

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**JÁROMSPÓRÁS GOMBÁK BÉTA-GLÜKOZIDÁZ ENZIMEINEK
VIZSGÁLATA: AZ ENZIM TISZTÍTÁSA ÉS JELLEMZÉSE, A KÓDOLÓ
GÉNEK MOLEKULÁRIS ÉS FUNKCIONÁLIS ELEMZÉSE**

Takó Miklós



Témavezetők:

Prof. Dr. Vágvölgyi Csaba, Tanszékvezető egyetemi tanár

Dr. Papp Tamás, Egyetemi docens

Biológia Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Mikrobiológiai Tanszék

Szeged

2011

BEVEZETÉS

A β -glükózidázok (EC 3.2.1.21; egyéb nevei: cellobiáz, β -D-glükózidáz, β -glükózid glükohidroláz, amigdalínáz) egy jól jellemzett, biológiailag fontos enzimesoportot alkotnak. Az enzim a glükóz β -térállású glükózidjainak hidrolízisét katalizálja, melynek eredményeként β -D-glükóz válik szabaddá. A szubsztrát specifitása széles, a β -(1 \rightarrow 4) kötés hasításán kívül egyéb glükóz diszacharidokat, úgymint a β -(1 \rightarrow 6) kötést tartalmazó genciobiózt, a β -(1 \rightarrow 2) kötésű szoforózt, illetve a β -(1 \rightarrow 3) kötést tartalmazó laminaribiózt is képes bontani kisebb aktivitással. A legfontosabb β -glükózidos kötéssel rendelkező diszacharid a cellobiáz, a cellobiáz elnevezés innen ered. Egyes β -glükózidázok a diszacharidok mellett bizonyos oligoszacharidok és aril-, illetve alkil-glükózid vegyületek nem redukáló vég felőli hidrolízisét is katalizálják. A β -glükózidázok meghatározott körülmények között szintetikus aktivitásra is képesek, ami különböző oligoszacharidok és glikokonjugátumok szintézisét teszi lehetővé.

A β -glükózidáz enzim a prokariótáktól kezdve a magasabb rendű emlősökig minden élőlénycsoportban jelen van és számos életfolyamatban jelentős szerepet tölt be (pl. raktározott poliszacharidok lebontása, sejtszintű szignalizáció, onkogenezis, gazda-patogén interakciók). Gombáknál a celluláz enzimrendszer fontos alkotója, ahol a rövid szálú oligoszacharidok és a cellobiáz glükózzá történő hidrolízisét végzi. A β -glükózidáz enzimek nagy jelentőséggel bírnak a gyakorlati alkalmazás szempontjából is, mely során az enzim hidrolitikus és szintetikus aktivitása egyaránt kiaknázható.

A járomspórás gombák (*Zygomycetes*) *Mucorales* rendjébe tartozó fajok többsége talajban, bomló szerves anyagokon előforduló szaprotróf szervezet. Sajátos szexuális folyamataik, különböző szabályzó mechanizmusaik vagy a gomba morfogenezis tanulmányozása okán gyakran vizsgált modellszervezetek. Számos orvosi, ipari, biotechnológiai és

mezőgazdasági szempontból fontos organizmust találunk közöttük. A csoport sok tagja különböző biotechnológiai folyamatokban alkalmazott extracelluláris enzimek (pl. lipázok, proteázok) termelőjeként, illetve értékes biológiai aktivitással rendelkező (pl. szteránvázas) vegyületek sztereospecifikus hidroxilálójaként kerül ipari felhasználásra.

A fonalas gombák általában jó β -glükozidáz termelőként ismertek. Számos gomba enzimet izoláltak és elemeztek is, azonban járomspórás gombák β -glükozidáz enzimeinek biokémiai és biotechnológiai szempontból fontos tulajdonságairól, valamint az enzimeket kódoló génekről és a géneket határoló régiókról jelenleg kevés információ áll rendelkezésünkre. Néhány fajból izoláltak ugyan már egy-egy enzimet, de alaposabb, a gyakorlati alkalmazás szempontjából is lényeges vizsgálatokat nem végeztek. A kutatásaink a járomspórás gombák közé tartozó Mucorales renden belüli izolátumok, különösen néhány termofil törzs β -glükozidáz enzimjének vizsgálatára irányultak.

