

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

DOKTORI (PH. D.) ÉRTEKEZÉS

KÉSZÍTETTE:

TAKÓ MIKLÓS

TÉMAVEZETŐK:

PROF. DR. VÁGVÖLGYI CSABA

DR. PAPP TAMÁS

BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA



**SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR
MIKROBIOLÓGIAI TANSZÉK**

**2011
SZEGED**

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
1. BEVEZETÉS	7
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	8
2.1. A járomspórás gombák főbb jellemzői	8
2.2. A Mucorales rend	8
2.2.1. A <i>Rhizomucor</i> nemzetség	9
2.2.2. A <i>Mucor</i> nemzetség	10
2.2.3. A <i>Rhizopus</i> nemzetség	10
2.2.4. A <i>Gilbertella</i> nemzetség	11
2.3. A vizsgált enzim: β-glükózidáz	11
2.3.1. A glikozidázok	11
2.3.2. A β -glükózidázok általános jellemzői	11
2.3.3. A β -glükózidázok osztályozása	13
2.3.4. A β -glükózidázok katalizáló folyamata	14
2.3.5. A katalitikus folyamatokban résztvevő aminosavak	16
2.4. A β-glükózidáz és a celluláz enzimrendszer	18
2.5. Azonosított gomba β-glükózidáz gének	20
2.6. Tisztított és jellemzett gomba β-glükózidáz enzimek	21
2.7. A járomspórás gombák β-glükózidáz termelése	23
2.8. A β-glükózidázok gyakorlati alkalmazása	24
3. CÉLKITŰZÉSEK	29
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	31
4.1. Alkalmazott törzsek	31
4.2. Táptalajok és tápoldatok	31
4.3. Felhasznált oldatok, pufferek és reagensek	32
4.4. Tenyésztési körülmények a β-glükózidáz termelés teszteléséhez	34
4.5. A β-glükózidáz enzimek vizsgálatához alkalmazott módszerek	35
4.5.1. A β -glükózidáz aktivitásának meghatározása	35
4.5.2. Az enzimek vizsgálata nyers kivonatban	36
4.5.3. A β -glükózidázok tisztításának folyamata	37
4.5.4. Reakcióelegyek a hidrolitikus aktivitás jellemzéséhez	38
4.5.5. Reakcióelegyek a szintetikus aktivitás jellemzéséhez	40

4.5.6. Antioxidáns aktivitású fenolok felszabadítása glikozidokból	41
4.6. A β-glükózidáz gén vizsgálatához alkalmazott módszerek.....	42
4.6.1. Genomi DNS izolálás	42
4.6.2. A kísérletek során alkalmazott indítószekvenciák.....	43
4.6.3. Alkalmazott PCR technikák és reakciókörülmények	43
4.6.4. DNS elválasztás agaróz gélen.....	45
4.6.5. DNS izolálás agaróz gélből	45
4.6.6. Génklónozás során alkalmazott módszerek.....	45
4.6.7. Kompetens <i>Escherichia coli</i> sejtek készítése	46
4.6.8. Az <i>Escherichia coli</i> sejtek transzformációja	46
4.6.9. Szekvenciák meghatározása és elemzése	46
4.6.10. Southern-hibridizáció	48
4.6.11. Az expressziós vektor szerkesztése	49
4.6.12. A <i>Mucor circinelloides</i> protoplasztok képzése.....	49
4.6.13. A <i>Mucor circinelloides</i> protoplasztok transzformációja	50
5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK.....	51
5.1. Járomspórás gombák β-glükózidáz termelésének tesztelése	51
5.2. A β-glükózidáz enzimek vizsgálata nyers kivonatban.....	54
5.3. A β-glükózidáz enzimek izolálása	57
5.4. A β-glükózidáz enzimek biokémiai jellemzése.....	59
5.4.1. Hőmérséklet optimum és stabilitás.....	60
5.4.2. pH optimum és stabilitás	61
5.4.3. Szubsztrát specifitás vizsgálatok	62
5.4.4. Mono- és diszacharidok enzimaktivitásra gyakorolt hatása.....	64
5.4.5. Lehetséges gátlószerek vizsgálata	66
5.4.6. Alkoholok enzimaktivitásra gyakorolt hatása	67
5.4.7. Az enzimek jellemző kinetikai paraméterei	69
5.5. A β-glükózidáz enzimek szintetikus aktivitásának vizsgálata	70
5.5.1. Szintetikus aktivitás vizsgálatok cellobióz szubsztráton.....	71
5.5.2. Szintetikus aktivitás vizsgálatok etanol jelenlétében.....	76
5.5.3. Szintetikus aktivitás vizsgálatok laktóz szubsztráton.....	77
5.6. Antioxidáns aktivitású fenolok felszabadítása glikozidokból.....	80
5.7. A <i>Rhizomucor miehei</i> β-glükózidáz gén	82
5.7.1. A gén izolálása és jellemzése	82

5.7.2. A kódolt aminosav szekvencia elemzése.....	84
5.7.3. A gén kifejeződésének vizsgálata.....	86
5.8. Gomba β-glükozidázok evolúciója	89
6. ÖSSZEFOGLALÁS	91
7. SUMMARY	96
IRODALOMJEGYZÉK	102
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	120
MELLÉKLETEK.....	121

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ATCC	American Type Culture Collection, USA
BCIP	5-bromo-4-kloro-3-indoil-foszfát
BGL	β -glükózidáz
<i>bgl</i>	β -glükózidáz gén
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures, Hollandia
CCRC	Culture Collection and Research Center of the Food Industry and Research Development Institute, Taiwan
CI	kloroform - izoamilalkohol
DMSO	dimetil-szulfoxid
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
ETH	Swiss Federal Institute of Technology Culture Collection
ExoI	árpa β -glükán exohidroláz
FRR	CSIRO Food Research Culture Collection, North Ride, Ausztrália
<i>gpdI</i>	gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz gén
HCA	hidrofób klaszter analízis
HGT-BG	<i>Aspergillus oryzae</i> magas glükóz toleranciával rendelkező β -glükózidáz
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (nagyfelbontású folyadék kromatográfia)
HPLC-ESI	High Performance Liquid Chromatography - Electrospray Ionization (nagyfelbontású folyadék kromatográfia - ionsapda tömegspektrometria)
IBP	Institute of Fermentation Industry C. C., Varsó, Lengyelország
IPCR	Inverse Polymerase Chain Reaction (inverz polimeráz lánreakció)
IPTG	izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid
K_m	Michaelis-Menten állandó
LB	Luria-Bertani tápközeg
LC-MS	Liquid Chromatography - Mass Spectrometry (folyadékkromatográfia - tömegspektrometria)
<i>leuA</i>	α -izopropilmalát izomeráz gén
MES	2-N-morfolin-etánszulfonsav
MOPS	3-N-morfolin-propánszulfonsav
MUFS	Culture Collection of the Department of Microbiology and Biochemistry, The University of the Orange Free State, Dél-Afrika
MUSCLE	Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation
NBS	N-brómszukcinimid
NBT	nitroblue tetrazolium klorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (mágneses rezonancia)
NRRL	Agricultural Research Service Culture Collection, USA
PCI	fenol - kloroform - izoamilalkohol
<i>pCMB</i>	<i>para</i> -kloro-merkuri-benzoésav
PCR	Polymerase Chain Reaction (polimeráz lánreakció)
PEG	polietilén-glikol
PMC	PEG - szorbitol - MOPS - kalciumklorid

<i>p</i> NPG	<i>para</i> -nitrofenil- β -D-glükopiranozid
<i>pyrG</i>	orotidin-5'-monofoszfát dekarboxiláz gén
RNáz	ribonukleáz
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (nátrium-lauril-szulfát)
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (denaturáló poliakrilamid gélelektroforézis)
SMC	szorbitol - MOPS - kalciumklorid
SSC	nátrium-klorid - nátrium-citrát
SZMC	Szeged Microbiological Collection, Szeged, Magyarország
TAE	Tris - Acetát - EDTA puffer
TCM	Tris - Calcium - Magnesium (trisz - kalcium - magnézium)
TJM	Culture Collection of Dr. Themis J. Michailides, University of California, USA
TRIS	trisz-(hidroxi-metil)-amino-metán
V_{max}	maximális reakciósebesség
WRL	Wellcome Bacterial Collection, Anglia
X-Gal	5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktopiranozid
YEG	Yeast Extract - Glucose (élesztőkivonat - glükóz)
YNB	Yeast Nitrogen Base (élesztő nitrogénforrás)
YPG	Yeast Extract - Pepton - Glucose (élesztőkivonat - pepton - glükóz)

1. BEVEZETÉS

A Mucorales rend a járomspórás gombák (Zygomycetes) legismertebb és legnagyobb csoportja. Az idetartozó fajok elsősorban növényi és állati eredetű bomló szerves anyagokon előforduló, talajból izolálható szaprotróf mikroorganizmusok. 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 más tagja különböző biotechnológiai folyamatokban alkalmazott extracelluláris enzimek (pl. lipázok, proteázok) termelőjeként (Gottfredsen, 1990, Outtrup és Boyce, 1990), illetve értékes biológiai aktivitással rendelkező (pl. szteránvázis) vegyületek sztereospecifikus hidroxilálójaként (Madyastha és Srivatsan, 1987) kerül ipari felhasználásra.

