., Bairoch, A. (2005) Protein identification and analysis tools on the ExPASy server, in: Walker, J.M. (ed.), The proteomics protocols handbook. Humana Press Inc., Totowa, NJ, USA, pp. 571-607.
- Gomes, T.A., Santos, L.B., Nogueira, A., Spier, M.R. (2018) Increase in an intracellular β -galactosidase biosynthesis using *L. reuteri* NRRL B-14171, inducers and alternative low-cost nitrogen sources under submerged cultivation. *Int. J. Food Eng.* 14, 20170333.

- Gonçalves, F.A., Leite, R.S.R., Rodrigues, A., Argandoña, E.J.S., Fonseca, G.G. (2013) Isolation, identification and characterization of a novel high level β -glucosidase-producing *Lichtheimia ramosa* strain. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 2, 377-384.
- Gottfredsen, S.E. (1990) Microbial lipases, in: Fogarty W.M., Kelly C.T. (eds.), Microbial enzymes and biotechnology. Elsevier Science Publishers Ltd, London, UK, pp. 255-274.
- Guerrero, C., Vera, C., Serna, N., Illanes, A. (2017) Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase in an agarose matrix functionalized by four different methods and application to the synthesis of lactulose. *Bioresour. Technol.* 232, 53-63.
- Halbmayr, E., Mathiesen, G., Nguyen, T.H., Maischberger, T., Peterbauer, C.K., Eijnsink, V.G., Haltrich, D. (2008) High-level expression of recombinant β -galactosidases in *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus sakei* using a sakacin P-based expression system. *J. Agric. Food Chem.* 56, 4710-4719.
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41, 95-98.
- Hesseltine, C.W. (1983) Microbiology of oriental fermented foods. *Annu. Rev. Microbiol.* 37, 575-601.
- Higashiyama, K., Fujikawa, S., Park, E.J., Shimizu, S. (2002) Production of arachidonic acid by *Mortierella* fungi. *Bioprocess Eng.* 7, 252-262.
- Hill, D., Sugrue, I., Tobin, C., Hill, C., Stanton, C., Ross, R.P. (2018) The *Lactobacillus casei* group: History and health related applications. *Front. Microbiol.* 9, 2107.
- Hofmann, K., Stoffel, W. (1993) TMBASE-A database of membrane spanning protein segments. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 374, 166.
- Holland, H.L. (2001) Biotransformation of organic sulfides. *Nat. Prod. Rep.* 18, 171-181.
- Hua, X., Yang, R., Zhang, W., Fei, Y., Jin, Z., Jiang, B. (2010) Dual-enzymatic synthesis of lactulose in organic-aqueous two-phase media. *Food Res. Int.* 43, 716-722.
- Hulo, N., Bairoch, A., Bulliard, V., Cerutti, L., Cuče, B.A., De Castro, E., Lachaize, C., Langendijk-Genevaux, P.S., Sigrist, C.J. (2008) The 20 years of PROSITE. *Nucleic Acids Res.* 36, D245-D249.
- Hung, M.N., Lee, B. (2002) Purification and characterization of a recombinant β -galactosidase with transgalactosylation activity from *Bifidobacterium infantis* HL96. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, 439-445.
- Hüttner, S., Granchi, Z., Nguyen, T.T., van Pelt, S., Larsbrink, J., Thanh, V.N., Olsson, L. (2018) Genome sequence of *Rhizomucor pusillus* FCH 5.7, a thermophilic

- zygomycete involved in plant biomass degradation harbouring putative GH9 endoglucanases. *Biotechnol. Rep.* 20, e00279.
- Ibragimova, S., Szebenyi, Cs., Sinka, R., Alzyoud, E.I., Homa, M., Vágvölgyi, Cs., Nagy, G., Papp, T. (2020) CRISPR-Cas9-based mutagenesis of the mucormycosis-causing fungus *Lichtheimia corymbifera*. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 3727.
- Invernici, M.M., Furlaneto, F.A.C., Salvador, S.L., Ouwehand, A.C., Salminen, S., Mantziari, A., Vinderola, G., Ervolino, E., Santana, S.I., Silva, P.H.F., Messori, M.R. (2020) *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 presents antimicrobial potential against periodontopathogens and modulates the immunological response of oral mucosa in periodontitis patients. *PLoS ONE* 15, e0238425.
- Ismail, S.A., Mabrouk, S.S., Mahoney, R.R. (1997) Purification and characterization of β -galactosidase from *Mucor pusillus*. *J. Food Biochem.* 21, 145-162.
- Javed, M.M., Zahoor, S., Shafaat, S., Mehmooda, I., Gul, A., Rasheed, H., Bukhari, A.I., Aftab, M.N. (2012) Wheat bran as a brown gold: Nutritious value and its biotechnological applications. *Afr. J. Microbiol. Res.* 6, 724-733.
- Jia, H., Wang, P. (2007) Enzymatic synthesis of galactosyl lactic ethyl ester and its polymer for use as biomaterials. *J. Biotechnol.* 132, 314-317.
- Ju, L.-K., Loman, A.A., Islam, S.M. (2019) α -Galactosidase and its applications in food processing, in: Melton, L., Shahidi, F., Varelis, P. (eds.), Encyclopedia of food chemistry. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 124-128.
- Juturu, V., Wu, J.C. (2018) Heterologous protein expression in *Pichia pastoris*: Latest research progress and applications. *ChemBioChem* 19, 7-21.
- Kaur, R., Panesar, P.S., Singh, R.S. (2018) Utilization of agro-industrial residues for the production of β -galactosidase using fungal isolate under solid state fermentation conditions. *Acta Aliment.* 47, 162-170.
- Kaur, R., Panesar, P.S., Singh, R.S. (2015) Utilization of whey for the production of β -galactosidase using yeast and fungal culture. *WASET Int. J. Nutr. Food Eng.* 9, 739-743.
- Kazemi, S., Khayati, G., Faezi-Ghasemi, M. (2016) β -Galactosidase production by *Aspergillus niger* ATCC 9142 using inexpensive substrates in solid-state fermentation: Optimization by orthogonal arrays design. *Iran. Biomed. J.* 20, 287-294.

