

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Járomspórás gombák extracelluláris lipázainak vizsgálata: enzimtermelés, hidrolitikus és szintetikus reakciók jellemzése

KOTOGÁN ALEXANDRA

Témavezetők:

DR. TAKÓ MIKLÓS

EGYETEMI ADJUNKTUS

DR. PAPP TAMÁS

EGYETEMI DOCENS

BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA



SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR

MIKROBIOLÓGIAI TANSZÉK

Szeged

2017

BEVEZETÉS

A lipáz enzimek (EC 3.1.1.3) a zsírok és olajok fő összetevőinek, a triglicerideknek glicerinné és szabad zsírsavakká történő hidrolízisét katalizálják. Hidrolitikus aktivitásuk mellett vízmentes, vagy alacsony víztartalmú közegben észter kötések szintézisére és áthelyezésére is képesek. Biológiai jelentőségükön kívül fontos szerepet töltenek be egyes biotechnológiai/ipari folyamatokban, az általuk katalizált reakciók változatosságának, valamint az enzimek nagyfokú szubsztrát specificitásának köszönhetően. Lipáz enzimeket széles körben alkalmaznak többek között az élelmiszer-, gyógyszer-, bőr-, és a detergens iparban, valamint a szerves szintéziseknél egyaránt. A kereskedelmi forgalomban kapható lipázok túlnyomó többsége mikrobiális eredetű, baktériumok vagy fonalas gombák által termelt. A mikrobákkal történő enzimtermeltetés fő előnye, hogy viszonylag nagy mennyiségű enzim állítható elő gazdaságos, olcsó körülmények között. Emellett a különböző mikroorganizmusokból származó lipázok változatos biokémiai jellemzőkkel, azaz szubsztrát specificitással, hőmérséklet és pH optimummal, stabilitással stb., rendelkezhetnek.

A Mucoromycota gombacsoport tagjai a fonalas gombák egyik legjelentősebb képviselői. Ökológiai jelentőségükön kívül jó néhány orvosi, ipari, biotechnológiai, illetve mezőgazdasági szempontból fontos fajt találunk közöttük. A járomspórás gombák jó extracelluláris enzimtermelőkként ismertek, de csak néhány ide tartozó faj által termelt lipáz izoláltak eddig, illetve használnak fel egyes ipari folyamatokban. Az enzimek termelésére, hidrolitikus és szintetikus aktivitására és biokémiai jellemzőire vonatkozó ismeretek is viszonylag korlátozottak. Ugyanakkor a biotechnológiai és ipari fejlesztések új lipázok iránti igénye további a hidrolitikus és/vagy szintetikus reakciók katalizálása szempontjából előnyös tulajdonságokkal rendelkező enzimek azonosítását és jellemzését teszi szükségessé.

A mezőgazdasági- és élelmiszeripari folyamatok során nagy mennyiségben keletkező melléktermékek (növénymaradványok, olajos mag préselvények) szubsztrátként való alkalmazása környezetbarát és olcsó biotechnológiai eljárás ipari jelentőségű lipáz enzimek termeltetésére.

CÉLKITŰZÉSEK

Doktori kutatómunkám célja az alap kutatásokban és potenciálisan biotechnológiai fejlesztésekben felhasználható lipáztermelő járomspórás gombák és extracelluláris lipáz enzimek azonosítása volt. Emellett célunk volt a lipázaktivitást mutató izolátumok enzimtermelésének vizsgálata különböző fermentációs körülményeket, és különféle mezőgazdasági és élelmiszeripari növénymaradvány szubsztrátokat felhasználva. Céljaink közé tartozott a termelt enzimek izolálása és a lipáz-katalizált hidrolitikus és szintetikus reakciók biokémiai jellemzése is.

Mindezek alapján a kutatás konkrét célkitűzései a következők voltak:

1. Különböző nemzetségekbe (*Mucor*, *Rhizomucor*, *Rhizopus*, *Gilbertella*, *Dissophora*, *Gamsiella*, *Mortierella* és *Umbelopsis*) tartozó járomspórás gombatorzsek extracelluláris lipáztermelésének tesztelése tributirin tartalmú szilárd tápközegen.
2. A kiválasztott izolátumok lipáztermelésének vizsgálata különböző tenyésztési körülmények között (pl. lipid induktorok, magas lipidtartalmú növényi szubsztrátok enzimtermelésre gyakorolt hatásának vizsgálata).
3. Átészterező és észterező reakciók katalizálásának vizsgálata kiválasztott enzimkivonatokkal. A reakció körülményeinek változtatásával az enzimek szintetikus aktivitásának biokémiai jellemzése.
4. Az ígéretes tulajdonságokkal (pl. nagy szintetikus és hidrolitikus aktivitással) rendelkező lipázok tisztítása, azonosítása.
5. A tisztított enzimek hidrolitikus aktivitásának biokémiai jellemzése (pl. hőmérséklet és pH optimum, stabilitás, enzimkinetika, szubsztrát specificitás meghatározása, lehetséges gátlószerek vizsgálata).

ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

Extracelluláris enzimtermelés vizsgálata:

- Tributirin tartalmú szilárd táptalaj
- Indukciós minimál tápoldat
- Süllyesztett tenyésztés (SmF) ásványi sókat és búzakorpát tartalmazó tápközegen
- Szilárd fázisú tenyésztés vízzel (SSF1) vagy ásványi sós tápoldattal és olívaolajjal (SSF2) nedvesített növényi szubsztrátokon

Lipázaktivitás meghatározása:

- A hidrolitikus aktivitás vizsgálata *p*-nitrofenil-palmitát (*p*NFP) szubsztráttal
- Az átszterező aktivitás vizsgálata *p*NFP szubsztráttal és gázkromatográfiás (GC) technikával
- Az észterező aktivitás vizsgálata GC technikával

Fehérjekoncentráció meghatározása:

- Bradford módszer
- Qubit™ Fluorométer és Quant-iT Protein Assay Kit (Life Technologies) alkalmazása

Enzimmtisztítás során alkalmazott módszerek:

- Ammónium-szulfát frakcionált kizsázás
- Méretkizárásos kromatográfia
- Anioncserélő kromatográfia
- SDS denaturáló poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE)
- Natív poliakrilamid gélelektroforézis
- Fehérjemintázat előhívás ezüst-nitrát festékkel
- Zimográfiai analízis fluorogén és kromogén szubsztrátokkal

A hidrolitikus aktivitás biokémiai jellemzése:

- Reakcióelegyek az enzimaktivitást befolyásoló tényezők (pl. hőmérséklet, pH, stb.) vizsgálatához
- Kinetikai paraméterek meghatározása Lineweaver-Burk féle linearizációval
- Vékonyréteg kromatográfia a regioszelektivitás meghatározásához

EREDMÉNYEK

1. Azonosítottunk magas extracelluláris lipolitikus aktivitással rendelkező járomspórás gombatörzseket. (Takó és mtsi., 2012; Kotogán és mtsi., 2014)

Jelen munkában a *Gilbertella*, *Rhizomucor*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Dissophora*, *Gamsiella*, *Mortierella* és *Umbelopsis* nemzetségbe tartozó 204 gombatörzs lipáztermelését teszteltük tributirin tartalmú szilárd tápközegen. A telepek körül keletkező feltisztulási zónák és telepátmérők alapján 21 nagy extracelluláris lipolitikus aktivitással rendelkező törzset azonosítottunk. Ezek közül *Mo. alpina*, *Mo. echinosphaera*, *M. corticolus*, *R. miehei*, *Rh. oryzae*, *Rh. stolonifer*, *U. autotrophica*, *U. isabellina*, *U. ramanniana* var. *angulispora* és *U. versiformis* izolátumokat választottunk ki további vizsgálatok elvégzése céljából.

2. Megvizsgáltuk a kiválasztott törzsek lipáztermelését különféle inductív körülmények között folyadék és szilárd fázisú fermentációban. (Kotogán és mtsi., 2014)

Teszteltük különböző növényi olajok, valamint szintetikus lipid származék enzimermelésre gyakorolt hatását. A Tween 80 és az olívaolaj jelentősen megnövelte a legtöbb tesztelt törzs lipáztermelését, így hatásos inductornak bizonyult. A tesztelt növényi olajok közül elsősorban a szója-, szezám-, gyapotmagolajok fokozták még egyes izolátumok enzimermelését.