A β -glükozidázok (β -D-glükozid glükohidrolázok) jelentős szerepet játszanak a biológiai folyamatokban, gombáknál a celluláz enzimrendszer fontos részét képezik. Ez az enzim felelős a rövid szálú oligoszacharidok és a cellobióz glükózzá történő hidrolíziséért. Meghatározott körülmények között szintetikus aktivitásra is képesek, ami különböző oligoszacharidok és glikokonjugátumok szintézisét teszi lehetővé (Palcic, 1999). Oligoszacharidokat széles körben alkalmaznak gyógyászati és diagnosztikai célokra, valamint probiotikumként hasznosítható baktériumok növekedésének serkentésére. Enzimatiszintézisük transzglykozilációval egy lépésben megoldható, szemben a bonyolultabb kémiai szintézissel (Flitsch, 2000). Ugyancsak elterjedt a β -glükozidáz enzimek hidrolitikus aktivitásának biotechnológiai és ipari alkalmazása is (pl. a gyógyszeriparban, vagy az élesztőkivonat gyártás során).

Munkánk célja mind az alap kutatásban, mind a biotechnológiai fejlesztésekben felhasználható, extracelluláris β -glükozidáz termelő járomspórás gombák azonosítása, az enzimaktivitás detektálása és jellemzése, az enzimet kódoló gén klónozása, valamint részletes molekuláris és funkcionális elemzése volt. A kódoló gén megismerése lehetőséget nyújt az enzim mennyiségének és aktivitásának javítására. Céljaink közé tartozott a nagy extracelluláris aktivitással rendelkező járomspórás gombák által termelt β -glükozidázok homogenitásig történő tisztítása, valamint az izolált enzimek hidrolitikus és szintetikus (transzglykozidáz) aktivitásának biokémiai jellemzése is.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A járomspórás gombák főbb jellemzői

A járomspórás gombák (*Zygomycetes*) a szárazföldi gombák egyik nagy csoportja. Ivaros szaporodásuk nem kötődik a víz jelenlétéhez. Többségük szaprotróf, talajban, korhadékban, rothadó gyümölcsökön, zöldségeken, komposztban él. Előfordul néhány parazita is, melyek elsősorban rovarokon, férgekben és gombákon élősöknek. Hifáik általában cönocitikusak, azaz nincs bennük válaszfal. Általában csak a gametangiumok és a sporogén szervek kialakulásakor keletkeznek válaszfalak. Néhány csoportra jellemző a morfológiai dimorfizmus, azaz a fonalas morfológia mellett képesek élesztőszerűen is növekedni, főleg oxigénhiányos, vagy magas hexóz tartalmú környezetben. Sejtfalukat elsősorban kitin és kitozán alkotja. Szaporodásuk ivartalan módon sporangiospórákkal történik. Ivaros spóraalakjuk a két gametangium fúziójával létrejövő járomspóra (zigospóra; *gör* zygos = járom, iga), melyről e gombák a nevüket is kapták. A járomspóra vastag falú, jellegzetes alakú képlet, gyakran rövid hifákból álló csomó burkolja. A csoport igen sok tagja esetében a taxonómusok különös hangsúlyt helyeztek a vegetatív szaporodással kapcsolatos jellemzőkre, ezért a legtöbb határozókulcs szinte kizárólag az ivartalan szaporító képletek morfológiáján alapul (Alexopoulos és mtsi., 1996). A dolgozatban csak a Mucorales rend tagjaival foglalkozom.

2.2. A Mucorales rend

A járomspórás gombák legtöbb fajt magában foglaló csoportja a Mucorales rend. Tagjai főleg szaprotrófok, talajban, korhadó növényi részekben, komposztálódó szerves maradványokon fordulnak elő, bár akad köztük néhány parazita is. A rendbe tartozó fajok általában gyors növekedésűek, és nagy tömegű hifaképzésre képesek. A legtöbb törzs a raktározott zöldségek és gyümölcsök kártevője, magas cukor- és sókoncentrációt elviselő képességük miatt konzervgyárakban is komoly károkat okozhatnak. A fajok hőmérséklet igénye változatos, termofileket és pszichofileket egyaránt találunk közöttünk. Ipari alkalmazásuk jelentős; számos törzset használnak keményítőhidrolízisre, valamint oxálsav, fumársav, tejsav, ecetsav és citromsav előállításra (Gottfredsen, 1990; Outtrup és Boyce, 1990). A kereskedelmileg fontos fumársav előállítása *Rhizopus stolonifer* gombával történik, míg más *Rhizopus* fajok nagyon fontos tejsavtermelők (Theron és Lues, 2010).

Noha a gyakorlatban a tejsav döntő mennyiségét baktériumokkal termeltetik, a gomba segítségével előállított végső termék könnyebben tisztítható, mint a bakteriális úton nyert. Mivel jó enzimtermelők, ezért extracellulárisan kiválasztott enzimeiket a fermentációs ipar számos területén alkalmazzák (pl. amiláz, lipáz, proteáz termeltetés; Lowe, 1992). A proteáz és lipáz enzimeiket elsősorban a sajtkészítésnél használják (Alves és mtsi., 2002). Ezen kívül egyes törzseiket kémiai vegyületek biokonverziójára alkalmazzák (szteroid transzformáció; hidrokortizon, prednizolon előállítás).

2.2.1. A *Rhizomucor* nemzetség

A *Rhizomucor* nemzetséget a *R. pusillus* és a *R. miehei* termofil fajok alkotják (Schipper, 1978; Vágvölgyi és mtsi., 1999). A *Mucor* nemzetségtől elsősorban a termofil jelleg és a rhizoid képzés miatt különítették el. A *R. miehei* homotallikus organizmus, míg a *R. pusillus* homo- vagy heterotallikus (Vastag és mtsi., 1998; Vastag és mtsi., 2000).

A *Rhizomucor* törzsek nagy jelentőségűek egyes biotechnológiai és élelmiszeripari alkalmazások okán is (pl. proteáz és lipáz termelés). A proteáz enzimeiket a sajtgyártás során használják, ugyanis savas aszpartil proteázuk a szarvasmarha renninhez (azaz a sajtgyártásnál a tej koagulálására használt kazeinbontó enzimhez) hasonlóan alkalmazható. A borjú oltóenzimnél nagyobb specifitású és hatékonyabb, így használatával jobb minőségű sajt nyerhető (Alves és mtsi., 2005). Több gombafaj izolátuma által termelt enzim nem specifikus proteináz aktivitását vizsgálták meg, amely során a *R. miehei* bizonyult a legjobb mikrobiális rennin forrásnak (Bailey és Siika-aho, 1988). A proteázot mosószer adalékanyagként, és a bőriparban is hasznosítják (Pandey és mtsi., 1999). A *R. miehei* által szekretált enzimek közé tartoznak a lipázok is (Huge-Jensen és mtsi., 1987). A lipázok a triacilglicerolok hidrolízisét és az észterek glicerolból és hosszú szénláncú zsírsavakból történő szintézisét katalizálják. A lipázokat a vegyiparban tisztítószer adalékanyagként alkalmazzák (Huge-Jensen és mtsi., 1987). A *Rhizomucor* lipázok a zsírsavakban és a növényi olajokban található lipideket képesek gyorsan hidrolizálni. Eltérően az emlős és bakteriális lipázoktól, a *R. miehei* lipáz zimogén formában szintetizálódik, 24 aminosav hosszúságú szignál peptiddel, valamint 70 aminosavnyi propeptiddel (Boel és mtsi., 1988), továbbá ez volt az első lipáz, melynek háromdimenziós szerkezetét röntgen vizsgálatokkal határozták meg (Brady és mtsi., 1990). A *R. miehei* lipáz génjét sikerült kifejezteni *Aspergillus oryzae*-ban is (Boel és mtsi., 1988).

2.2.2. A *Mucor* nemzetség

A *Mucor* nemzetségbe tartozó fajok jellemzően világos színű telepeket képeznek, melyek később, a spórák érésekor megbarnulnak, illetve megfeketednek. Indát és rizoidokat nem fejlesztenek, az apofízis is hiányzik. A legtöbb *Mucor* faj 37 °C-on nem képes növekedni, de a nemzetség tartalmaz néhány termotoleráns fajt is (de Hoog és mtsi., 2000). A *Mucor* fajok többsége szaprotróf, ismertebbek a *M. mucedo*, *M. circinelloides*, *M. racemosus* és a *M. rouxii*, amelyek laboratóriumi vizsgálatoknak is gyakori objektumai. A jelen dolgozatban részletesen vizsgált *M. circinelloides*, sok más *Mucor* fajhoz hasonlóan, húsos gyümölcsök és raktározott növényi eredetű élelmiszerek ismert raktári kártevője. A *M. hiemalis*, *M. racemosus* és a *M. baciliformis* fajok kiemelkedő proteáz termelésük miatt ipari jelentőségűek. A *Rhizomucor* fajokkal együtt a *Mucor* nemzetség tagjai a leginkább tanulmányozott lipáztermelők (Alves és mtsi., 2002).

2.2.3. A *Rhizopus* nemzetség

A Mucorales rend egyik jól ismert nemzetsége. Sporangiumaik apofízissel rendelkeznek, a zigospóra szuszpenzorai szemben állók, a sporangiofórok eredésénél rizoidokat és sztolonokat képeznek. Talajban, korhadó növényeken, élelmiszerek felületén és poros felszíneken gyakran megtalálhatók, de másodlagos növényi és opportunistá human patogének is lehetnek. Optimális növekedési hőmérsékletük fajtól függően 28 - 45 °C között van. Az egyik leggyorsabban és leglátványosabban szaporodó csoport. A *Rhizopus* nemzetség ismertebb fajai a *Rh. oryzae*, a *Rh. microsporus*, a *Rh. oligosporus* és a *Rh. stolonifer*.