- Kim, S.G., Batt, C.A. (1988) Heterologous expression and stability of the *Escherichia coli* β -galactosidase gene in *Streptococcus lactis* by translation fusion. *Food Microbiol.* 5, 59-73.
- Kotogán, A., Zambrano, C., Kecskeméti, A., Varga, M., Szekeres, A., Papp, T., Vágvölgyi, Cs., Takó, M. (2018) An organic solvent-tolerant lipase with both hydrolytic and synthetic activities from the oleaginous fungus *Mortierella echinosphaera*. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 1129.
- Kubicek, C.P., Herrera-Estrella, A., Seidl-Seiboth, V., Martinez, D.A., Druzhinina, I.S., Thon, M., Zeilinger, S., Casas-Flores, S., Horwitz, B.A., Mukherjee, P.K., Mukherjee, M., *et al.* (2011) Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. *Genome Biol.* 12, 1-15.
- Langarica-Fuentes, A., Handley, P.S., Houlden, A., Fox, G., Robson, G.D. (2014) An investigation of the biodiversity of thermophilic and thermotolerant fungal species in composts using culture-based and molecular techniques. *Fungal Ecol.* 11, 132-144.
- Lateef, A., Oloke, J.K., Kana, E.B.G., Oyeniyi, S.O., Onifade, O.R., Oyeleye, A.O., Oladosu, O.C. (2008) *Rhizopus stolonifer* LAU 07: A novel source of fructosyltransferase. *Chem. Pap.* 62, 635-638.
- Lebreton, A., Corre, E., Jany, J.L., Brillet-Guéguen, L., Pérez-Arques, C., Garre, V., Monsoor, M., Debuchy, R., le Meur, C., Coton, E., Barbier, G., Meslet-Cladière, L. (2020) Comparative genomics applied to *Mucor* species with different lifestyles. *BMC Genom.* 21, 135.
- Lee, J.Y., Kwak, M.S., Roh, J.B., Kim, K., Sung, M.H. (2017) Microbial β -galactosidase of *Pediococcus pentosaceus* ID-7: Isolation, cloning, and molecular characterization. *J. Microbiol. Biotechnol.* 27, 598-609.
- Li, D., Li, S., Wu, Y., Jin, M., Zhou, Y., Wang, Y., Chen, X., Han, Y. (2020) Cloning and characterization of a new β -galactosidase from *Alteromonas* sp. QD01 and its potential in synthesis of galacto-oligosaccharides. *Mar. Drugs* 18, 312.
- Liao, X., Huang, J., Zhou, Q., Guo, L., Lin, J., You, L., Liu, S., Yang, J. (2017) Designing of a novel β -galactosidase for production of functional oligosaccharides. *Eur. Food Res. Technol.* 243, 979-986.
- Liu, R., Chen, L., Jiang, Y., Zhou, Z., Zou, G. (2015) Efficient genome editing in filamentous fungus *Trichoderma reesei* using the CRISPR/Cas9 system. *Cell Discov.* 1, 10507.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 25, 402-408.

- Lorenzoni, A.S.G., Aydos, L.F., Klein, M.P., Rodrigues, R.C., Hertz, P.F. (2014) Fructooligosaccharides synthesis by highly stable immobilized β -fructofuranosidase from *Aspergillus aculeatus*. *Carbohydr. Polym.* 103, 193-197.
- Lu, L., Guo, L., Wang, K., Liu, Y., Xiao, M. (2020) β -Galactosidases: A great tool for synthesizing galactose-containing carbohydrates. *Biotechnol. Adv.* 39, 107465.
- Mahoney, R.R. (2002) Enzymes exogenous to milk in dairy technology, β -D-Galactosidase, in: Roginski, H. (ed.), Encyclopedia of dairy sciences. Elsevier, pp. 907-914.
- Manan, M.A., Webb, C. (2018) Estimation of growth in solid state fermentation: A review. *Malays. J. Microbiol.* 14, 61-69.
- Martarello, R.D., Cunha, L., Cardoso, S.L., de Freitas, M.M., Silveira, D., Fonseca-Bazzo, Y.M., Homem-de-Mello, M., Filho, E.X.F., Magalhães, P.O. (2019) Optimization and partial purification of beta-galactosidase production by *Aspergillus niger* isolated from Brazilian soils using soybean residue. *AMB Express* 9, 81.
- Mateos Diaz, J.C., Rodríguez, J.A., Roussos, S., Cordova, J., Abousalham, A., Carriere, F., Baratti, J. (2006) Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. *Enzym. Microb. Technol.* 39, 1042-1050.
- McIlvaine, T.C. (1921) A buffer solution for colorimetric comparison. *J. Biol. Chem.* 49, 183-186.
- Morin-Sardin, S., Nodet, P., Coton, E., Jany, J.L. (2017) *Mucor*: A Janus-faced fungal genus with human health impact and industrial applications. *Fungal Biol. Rev.* 31, 12-32.
- Morin-Sardin, S., Rigalma, K., Coroller, L., Jany, J.L., Coton, E. (2016) Effect of temperature, pH, and water activity on *Mucor* spp. growth on synthetic medium, cheese analog and cheese. *Food Microbiol.* 56, 69-79.
- Movahedpour, A., Ahmadi, N., Ghalamfarsa, F., Ghesmati, Z., Khalifeh, M., Maleksabet, A., Shabaninejad, Z., Taheri-Anganeh, M., Savardashtaki, A. (2022) β -Galactosidase: From its source and applications to its recombinant form. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 69, 612-628.
- Nagy, G., Szebenyi, Cs., Csernetics, Á., Vaz, A.G., Tóth, E.J., Vágvölgyi, Cs., Papp, T. (2017) Development of a plasmid free CRISPR-Cas9 system for the genetic modification of *Mucor circinelloides*. *Sci. Rep.* 7, 16800.
- Nagy, Z., Kiss, T., Szentirmai, A., Biró, S. (2001) β -Galactosidase of *Penicillium chrysogenum*: Production, purification, and characterization of the enzyme. *Protein Expr. Purif.* 21, 24-29.