A búzakorpa hatékony inductora a fonalas gombák lipáztermelésének, így a kiválasztott törzsek enzimermelését búzakorpa alapú folyadék és szilárd fázisú fermentációban is teszteltük. Folyadék rendszerben (SmF) a *Mo. echinosphaera*, *Rh. stolonifer*, *U. autotrophica*, *U. ramanniana* var. *angulispora* és *U. versiformis* nagyobb térfogati aktivitást mutatott, mint a minimál indukciós tápközegen. A különböző izolátumok esetében a tenyésztés eltérő fázisaiban mértük a legmagasabb lipázaktivitást. Búzakorpa alapú szilárd fermentációban (SSF) kétféle tenyésztési körülményt hasonlítottunk össze: SSF1 esetében csak desztillált vízzel, míg SSF2 esetében ásványi sók oldatával, illetve 1,5% olívaolajjal egészítettük ki a tápközéget. Minden törzs esetében nagyobb, de különösen a *R. miehei*, *Rh. oryzae* NRRL 1526, *Rh. stolonifer* és *U. versiformis* izolátumok fermentleveiben jelentős, mintegy négyszer magasabb enzimermelést detektáltunk SSF2 tápközegen, mint SSF1-en. Az SSF2 tápközegen magas enzimermelést a *R. miehei*, *M. corticolus*, *U. autotrophica*, *U. ramanniana* var. *angulispora* és *U. versiformis* (4415; 1733,4; 416,3; 355,7 és 287,1 U/g száraz szubsztrát) törzsek esetén azonosítottunk. A búzakorpa mellett más magas lipidtartalmú növényi maradványokat is bevontunk a

vizsgálatainkba, ahol a legnagyobb lipázaktivitásokat mákliszt és tökmag préselési örlemény, mint szubsztrát alkalmazása esetén kaptuk.

3. Vizsgáltuk és jellemeztük járomspórás gombákból nyert nyers lipáz kivonatok átészterező és észterező aktivitásait. (Kotogán és mtsi., 2014; Kotogán és mtsi., 2016)

A kísérletekben az előzetes tesztheink alapján kiválasztott izolátumok búzakorpa alapú szilárd fermentáció utáni nyers enzimkivonataival dolgoztunk. A termelt lipázok átészterező aktivitását *p*NFP acil donor és etanol acil akceptor alkalmazásával teszteltük 30 perc inkubációt követően. A legnagyobb aktivitást (1,7 – 4,8 U/mg) a *R. miehei*, *Rh. stolonifer*, *Mo. echinosphaera*, *M. corticolus*, és *Rh. oryzae* NRRL 1526 és NRRL 1472 törzsek által termelt enzimek mutatták.

Az átészterező reakciók jellemzésénél megvizsgáltuk egyes alkán és cikloalkán reakcióközegek alkoholízisre gyakorolt hatását, ahol általában a leghatékonyabb *p*NFP konverzió értékeket *n*-heptánban kaptuk. A hőmérséklet átészterezésre kifejtett hatását 20 – 50 °C közötti tartományon vizsgáltuk. A konverziós ráta lineárisan növekedett a 6 órás inkubáció alatt 40 °C-on, kivéve a *Rh. oryzae* NRRL 1472, *U. autotrophica* és *U. versiformis* enzimkivonatok esetében, melyek a maximális konverziót már 4 óra inkubációt követően elérték. A *Rh. stolonifer*, *Rh. oryzae* NRRL 1526, *M. corticolus*, *Mo. echinosphaera* és *Mo. alpina* lipázok kezdeti *p*NFP konverziója 50 °C-on hatékonyabbnak bizonyult, mely a magas hőmérséklet katalízis-fokozó hatásával magyarázható. Hosszabb inkubáció hatásának vizsgálatakor a reakciós ráta lineáris emelkedését tapasztaltuk az első 48 órában, a maximális *p*NFP konverziót 96 óra elteltével állapítottuk meg: a legmagasabb értékeket a *R. miehei* és a *Mo. echinosphaera* enzimkivonatai mutatták, 90,5 és 88,5% konverzióval. Az átészterezés hatékonyságát különböző acil akceptor molekulák jelenlétében is teszteltük, melynek során az átészterezés a vizsgált alkoholok mindegyikével végbement; a leghatékonyabb *p*NFP konverziót etanol esetében figyelhettük meg. Az etanol koncentráció átészterezésre gyakorolt hatását 0,85 – 5,1 M (5 – 30%, v/v) tartományban vizsgáltuk. A *p*NFP konverzió jelentős növekedését tapasztaltuk az etanol koncentráció növelésével a *R. miehei* és *Rh. oryzae* lipázoknál 3,4 M, míg a *Rh. stolonifer* és *M. corticolus* enzimkivonatok esetében 4,2 M etanol koncentrációig. Különböző acil-donor molekula tesztelésénél a közepes szénlánc-hosszúságú (C8 – C12) aril-észterek alkalmazásakor nagyobb *p*NFP konverziót állapítottunk meg, mint a rövid vagy hosszú zsírsavláncot tartalmazó észterek esetében.