Élelmiszeripari és biotechnológiai szempontból egyaránt nagy jelentőségűek. Néhány tradicionális távol-keleti étel (pl. tempeh) fermentációjához használt starter kultúrájának fontos összetevője a *Rh. microsporus* var. *oligosporus* (Hachmeister és mtsi., 1993). A gomba enzimátikus úton részlegesen lebontja, átalakítja a kiindulási alapanyagot. Munkánk során a *Rh. oryzae* fajt tanulmányozzuk részletesen, melynek törzsei közt jó tejsavtermelőket is azonosítottak (Bai és mtsi., 2003; Maas és mtsi., 2006). A *Rhizopus* törzseket az élesztők mellett alkoholok előállításában is alkalmazzák (Taherzadeh és mtsi., 2003).

2.2.4. A *Gilbertella* nemzetség

A *Gilbertella* nemzetség egyetlen fajt foglal magába (Hesseltine, 1960). A *G. persicaria* raktári kártevője lehet gyümölcsöknek, zöldségeknek (pl. körte, sárgabarack, paradicsom). Jellegzetessége, hogy a sporangium egyetlen hosszanti irányú hasadással nyílik fel. A sima falú spórák csúcsi részein vékony fonalszerű függelékek vannak. A viszonylag kevésbé vizsgált járomspórák fajok közé tartozik.

2.3. A vizsgált enzim: β -glükózidáz

2.3.1. A glikozidázok

A glikozidázok (vagy karbohidrázok; EC 3.2.1) igen elterjedt hidrolitikus enzimek, melyek a glikozidos kötéseket bontják *O*-glikozidokban (Naumoff, 2011). A glikozidázok bizonyos körülmények között transzglikoziláción és reverz hidrolízisen keresztül oligoszacharidok és glikokonjugátumok szintézisére is képesek (Palcic, 1999; Ajisaka és Yamamoto, 2002). Oligoszacharidoknak azokat a szénhidrátokat tekintjük, melyekben 2 - 10 monoszacharid egység kapcsolódik egymáshoz *O*-glikozidos kötéssel (McNaught, 1996; Eggleston és Cote, 2003).

A glikozidázokat egyszerű glikozidokat (pl. oligoszacharidok) és poliszacharidokat bontó enzimekre lehet felosztani. Az egyszerű glikozidokat bontó enzimek közé tartozik az α - és β -galaktozidáz, a β -fruktozidáz, az α -glükózidáz, valamint a munkánk során vizsgált β -glükózidáz is. Az egyszerű glikozidokat bontó glikozidázok közül a legalaposabban tanulmányozott enzim az élesztő invertáz, amelyik a szacharózt hidrolizálja glükózra és fruktózra (Burger és mtsi., 1961; Andjelkovic és mtsi., 2010). A poliszacharid bontó glikozidáz enzimek az élettanilag fontos tartalék és váz poliszacharidok anyagcseréjében játszanak szerepet (Savoie és Gourbière, 1987). A legfontosabbak az amilázok, melyek a keményítő típusú poliszacharidok hidrolízisét katalizáló enzimek.

2.3.2. A β -glükózidázok általános jellemzői

A β -glükózidázok (EC 3.2.1.21; egyéb nevei: genciobiáz, cellobiáz, emulzin, β -D-glükózidáz, β -glükózid glükohidroláz, amigdalínáz, arbutináz, elatráz) egy jól jellemzett, biológiailag fontos enzimsoprotot 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 (Rojas és mtsi., 1995). A legfontosabb β -glükozidos kötéssel rendelkező diszacharid a cellobióz, a cellobiáz elnevezés innen ered. Egyes β -glükozidázok a diszacharidok mellett bizonyos oligoszacharidok és aril-, illetve alkil-glükozid vegyületek nem redukáló vég felőli hidrolízisét is katalizálják (Decker és mtsi., 2001; Wallecha és Mishra, 2003). A glükóz lánc növekedésével csökken az enzimaktivitás (Bisaria és Mishra, 1989; Kubicek és mtsi., 1993).

A β -glükozidázok a prokariótáktól kezdve a magasabb rendű emlősökig minden élőlénycsoportban jelen vannak. Számos biológiai folyamatban jelentős szerepük van, mint pl. a raktározott poliszacharidok lebontása, sejtszintű szignalizáció, onkogenezis és gazdapatogén interakciók. Emberben a β -glükozidáz hiány felelős az úgynevezett Gaucher szindrómáért, amely egy ritka, recesszív öröklésű betegség (Fredrickson és Sloan, 1972). Az enzimdeficiens sejtek nem képesek hidrolizálni a glikozilceramidokat, így azok felhalmozódnak a szervezetben, és különböző belső szervek (lép, máj, nyirokcsomók) megnagyobbodását okozzák (Barton és mtsi., 1990).

A termelő szervezettől, valamint az enzim tulajdonságaitól függően a β -glükozidáz sejten belül (intracellulárisan), illetve kívül (extracellulárisan) is elhelyezkedhet. A bakteriális és az élesztő β -glükozidáz enzimek főleg intracelluláris elhelyezkedésűek, a fonalas gombák azonban néhány kivételtől eltekintve (pl. *Trichoderma reesei* BGLII; Saloheimo és mtsi., 2002) a sejten kívüli térbe szekretálják az enzimet (Bhatia és mtsi., 2002). Sejtfalhoz kötött β -glükozidázok szintén ismertek gombáknál, melyeket többek között a *Pichia etchellsii* (Roy és mtsi., 2005), a *Neurospora crassa* (Eberhart és Beck, 1970), a *T. reesei* (Messner és Kubicek, 1990), a *Trichoderma viride* (Usami és mtsi., 1990), valamint az *Aspergillus kawachii* (Iwashita és mtsi., 1998) izolátumok esetében sikerült azonosítani. A fonalas gombáknál valószínűleg a tenyésztési körülmények is befolyásolják a termelt β -glükozidáz enzim elhelyezkedését. Az enzimek nagyobb része folyadék tenyészetnél sejtfalhoz kötött, míg szilárd fázisú fermentációnál oldott állapotban található (Oda és mtsi., 2006). Feltételezhetően bizonyos természetes eredetű cellulóz szubsztrátok jelenlétében a fonalas gombák által termelt β -glükozidáz sejten kívüli térbe történő szekréciója indukálható, valamint a sejtfalhoz gyengébben kötött enzimek is felszabadulhatnak. Ezt az elképzelést különböző, β -glükozidázok izolálásával,

jellemzésével, illetve az enzim aktivitásával kapcsolatos vizsgálatok is alátámasztják (Borgia és Mehnert, 1982; Saloheimo és mtsi., 2002).

2.3.3. A β -glükózidázok osztályozása

A β -glükózidázok heterogén csoportot alkotnak a hidrolitikus enzimeken belül, osztályozásukra nincs egyszerű, széles körben alkalmazható módszer. Az irodalomban általában szubsztrátspecifitásuk vagy nukleotid szekvenciájuk alapján különböztetik meg őket (Henrissat és Bairoch, 1996). A szubsztrátspecifitás alapján az enzimek (1) aril β -glükózidázokra (aril-glükózid hasítás), (2) cellobiázokra (cellobióz hidrolízis), illetve (3) széles szubsztrátspecifitású enzimekre oszthatók fel. A legtöbb β -glükózidáz az utóbbi kategóriába sorolható. Az enzimek osztályozásának érdekében számos további tanulmány született (Beguín, 1990; Rojas és mtsi., 1995), azonban ezeket már szinte teljesen felváltották a nukleotid szekvenciákon alapuló rendszerek (Henrissat és Bairoch, 1996). Ennek alapja a nukleotid szekvenciák összehasonlításain kívül a hidrofób klaszter analízis (HCA), amely a fehérjék térszerkezetének hasonlóságait vizsgálja. Számos β -glükózidázon végzett HCA vizsgálat azt mutatta, hogy az α -hélixek és a β -lemezek hasonló elhelyezkedésűek a harmadlagos szerkezetben, illetve, hogy számos igen konzervált aminosav helyezkedik el az aktív centrum mellett. Az ilyen osztályozás az enzimek strukturális sajátosságait, evolúciós kapcsolatait, illetve katalitikus mechanizmusait is tükrözi.

A közel 2500 glikozid hidrolázt 88 családba sorolják. A β -glükózidázok a glikozid hidrolázok 1. és 3. családjában kaptak helyet. Mindkét családba úgynevezett „megtartó” enzimek tartoznak, amelyek nem változtatják meg az anomer konfigurációt. Az 1. család ősbaktériumokban, növényekben és emlősökben megtalálható β -glükózidázokat tartalmaz, amelyek jellegzetes β -galaktozidáz aktivitást is mutatnak. Számos ide tartozó enzim háromdimenziós szerkezete is ismert (Hakulinen és mtsi., 2000; Zouhar és mtsi., 2001), mely segít megérteni széles szubsztrátspecifitásukat, működésüket és főbb szerkezeti vonásaikat.

A glikozid hidrolázok 3. családjának megközelítőleg 100 ismert tagja van, melyek közül a legtöbb mikrobiális eredetű β -glükózidáz. A családba tartozó enzimek közül tudomásunk szerint egyedül az árpa β -glükán exohidroláznak (ExoI) ismert a háromdimenziós szerkezete (Varghese és mtsi., 1999). Az árpa ExoI szerkezetét felhasználva azonban számos 3. családba tartozó enzim háromdimenziós szerkezetét is

modellezték (Harvey és mtsi., 2000). A 3. család enzimeit az AB és AB' osztályokra oszthatóak tovább. Mindegyik enzim két domaint tartalmaz (A és B), ahol a B domain tartalmazza a vélt aktív centrumot (az SDW motívum D aminosava). Az AB' osztálynál a B domain lényegesen kisebb, azonban a konzervált szekvenciák még megmaradtak (Faure és mtsi., 1999). Molekuláris szinten a 3. enzimcsalád génjei öt eltérő régiót tartalmaznak: N-terminális rész, N-terminális katalitikus domain, nemhomológ régió, C-terminális domain (funkciója ismeretlen) és a maradék C-terminális rész.