- Nakayama, T., Amachi, T. (2002) β -Galactosidase, enzymology, in: Flickinger, M.C., Drew, S.W. (eds.), Encyclopedia of bioprocess technology. John Wiley & Sons Inc., Hoboken, NJ, USA, ebt102.
- Nath, A., Mondal, S., Chakraborty, S., Bhattacharjee, C., Chowdhury, R. (2014) Production, purification, characterization, immobilization, and application of β -galactosidase: A review. *Asia-Pac. J. Chem. Eng.* 9, 330-348.
- Neves, M.L.C., Da Silva, M.F., Souza-Motta, C.M., Spier, M.R., Soccol, C.R., Porto, T.S., Moreira, K.A., Porto, A.L.F. (2011) *Lichtheimia blakesleeana* as a new potential producer of phytase and xylanase. *Molecules* 16, 4807-4817.
- Nguyen, T.T., Nguyen, H.M., Geiger, B., Mathiesen, G., Eijssink, V.G., Peterbauer, C.K., Haltrich, D., Nguyen, T.H. (2015) Heterologous expression of a recombinant lactobacillal β -galactosidase in *Lactobacillus plantarum*: Effect of different parameters on the sakacin P-based expression system. *Microb. Cell Factories* 14, 30.
- Nielsen, H. (2017) Predicting secretory proteins with SignalP, in: Kihara, D. (ed.), Protein function prediction. Methods and protocols. Humana Press, New York, NY, USA, pp. 59-73.
- Nivetha, A., Mohanasrinivasan, V. (2017) Mini review on role of β -galactosidase in lactose intolerance. *IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng.* 263, 022046.
- O'Connell, S., Walsh, G. (2010) A novel acid-stable, acid-active β -galactosidase potentially suited to the alleviation of lactose intolerance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86, 517-524.
- O'Connell, S., Walsh, G. (2007) Purification and properties of a β -galactosidase with potential application as a digestive supplement. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 141, 1-13.
- Oda, K., Kakizono, D., Yamada, O., Iefuji, H., Akita, O., Iwashita, K. (2006) Proteomic analysis of extracellular proteins from *Aspergillus oryzae* grown under submerged and solid-state culture conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 3448-3457.
- Oh, N.S., Kim, K., Oh, S., Kim, Y. (2019) Enhanced production of galactooligosaccharides enriched skim milk and applied to potentially synbiotic fermented milk with *Lactobacillus rhamnosus* 4B15. *Food Sci. Anim. Resour.* 39, 725-741.
- Ojwach, J., Kumar, A., Mutanda, T., Mukaratirwa, S. (2020) Fructosyltransferase and inulinase production by indigenous coprophilous fungi for the biocatalytic conversion of sucrose and inulin into oligosaccharides. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 30, 101867.

- Orikasa, Y., Oda, Y. (2013) Molecular characterization of β -fructofuranosidases from *Rhizopus delemar* and *Amylomyces rouxii*. *Folia Microbiol.* 58, 301-309.
- Orikasa, Y., Oda, Y., Ohwada, T. (2018) Identification of *sucA*, encoding β -fructofuranosidase, in *Rhizopus microsporus*. *Microorganisms* 6, 26.
- Outtrup, H., Boyce, C.O.L (1990) Microbial proteinases and biotechnology, in: Fogarty, W.M., Kelly, C.T. (eds.), *Microbial enzymes and biotechnology*. Elsevier Science Publishers Ltd, London, UK, pp. 227-254.
- Pagni, M., Ioannidis, V., Cerutti, L., Zahn-Zabal, M., Jongeneel, C.V., Falquet, L. (2004) MyHits: a new interactive resource for protein annotation and domain identification. *Nucleic Acids Res.* 32, W332-W335.
- Pais, P., Almeida, V., Yılmaz, M., Teixeira, M.C. (2020) *Saccharomyces boulardii*: What makes it tick as successful probiotic? *J. Fungi* 6, 78.
- Panesar, P.S., Kaur, R., Singh, R.S. (2016) Isolation and screening of fungal strains for β -galactosidase production. *WASET Int. J. Nutr. Food Eng.* 10, 400-404.
- Panesar, P.S., Kaur, R., Singh, R.S., Kennedy, J.F. (2018) Biocatalytic strategies in the production of galacto-oligosaccharides and its global status. *Int. J. Biol. Macromol.* 111, 667-679.
- Panesar, P.S., Kumari, S., Panesar, R. (2010) Potential applications of immobilized β -galactosidase in food processing industries. *Enzyme Res.* 2010, 473137.
- Papp, T., Nyilasi, I., Csernetics, Á., Nagy, G., Takó, M., Vágvölgyi, Cs. (2016) Improvement of industrially relevant biological activities in Mucoromycotina fungi, in: Schmoll, M., Dattenböck, C. (eds.), *Gene expression systems in fungi: Advancements and applications*. Fungal Biology. Springer, Cham, Switzerland, pp. 97-118.
- Park, M.J., Park, M.S., Ji, G.E. (2019) Cloning and heterologous expression of the β -galactosidase gene from *Bifidobacterium longum* RD47 in *B. bifidum* BGN4. *J. Microbiol. Biotechnol.* 29, 1717-1728.
- Patel, J.D., Raol, B.V., Bhavsar, N.H., Raol, G.G. (2018) One-factor-at-a-time (OFAT) optimization of β -galactosidase production from *Aspergillus flavus* gr. NFCCI-2728 in submerged fermentation. *J. Harmoniz. Res. Appl. Sci.* 6, 227-235.
- Petrikkos, G., Skiada, A., Lortholary, O., Roilides, E., Walsh, T.J., Kontoyiannis, D.P. (2012) Epidemiology and clinical manifestations of mucormycosis. *Clin. Infect. Dis.* 54, S23-34.