CÉLKITŰZÉSEK

A kutatási program fontos célkitűzése az alap kutatásokban és egyes biotechnológiai folyamatokban felhasználható, jó extracelluláris β -glükozidáz termelő járomspórás gombák azonosítása, az enzimaktivitás vizsgálata, valamint a magas β -glükozidáz aktivitással rendelkező törzsek által termelt enzimek izolálása és biokémiai jellemzése volt. Céljaink közé tartozott továbbá az enzimeket kódoló gének azonosítása, klónozása, valamint részletes molekuláris és funkcionális elemzése is.

Ennek érdekében a következő konkrét célkitűzéseket fogalmaztuk meg:

1. A rendelkezésünkre álló *Mucor*, *Rhizomucor*, *Rhizopus* és *Gilbertella* nemzetségbe tartozó izolátumok extracelluláris β -glükozidáz termelésének tesztelése folyadék és szilárd fázisú

- tápközegekben, lehetőség szerint új, ígéretes termelő törzsek azonosítása.
2. A jó enzimtermelő izolátumok esetén különböző, biotechnológiai szempontból fontos faktorok hatásának vizsgálata a nyers kivonatok β -glükózidáz aktivitására.
 3. Néhány nagy extracelluláris enzimaktivitással rendelkező járomspórás gomba által termelt β -glükózidáz enzim homogenitásig történő tisztítása.
 4. A tisztított extracelluláris β -glükózidáz enzimek hidrolitikus aktivitásának biokémiai jellemzése, a hidrolízis körülményeinek optimalizálása.
 5. Néhány tisztított β -glükózidáz által katalizált oligoszacharid szintézis vizsgálata, a reakció körülményeinek optimalizálása az idő, a hőmérséklet és a pH függvényében, cellobióz szubsztráton. A szintetikus aktivitás vizsgálata egyéb donor, illetve akceptor vegyületek felhasználásával.
 6. Antioxidáns aktivitással rendelkező növényi eredetű fenolok glikozidokból történő, β -glükózidáz által katalizált felszabadulásának vizsgálata.
 7. A β -glükózidáz enzimet kódoló gén klónozása, valamint molekuláris és funkcionális jellemzése egyes jó extracelluláris enzimtermeléssel rendelkező járomspórás gombákban.

ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

Szűrő módszerek (screening) enzimaktivításra

Analitikai módszerek:

- Spektrofotometriás mérések (UV, VIS)
- Fluorometriás mérések
- Nagyfelbontású folyadék kromatográfia (HPLC)
- Folyadékkromatográfia - tömegspektrometria (LC-MS)
- Méretkizárásos kromatográfia

- Ioncserélő kromatográfia
- Elektroforetikus technikák:
- Agaróz gélelektroforézis
 - Denaturáló poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE)
 - Izoelektromos fókuszálás
- DNS alapú technikák:
- Genomi és plazmid DNS tisztítása
 - Polimeráz láncreakció (PCR, Inverz PCR)
 - DNS szakaszok klónozása
 - DNS szekvenálás
 - Plazmid konstrukciók létrehozása
 - Baktériumok transzformációja
 - Southern-hibridizáció
- Nukleotid és aminosav szekvenciák elemzése:
- Nukleotid szekvenciák analízise (BLAST, FASTA)
 - Nukleotid és aminosav szekvenciák illesztése
 - Enzimfehérje analízis (ProtParam, SignalP, Motif Scan-MyHits)
 - Fehérje szerkezet meghatározás (STRAP)
 - Filogenetikai analízis
- Genetikai transzformációs módszerek:
- Protoplasztok képzése
 - Polietilén-glikol (PEG) mediált transzformáció
 - Transzformánsok szelektálása

EREDMÉNYEK

Járomspórák gombák extracelluláris β -glükozidáz termelésének tesztelése (Takó és mtsi., 2010a)