2.3.4. A β -glükózidázok katalizáló folyamata

A β -glükózidáz enzimek az egyszerű glükózidok glükózzá történő hidrolíziséért felelősek, valamint bizonyos körülmények között szintetikus aktivitásra is képesek, ami különböző oligoszacharidok és glükokonjugátumok szintézisét teszi lehetővé. A β -glükózidázok katalizáló folyamatát a 1. ábra szemlélteti.

Hidrolízis

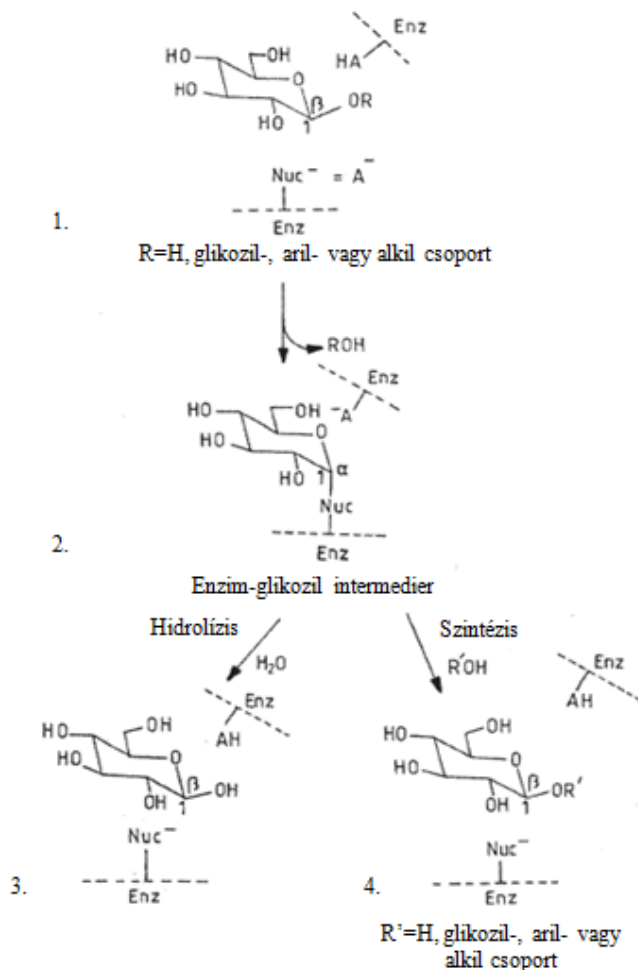
A β -glükózidáz enzim a ciklikus aldózok glikozidos hidroxilcsoportja és egy másik összetevő (cukor; amino-alkohol; aril-alkohol; primer, szekunder, vagy terciér alkohol) hidroxil csoportja közötti glikozid kötések hidrolízisét katalizálja.

A glikoziláció folyamán nukleofil támadás éri a szubsztrát glikozid anomer (C_1) központját, ami egy kovalensen kötött α -glikozil-enzim intermediert képez (Withers és Street, 1988), így a C_1 konfigurációja megfordul (1. ábra). Az enzim másik aktív része savbázis katalizátorként H^+ iont szolgáltat a glikozidos hidroxilcsoport oxigénjének, ezáltal az aglikon (diszacharidok esetén másik glikon) csoport távozását segíti elő. A glikozil-enzim intermediert az anomer centrumnál támadó vízmolekulák hatására hidrolizál, a reakció eredményeként β -glükóz keletkezik.

Reverz hidrolízis vagy transzglikoziláció

A β -glükózidázok által katalizált szintézis reverz hidrolízisen vagy transzglikoziláción keresztül történhet. A reverz hidrolízis folyamatánál a szubsztrát H atomja az R lánc helyén található (1. ábra). Az enzim-glikozil intermediert egy $R'OH$ komplexszel lép reakcióba, ahol az R' egy másik cukor, így a termodinamikai kontroll alatt álló reakció eredményeként diszacharid termék keletkezik. A transzglikozilációnál a szubsztrát H atomja helyén egy R lánc található. Egy másik nukleofil (víz, illetve aril- vagy

alkil-alkohol; R'OH) enzim-glikozil intermediérral képzett reakciója egy új glikozidot fog eredményezni. A termék szerkezetének minőségét a víz és az akceptor R'OH enzim-glikozil intermediérral való kölcsönhatása határozza meg, amely kinetikai kontroll alatt áll.



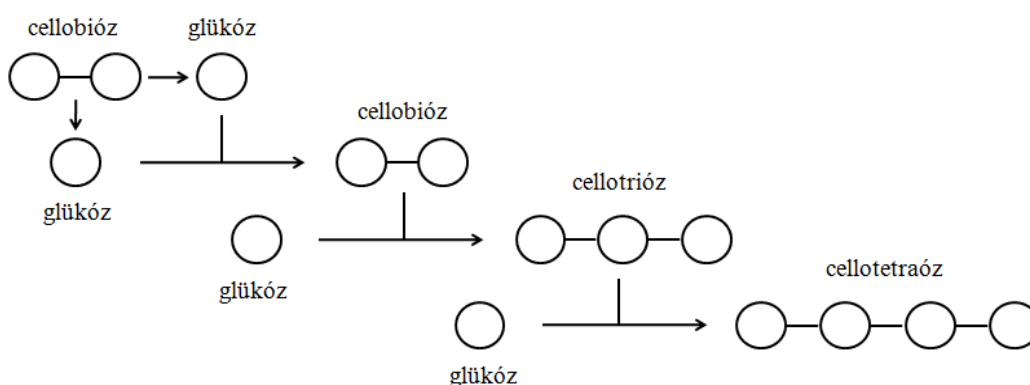
1. ábra. A β -glükózidázok katalizáló folyamata (Bhatia és mtsi., 2002).

Az enzim funkcionális csoportja (A^- , 1) általi nukleofil támadás a β -glükózid kötés anomer konfigurációjának inverziójához vezet az enzim-glikozil intermediérrben (2). Az ezt követő reakciók víz vagy cukor (aril- vagy alkil glükózidok) jelenlétében a β -forma megtartásához vezetnek, hidrolízist (3) vagy szintetikus folyamatot eredményezve (4).

Az oligoszacharidok β -glükózidáz enzim katalizált gyors szintézise rendszerint valamilyen diszacharid szubsztrát (cellobióz, laktóz, genciobióz) transzglykozilációjával vihető véghez (Gusakov és mtsi., 1984; Boon és mtsi., 1999; Kono és mtsi., 1999). A β -glükózidázok által cellobióz szubsztráton katalizált oligoszacharid szintézis (transzglykoziláció) feltételezett mechanizmusának lényegét a 2. ábra szemlélteti. A termodinamikai kontroll alatt álló reverz hidrolízis során a di- és oligoszacharidok szintézise meglehetősen lassú, illetve a keletkezett termékek mennyisége is alacsony (Bucke, 1996; Plou és mtsi., 2007). Transzglykoziláció esetén a termék mennyisége

megközelítheti a 40%-ot (m/v%), szemben a termodinamikailag kontrollált folyamatok 20% (m/v%) körüli termelékenységével. A reakcióidőt azonban szigorúan kontrollálni kell, hogy a hidrolízis ne dominálhasson (Bruins és mtsi., 2003). A monoszacharidokból történő di- és oligoszacharid szintézis a gombák intracelluláris β -glükózidázainál lehet jelentős, melyek a sejten belüli szabad glükóz mennyiségét transzglükózidáz aktivitásuk segítségével alacsony szinten tartják, ezzel elősegítik az extracelluláris β -glükózidázok szekrécióját (Pal és mtsi., 2010).

Kiemelkedő szintetikus aktivitással rendelkező β -glükózidázt írtak le a *Sclerotinia sclerotiorum* fonalas gombában (Smaali és mtsi., 2004a), valamint az anaerob *Piromyces* E2 izolátum esetében (Harhangi és mtsi., 2002). A *S. sclerotiorum* β -glükózidáz enzimmel az egyes glükó-oligoszacharidok és alkil-glükózidok szintézisét részletesen is tanulmányozták (Smaali és mtsi., 2007).



2. ábra. A transzglükóziláció feltételezett mechanizmusa cellobióz szubsztráton (Saibi és mtsi., 2007).

A β -glükózidáz a cellobiózt két glükóz molekulára hasítja (hidrolitikus aktivitás), amelyek további oligoszacharidok építőegységeiként szolgálnak. Egy glükóz molekula kapcsolása a cellobiózhoz cellotriózt eredményez, amelyből egy további glükóz beépülésével cellotetraózt keletkezik.

2.3.5. A katalitikus folyamatokban résztvevő aminosavak

A β -glükózidázok szubsztráttal történő kölcsönhatásának mechanizmusa kevésbé ismert. Ez különösen az aglikon részre vonatkozik, amely a szubsztrátok tekintetében nagy diverzitást mutat, továbbá felelős a szubsztrát specifitás finom eltéréseiért is. A katalitikusan inaktív kukorica β -glükózidáz kristályszerkezetének ismerete azonban irányvonalat szolgáltat az enzim és az aglikon oldalrész kölcsönhatásának vizsgálatához (Czjzek és mtsi., 2000). Az említett komplex szerkezeti adatai azt mutatják, hogy a szubsztrát aglikonját egyik oldalról triptofán (Trp378), másik oldalról fenilalanin (Phe198,

Phe205 és Phe466) fogja közre. Ezen aminosavak variálódása adja a β -glükózidázok szubsztrát specifikitásának eltéréseit, ezzel nagyon fontos szerepet adva e négy aminosavnak.