- Rabie, N.B., Althaqafi, A.O. (2012) *Rhizopus*-associated soft tissue infection in an immunocompetent air-conditioning technician after a road traffic accident: A case report and review of the literature. *J. Infect. Public Health*. 5, 109-111.
- Raol, G.G., Raol, B.V., Prajapati, V.S., Bhavsar, N.H. (2015) Utilization of agro-industrial waste for β -galactosidase production under solid state fermentation using halotolerant *Aspergillus tubingensis* GR1 isolate. *3 Biotech* 5, 411-421.
- Ray, R.C., Ravi, V. (2005) Post harvest spoilage of sweetpotato in tropics and control measures. *Crit. Rev. Food Sci.* 45, 623-644.
- Ren, G-h., Cao, L-c., Kong, W., Wang, Z-j., Liu, Y-h. (2016) Efficient secretion of the β -galactosidase Bgal1-3 via both Tat-dependent and Tat-independent pathways in *Bacillus subtilis*. *J. Agric. Food Chem.* 64, 5708-5716.
- Robledo, A., Aguilar, C.N., Belmares-Cerda, R.E., Flores-Gallegos, A.C., Contreras-Esquivel, J.C., Montañez, J.C., Mussatto, S.I. (2016) Production of thermostable xylanase by thermophilic fungal strains isolated from maize silage. *CyTA J. Food* 14, 302-308.
- Rodrigues, R.C., Fernandez-Lafuente, R. (2010) Lipase from *Rhizomucor miehei* as an industrial biocatalyst in chemical process. *J. Mol. Catal., B Enzym.* 64, 1-22.
- Rodriguez-Colinas, B., Poveda, A., Jimenez-Barbero, J., Ballesteros, A.O., Plou, F.J. (2012) Galacto-oligosaccharide synthesis from lactose solution or skim milk using the β -galactosidase from *Bacillus circulans*. *J. Agric. Food Chem.* 60, 6391-6398.
- Saburi, W., Ueno, H.M., Matsui, H., Mori, H. (2014) Acidophilic β -galactosidase from *Aspergillus niger* AHU7120 with lactose hydrolytic activity under simulated gastric conditions. *J. Appl. Glycosci.* 61, 53-57.
- Salar, R.K., Aneja, K.R. (2007) Thermophilic fungi: Taxonomy and biogeography. *J. Agr. Technol.* 3, 77-107.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York.
- Saqib, S., Akram, A., Halim, S.A., Tassaduq, R. (2017) Sources of β -galactosidase and its applications in food industry. *3 Biotech* 7, 79.
- Schwartz, V.U., Santiago, A.L.C.M.A., Jacobsen, I.D., Voigt, K. (2014) The pathogenic potential of the *Lichtheimia* genus revisited: *Lichtheimia brasiliensis* is a novel, non-pathogenic species. *Mycoses* 57, 128-131.

- Sen, S., Ray, L., Chattopadhyay, P. (2012) Production, purification, immobilization, and characterization of a thermostable β -galactosidase from *Aspergillus alliaceus*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 167, 1938-1953.
- Seyis, I., Aksoz, N. (2004) Production of lactase by *Trichoderma* sp. *Food Technol. Biotechnol.* 42, 121-124.
- Shaikh, S.A., Khire, J.M., Khan, M.I. (1997) Production of β -galactosidase from thermophilic fungus *Rhizomucor* sp. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 19, 239-245.
- Shaikh, S.A., Khire, J.M., Khan, M.I. (1999) Characterization of a thermostable extracellular β -galactosidase from a thermophilic fungus *Rhizomucor* sp. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 1472, 314-322.
- Sheikhi, A., Shakerian, M., Giti, H., Baghaeifar, M., Jafarzadeh, A., Ghaed, V., Heibor, M.R., Baharifar, N., Dadafarin, Z., Bashirpour, G. (2016) Probiotic yogurt culture *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and *Lactobacillus acidophilus* LA-5 modulate the cytokine secretion by peripheral blood mononuclear cells from patients with ulcerative colitis. *Drug Res.* 66, 300-305.
- Silva, C.A.D.A., Lacerda, M.P.F., Leite, R.S.R., Fonseca, G.G. (2013) Production of enzymes from *Lichtheimia ramosa* using Brazilian savannah fruit wastes as substrate on solid state bioprocesses. *Electron. J. Biotechnol.* 16, 7.
- Silva, M.E.D., Franco, T.T. (1999) Purification of microbial β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis* by bioaffinity partitioning. *Rev. Microbiol.* 30, 324-331.
- Silva, M.P., Rossoni, R.D., Junqueira, J.C., Jorge, A.O.C. (2016) Probiotics for prevention and treatment of candidiasis and other infectious diseases: *Lactobacillus* spp. and other potential bacterial species, in: Rao, V., Rao, L.G. (eds.), Probiotics and prebiotics in human nutrition and health. IntechOpen, London, UK, pp. 241-262.
- Silvério, S.C., Macedo, E.A., Teixeira, J.A., Rodrigues, L.R. (2018) New β -galactosidase producers with potential for prebiotic synthesis. *Bioresour. Technol.* 250, 131-139.
- Song, Y.S., Suh, Y.J., Park, C., Kim, S.W. (2013) Improvement of lactulose synthesis through optimization of reaction conditions with immobilized β -galactosidase. *Korean J. Chem. Eng.* 30, 160-165.
- Spatafora, J.W., Chang, Y., Benny, G.L., Lazarus, K., Smith, M.E., Berbee, M.L., Bonito, G., Corradi, N., Grigoriev, I., Gryganskyi, A., James, T.Y., O'Donnell, K., Roberson, R.W., Taylor, T.N., Uehling, J., Vilgalys, R., White, M.M., Stajich, J.E. (2016) A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia* 108, 1028-1046.