Néhány kiválasztott enzimmél a palmitinsav és etanol közötti észterezést is megvizsgáltuk. A *Mo. echinosphaera* és *R. miehei* lipáznál 48 óra, míg a *Rh. stolonifer*

enzimnél 24 óra után sorrendben 9,77, 9,98 és 10,54 mg/l etil-palmitát mennyiséget mértünk gázkromatográfiás technikával. Az észterező aktivitás mindegyik vizsgált enzimmél alacsonyabbnak bizonyult, mint az átészterező. Az észterezés katalizálásának jellemzésekor kimutattuk, hogy az enzimek elsősorban a hosszú, C16 – C18 zsírsavak észterezését részesítik előnyben.

4. Tisztítottunk lipáz enzimeket nagy szintetikus és hidrolitikus aktivitással rendelkező nyers enzimekből. (Takó és mtsi., 2017)

Az előzetes tesztek eredményei alapján a *R. miehei* NRRL 5282, *Rh. oryzae* NRRL 1526, *Rh. stolonifer* SZMC 13609, *M. corticolus* SZMC 12031 és *Mo. echinosphaera* CBS 575.75 izolátumok extracelluláris lipáz enzimeinek tisztítását végeztük el. A tisztítás a nyers kivonatokból ammónium-szulfát frakcionálással, majd gélszűrést követő ioncserélő és méretkizárásos kromatográfiás elválasztással történt. A tisztított enzimfehérjék molekulatömegét SDS poliakrilamid gélelektroforézissel állapítottuk meg; a *R. miehei* enzim 55 kDa, a *Rh. oryzae* 35 kDa, a *Rh. stolonifer* 28 kDa, a *M. corticolus* 20 kDa, míg a *Mo. echinosphaera* lipáz 30 kDa méretűnek bizonyult. A tisztított lipázok zimográfiai vizsgálatát α -naftil-acetát és 4-metilumbelliferil-nonanoát szubsztrátokkal végeztük el. Az izolált lipázok képesnek bizonyultak a pNFP és etanol közötti átészterezés katalizálására.

5. Jellemeztük a tisztított lipázok hidrolitikus aktivitását különböző reakciókörülmények között. (Takó és mtsi., 2017)

A lipázok biokémiai jellemzését a hidrolitikus aktivitásra ható tényezők figyelembevételével végeztük el. Az enzimaktivitás hőmérsékleti optimumát a *Mo. echinosphaera* enzim esetében 20 – 30 °C, a *M. corticolus* és a *Rh. oryzae* lipázoknál 30 °C, a *R. miehei* enzimmél 40 °C, míg a *Rh. stolonifer* lipáznál 50 °C körüli értéknek határoztuk meg. A *R. miehei* és *Rh. stolonifer* lipázok 50 °C-ig stabilnak bizonyultak, így termotoleránsnak tekinthetők. Ígéretes a *Mo. echinosphaera* lipáz 20 °C-on, valamint a *Rh. oryzae*, a *Rh. stolonifer* és a *M. corticolus* enzimek 5 °C-on mutatott maradék aktivitása is.

A *R. miehei* és *M. corticolus* lipázok aktivitásának pH optimumát a kissé alkalikus (pH 6,8 – 7,4 és pH 7,0 – 7,4), míg a *Rh. oryzae* és *Rh. stolonifer* enzimekét az enyhén savas pH tartományban (pH 5,0 – 5,4 és pH 4,6 – 5,0) állapítottuk meg. A *R. miehei* és *M. corticolus* enzimek stabilitásukat pH 7,0 – 8,0 és 6,2 – 7,4, míg a *Rh. oryzae* és *Rh. stolonifer* az alacsonyabb pH 5,4 – 6,8 és 4,2 – 5,4 tartományban képesek megőrizni. A *Mo. echinosphaera*

lipáz enzim aktivitásának pH optimuma 6,6 – 7,0 közötti volt, valamint széles pH tartományban mutatott aktivitást (pH 4,6 – 8,0) és stabilitást (pH 3,4 – 8,0).