A katalitikus folyamatokban résztvevő aminosavak különböző módszerekkel (kinetikai jelölés, szekvencia illesztés, specifikus aminosavak kémiai módosítása, hely-specifikus mutagenézis) történő azonosítása betekintést nyújt az egyes β -glükózidáz enzimek hidrolitikus és szintetikus aktivitásaiba. A hidrofób aminosavak, a karboxilsav oldallánccal rendelkező aminosavak, valamint a hisztidin és a cisztein szerepe meglehetősen jól ismert a különböző β -glükózidázok katalitikus folyamataiban.

A *Clostridium papyrosolvens* β -glükózidáz N-brómszukcinimiddal (NBS) történt kémiai modifikációja a triptofán (Trp) aminosavakat a katalitikus aktivitással hozta összefüggésbe, ahol az NBS a triptofán indolgyűrűjének irreverzibilis oxidációját katalizálja (Sharmila és mtsi., 1998). A *Streptomyces* fajokban a katalitikus nukleofil előtt egy konzervált MGW356 motívumot sikerült azonosítani. A konzervált aminosavak gyűrűi valószínűleg szubsztrát kötő helyek lehetnek, valamint az aromás aminosav oldalláncok és a szacharid közötti szénhidrát-protein köteléket erősíthetik (Perez-Pons és mtsi., 1995). Az *Agrobacterium* fajok β -glükózidázainál hely-specifikus mutáció segítségével véghezvitt vizsgálatokban megállapították, hogy a tirozin (Tyr298) aminosav a katalízis szempontjából nélkülözhetetlen, ugyanis a szabad enzimből a közeli nukleofil glutaminsav (Glu358) deprotonált állapotát stabilizálja (Gebler és mtsi., 1995). Ennek következtében a hidrofób aminosavak közvetve, vagy közvetlenül (szubsztrát kötés és orientáció) döntő szerepet játszanak a β -glükózidázok aktivitásában.

A karboxilcsoport (-COOH) oldalláncot hordozó aminosavak szerepe nagyrészt tisztázott az egyes β -glükózidáz enzimek katalitikus aktivitásában. A karboxilcsoport kémiai modifikációja karbodiimiddal érhető el (Chan és mtsi., 1988), így például az 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid az Asp/Glu karboxil csoportjának módosulását katalizálja. A 3. családba sorolt *Aspergillus wentii* β -glükózidáz enzimnél a konzervált SDW motívumokban megtalálható aszparaginsavat (D) egy lehetséges nukleofil régióként azonosították (Bause és Legler, 1980).

A trópusi *Botryodiplodia theobromae* gomba β -glükózidáz hidrolitikus aktivitásának vizsgálatok megállapították, hogy az enzim aktív centrumánál lejátszódó katalitikus folyamatokat valószínűleg egy karboxil- és egy hisztidin imidazol csoport ionizációs állapota befolyásolja (Umezurike, 1977). Az *Arthrobotrys conoides* és a *T. reesei* gombákkal folytatott kutatások ugyancsak megerősítették az enzim aktív

centrumánál elhelyezkedő hisztidin katalitikus aktivitásban betöltött szerepét (Kumble és mtsi., 1992; Mata és mtsi., 1993).

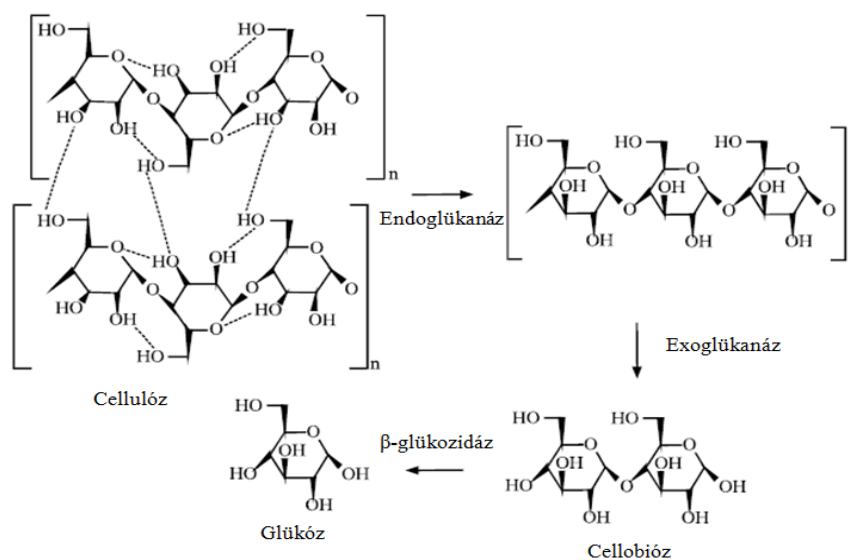
A cisztein aminosav szubsztrátkötésben betöltött szerepét a *T. reesei* β -glükózidáz enzimnél vizsgálták, ahol a cisztein aminosavakat para-kloro-merkuri-benzoészav (*p*CMB) kémiai ágens segítségével sikerült lekötöniük, így az enzim tio-glükozil intermedier nem tudott kialakulni, ami az enzim inaktivációját eredményezte. Amikor azonban a kémiai módosítás előtt inkubálták az enzimet a szubsztráttal, a *p*CMB nem tudott kötődni az aminosavhoz, mely a cisztein enzimaktivitásában betöltött szerepét erősíti meg (Mata és mtsi., 1993).

A katalízisben szerepet játszó kulcsmolekulák felfedezése új utakat nyitott meg a β -glükózidázok hidrolitikus és szintetikus folyamatainak megismeréséhez. A technika fejlődésével új glikoszintázok tervezése és használata vált lehetővé. Mutációk segítségével sikerült a kutatóknak egy olyan enzimet (glükoszintáz) előállítani, ami hidrolitikus aktivitással nem rendelkezik, ellenben magas szintetikus aktivitást mutat (Vocadlo és Withers, 2000; Withers, 2001). Mutáns *Pyrococcus furiosus* Cel B fehérjével folyó kutatásokban fokozott oligoszacharid szintézist sikerült megerősíteni ott, ahol a mutáció az enzim aktivitást, az enzim kinetikát és a szubsztrát specifikitást befolyásolja. A Phe426 Tyr aminosavra cserélődése az oligoszacharid termelés fokozódásához vezet, illetve a metionin lizinre cserélődése a Cel B által katalizált transzglykozilációs reakcióban egy megnövelt pH optimumot eredményez. A Met424→Lys/Phe426→Tyr kettős mutánsok alacsonyabb laktóz koncentrációnál jobb transzglykozilációs aktivitást mutattak, mint a vad típusú enzim (Hansson és mtsi., 2001).

2.4. A β -glükózidáz és a celluláz enzimrendszer

A β -glükózidázok baktériumokban és gombákban a celluláz enzimrendszer fontos részét képezik, ahol a rövid szálú oligoszacharidok és a cellobióz glükózzá történő hidrolíziséért felelősek. A cellulóz a Föld legelterjedtebb makromolekulája, mely a növényi sejtfal alkotóelemeként a leggyakoribb összetevője a növényi biomasszának. A cellulóz a növényi szárazanyag tömegben kb. 35 - 50% koncentrációban található meg (Lynd és mtsi., 1999). A természetben a cellulóz csak ritkán fordul elő tiszta állapotban, a legtöbb esetben egyéb strukturális biopolimerek (hemicellulóz és lignin) közé ágyazva található (Marchessault és mtsi., 1993). A lineáris cellulóz biopolimerben a glükóz molekulák β -(1→4) glikozidos kötéssel kapcsolódnak egymáshoz.

Az oldhatatlan cellulóz hidrolízisének, és hasznosításának érdekében a mikroorganizmusok szabad, vagy sejthez kötött extracelluláris cellulázokat termelnek. A celluláz enzimszisztéma alkotórészeit a katalitikus működés módja, valamint újabban az enzimek szerkezeti tulajdonságai alapján osztályozzák (Henrissat és mtsi., 1998). Az enzimaktivitások három fő típusa található meg a teljes celluláz enzimszisztémában: (a) az endoglukanázok vagy 1,4- β -D-glükán-4-glükánhidrolázok (EC 3.2.1.4), (b) az exoglukanázok, ezen belül 1,4- β -D-glükán glükánhidrolázok (cellodextrinázok, EC 3.2.1.74) és 1,4- β -D-glükán cellobiohidrolázok (cellobiohidrolázok, EC 3.2.1.91), illetve (c) a β -glükozidázok vagy β -glükozid glükohidrolázok (EC 3.2.1.21). Az endoglukanázok a cellulóz poliszacharid lánc amorf régiójában hasítanak, mellyel változó hosszúságú oligoszacharidokat, és ezzel együtt új láncvégeket hoznak létre. Az exoglukanázok a cellulóz poliszacharid redukáló és nem redukáló végeinek hasításával glükózt (glükánhidrolázok), vagy cellobiózt (cellobiohidrolázok) szabadítanak fel. A β -glükozidázok a cellodextrinek, valamint az endo- és exoglukanáz gátló cellobióz glükózzá történő hasítását végzik (Lynd és mtsi., 2002). A celluláz enzimszisztéma működési mechanizmusát a 3. ábrán szemléltetjük.