- Srivastava, D., Walker, J. (1959) Mechanisms of infection of sweet potato roots by *Rhizopus stolonifer*. *Phytopathology* 49, 400-406.
- Suyama, K., Adachi, S., Toba, T., Sohma, T., Hwang, C.J., Itoh, T. (1986) Isoraffinose (6^G- β -galactosylsucrose) synthesized by the intermolecular transgalactosylation reaction of *Escherichia coli* β -galactosidase. *Agric. Biol. Chem.* 50, 2069-2075.
- Sykes, D.E., Abbas, S.A., Barlow, J.J., Matta, K.L. (1983) Substrate specificity and other properties of the β -D-galactosidase from *Aspergillus niger*. *Carbohydr. Res.* 116, 127-138.
- Szajewska, H., Konarska, Z., Kołodziej, M. (2016) Probiotic bacterial and fungal strains: Claims with evidence. *Dig. Dis.* 34, 251-259.
- Szilagyi, A., Ishayek, N. (2018) Lactose intolerance, dairy avoidance, and treatment options. *Nutrients* 10, 1994.
- Taherzadeh, M.J., Edebo, L. (2009) Exploring zygomycetes fungi for industrial applications. *N Biotechnol.* 25, 83.
- Tanaka, Y., Kagamiishi, A., Kiuchi, A., Horiuchi, T. (1975) Purification and properties of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *J. Biochem.* 77, 241-247.
- Tochio, T., Kadota, Y., Tanaka, T., Koga, Y. (2018) 1-Kestose, the smallest fructooligosaccharide component, which efficiently stimulates *Faecalibacterium prausnitzii* as well as Bifidobacteria in humans. *Foods* 7, 140.
- Tokošová, S., Hronská, H., Rosenberg, M. (2015) Production of galacto-oligosaccharides by commercial preparates of fungal galactosidase. *Acta Chim. Slovaca* 8, 101-106.
- Torres, D.P., Gonçalves, M.D.P.F., Teixeira, J.A., Rodrigues, L.R. (2010) Galacto-oligosaccharides: Production, properties, applications, and significance as prebiotics. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 9, 438-454.
- Tusnányi, G.E., Simon, I. (2001) The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics* 17, 849-850.
- Vágvölgyi, Cs., Vastag, M., Ács, K., Papp, T. (1999) *Rhizomucor tauricus*: a questionable species of the genus. *Mycol. Res.* 103, 1318-1322.
- van Heerden, I., Cronjé, C., Swart, S.H., Kotzé, J.M. (2002) Microbial, chemical and physical aspects of citrus waste composting. *Bioresour. Technol.* 81, 71-76.
- van Heeswijk R., Roncero M.I.G. (1984) High frequency transformation of *Mucor* with recombinant plasmid DNA. *Carlsberg Res. Commun.* 49, 691-702.

- Vastag, M., Papp, T., Kasza, Zs., Vágvölgyi, Cs. (1998) Differentiation of *Rhizomucor* species by carbon source utilization and isoenzyme analysis. *J. Clin. Microbiol.* 36, 2153-2156.
- Vastag, M., Papp, T., Kasza, Zs., Vágvölgyi, Cs. (2000) Intraspecific variation in two species of *Rhizomucor* assessed by random amplified polymorphic DNA analysis. *J. Basic Microbiol.* 40, 269-277.
- Veana, F., Flores-Gallegos, A.C., Gonzalez-Montemayor, A.M., Michel-Michel, M., Lopez-Lopez, L., Aguilar-Zarate, P., Ascacio-Valdés, J.A., Rodríguez-Herrera, R. (2018) Invertase: An enzyme with importance in confectionery food industry, in: Kuddus, M. (ed.), *Enzymes in food technology*. Springer, Singapore, pp. 187-212.
- Vera, C., Córdova, A., Aburto, C., Guerrero, C., Suárez, S., Illanes, A. (2016) Synthesis and purification of galacto-oligosaccharides: state of the art. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 32, 197.
- Verkhnyatskaya, S., Ferrari, M., de Vos, P., Walvoort, M.T.C. (2019) Shaping the infant microbiome with non-digestible carbohydrates. *Front. Microbiol.* 10, 343.
- Vidya, B., Palaniswamy, M., Angayarkanni, J., Nawaz, K.A., Thandeeswaran, M., Chaithanya, K.K., Tekluu, B., Muthusamy, K., Gopalakrishnan, V.K. (2020a) Purification and characterization of β -galactosidase from newly isolated *Aspergillus terreus* (KUBCF1306) and evaluating its efficacy on breast cancer cell line (MCF-7). *Bioorg. Chem.* 94, 103442.
- Vidya, C.H., Gnanesh Kumar, B.S., Chinmayee, C.V., Singh, S.A. (2020b) Purification, characterization and specificity of a new GH family 35 galactosidase from *Aspergillus awamori*. *Int. J. Biol. Macromol.* 156, 885-895.
- Villamiel, M., Montilla, A., Olano, A., Corzo, N. (2014) Production and bioactivity of oligosaccharides derived from lactose, in: Moreno, F.J., Sanz, M.L. (eds.), *Food oligosaccharides: Production, analysis and bioactivity*. Wiley-Blackwell, Chichester, UK, pp. 137-167.
- Vishwanataha, T., Sampath, A., Jain, S.N., Divyashree, B.C., Reena, V., Sowmya, G., MohanKumar, B.S., Venugopal, N., Patil, S.J., Siddalingeshwara, K.G. (2012) A novel approach for screening and synthesis of β -galactosidase from microbial origin. *Int. J. Appl. Biotechnol. Biochem.* 2, 285-290.
- Wagner, L., Stielow, B., Hoffmann, K., Petkovits, T., Papp, T., Vágvölgyi, Cs., de Hoog, G. S., Verkley, G., Voigt, K. (2013) A comprehensive molecular phylogeny of the