A *R. miehei* enzim a C6 – C12, míg a *Rhizopus* izolátumok enzimeit a C8 – C12 szénlánc-hosszúságú zsírsavakat tartalmazó *p*NF-észtereket hidrolizálták a legnagyobb mértékben. Ezzel szemben a *Mo. echinosphaera* és a *M. corticolus* izolátumok lipázai szélesebb szubsztrátpreferenciát mutattak: a *M. corticolus* lipáz a C4 – C12, a *Mo. echinosphaera* enzim a C3 – C10 zsírsavakat tartalmazó *p*NF-észterek hidrolízisét katalizálta a legnagyobb mértékben. A trioleát-hidrolízis termékeinek vizsgálatakor kimutattuk, hogy az izolált enzimek mindegyike 1,3 regioszelektivitással rendelkezik. Megállapítottuk a tisztított lipázok *p*NFP szubsztrátra vonatkozó kinetikai paramétereit is.

Fémionok és reagensek enzimaktivitásra gyakorolt hatásának vizsgálatakor jelentős enzimaktivitás gátló hatást a Hg^{2+} , NBS és SDS jelenlétében tapasztaltunk. A legtöbb enzim aktivitását a reakcióközegben jelenlévő 5 mM Na^+ és K^+ 5 – 37%-kal fokozta, mely feltételezhetően az enzimek konformációjának stabilizálásával fejti ki hatását. Különösen a *Rh. stolonifer* és a *Mo. echinosphaera* lipázok bizonyultak stabilnak számos vizsgált fémsó jelenlétében.

A *R. miehei* és *Rh. oryzae* enzimek 5 – 10% metanol, etanol, propanol és izopropanol, a *Mo. echinosphaera* lipáz 5 – 15%, míg a *Rh. stolonifer* és a *M. corticolus* lipázok 20% metanol, etanol és izopropanol jelenlétében is stabilnak bizonyultak. Általánosságban, az enzimek aktivitását a hexanol és a butanol, egyes enzimek esetében az izoamil-alkohol jelentősen csökkentette. Néhány reakcióelegyben nagyobb *p*-nitrofenol felszabadulást tapasztaltunk a kontrollhoz képest, melyhez a vízaktivitás csökkenés következtében fellépő *p*NFP átészterezés is hozzájárulhatott. A vizsgált enzimek nagy stabilitást mutattak a vízzel nem elegyedő telített alkánokban (*n*-hexán, ciklohexán, *n*-heptán és izooktán).

ÖSSZEFOGLALÁS

1. 21 nagy extracelluláris lipolitikus aktivitással rendelkező járomspórás gombatörzset azonosítottunk.
2. Megvizsgáltuk a jó enzimaktivitású törzsek lipáztermelését különféle induktív körülmények között folyadék és szilárd fázisú fermentációban. Jelentősen bővültek ismereteink az enzimek termelésével kapcsolatban különböző induktor, szubsztrát és tenyésztési körülmény alkalmazásakor.
3. Vizsgáltuk és jellemeztük járomspórás gombákból nyert nyers lipáz kivonatok átészterező és észterező aktivitásait különböző reakciókörülmény, valamint acil donor és akceptor vegyületek jelenlétében. Tudomásunk szerint elsőként mutattunk ki szintetikus aktivitást szerves közegben *Mortierella* és *Umbelopsis* extracelluláris lipázok esetében.
4. Izoláltuk a *R. miehei* NRRL 5282, *Rh. oryzae* NRRL 1526, *Rh. stolonifer* SZMC 13609, *M. corticolus* SZMC 12031 és *Mo. echinosphaera* CBS 575.75 törzsek által búzaborpa szubsztráton termelt extracelluláris lipáz enzimeket. Elsőként izoláltunk és jellemeztünk extracelluláris lipáz enzimet *Rh. stolonifer*, valamint a *Mortierella* nemzetségbe sorolt törzsből.
5. Jellemeztük a tisztított lipázok hidrolitikus aktivitását különböző reakciókörülmények között. A vizsgált lipázok között termotoleráns, valamint széles pH toleranciával rendelkező enzimeket is azonosítottunk. Szubsztrát specificitásukra elsősorban a közepes szénlánc hosszúságú zsírsavak preferálása és az 1,3 regioszelektivitás jellemző. Az izolált lipázok kezdeti aktivitásuk nagy részét megőrizték számos fémsó, reagens, alkohol és alkán jelenlétében. Eredményeink alapján a tisztított és jellemzett enzimek az alap kutatásokban és a biotechnológiai fejlesztésekben, különösen a szerves szintézis folyamataiban felhasználható értékes tulajdonságokkal rendelkeznek.