3. ábra. A celluláz enzimszisztéma működési mechanizmusa (Karmakar és Ray, 2011).

A gombák cellulóztermelését, valamint celluláz enzimszisztémát többek között a *Phanerochaete chrysosporium* (Szabó és mtsi., 1996; Khan és mtsi., 2007), az *Acremonium cellulolyticus* (Ikeda és mtsi., 2007), a *Penicillium funiculosum* (Castro és mtsi., 2010), a *Penicillium brasilianum* (Jorgensen és mtsi., 2003), az *Aspergillus niger*

(Wang és mtsi., 2004; Sohail és mtsi., 2009), a *Trichoderma viride* (Jiang és mtsi., 2011) és a *T. reesei* (Kubicek és mtsi., 1993; Nidetzky és mtsi., 1994; Juhász és mtsi., 2005) fajoknál vizsgálták részletesen. A gomba celluláz enzimrendszer biokémiai hátteréről és a mikrobiális cellulázok ipari alkalmazásáról ugyancsak számos tanulmány jelent meg (Coughlan, 1990; Wood, 1992; Sukumaran és mtsi., 2005; Singh és mtsi., 2007).

2.5. Azonosított gomba β -glükózidáz gének

A gombák jól ismert β -glükózidáz termelők, az enzimet kódoló géneket számos fonalas és élesztő gombánál azonosították és klónozták. Az expresszió vizsgálatáról azonban csak kevés tanulmány készült el, ami a glikoziláció komplexitásának és a szerkezeti gének magas intron tartalmának tudható be. Gomba β -glükózidázokat *T. reesei* (Barnett és mtsi., 1991; Murray és mtsi., 2004), *A. oryzae* (Takashima és mtsi., 1999), *Saccharomyces cerevisiae* (Dan és mtsi., 2000) és *Pichia pastoris* (Dan és mtsi., 2000) eukarióta expressziós vektorokba, valamint a *Talaromyces emersonii* (Morrison és mtsi., 1990) és a *Ph. chrysosporium* (Li és Renganathan, 1998) β -glükózidázokat *Escherichia coli* baktériumba sikerült klónozni.

A legtöbb klónozott β -glükózidáz extracelluláris elhelyezkedésű, de néhány, mint például az *A. kawachii* rekombináns BGLA a gazda *S. cerevisiae* periplazmatikus terében lokalizálódik (Iwashita és mtsi., 1999). A napjainkban elvégzett gombagenom szekvenálások, valamint az egyes gének azonosítása több, β -glükózidáz enzimet kódoló gén jelenlétét feltételezik. A *T. emersonii* fonalas gomba β -glükózidáz gének vizsgálatakor egy feltételezhetően intracelluláris (*bgl1*), és egy extracelluláris (*aven1*) elhelyezkedésű enzimet kódoló gént fedeztek fel (Collins és mtsi., 2007). A *bgl1* a glikozid hidroláz 1., míg az *aven1* a 3. családba sorolt β -glükózidázok kódoló génjeivel mutatott homológiát. Járomspórás gombáknál a jelen munkában izolált génen kívül ismereteink szerint nem írtak le β -glükózidáz enzimet kódoló géneket.

Az élesztő β -glükózidázokról viszonylag kevesebb ismeret áll rendelkezésünkre, így a kódoló gének közül is csak néhányuk izolálását és klónozását valósították meg. Élesztő β -glükózidáz géneket *S. cerevisiae* vagy *Candida* sp. eukarióta gazdáiban (Skory és Freer, 1995; Skory és mtsi., 1996), illetve a *Candida wickerhamii* és a *P. etchellsii* β -glükózidáz génjeit *E. coli* prokarióta expressziós rendszerekben sikerült kifejezteni (Pandey és Mishra, 1997; Sethi és mtsi., 2002; Roy és mtsi., 2005; Bhatia és mtsi., 2005). Az *E. coli* baktériumban expresszáltatott *Pichia* enzimek általában intracelluláris (*P.*

etchellsii BGLI), vagy periplazmatikus (*P. etchellsii* BGLII) elhelyezkedésűek, illetve újabb vizsgálatok során sejtfalhoz kötött formáit is felfedezték (Roy és mtsi., 2005). A *Saccharomycopsis fibuligera* élesztő *S. cerevisiae* gazdában klónozott BGL1 és BGL2 enzimje az extracelluláris térbe szekretálódik (Machida és mtsi., 1988).

2.6. Tisztított és jellemzett gomba β -glükózidáz enzimek

β -Glükózidáz enzimeket számos fonalas gomba esetén tisztítottak és biokémiailag jellemeztek (Eyzaguirre és mtsi., 2005), melyek közül néhány enzim hőmérséklet és pH optimumát az 1. táblázatban foglaltuk össze. Érdemes megemlíteni, hogy a táblázatban ismertetett enzimek közül a *Fusarium oxysporum* által termelt β -glükózidáz magas transzglükózidáz aktivitással (Christakopoulos és mtsi., 1994a), valamint az *A. oryzae* gomba HGT-BG enzimje magas glükóz toleranciával rendelkezik (Riou és mtsi., 1998). Ugyancsak glükóz toleráns enzimet azonosítottak az *A. niger* CCRC 31494 törzsnél is (Yan és Lin, 1997). A fonalas gombák közül az *Aspergillus* és a *Trichoderma* nemzetségek β -glükózidáz enzimjeit tanulmányozták legrészletesebben. Az 1. táblázatban felsorolt *Aspergillus* fajokon kívül az *A. phoenicis*, *A. carbonarius*, *A. nidulans*, *A. japonicus*, *A. niger* és *A. terreus* fajoknál tisztítottak és jellemeztek β -glükózidázt (Buachidze és mtsi., 1987; Sanyal és mtsi., 1988; Kwon és mtsi., 1992; Watanabe és mtsi., 1992; Jäger és mtsi., 2001).

A termofil és a mezoterm gombák által termelt celluláz enzimek, a hőstabilitás kivételével, molekuláris jellemzőiket tekintve nagyfokú hasonlóságot mutatnak (Maheshwari és mtsi., 2000). A jelen dolgozatban vizsgált *R. miehei* járomspórás gomba izolátumokon kívül a β -glükózidáz enzimeket egyéb termofil gombák esetében is tanulmányozták, melyek közül a *Humicola grisea* var. *thermoidea*, a *Humicola insolens*, a *Humicola lanuginosa*, a *Sporotrichum thermophile*, a *T. emersonii*, valamint a *Thermoascus aurantiacus* β -glükózidázok főbb jellemzői szintén az 1. táblázatban találhatóak. A tisztított és jellemzett β -glükózidázok a 45 - 250 kDa méretű molekulatömegetől, a 9 - 50%-ig terjedő szénhidrát tartalomig nagy változatosságot mutatnak. A β -merkaptóetanol a *H. insolens* által termelt β -glükózidáz aktivitását növeli, továbbá a nátrium-lauril-szulfát (SDS) gátló hatásával szemben is ellenállóvá teszi az enzimet (Rao és Murthy, 1991). A hígított enzim aktivitása 8 M hígysav jelenlétében is megmarad. A *Chaetomium thermophile* var. *coprophile* izolátum által termelt enzimek közül egy sejtfalhoz kötött, és egy extracelluláris β -glükózidázt is izoláltak és jellemeztek

(Lusis és Becker, 1973). A vizsgálatok során a szekretált enzim jelentősen magasabb stabilitását tapasztalták. A molekulatömeg, a pH és hőmérséklet optimum, a hőstabilitás, valamint a transzglykozilációs aktivitás tekintetében eltérő enzimeket azonosítottak a *Sp. thermophile* gombatörzsnél, melyek között intracelluláris és sejtfalhoz kötött formák egyaránt előfordultak (Canevascini és Meyer, 1979; Bhat és Bhat, 1997). A sejtfalkötött enzimek feltételezhetően a sejtfal bioszintézisben, valamint celluláz enzimekkel komplexet alkotva a szolubilis cellulóz hidrolízisében vesznek részt (Gaikwad és Maheshwari, 1994).

1. táblázat. Néhány izolált és jellemzett gomba β -glükózidáz enzim.

Az enzim eredete	Molekula-tömeg (kDa)	pH optimum	Hőmérséklet optimum (°C)	Forrás
<i>Acremonium persicinum</i>	128	5,5	50	Pitson és mtsi., 1997
<i>Aspergillus oryzae</i> HGT-BG	43	5,0	50	Riou és mtsi., 1998
<i>Aspergillus sojae</i>	118	5,0	60	Kimura és mtsi., 1999
<i>Fusarium oxysporum</i>	110	5,0 - 6,0	60	Christakopoulos és mtsi., 1994a
<i>Humicola grisea</i> var. <i>thermoidea</i>	156	4,0 - 4,5	60	Filho, 1996
<i>Humicola insolens</i>	55	6,0 - 6,5	60	Souza és mtsi., 2010
<i>Humicola lanuginosa</i>	110	4,5	60	Anand és Vithayathil, 1989
<i>Penicillium decumbens</i>	120	4,5 - 5,0	65 - 70	Chen és mtsi., 2010
<i>Penicillium pinophilum</i>	120	3,5	32	Joo és mtsi., 2010
<i>Periconia</i> sp.	116	5,5	70	Harnpicharnchai és mtsi., 2009
<i>Scytalidium thermophilum</i>	40	6,5	60	Zanoelo és mtsi., 2004
<i>Sporotrichum thermophile</i>	240	5,4	65	Bhat és Bhat, 1997
<i>Stachybotrys</i> sp.	85	5,0	50	Amouri és Gargouri, 2006
<i>Talaromyces emersonii</i>	135	4,1	70	Coughlan és McHale, 1988
<i>Termitomyces clypeatus</i>	56	5,4	45	Ghorai és mtsi., 2010
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	98	4,2	71	Khandke és mtsi., 1989
<i>Trichoderma koningii</i>	69,1	5,0	50	Lin és mtsi., 2010
<i>Trichoderma reesei</i> β -glükózidáz I	71	4,6	65 - 70	Chen és mtsi., 1992
β -glükózidáz II	114	4,0	60	