Kezdeti vizsgálataink során a *Gilbertella*, *Mucor*, *Rhizomucor* és *Rhizopus* nemzetségek 95 izolátumának β -glükozidáz termelését teszteltük 1% cellobiózt tartalmazó minimál tápoldaton. Az egyes nemzetségek tagjai közül kiválasztottuk a legjobb enzimtermelőket (6 *Mucor*, 4 *Rhizomucor*, 3 *Rhizopus* és 3 *Gilbertella*), melyek extracelluláris β -glükozidáz aktivitását búzakorpán is megvizsgáltuk, ugyanis a fonalas gomba eredetű β -glükozidáz enzimek szilárd fázisú fermentációs rendszerekben nagyobb mennyiségben termelődhetnek, amihez a cello-oligoszacharidokban gazdag mezőgazdasági hulladék búzakorpa jól alkalmazható szubsztrát. A szilárd fázisú

fermentáció a folyadékos tenyészetnél általában jelentősen magasabb β -glükózidáz aktivitást eredményezett. A legmagasabb térfogati aktivitást, valamint termékhozamot a *Gilbertella persicaria* (58,6 - 70,9 U ml⁻¹ és 351,6 - 425,4 U g⁻¹ búzakorpa) és a *Mucor corticolus* (94,9 U ml⁻¹ és 569,4 U g⁻¹ búzakorpa) izolátumok esetén tapasztaltuk. A termofil *Rhizomucor miehei* törzsek közül az NRRL 5282 és ETH M4918 kódjelűek enzimtermelése emelhető ki, melyeknél 38,3 U ml⁻¹ és 42 U ml⁻¹ térfogati aktivitást állapítottunk meg búzakorpa szubsztrát alkalmazása esetén. A *Rhizopus* izolátumok szilárd fázisú fermentációval nyert nyers kivonatai megközelítőleg azonos, 15,1 - 18,4 U ml⁻¹ térfogati aktivitással rendelkeztek. Az inkubációs hőmérséklet enzimtermelésre gyakorolt hatását is megvizsgáltuk, ahol az egyes törzsek β -glükózidáz termelésében jelentős eltéréseket tapasztaltunk.

A β -glükózidáz enzimek vizsgálata nyers kivonatban (Takó és mtsi., 2010a)

A *Rhizopus*, *Rhizomucor*, *Mucor* és *Gilbertella* nemzetségekbe tartozó, jó enzimtermelő izolátumok szilárd fázisú fermentálás utáni nyers enzimm kivonataiban az etanol, a glükóz, a savas pH, valamint a hőmérséklet β -glükózidáz aktivitásra gyakorolt hatását is megvizsgáltuk. Az etanolt 5 - 10% (v/v%) koncentrációban alkalmazva számottevő enzimaktivitás emelkedést tapasztaltunk a *R. miehei*, a *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* és a *Mucor fragilis* törzsek esetében. A glükóz 1% koncentrációban történő jelenléte a *M. corticolus* β -glükózidáz aktivitását gátolta legkevésbé. Néhány izolátum (*R. miehei* NRRL 5901 és ETH M4918, *Rh. microsporus* var. *oligosporus*, *Mucor racemosus* f. *chibinensis*) β -glükózidáz enzimjénél enyhe enzimaktivitás emelkedést tapasztaltunk savas közegben. A 75 °C-on elvégzett hőmérséklet tolerancia vizsgálatoknál a legmagasabb maradék enzimaktivitást a *R. miehei* NRRL 5282 törzs

enzimjénél figyelhettük meg. A cellobióz szubsztrát a *R. miehei* β -glükózidázok esetében jelentős hőinaktivációtól védő hatást biztosított.

A β -glükózidáz enzimek izolálása

Az előzetes vizsgálatok eredményei alapján a *R. miehei* NRRL 5282 (Takó és mtsi., 2010b; Krisch és mtsi., 2011), a *M. corticolus* SZMC 12031, a *Rhizopus niveus* CBS 403.51, és a *G. persicaria* ATCC 201107 izolátumok által termelt β -glükózidáz enzimek homogenitásig történő tisztítását, illetve részletes jellemzését végeztük el. A gombatorzsek búzaborpán történő tenyésztésével nagy enzimaktivitású nyers kivonatokat sikerült előállítanunk, melyekből négy lépésben SDS-PAGE homogenitásig tisztítottuk a termelt enzimeket. Az enzimek specifikus aktivitására *R. miehei*-nél $62,2 \text{ U mg}^{-1}$, *M. corticolus*-nál $118,5 \text{ U mg}^{-1}$, *Rh. niveus*-nál $70,6 \text{ U mg}^{-1}$, *G. persicaria*-nál pedig $121,1 \text{ U mg}^{-1}$ értékeket határoztunk meg a negyedik tisztítási lépés után. Az izolált enzimfehérjék molekulatömege az elektroforetikus elválasztást követően 75 - 80 kDa volt.