A DOLGOZAT ALAPJÁT KÉPEZŐ PUBLIKÁCIÓK

Referált folyóiratban megjelent publikációk:

Takó, M., **Kotogán, A.**, Papp, T., Kadaikunnan, S., Alharbi, N.S., Vágvölgyi, Cs. (2017) Purification and properties of extracellular lipases with transesterification activity and 1,3-regioselectivity from *Rhizomucor miehei* and *Rhizopus oryzae*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 27:(2) pp. 277–288. *IF*_{2015/2016}: 1,685

Kotogán, A., Kecskeméti, A., Szekeres, A., Papp, T., Chandrasekaran, M., Kadaikunnan, S., Alharbi, N.S., Vágvölgyi, Cs., Takó, M. (2016) Characterization of transesterification reactions by Mucoromycotina lipases in non-aqueous media. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 127: pp. 47-55. *IF*_{2015/2016}: 2,189

Kotogán, A., Németh, B., Vágvölgyi, Cs., Papp, T., Takó, M. (2014) Screening for extracellular lipase enzymes with transesterification capacity in Mucoromycotina strains. *Food Technol. Biotechnol.* 52:(1) pp. 73-82. *IF*₂₀₁₄: 0,92

Takó, M., **Kotogán, A.**, Németh, B., Radulov, I., Niță, L.D., Tărău, D., Dicu, D., Tóth, B., Papp, T., Vágvölgyi, Cs. (2012) Extracellular lipase production of zygomycetes fungi isolated from soil. *Rev. Agric. Rural Dev.* 1:(1) pp. 61-65.

Konferencia közlemények:

Kotogán, A., Papp, T., Vágvölgyi, Cs., Takó, M. (2013) Extracellular lipase production in solid state fermentation using agricultural and food industrial by-products as substrates. In: Dalmadi, I., Engelhardt, T., Bogó-Tóth, Zs., Baranyai, L., Bús-Pap, J., Mohácsi-Farkas, Cs. (szerk.) Food Science Conference 2013 - With research for the success of Darányi Program: Book of proceedings. pp. 173-176.

Konferencia összefoglalók:

Kotogán, A., Kecskeméti, A., Papp, T., Szekeres, A., Vágvölgyi, Cs., Takó, M. (2016) Synthetic reactions of lipase enzymes from Mucoromycotina fungi. In: Mrša V, Teparić R,

Kifer D (szerk.) Power of Microbes in Industry and Environment 2016: Programme and abstracts. Microbiological Society, 2016. p. 36.

Kotogán, A., Kecskeméti, A., Papp, T., Szekeres, A., Vágvölgyi, Cs., Takó, M. (2015) Investigation of the transesterification and esterification properties of extracellular lipase enzymes from Mucoromycotina fungi. In: 6th Congress of European Microbiologists (FEMS 2015). Paper FEMS-1012.

Kotogán, A. (2015) Extracellular lipase enzymes from zygomycetes fungi: production, isolation and examination of biotechnologically relevant properties. Dissertation summaries. *Acta Biol. Szeged.* 59:(1) p. 95.

Takó, M., **Kotogán, A.,** Sója, A., Kecskeméti, A., Mondal, K.C., Papp, T., Vágvölgyi, Cs. (2015) Purification and characterization of a lipase with high synthetic activity from *Rhizopus stolonifer*. In: 6th Congress of European Microbiologists (FEMS 2015). Paper FEMS-1006.

Kecskeméti, A., **Kotogán, A.,** Bruszel, B., Szécsényi, Zs., Takó, M., Vágvölgyi, Cs., Szekeres, A. (2014) GC-FID measurement method for esterification activity of fungal lipase enzymes. In: A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2014. évi Nagygyűlése és EU FP7 PROMISE Regional Meeting: Absztraktfüzet, p. 27.

Kecskeméti, A., Takó, M., **Kotogán, A.,** Sója, A., Vágvölgyi, Cs., Szekeres, A. (2014) Lipáz enzimek észterezési aktivitásának vizsgálata gázkromatográfiás módszerrel. In: Gazdag M, Felinger A, Babják M, Drahos L, Horváth K, Janáky T, Móricz Á (szerk.) Elválasztástudományi Vándorgyűlés 2014: Végleges program, Előadás- és poszterkivonatok. p. 114.