Ugyancsak számos β -glükózidázt tisztítottak és tanulmányoztak élesztőgombák esetén is. Egyes β -glükózidázok az íz- és aromaanyagok jelentős részét adó terpén vegyületek szabaddá tételére képesek, így főként a must- és borgyártás során előforduló élesztők, ezen belül is a *S. cerevisiae* által termelt β -glükózidáz enzimeket vizsgálták részletesen (Rosi és mtsi., 1994; Spagna és mtsi., 2002; Hernandez és mtsi., 2003). A különböző terpén vegyületek felszabadítására felhasználható, alacsony pH értéken is aktív

enzimet a *Candida molischiana* élesztőnél írtak le (Vasserot és mtsi., 1991), valamint ezen faj egy izolátumánál az oldott cellodextrinek hidrolízisére képes enzim is azonosítottak (Gonde és mtsi., 1985). Élesztő β -glükózidázokat tisztítottak és jellemeztek továbbá a *Saccharomyces fragilis* és a *Saccharomyces dozhanskii* izolátumoknál, ahol a két enzim a hőstabilitás, valamint bizonyos szintetikus szubsztrátok iránti affinitás kivételével hasonló biokémiai tulajdonságokkal rendelkezett (Fleming és Duerksen, 1967). A *Debaryomyces hansenii* élesztőnél glükóz és etanol jelentésében is magas hidrolitikus aktivitást mutató, intracelluláris β -glükózidáz enzim azonosítottak, mely különböző terpén vegyületek glikozidos kötésből történő felszabadítására képes, így a borgyártás folyamatai során ízfokozó adalékanyagként alkalmazható (Yanai és Sato, 1999).

2.7. A járomspórás gombák β -glükózidáz termelése

A járomspórás gombák számos biotechnológiai és ipari jelentőségű enzim nagy mennyiségben történő termelőiként ismertek, közülük egyes fajokat jó celluláz enzim forrásként azonosítottak (Tomme és mtsi., 1995). A járomspórás gombák celluláz enzimrendszerét illetően ugyanakkor kevés adat áll rendelkezésünkre, jóllehet fermentációs kísérletek során számos Mucorales rendbe tartozó gombatörzsnél jelentős enzimaktivitást sikerült kimutatni (Lotfi és mtsi., 2010).

A *R. pusillus* cellulolitikus aktivitásának vizsgálatakor a hidrolitikus enzimek bontották a natív cellulózt, a karboximetil cellulózt és a cellobiózt (Somkuti és mtsi., 1969), továbbá a *R. miehei* izolátummal végzett szénasszimilációs kísérletekben a cellobióz és egyéb diszacharidok meglehetősen jó szénforrásnak bizonyultak (Vastag és mtsi., 1998). A járomspórás gomba celluláz enzimrendszerek vizsgálata során egy *Rh. oryzae*, egy *M. circinelloides*, valamint egy *R. miehei* törzs által termelt endoglükánáz enzim is azonosítottak és jellemeztek (Murashima és mtsi., 2002; Saha, 2004; Boyce és Walsh, 2007).

Néhány járomspórás gomba β -glükózidáz enzimjét már tisztították és jellemezték, azonban egyéb fonalas gombákhoz viszonyítva ez egy kevésbé feltárt terület. A β -glükózidáz aktivitását többek között *M. racemosus*-ban vizsgálták mélyrehatóbban (Borgia és Sypherd, 1977). Az enzim szolubilis és sejtfalkötött formáját egyaránt sikerült izolálni, ahol mindkét enzim egy kb. 91 kDa tömegű glikoproteinnek azonosították (Borgia és Mehnert, 1982). Az aminosav összetételük és az N-terminálison elhelyezkedő lizinjük azonos, valamint kb. 10% szénhidrátot tartalmaznak. Kitozanáz lítikus enzimmel az

ozmotikusan stabil sejtekből felszabadított β -glükózidáz mennyiségének mérése azt mutatta, hogy a sejt β -glükózidáz tartalmának több, mint 80%-a a plazmamembrán külső részén helyezkedik el.

A *M. circinelloides* LU M40 izolátumnál egy 94,8 kDa molekulatömegű extracelluláris β -glükózidáz (linamaráz) enzimet azonosítottak, melynek hőmérsékleti optimuma 40 °C, pH optimuma pedig 5,5 körül volt (Petruccioli és mtsi., 1999). Egy korábbi kutatásban azonban két különböző extracelluláris β -glükózidáz enzim jelenléte volt kimutatható az azóta már a *Rhizomucor* nemzetségbe sorolt *Mucor miehei* YH-10 gombatorzsnél (Yoshioka és Hayashida, 1980).

A *Rhizopus* nemzetségbe tartozó fajok közül ismereteink szerint mindössze egy karboximetil cellulóz szénforráson tenyésztett *Rh. oryzae* izolátum β -glükózidáz enzimjét tisztították homogenitásig (Takii és mtsi., 2005). Az izolált enzim molekulatömege 105 kDa, hidrolitikus aktivitásának hőmérsékleti optimumát 50 °C, míg pH optimumát 5,0 értékben állapították meg.

A kutatásaink a járomspórás gombák közé tartozó Mucorales renden belüli izolátumok, köztük néhány termofil törzs β -glükózidáz enzimjének vizsgálatára irányultak. A termofil gombák egyik, és talán legfontosabb biotechnológiai jelentősége a biológiai folyamatokban résztvevő különböző enzimek, köztük a cellulázok, termelése. A lignocellulóz biomasszából történő bioetanol előállítási költsége termofil mikroorganizmusok alkalmazásával nagymértékben csökkenthető, ugyanis a keletkezett glükóz és xilóz etanollá fermentálása hatékonyabb, illetve a folyamat végén az etanol könnyen és gyorsan eltávolítható a rendszerből (Kumar és mtsi., 2009).

2.8. A β -glükózidázok gyakorlati alkalmazása

A β -glükózidáz enzimek nagy jelentőséggel bírnak a gyakorlati alkalmazás szempontjából is, mely során az enzim hidrolitikus és szintetikus aktivitása egyaránt kiaknázzható.

A cellulóz glükózzá történő enzimatis hidrolízise biotechnológiai szempontból is nagy jelentőségű (Bhat, 2000; Lynd és mtsi., 2002). A β -glükózidáznak a celluláz enzimrendszer részeként jelentős szerepe van az olcsó, ipari, vagy mezőgazdasági hulladék alapanyagból történő bioetanol előállításban (Prasad és mtsi., 2007; Chen és mtsi., 2007; Hardiman és mtsi., 2010). A β -glükózidáz táplálék-kiegészítőként történő alkalmazása is előnyös lehet, ugyanis egyszerű-gyomrú állatoknál (sertés, baromfi) a celluláz

enzimrendszer egyéb enzimeit kiegészítve segíti a cellulóz lebontását (Leclerc és mtsi., 1987; Zhang és mtsi., 1996). A *T. reesei* gombából származó enzim preparáció (ún. Barlican), amely cellulóz hidrolizáló enzimeket tartalmaz, tökéletesen alkalmazható táplálék-kiegészítőként is (Coenen és mtsi., 1995).

Számos élelmiszer (szőlő, bor, alma, különböző gyümölcslevek) tartalmaz illékony terpén származékokat ugyanúgy, mint nem illékony, szagtalan glükozid prekursorokat, melyekből az értékes aromaanyagok származtathatók. A prekursorban található aglikon rész lehet illékony fenolszármazék (pl. vanillin), nyílt láncú vagy ciklikus alkohol (pl. hexanol, benzilalkohol), valamint terpén (pl. nerol, linalol, gerániol és citronellol) (Gunata és mtsi., 1985). A glikozid kötések β -glükozidáz enzimmel történő hidrolízisekor az aglikon rész leválik, így különböző aromaanyagok szabadulhatnak fel, mely folyamat a természetben vagy nagyon lassan megy végbe, vagy nem szabadul fel a teljes illatanyag rezervoár. Külső forrásból származó β -glükozidáz hozzáadása azonban segítheti az íz- és illatanyagok szabaddá válását, ami a borgyártás folyamatainál lehet előnyös tényező (Cabaroglu és mtsi., 2003; Palmeri és Spagna, 2007). Az aromáért felelős komponens kötött állapotból történő felszabadítására meglehetősen sok kísérletet végeztek el, amelyek eredményeképpen a muskotály bor minőségének javítására egy glükóz toleráns *C. molischiana* β -glükozidáz enzimet alkalmaznak a gyakorlatban (Gueguen és mtsi., 1997). Egyes szicíliai borok antioxidáns hatású *transz*-rezveratrol tartalmát *A. niger* β -glükozidáz enzim hozzáadásával nagymértékben sikerült emelni (Todaro és mtsi., 2008).