A β -glükózidáz enzimek biokémiai jellemzése

A tisztított β -glükózidáz enzimek biokémiai jellemzését az enzim hidrolitikus aktivitására ható számos tényező figyelembe vételével végeztük el. A termofil *R. miehei* által termelt β -glükózidáz enzim aktivitásának hőmérsékleti optimumát $65 \text{ }^\circ\text{C}$, míg a többi izolátumét $50 \text{ }^\circ\text{C}$ körül állapítottuk meg. A vizsgált β -glükózidázok közül a *R. miehei* enzim bizonyult termotoleránsnak. Az enzimek hidrolitikus aktivitásának pH optimuma a pH 5,0 - 5,5 tartományra tehető, azonban a *R. miehei* β -glükózidáz alacsony pH értéken (pH 3,0) is megőrizte aktivitásának 20%-át. A *Rhizomucor* β -glükózidáz pH 4,0 - 6,0, míg a többi vizsgált enzim pH 4,5 - 7,0 tartományban bizonyult stabilnak.

Az enzimek szubsztrát specifitásának elemzésekor a szubsztrátok hidrolízise elsősorban a β -(1 \rightarrow 4) kötések tartalmozó szacharidokon bizonyult jelentősnek, azonban enyhe enzimaktivitást a β -(1 \rightarrow 2) kötést tartalmozó szoforóz esetében is sikerült kimutatnunk. A *R. miehei* β -glükozidáz számottevő mértékben hidrolizálta a β -galaktozid kötéssel rendelkező szubsztrátokat is, továbbá az enzim kisebb mértékű α -glükozidáz és N-acetilglükózaminidáz aktivitást is mutatott. Az eredmények alapján feltételezhető, hogy a *R. miehei* által termelt enzim a széles szubsztrát specifitású β -glükozidázok csoportjába tartozik. Az enzimek jellemzése során meghatároztuk a tisztított β -glükozidázok *p*NPG szubsztrátra vonatkozó kinetikai paramétereit is.

A tisztított enzimek nem, vagy csak meglehetősen alacsony glükóz toleranciát mutattak, közülük egyedül a *M. corticolus* β -glükozidáz emelhető ki, mely a kezdeti hidrolitikus aktivitás 31%-át 20 mg ml⁻¹ glükóz jelenlétében még megőrizte. A *R. miehei*, *Rh. niveus* és *G. persicaria* enzimek aktivitását az alacsony koncentrációban alkalmazott fruktóz enyhén fokozta. A szacharóz viszont jelentősen növelte a *R. miehei* enzim aktivitását, míg a *Rh. niveus* és a *G. persicaria* enzimét kisebb mértékben növelte. A *M. corticolus* β -glükozidáz által katalizált *p*NPG hidrolízis jelentős emelkedést mutatott laktóz, fruktóz, galaktóz és szacharóz jelenlétében, mely az enzim magas transzglükozidáz aktivitását feltételezi.

Az enzimek biokémiai jellemzése során számos fémsó és reagens gátló hatását is elemeztük, melynek eredményei alapján feltételezhető, hogy az enzimek megfelelő működéséhez tiol-csoport jelenléte is szükséges, továbbá katalízisben betöltött fontos szerep valószínűsíthető a triptofán és az aszparaginsav aminosavaknak is. Az alkoholok enzimaktivitásra gyakorolt hatásának vizsgálatakor a *R. miehei* enzimmél 30% emelkedést tapasztaltunk a hidrolitikus aktivitásban 10% (v/v%) etanol jelenlétében, amit valószínűleg a felszabadult glükóz mennyiségének, így gátló hatásának

csökkenése okoz, mely az adott enzim nagyfokú transzglükozidáz aktivitását feltételezi.