- Mortierellales (Mortierellomycotina) based on nuclear ribosomal DNA. *Persoonia* 30, 77-93.
- Wang, Y., Liu, X., Zheng, R. (2013) Four new species records of *Umbelopsis* (Mucoromycotina) from China. *J. Mycol.* 2013, 970216.
- Widmer, F., Leuba, J.L. (1979) β -Galactosidase from *Aspergillus niger*: Separation and characterization of three multiple forms. *Eur. J. Biochem.* 100, 559-567.
- Xavier, J.R., Ramana, K.V., Sharma, R.K. (2018) β -Galactosidase: Biotechnological applications in food processing. *J. Food Biochem.* 42, e12564.
- Xie, J., Wang, B., He, Z., Pan, L. (2020) A thermophilic fungal GH36 α -galactosidase from *Lichtheimia ramosa* and its synergistic hydrolysis of locust bean gum. *Carbohydr. Res.* 491, 107911.
- Yamada, M., Chiba, S., Endo, Y., Isobe, K. (2017) New alkalophilic β -galactosidase with high activity in alkaline pH region from *Teratosphaeria acidotherma* AIU BGA-1. *J. Biosci. Bioeng.* 123, 15-19.
- Yuan, T., Yang, P., Wang, Y., Meng, K., Luo, H., Zhang, W., Wu, N., Fan, Y., Yao, B. (2008) Heterologous expression of a gene encoding a thermostable β -galactosidase from *Alicyclobacillus acidocaldarius*. *Biotechnol. Lett.* 30, 343-348.
- Zhang, K., Bonito, G., Hsu, C.M., Hameed, K., Vilgalys, R., Liao, H.L. (2020) *Mortierella elongata* increases plant biomass among non-leguminous crop species. *Agronomy* 10, 754.
- Zhou, Q.Z.K., Chen, X.D. (2001) Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Biochem. Eng. J.* 9, 33-40.
- Zolnere, K., Ciprovica, I. (2017) The comparison of commercially available β -galactosidases for dairy industry: Review, in: Proceedings of the 23rd Annual International Scientific Conference “Research for Rural Development 2017”, Jelgava, Latvia, 17-19 May 2017. Latvia University of Agriculture, Jelgava, Latvia, Volume 1, pp. 215-222.

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm Prof. Dr. Vágvölgyi Csaba tanszékvezetőnek, hogy támogatta és lehetővé tette a munkámat a SZTE TTIK Mikrobiológiai Tanszéken.

Köszönettel tartozom témavezetőimnek, Dr. Takó Miklósnak és Dr. Nagy Gábornak, hogy PhD hallgatói tanulmányaim alatt figyelemmel kísérték és ösztönözték munkásságomat. Köszönöm nekik a sok hasznos elméleti és gyakorlati tanácsot, és a munkám alatt nyújtott sokrétű és önzetlen támogatásukat.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Szekeres Andrásnak és Dr. Varga Mónikának a folyadék-kromatográfiás méréseknél, valamint a szintézis vizsgálatoknál nyújtott elméleti segítségükért, tanácsaikért. Illetve Prof. Dr. Papp Tamásnak, aki lehetővé tette, hogy a molekuláris biológiai kísérleteim is megvalósulhassanak.

Köszönettel tartozom szakdolgozóimnak, Papp Zsanettnek és Juhász Regina Kingának, akik a dolgozatban is ismertetett témán dolgoztak.

Köszönet illeti a 312. labor és 309. labor minden dolgozóját, a laborban nyújtott segítségükért, baráti szavaikért, mellyel nagymértékben segítették munkámat.

Továbbá köszönettel tartozom a SZTE TTIK Mikrobiológiai Tanszék valamennyi dolgozójának, aki bármilyen módon segítette dolgozatom elkészülését.

Hálásan köszönöm Anyukámnak és párjának, testvéremnek és barátaimnak, hogy mindvégig mellettem álltak, támogattak, bíztattak, így hozzásegítettek dolgozatom elkészítéséhez.

A kutatást a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal FK 134886, a 2019-2.1.11-TÉT-2020-00148 és a Széchenyi 2020 Program EFOP-3.6.1-16-2016-00008 projektek támogatták. A dolgozattal kapcsolatos kutatásokhoz az infrastrukturális háttérrel a GINOP-2.3.3-15-2016-00006 számú, „Mikrobiális génbankoz kapcsolódó integrált élettudományi és hatóanyag kutatás-fejlesztési centrum” című pályázat biztosította.

10. FÜGGELÉK

F1. táblázat. A β -galaktozidáz termelés vizsgálatokba bevont Mucoromycota törzsek és aktivitásaik X-gal tartalmú tápközegen. A kék szín intenzitása egyenesen arányos az enzimaktivitás erősségével.

Gombák	Gyűjteményi kód	β -Galaktozidáz aktivitás ¹					
		t (inkubáció)/nap					
		1	2	4	6	8	10
<i>Lichtheimia</i> csoport							
<i>Lichtheimia brasiliensis</i>	SZMC 23766	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS
<i>Lichtheimia corymbifera</i>	SZMC 11361	++	++++	++++	+++++	+++++	+++++
<i>Lichtheimia corymbifera</i>	SZMC 11367	NKS	+	+	++	++	+++
<i>Lichtheimia corymbifera</i>	SZMC 23760	+	+++	++++	++++	++++	+++++
<i>Lichtheimia corymbifera</i>	SZMC 23761	+	+++	++++	+++++	+++++	+++++
<i>Lichtheimia hyalospora</i>	SZMC 11363	+	+++	++++	++++	+++++	+++++
<i>Lichtheimia hyalospora</i>	SZMC 11364	++	++++	++++	+++++	+++++	+++++
<i>Lichtheimia hyalospora</i>	SZMC 23765	NKS	++	++	+++	+++	++++
<i>Lichtheimia ornata</i>	SZMC 11370	++	++++	++++	++++	++++	+++++
<i>Lichtheimia ornata</i>	SZMC 11368	+	+++	+++	++++	+++++	+++++
<i>Lichtheimia ornata</i>	SZMC 23764	+	+++	++++	+++++	+++++	+++++
<i>Lichtheimia ramosa</i>	SZMC 11369	++	++	++++	++++	++++	++++
<i>Lichtheimia ramosa</i>	SZMC 11360	+++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
<i>Lichtheimia ramosa</i>	SZMC 11362	++	++++	++++	+++++	+++++	+++++
<i>Lichtheimia ramosa</i>	SZMC 23762	+	+++	+++	++++	++++	+++++
<i>Lichtheimia ramosa</i>	SZMC 23763	+	++	+++	+++	++++	++++
<i>Lichtheimia sphaerocystis</i>	SZMC 11371	+	+++	+++	++++	+++++	+++++
<i>Lichtheimia sphaerocystis</i>	SZMC 23768	+	+++	++++	++++	++++	+++++
<i>Mortierella</i> csoport							
<i>Mortierella alpina</i>	SZMC 11213	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS
<i>Mortierella gamsii</i>	SZMC 11215	NKS	NKS	NKS	+	++	++