Kotogán, A., Takó, M., Sója, A., Vágvölgyi, Cs., Papp, T. (2014) Extracellular lipase production of *Mortierella echinosphaera* using plant residues as substrate. In: Maráz A, Pfeiffer I, Vágvölgyi Cs (szerk.) Fiala Biotechnológusok Országos Konferenciája "FIBOK 2014": Program és összefoglalók. Szeged: JATEPress Kiadó, p. 67.

Kotogán, A., Sója, A., Papp, T., Vágvölgyi, Cs., Takó, M. (2014) Lipase production of *Mortierella echinosphaera*. In: Gábor Keszthelyi-Szabó, Cecilia Hodúr, Judit Krisch (szerk.) ICoSTAF'14: International Conference on Science and Technique Based on Applied and Fundamental Research. Book of abstracts, p. 30.

Kotogán, A., Sója, A., Papp, T., Vágvölgyi, Cs., Takó, M. (2014) Purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor corticolus*. In: A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2014. évi Nagygyűlése és EU FP7 PROMISE Regional Meeting Absztraktfüzet p. 32.

Takó, M., **Kotogán, A.,** Sója, A., Papp, T., Vágvölgyi, Cs. (2014) Characterization of an extracellular lipase from the fungus *Mortierella echinosphaera*. In: Cotoraci C, Ardelean A (szerk.) 16th Danube-Kris-Mures-Tisa (DKMT) Euroregion Conference on Environment and Health: Book of Abstracts. p. 27.

Kotogán, A., Kerekes, E.B., Papp, T., Vágvölgyi, Cs., Takó, M. (2013) Wheat bran as substrate for production of lipase enzymes by Mucoromycotina fungi. 4th Central European Forum for Microbiology. *Acta. Microbiol. Immunol. Hung.* **60**:(S) pp. 160-161.

Kotogán, A., Sója, A., Papp, T., Vágvölgyi, Cs., Takó, M. (2013) Lipase production of Mucoromycotina fungi: from fermentation studies to enzyme purification. In: Gácsér A, Vágvölgyi Cs (szerk.) Kutatások az SZTE Biológus Tanszékein: 1. Biomedica Minikonferencia. JATEPress Kiadó, p. 15.

Takó, M., **Kotogán, A.,** Petkovits, T., Vágvölgyi, Cs., Papp, T. (2013) Transesterification activity of extracellular lipase enzymes from Mucoromycotina fungi. In: Škrbić B (szerk.) 15th Danube-Kris-Mures-Tisa (DKMT) Euroregion Conference on Environment and Health with satellite event LACREMED Conference "Sustainable agricultural production: restoration of agricultural soil quality by remediation": Book of Abstracts. p. 110.

Takó, M., **Kotogán, A.,** Kerekes, E.B., Vágvölgyi, Cs., Papp, T. (2013) Catalysis of synthetic reactions in non-aqueous conditions by lipase enzymes from Mucoromycotina fungi. 4th Central European Forum for Microbiology. *Acta. Microbiol. Immunol. Hung.* **60**:(S) pp. 246-247.

Kotogán, A., Takó, M., Németh, B., Vágvölgyi, Cs., Papp, T. (2012) Járomspórás gombák extracelluláris lipáz enzimeinek izolálása és jellemzése - Isolation and characterization of extracellular lipase enzymes from zygomycetes. 5th Hungarian Mycological Conference. *Mikológiai Közlemények-Clusiana*, **51**:(1) pp. 99-100.

Kotogán, A., Németh, B., Takó, M., Vágvölgyi, Cs., Papp, T. (2012) Characterization of lipase enzymes from the zygomycete *Rhizomucor miehei* and *Rhizopus oryzae*. In: 14th DKMT Euroregional Conference on Environment and Health. Paper 16.

Németh, B., **Kotogán, A.**, Takó, M., Vágvölgyi, Cs., Papp, T. (2012) Effects of culturing conditions on production of lipase enzymes from zygomycetes. In: 14th DKMT Euroregional Conference on Environment and Health. Paper 25.

Vágvölgyi, Cs., Takó, M., **Kotogán, A.**, Krisch, J., Papp, T. (2012) Production of industrial enzymes in solid state fermentation of agricultural wastes by zygomycetes. *Rev. Agric. Rural Dev.* **1**:(1) p. S484.