A β -glükozidáz enzimek szintetikus aktivitásának vizsgálata

A szintetikus aktivitás tanulmányozásakor a tisztított *R. miehei* és *M. corticolus* β -glükozidáz enzimeket vizsgáltuk részletesen, mely során különböző monoszacharid donor és akceptor vegyületeket alkalmaztunk. A transzglükozidáz aktivitás tanulmányozásához az enzimek szubsztrátjaként cellobiózt használtunk. A reakció eredményeként cellotrióz, illetőleg hosszabb inkubációs idő után kevés mennyiségű cellotetraóz megjelenését mutattuk ki a reakcióelegyekben, ahol a keletkezett oligoszacharidok mennyisége a donorként és akceptorként egyaránt funkcionáló cellobióz mennyiségével egyenes arányban növekedett. A legnagyobb termékmennyiséget mindkét enzimnél magas szubsztrát koncentráció alkalmazása mellett (350 - 400 mg ml⁻¹) tapasztaltuk. A legtöbb cellotrióz a pH 4,0 - 6,0 tartományok közé pufferelt reakcióelegyekben, *R. miehei* β -glükozidáznál 70 °C, míg *M. corticolus* enzimnél 50 °C hőmérsékleten keletkezett.

A laktóz szubsztráton történő szintézis tanulmányozásakor a *R. miehei* β -glükozidáz esetén egy feltételezhetően szintetikus triszacharid megjelenését mutattuk ki a reakcióelegyből (Krisch és mtsi., 2011). A *R. miehei* enzim transzgalaktozidáz aktivitását is azonosítottuk, így a keletkezett termék az egyes β -galaktozidázok, valamint a β -galaktozidáz-szerű β -glükozidázok transzgalaktozidáz aktivitásának vizsgálatakor kimutatott galakto-oligoszacharid is lehet. A *R. miehei* enzimmal cellobióz vagy *p*NPG szubsztráton, etanol jelenlétében is tapasztaltunk termékképződést, melyet etil-glükozidnak feltételezünk.

Antioxidáns aktivitású fenolok felszabadítása glikozidokból (Krisch és mtsi., 2011)

A tisztított *R. miehei* β -glükózidáz antioxidáns aktivitású fenolokat felszabadító tulajdonságát is megvizsgáltuk, melyhez a fenolokat nagy mennyiségben tartalmazó, magas antioxidatív kapacitással rendelkező meggy gyümölcsöt alkalmaztuk. A β -glükózidázzal történő kezelés alatt jelentős koncentráció emelkedést tapasztaltunk a meggytörköly kivonatban található 4-hidroxi-benzoészav, vanillinsav és sziringsav vegyületek tekintetében.

A *Rhizomucor miehei* (NRRL 5282) β -glükózidáz gén (*bgl*) klónozása, valamint molekuláris és funkcionális jellemzése (Vágvölgyi és mtsi., 2007; Takó és mtsi., 2010b)

A β -glükózidázok izolálásával és jellemzésével párhuzamosan az enzimet kódoló gének azonosítását és funkcionális jellemzését is megkezdjük. Az eddigi munkánk a termofil *R. miehei* NRRL 5282 törzs β -glükózidáz enzimet kódoló génjének (*bgl*) vizsgálatára terjedt ki részletesen. A teljes *R. miehei bgl* gént, valamint a gént határoló régiókat IPCR technika alkalmazásával izoláltuk, majd a feltételezett BGL fehérjét kódoló szakasz meghatározása után annak aminosav szekvenciáját részletesen is elemeztük. Az azonosított fehérjeszekvencia a glikozid hidrolázok 3. családján belüli 4. alcsaládba sorolt, β -glükózidáz aktivitással rendelkező gomba enzimekkel mutatta a legnagyobb hasonlóságot. Az elemzés során azonosítottuk a BGL fehérjében található N-terminális és C-terminális doméneket, valamint ismert gomba β -glükózidázokkal történő összehasonlítást követően lehetséges katalitikus nukleofil és H^+ donor régiókat is meghatároztunk. A tisztított *R. miehei* β -glükózidáz fehérje tömegspektrometriai analízise az izolált enzimet a feltételezett *R. miehei* BGL fehérjeként azonosította, valamint megerősítette, hogy a tisztított enzim a klónozott *bgl* gén által

kódolt. Ugyancsak részletesen elemeztük a gént határoló régiókat is, ahol a promóter és terminális régiókban számos jellegzetes nukleotid szekvencia motívumot azonosítottunk.