Gombák	Gyűjteményi kód	β -Galaktozidáz aktivitás ¹					
		t (inkubáció)/nap					
		1	2	4	6	8	10
<i>Mortierella antarctica</i>	SZMC 11217	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS
<i>Mortierella echinosphaera</i>	SZMC 11251	+	+	+++	++++	++++	+++++
<i>Mortierella exigua</i>	SZMC 11257	NKS	NKS	+	++	++	++
<i>Mortierella turficola</i>	SZMC 11207	NKS	NKS	+	++	++	+++
<i>Mortierella gemmifera</i>	SZMC 11201	+	+	++	+++	+++	+++
<i>Mortierella globulifera</i>	SZMC 11209	+	++	+++	+++	++++	+++++
<i>Mortierella indohii</i>	SZMC 11253	NKS	+	++	+++	+++	++++
<i>Mortierella capitata</i>	SZMC 11256	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS
<i>Mortierella paraensis</i>	SZMC 11272	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS
<i>Mortierella parvispora</i>	SZMC 11266	NKS	+	+	++	+++	+++
<i>Mortierella rishikeshae</i>	SZMC 11273	NKS	NKS	+	++	+++	++++
<i>Mortierella wolfii</i>	SZMC 11243	+	++	+++	+++	+++	++++
<i>Mortierella zychnae</i>	SZMC 11212	NKS	+	++	++	++	+++
<i>Mortierella epicladia</i>	SZMC 11247	NKS	NKS	NKS	+	+	++
Mucor csoport							
<i>Mucor amphibiorum</i>	SZMC 12014	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS
<i>Mucor circinelloides</i>	SZMC 20680	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS
<i>Mucor circinelloides</i>	SZMC 12028	+	++	++	+++	+++	++++
<i>Mucor corticolus</i>	SZMC 12031	NKS	NKS	NKS	+	+++	+++
<i>Mucor corticolus</i>	SZMC 12058	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS
<i>Mucor fragilis</i>	SZMC 0482	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS
<i>Mucor guillermondii</i>	SZMC 12011	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS
<i>Mucor hiemalis</i> f. <i>hiemalis</i>	SZMC 12056	+	++	++	++	++	+++
<i>Mucor mucedo</i>	SZMC 0485	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS
<i>Mucor piriformis</i>	SZMC 12077	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS
<i>Mucor plumbeus</i>	SZMC 12070	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS
<i>Mucor plumbeus</i>	SZMC 12635	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS

Gombák	Gyűjteményi kód	β -Galaktozidáz aktivitás ¹					
		t (inkubáció)/nap					
		1	2	4	6	8	10
<i>Mucor plumbeus</i>	SZMC 12023	++	++++	++++	++++	++++	+++++
<i>Mucor racemosus</i>	SZMC 0472	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS
<i>Mucor irregularis</i>	SZMC 23820	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS
<i>Mucor irregularis</i>	SZMC 23821	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS
<i>Mucor racemosus</i> f. <i>chibinensis</i>	SZMC 12005	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS
Rhizomucor csoport							
<i>Rhizomucor miehei</i>	SZMC 11005	++	+++	++++	++++	++++	+++++
<i>Rhizomucor miehei</i>	SZMC 11008	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS
<i>Rhizomucor miehei</i>	SZMC 11014	++	++++	+++++	+++++	+++++	+++++
<i>Rhizomucor miehei</i>	SZMC 11007	NKS	+	++	+++	++++	+++++
<i>Rhizomucor miehei</i>	SZMC 11009	NKS	NKS	NKS	+	+	++
<i>Rhizomucor miehei</i>	SZMC 11028	+	+++	++++	++++	++++	+++++
<i>Rhizomucor pusillus</i>	SZMC 11025	+	+++	+++	++++	++++	+++++
<i>Rhizomucor pusillus</i>	SZMC 11024	NKS	NKS	+++	++++	++++	++++
<i>Rhizomucor pusillus</i>	SZMC 11022	+	+++	++++	++++	++++	+++++
<i>Rhizomucor pusillus</i>	SZMC 11023	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS
<i>Rhizomucor pusillus</i>	SZMC 11021	NKS	+	++	++	+++	+++
Rhizopus csoport							
<i>Rhizopus arrhizus</i>	SZMC 21290	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS
<i>Rhizopus arrhizus</i>	SZMC 21291	+	+	+	+	+	+
<i>Rhizopus homotallicus</i>	SZMC 13623	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS
<i>Rhizopus microsporus</i>	SZMC 21297	NKS	NKS	++	+++	++++	++++
<i>Rhizopus microsporus</i>	SZMC 21298	+	++	++	+++	+++	+++
<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>oligosporus</i>	SZMC 13622	NKS	NKS	++	+++	+++	+++
<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>oligosporus</i>	SZMC 13619	NKS	+	+++	++++	++++	+++++