Takó, M., **Kotogán, A.**, Németh, B., Vágvölgyi, Cs., Papp, T. (2011) Production of extracellular lipase enzymes by zygomycetous fungi isolated from soil. In: Tărău D, Niță LD, Vágvölgyi Cs, Kótai C (szerk.) Development and evaluation of a complex chemical-physical-microbiological approach for assessing the quality of soils: SOILMAP Midterm Scientific Conference. p. 27.

Takó, M., **Kotogán, A.**, Vágvölgyi, Cs., Papp, T. (2010) Production of extracellular lipase enzymes by Zygomycetes. In: Frece J, Kos B, Mrša V (szerk.) Power of Microbes in Industry and Environment. p. 81.

EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

Referált folyóiratban megjelent közlemények:

Takó, M., **Kotogán, A.**, Krisch, J., Vágvölgyi, Cs., Mondal, K.C., Papp, T. (2015) Enhanced production of industrial enzymes in Mucoromycotina fungi during solid-state fermentation of agricultural wastes/by-products. *Acta Biol. Hung.* **66**:(3) pp. 348-360. **IF**₂₀₁₅: 0,605

Takó, M., **Kotogán, A.**, Krisch, J., Vágvölgyi, Cs., Papp, T. (2014) Utilization of oilseed residues and oat bran as substrates for β -glucosidase production by zygomycetous fungi. *Rev. Agric. Rural Dev.* **3**:(1) pp. 49-54.

Konferencia összefoglalók:

Kotogán, A., Tari, A.R., Bencsik, O., Papp, T., Vágvölgyi, Cs., Nyilasi, I., Mondal, K.C., Takó, M. (2016) Analysis of fatty acid production of lipolytic zygomycetes fungi. In: Škrbić B (szerk.)

18th Danube-Kris-Mures-Tisa (DKMT) Euroregional Conference on Environment and Health: Book of abstracts. pp. 93-94.

Takó, M., Zambrano, C., **Kotogán, A.**, Krisch, J., Papp, T., Mondal, K.C., Vágvölgyi, Cs. (2016) Solid-state fermentation of dragon fruit residues to produce phenolic antioxidants using *Rhizomucor miehei*. In: Škrbić B (szerk.) 18th Danube-Kris-Mures-Tisa (DKMT) Euroregional Conference on Environment and Health: Book of abstracts. pp. 86-87.

Takó, M., Zambrano, C., **Kotogán, A.**, Kerekes, E.B., Krisch, J., Papp, T., Vágvölgyi, Cs. (2016) Antimicrobial effect of antioxidative extracts obtained after solid-state bioprocessing of oilseed residues using the zygomycete *Rhizomucor miehei*. In: Mrša V, Teparić R, Kifer D (szerk.) Power of Microbes in Industry and Environment 2016: Programme and abstracts p. 66.

Zambrano, C., Takó, M., **Kotogán, A.**, Komáromi, L., Krisch, J., Vágvölgyi, Cs. (2016) Production of phenolic antioxidants from apple residues. In: International Conference on Science and Technique Based on Applied and Fundamental Research (ICoSTAF'16): Proceedings. 5 p.

Zambrano-Carrillo, C., **Kotogán, A.**, Komáromi, L., Takó, M., Krisch, J., Vágvölgyi, Cs. (2016) Production of phenolic antioxidants from apple residues. In: Gábor Keszthelyi-Szabó, Cecília Hodúr, Judit Krisch (szerk.) International Conference on Science and Technique Based on Applied and Fundamental Research (ICoSTAF'16): Book of Abstracts. p. 48.

Kotogán, A., Kerekes, E.B., Babos, G., Krisch, J., Papp, T., Chandrasekaran, M., Kadaikunnan, S., Alharbi, N.S., Vágvölgyi, Cs., Takó, M. (2015) Bioconversion of oilseed residues by *Rhizomucor miehei* for production of phenolic antioxidants. 17th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology. *Acta Microbiol Immunol. Hung.* 62:(S2) pp. 167-168.

Takó, M., **Kotogán, A.**, Babos, G., Sója, A., Papp, T., Vágvölgyi, Cs., Krisch, J. (2015) Enhancement of the bioavailability of extractable berry phenolics by solid state fermentation. In: 6th Congress of European Microbiologists (FEMS 2015). Paper FEMS-2831.

Összesített impakt faktor: 5,399