A *R. miehei* β -glükózidáz enzimet kódoló gén (*bgl*) kifejeződésének vizsgálatához expressziós vektort készítettünk, melyben a *Mucor circinelloides gpd1* (glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz) gén promóter és terminális régióival építettük össze a teljes *bgl* gént, majd az elkészített vektorral elvégeztük az MS12 *M. circinelloides* kettős auxotróf (leuA⁻ és pyrG⁻) törzs PEG mediált protoplaszt transzformációját. A cellobiózon és búzakorpán történő tenyésztést követően a transzformánsok fermentlevei és nyers kivonatai az eredeti MS12 törzsénél jelentősen magasabb enzimaktivitást mutattak, továbbá a nyers kivonatból részlegesen tisztított fehérjék elektroforetikus elválasztását követően egy új sáv megjelenését is tapasztaltuk az egyik transzformáns fehérjemintázatában.

A glikozid hidrolázok 3. családján belüli 4. alcsaládba tartozó gomba β -glükózidázokkal filogenetikai vizsgálatokat is végeztünk, melybe a *R. miehei* BGL mellett egyéb járomspórás gomba hipotetikus fehérjéket is bevontunk. A vizsgálatok eredményeként kapott konszenzus fa a járomspórás gomba β -glükózidázok monofiletikus eredetét mutatja.

ÖSSZEFOGLALÁS

1. Azonosítottunk jó extracelluláris β -glükózidáz termelő járomspórás gombákat.
2. Megvizsgáltuk az etanol, a glükóz, a savas pH, valamint a hőmérséklet β -glükózidáz aktivitásra gyakorolt hatását a jó enzimtermelő izolátumok szilárd fázisú fermentálás utáni nyers enzimkivonataiban. A vizsgált β -glükózidázok között sav- és termotoleráns enzimeket azonosítottunk.

3. Izoláltuk a *R. miehei* NRRL 5282, a *M. corticolus* SZMC 12031, a *Rh. niveus* CBS 403.51 és a *G. persicaria* ATCC 201107 törzsek által búzakorpa szubsztráton termelt β -glükózidáz enzimeket.
4. Elvégeztük a tisztított β -glükózidáz enzimek biokémiai jellemzését az enzim hidrolitikus aktivitására ható számos tényező figyelembevételével.
5. Részletesen vizsgáltuk a tisztított *R. miehei* és a *M. corticolus* β -glükózidáz enzimek szintetikus aktivitását különböző monoszacharid donor és akceptor vegyületek jelenlétében. A *R. miehei* β -glükózidáz esetén jelentős transzgalaktozidáz aktivitást állapítottunk meg, így tudomásunk szerint elsőként azonosítottunk transzgalaktozidáz aktivitással rendelkező fonalas gomba β -glükózidázt.
6. Tanulmányoztuk különböző antioxidáns aktivitású fenolok *R. miehei* β -glükózidáz általi felszabadulását glikozidokból.
7. A *R. miehei* NRRL 5282 törzsből izoláltuk és jellemeztük az első, járomspórás gombából származó β -glükózidáz gént (*bgl*) és a szabályozó régióit. Génexpresszió vizsgálatokat végeztünk heterológ rendszerben. Tudomásunk szerint elsőként izoláltunk és jellemeztünk járomspórás gombából származó β -glükózidáz gént.
8. Filogenetikai vizsgálatokat végeztünk a glikozid hidrolázok 3. családján belüli 4. alcsaládba tartozó gomba β -glükózidázokkal.

A DOLGOZAT ALAPJÁT KÉPEZŐ PUBLIKÁCIÓK

Könyvfejezet:

Krisch, J., **Takó, M.**, Papp, T., Vágvölgyi, Cs. (2010) Characteristics and potential use of β -glucosidases from Zygomycetes. In: Vilas, A. M. (ed.) Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. Formatex Research Center, pp. 891-896.