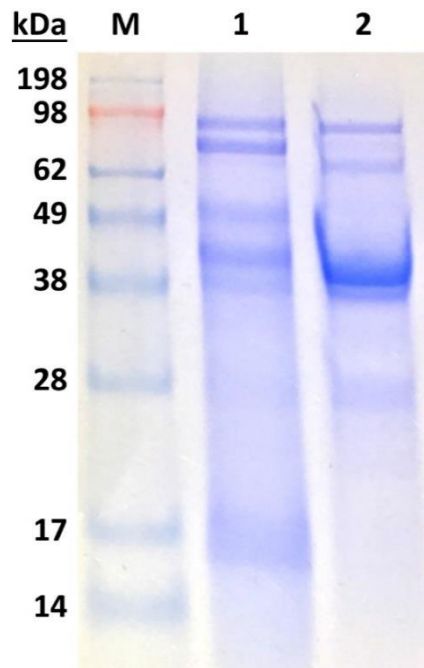
Gombák	Gyűjteményi kód	β -Galaktozidáz aktivitás ¹					
		<i>t</i> (inkubáció)/nap					
		1	2	4	6	8	10
<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>rhizopodiformis</i>	SZMC 13645	++	+++	+++	++++	++++	++++
<i>Rhizopus niveus</i>	SZMC 13625	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS
<i>Rhizopus oryzae</i>	SZMC 0497	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS
<i>Rhizopus oryzae</i>	SZMC 13618	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS
<i>Rhizopus oryzae</i>	SZMC 13635	NKS	NKS	NKS	NKS	++	+++
<i>Rhizopus oryzae</i>	SZMC 13643	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS
<i>Rhizopus oryzae</i>	SZMC 0495	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS
<i>Rhizopus oryzae</i>	SZMC 13616	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS
<i>Rhizopus oryzae</i>	SZMC 13611	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS
<i>Rhizopus oryzae</i>	SZMC 13617	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS
<i>Rhizopus oryzae</i>	SZMC 13634	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS
<i>Rhizopus schipperae</i>	SZMC 21304	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS
<i>Rhizopus stolonifer</i>	SZMC 21295	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS	NKS
<i>Umbelopsis</i> csoport							
<i>Umbelopsis angularis</i>	SZMC 11252	+	++	+++	+++	++++	+++++
<i>Umbelopsis autotrophica</i>	SZMC 11276	+	++	+++	++++	++++	++++
<i>Umbelopsis isabellina</i>	SZMC 11076	+	+	+++	++++	++++	+++++
<i>Umbelopsis isabellina</i>	SZMC 11335	+	+	+++	+++	++++	++++
<i>Umbelopsis isabellina</i>	SZMC 11325	+	++	+++	++++	+++++	+++++
<i>Umbelopsis isabellina</i>	SZMC 11290	+	++	++	++++	++++	+++++
<i>Umbelopsis isabellina</i>	SZMC 11319	+	+	+++	++++	++++	+++++
<i>Umbelopsis isabellina</i>	SZMC 11323	+	++	++	+++	+++	+++
<i>Umbelopsis longicollis</i>	SZMC 11208	+	+++	++++	+++++	+++++	+++++
<i>Umbelopsis ovata</i>	SZMC 22674	+	++	++++	+++++	+++++	+++++
<i>Umbelopsis dimorpha</i>	SZMC 22797	+	+	+	++	+++	+++
<i>Umbelopsis ramanniana</i>	SZMC 11078	+	++	+++	+++++	+++++	+++++

Gombák	Gyűjteményi kód	β -Galaktozidáz aktivitás ¹					
		<i>t</i> (inkubáció)/nap					
		1	2	4	6	8	10
<i>Umbelopsis ramanniana</i> var. <i>angulispora</i>	SZMC 11234	+	+++	+++++	+++++	+++++	+++++
<i>Umbelopsis versiformis</i>	SZMC 21866	NKS	+	++	++	+++	+++
<i>Umbelopsis versiformis</i>	SZMC 23387	+	+++	++++	+++++	+++++	+++++
<i>Umbelopsis vinacea</i>	SZMC 11316	++	++	+++	+++	+++	++++
<i>Umbelopsis ovata</i>	SZMC 22674	+	+	+	++	+++	+++

¹ halványkék (+), világoskék (++), kék (+++), sötétkék (++++), mélysötétkék (+++++), NKS: nincs kék elszíneződés

F2. táblázat. Gének, génszakaszok felszaporításához használt indítószekvenciák. Az aláhúzott betűk a restriktációs hasítóhelyeket jelölik.

Indítószekvencia kódja	Indítószekvencia nukleotid sorrendje, 5'-3'	Termék
Az RT-qPCR analízishez használt indítószekvenciák		
Lracin1rtfw	GACTGAAGCACCTTTGAACC	Aktin1 egy rövid szakasza
Lracin1rtrev	CCAGAGTCAAGCACAATACC	
Lracin2rtfw	CTCCTGCTTTCTATGTTGCC	Aktin2 egy rövid szakasza
Lracin2rtrev	ACGACCAGCCATATCAAGAC	
Lr10529rtfw	TCCACAGCATGACTTCTACC	β -gal1 egy rövid szakasza
Lc10529rtrev	CCACCCAGAAACAAAGACTC	
Lr00048rtfw	TACTACTACCAGCGAGATATTTACAC	β -gal2 egy rövid szakasza
Lr00048rtrev	GAGCAAGACATCATCCTTTACTG	
A pyrG gén felszaporításához használt indítószekvenciák		
LrpyrGfw	ATGCAGTATAGCAGCATCCTA	A pyrG kódoló szakasza
LrpyrGrev	TTACTTTTGTACACGTTCTAA	
LrpyrGP1	TGATGCTTTATCCACTATGGCT	A pyrG saját promóter és terminális régióval
LrpyrGP2	TCCACAACCTTGACATCATCC	
A β-galaktozidáz gének túltermeltetéséhez használt indítószekvenciák		
Bgal1oeP1	TTATCTAGATGATGCTTTATCCACTATGGCT	A β -gal1 saját promóter és terminális régióval
Bgal1oeP2	TTATCTAGATCCACAACCTTGACATCATCC	
Bgal2oeP1	CGCTCTAGAGTGAGCAAGGGCGAGGAGCT	A β -gal2 saját promóter és terminális régióval
Bgal2oeP2	TTATCTAGATTACTTGTACAGCTCGTCCA	
A β-galaktozidáz enzimek heterológ rendszerben történő termeltetéséhez használt indítószekvenciák		
Bgal1ppichP1	TCTCTCGAGAAAAGAGAGGGCTGAAGCTCATCAACGC ACTTATGGTACTCTC	A β -gal1 cDNS
Bgal1ppichP2	TTATCTAGATCAATGATGATGATGATGATGGGATCC TCTTGGAACCAAGATTCCAGAGCGTCTTCCAAAC TTAGCGGCCGCGCACCTCTTGTGAGCTTGGAAGC	
Bgal2ppichP1	GAGACGAAAGCAACAACGG	A β -gal2 cDNS
Bgal2ppichP2	TTATCTAGATCAATGATGATGATGATGATGGGATCC TCTTGGAACCAA	



F1. ábra. A *L. ramosa* (1) és *R. pusillus* (2) nyers β -galaktozidázok SDS-PAGE vizsgálata. A részleges tisztítást Bio-Gel P-6 sómentesítő gyantán (Bio-Rad, USA) végeztük. M: SeeBlue Plus2 SDS-PAGE molekulaméret sztenderd (Invitrogen, USA).