Folyóiratcikkek:

Vágvölgyi, Cs., Manczinger, L., Krisch, J., **Takó, M.**, Papp, T. (2007) New microbial enzymes: clues for environment friendly biorefinery technologies. *Cereal Res. Commun.* 35(2), 1265-1268. **IF: 1.190**

Takó, M., Farkas, E., Lung, Sz., Krisch, J., Vágvölgyi, Cs., Papp, T. (2010a) Identification of acid- and thermotolerant extracellular β -glucosidase activities in Zygomycetes fungi. *Acta Biol. Hung.* 61, 101-110. **IF: 0.551**

Takó, M., Tóth, A., Nagy, L. G., Krisch, J., Vágvölgyi, Cs., Papp, T. (2010b) A new β -glucosidase gene from the zygomycete fungus *Rhizomucor miehei*. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 97, 1-10. **IF: 1.983**

Krisch, J., Bencsik, O., Papp, T., Vágvölgyi, Cs., **Takó, M.** (2011) A novel thermo-acidotolerant β -glucosidase with transgalactosylation capacity from the zygomycete fungus *Rhizomucor miehei*. *Bioresour. Technol.* (benyújtva)

Konferencia összefoglalók, posztterek:

Papp, T., **Takó, M.**, Galgóczy, L., Vágvölgyi, Cs. (2004) Cloning and partial sequence analysis of the gene encoding a β -glucosidase in *Rhizomucor miehei*. MMT 2004 évi Nagygyűlése, Keszthely, Hungary.

Takó, M., Csernetics, Á., Papp, T., Vágvölgyi, Cs. (2005) Molecular cloning and sequence analysis of a new beta-glucosidase gene in *Rhizomucor miehei*. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 52, 254-255.

Takó, M., Papp, T., Vágvölgyi, Cs. (2006) Isolation and expression of the *Rhizomucor miehei* β -glucosidase gene. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 53, 351-352.

Takó, M., Linka, B., Papp, T., Vágvölgyi Cs. (2006) A novel β -glucosidase gene from *Rhizomucor miehei*. ECFG-8. Vienna, Austria. Abstracts 257.

Takó, M., Farkas, E., Krisch, J., Papp, T., Vágvölgyi, Cs. (2007) Detection of extracellular beta-glucosidase activity in Zygomycetes fungi. Power of Microbes in Industry and Environment, Zadar, Croatia. Abstracts 64.

Takó, M., Papp, T., Krisch, J., Vágvölgyi, Cs. (2008) Purification and partial characterization of extracellular beta-glucosidase from *Rhizomucor miehei*. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 55, 251.

Vágvölgyi, Cs., **Takó, M.,** Farkas, E., Papp, T., Krisch, J. (2008) Extracellular beta-glucosidase activities in Zygomycetes. ECFG-09 Edinburgh, United Kingdom. Abstracts 178.

Takó, M., Bencsik, O., Krisch, J., Papp, T., Vágvölgyi, Cs. (2009) Transglycosylation activity of a beta-glucosidase from *Rhizomucor miehei*. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 56, 249-250.

Tserennadmid, R., **Takó, M.,** Lung, Sz., Krisch, J., Papp, T., Vágvölgyi, Cs. (2009) Purification and partial characterization of an extracellular beta-glucosidase from *Mucor corticolus*. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 56, 232-233.

Takó, M., Krisch, J., Bencsik, O., Vágvölgyi, Cs., Papp, T. (2010) Synthetic activity of beta-glucosidases by Zygomycetes fungi. Power of Microbes in Industry and Environment, Malinska, Croatia. Abstracts 132.

EGYÉB PUBLIKÁCIÓK

Könyvfejezet:

Papp, T., Nyilasi, I., **Takó, M.,** Nagy, L., Vágvölgyi, Cs. (2011) *Rhizomucor*. In: Liu, D. (ed.) Molecular Detection of Human Fungal Pathogens. CRC Press Taylor & Francis Group, pp. 783-790.

Folyóiratcikkek:

Palágyi, Z., Papp, T., **Takó, M.,** Nagy, Á., Pesti, M., Vágvölgyi, Cs. (2004) Genetic variability of astaxanthin-producing yeasts: random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Phaffia rhodozyma* and *Xanthopyllomyces dendrorhous*. *Acta Biol. Szeged.* 48, 35-38.

Takó, M., Csernetics, Á. (2005) Genotypic analysis of variability in Zygomycetes. *Acta Biol. Hung.* 56, 345-357. *IF: 0.64*

Nyilasi, I., Papp, T., **Takó, M.**, Nagy, E., Vágvölgyi, Cs. (2005) Iron gathering of opportunistic pathogen fungi. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 52, 185-197.

Csernetics, Á., Péteri, Zs., Linka, B., **Takó, M.** (2005) Physiological and genetic variability of Zygomycetes causing post-harvest decay. *Acta Phytopathol. Entomol. Hung.* 40, 267-277.

Lukács, Gy., **Takó, M.**, Nyilasi, I. (2006) Pulsed-field gel electrophoresis: a versatile tool for analysis of fungal genomes. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 53(1), 95-104.

Takó, M., Lung, Sz., Krisch, J., Papp, T., Vágvölgyi, Cs. (2009) Production of cellulolytic enzymes on agricultural waste by different Zygomycetes. *J. Eng. Ann. Fac. Eng. Huned.* 7, 169-172. (ISSN: 1584-2665)

Krisch, J., Pardi, Zs., Kovács, K., **Takó, M.**, Papp, T., Vágvölgyi, Cs., Tserennadmid, R. (2010) Effect of essential oils in food systems. *Anal. Tech. Szegediensis* 2-3, 128-132.

Tserennadmid, R., **Takó, M.**, Galgóczy, L., Papp, T., Pesti, M., Vágvölgyi, Cs., Almássy, K., Krisch, J. (2010) Anti yeast activities of some essential oils in growth medium, fruit juices and milk. *Int. J. Food Microbiol.* 144(3), 480-486. *IF:3.011*

Tserennadmid, R., **Takó, M.**, Galgóczy, L., Papp, T., Vágvölgyi, Cs., Gerő, L., Krisch, J. (2010) Antibacterial effect of essential oils and interaction with food components. *Cent. Eur. J. Biol.* 5(5), 641-648. *IF: 0.915*

Kovács, L., Virágh, M., **Takó, M.**, Papp, T., Vágvölgyi, Cs., Galgóczy, L. (2011) Isolation and characterization of *Neosartorya fischeri* antifungal protein (NFAP). *Peptides* 32, 1724-1731. *IF: 2.654*

Összesített impakt faktor: 20,332

Társszerzői nyilatkozat

Kijelentjük, hogy Takó Miklós szerepe meghatározó jelentőségű volt a

Vágvölgyi, Cs., Manczinger, L., Krisch, J., **Takó, M.**, Papp, T. (2007) New microbial enzymes: clues for environment friendly biorefinery technologies. *Cereal Res. Commun.* 35(2), 1265-1268.

Takó, M., Farkas, E., Lung, Sz., Krisch, J., Vágvölgyi, Cs., Papp, T. (2010a) Identification of acid- and thermotolerant extracellular β -glucosidase activities in Zygomycetes fungi. *Acta Biol. Hung.* 61, 101-110.

Takó, M., Tóth, A., Nagy, L. G., Krisch, J., Vágvölgyi, Cs., Papp, T. (2010b) A new β -glucosidase gene from the zygomycete fungus *Rhizomucor miehei*. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 97, 1-10.

Krisch, J., **Takó, M.**, Papp, T., Vágvölgyi, Cs. (2010) Characteristics and potential use of β -glucosidases from Zygomycetes. In: Vilas, A. M. (ed.) Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. Formatex Research Center, pp. 891-896.

Krisch, J., Bencsik, O., Papp, T., Vágvölgyi, Cs., **Takó, M.** (2011) A novel thermo-acidotolerant β -glucosidase with transgalactosylation capacity from the zygomycete fungus *Rhizomucor miehei*. *Bioresour. Technol.* (benyújtva)

címmel megjelent közleményekben, így az értekezésben és a publikációkban közölt eredményeket tudományos fokozat (Ph.D.) megszerzésére nem használtuk fel és ezt a jövőben sem fogjuk tenni.

Szeged, 2011. október 06.

Prof. Dr. Vágvölgyi Csaba

Dr. Papp Tamás

Dr. Krisch Judit