A táplálkozás jelentősen hozzájárul az egészségi mutatók változásához, ezért egyre nagyobb szerep jut a növényi eredetű természetes antioxidánsoknak (Ramarathnam és mtsi., 1995). A kedvező hatásokat többek között az antioxidáns tulajdonságokkal rendelkező fenol jellegű vegyületeknek tulajdonítják (Kahkonen és mtsi., 1999), melyek két módon fejthetik ki hatásukat; reakcióba léphetnek közvetlenül a szabad gyökökkel és kioltják azok hatását, vagy együttműködve segítik a szervezet antioxidáns enzimeinek működését (Vattem és mtsi., 2005). Az antioxidáns hatású fenol vegyületek tumor ellenes, gyulladáscsökkentő, vérnyomáscsökkentő és trombózis gátló hatása jól ismert (Hertog és mtsi., 1993; Le Marchand és mtsi., 2000), illetve a gyomor-bélrendszert érintő fertőzések megelőzésében is szerepük lehet azáltal, hogy megakadályozzák a kórokozók megtapadását a bélfalon (Sharon és Ofek, 2002). A szervezet számára a glikolizált polifenolok biológiai elérhetősége alacsony, ugyanis nem képesek átjutni a bélfalon (Duthie és mtsi., 2003). Ahhoz, hogy ezeknek a vegyületeknek a passzív felszívódása megtörténjen a vékonybélben, a glikozidos kötések β -glükozidázok általi felbontására van

szükség, ezáltal a felszabadult aglikon már képes áthatolni a sejthártyán (Scalbert és Williamson, 2000). Az antioxidáns hatású természetes fenolok mennyisége a glikozidos kötések egy részének szervezetbe kerülés előtti bontásával megnövelhető (Vattem és mtsi., 2005). Néhány hagyományos távol-keleti étel előállításában évezredek óta alkalmazzák a szilárd fázisú fermentációt, melynek eredményeként nemcsak az ételek eltarthatósága és íze javul, de az újabb kutatások szerint az antioxidáns hatás is növekszik (Randhir és mtsi., 2004). Ez a fermentációban résztvevő gombák szénhidrát-hidrolizáló enzimeinek, köztük a β -glükozidáznak köszönhető (McCue és Shetty, 2003). A kasszava fermentációjakor hozzáadott β -glükozidáz enzim elősegítheti a mérgező cianogén glükozid vegyületek lebontását is (Essers és mtsi., 1995).

Egyes gyümölcs- és zöldségfeldolgozás után visszamaradt növényi eredetű hulladékok (szár, mag, héj) hasznosításában is fontos szerepet játszik a β -glükozidáz (Correia és mtsi., 2004). Ezekből a glikozidos fenolokban gazdag maradványokból a szervezet számára könnyen felvehető szabad fenolok előállítására alkalmazzák a β -glükozidáz enzimet (Vattem és Shetty, 2002). A folyamat végén magas antioxidáns aktivitással rendelkező szabad fenolok extrahálhatók a fermentumból, amelyek természetes eredetű kiegészítőként más élelmiszerekhez adhatók (Zheng és Shetty, 2000; Vattem és Shetty, 2003). A fermentációt folyadék, illetve szilárd fázisú rendszerben egyaránt hatékonyan lehet alkalmazni.

A β -glükozidázok szintetikus aktivitásának eredményeképpen különböző oligoszacharidok és glikokonjugátumok képződhetnek (Wymer és Toone, 2000). Bizonyos oligoszacharid termékek szintézisét néhány, gombák által termelt β -glükozidáz enzimmel már részletesen tanulmányozták (2. táblázat), azonban járomspórás gombákból származó enzimekkel ilyen vizsgálatokat még nem végeztek. A szintézis kémiai folyamatai nagyon lassan mennek végbe, azonban a szintetikus termékek gyógyszer-, és élelmiszeriparban történő alkalmazása az enzim magas szelektivitásának köszönhetően igen elterjedt (Varki, 1993; Perugino és mtsi., 2004). Termostabil enzimekkel magas hőmérsékleten inkubált reakcióelegyekben a donor szubsztrátokat nagyobb koncentrációban lehet alkalmazni, kicsapódásuk elkerülhető, így a reakció során nagyobb mennyiségű szintetikus termék keletkezhet. A termofil *Caldocellum saccharolyticum* baktérium által termelt, termostabil β -glükozidáz enzimmel például magas hőmérsékleten, nagy laktóz koncentrációnál jelentősen több oligoszacharid szintetikus termék keletkezett, mint a kereskedelmi forgalomban kapható *A. oryzae* β -galaktozidáz enzimmel (Stevenson és mtsi., 1996).

2. táblázat. Oligoszacharidok szintézise gomba β -glükozidáz enzimekkel (Bhatia és mtsi., 2002).

Az enzim eredete	Szubsztrát	A reakció körülményei	Termékek	A reakció típusa	A termék(ek) mennyisége	Forrás
<i>Aspergillus foetidus</i>	Cellobióz (0,1 - 0,2 M)	40 °C, pH 4,5	Glükóz, Genciobióz, Izocelotrióz, >3 egységből álló oligoszacharidok	Transz- glikoziláció	Izocelotrióz (20 - 30 mM), Genciobióz (20 - 30 mM), egyéb (40 - 60 mM)	Gusakov és mtsi., 1984
<i>Aspergillus niger</i>	Cellobióz (15%)	50 °C, pH 5,0; 24 h	Celotrióz, Genciobióz, Glükóz	Transz- glikoziláció	Genciobióz + Celotrióz (30% mol/mol)	Yan és Liau, 1998
<i>Pichia etchellsii</i>	a) Glükóz b) Cellobióz	35 °C, pH 6,0; 12 h	Diszacharidok, >3 egységből álló oligoszacharidok	a) Reverz hidrolízis b) Transz- glikoziláció	főleg >3 egységből álló oligoszacharidok	Pandey és Mishra, 1997
<i>Fusarium oxysporum</i>	Cellobióz (16% v/w) Genciobióz (40% v/w)	45 °C, pH 7,0; 16 h	Glükóz, Celotrióz	Transz- glikoziláció	Kiindulási szubsztrát 15 - 20%-a	Christakopoulos és mtsi., 1994b
<i>Trichoderma pseudokoningii</i> (S38) BGL-I és BGL-II	Cellobióz + Glükóz	38 °C, 48 h	BGL-I → Genciobióz (főleg), Laminaribióz, Szoforóz BGL-II → Trehalóz, Celotrióz	Transz- glikoziláció	BGL-II esetében > BGL-I	Dong és mtsi., 1996

A bioszintetikus reakciókban elterjedtté vált az alkil-glükózidok, mint szerves oldószerek használata, melyek β -glükózidázok általi enzimátikus szintézise egy lépésben megoldható, szemben a bonyolultabb kémiai módszerekkel (Palcic, 1999; Flitsch, 2000). Az új generációs alkil-glükózidok biodegradálható, emulgeálható, illetve antimikrobiális hatással rendelkező, semleges töltésű felületaktív vegyületek (Douglas és Vulfson, 1995; Ismail és mtsi., 1999), ezért számos élelmiszer- és vegyipari folyamat során nagy jelentőséggel rendelkezhetnek (Rantwijk és mtsi., 1999). A biológiai membránban való kitűnő oldhatóságuk következtében a hexil-, heptil-, és oktil-glükózidokat gyógyszerhordozó molekulákként használják (Kiwada és mtsi., 1985, Shinoyama és mtsi., 1991). A butil-glükózidok prekursorokként való gyógyszeripari felhasználása elterjedt, továbbá még folyékony kristály generátorokként is alkalmazzák (Castro és mtsi., 1997). A primer alkoholokat kivéve, a β -glükózidáz-katalizált reakciókban a szekunder, terciár és aril-alkoholok, a monoterpének és a diolok is a glükózil csoport akceptorai. A *Py. furiosus* glükózidáz enzimek által szintetizált organoszilikon alkoholok glükózidjai mezőgazdasági vegyszerekként, illetve gyógyszerekként is felhasználhatóak (Fischer és mtsi., 1996). A monoterpén alkoholok glükózidjainak enzimátikus szintézise az élelmiszeriparban váltott ki érdeklődést (Gunata és mtsi., 1994). Különböző aril-glükózidok és még számos természetes vegyület szintézisét *Sulfolobus solfataricus* termotabil β -glikózidázzal is sikerült elérni (Tricone és Pagnotta, 1995).

A glikózidázok számos anyagcsere betegségben (diabetes), vírus- és baktériumfertőzésben, illetve a rák kialakulásában vehetnek részt, így a különböző β -glükózidáz inhibitorok tanulmányozása egy érdekes területe az alkalmazott kutatásoknak (Borges de Melo és mtsi., 2006). Ezek a potenciális és szelektív glikózidáz inhibitorok óriási szerepet kaphatnak a védekezés tekintetében, továbbá alkalmazhatók az enzimek aktív centrumának feltérképezése során is (El Ashry és mtsi., 2000).

3. CÉLKITŰZÉSEK

A fonalas gombák jó β -glükózidáz termelőként ismertek, számos gomba enzimet izoláltak és elemeztek is, azonban járomspórás gombák β -glükózidáz enzimeinek biokémiai és biotechnológiai szempontból fontos tulajdonságairól, valamint az enzimeket kódoló génekről és a géneket határoló régiókról jelenleg kevés információ áll rendelkezésünkre. Néhány fajból ugyan izoláltak már egy-egy enzimet, de szélesebb spektrumú, a gyakorlati alkalmazás szempontjából lényeges vizsgálatokat nem végeztek.

A kutatási program fontos célkitűzése az alap kutatásokban és egyes biotechnológiai folyamatokban felhasználható, jó extracelluláris β -glükózidáz termelő járomspórás gombák azonosítása, az enzimaktivitás vizsgálata, valamint a magas β -glükózidáz 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 -glükózidáz 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 (pl. etanol vagy glükóz jelenléte, savas környezet, illetve magas hőmérsékleten történő inkubálás) 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 *bgl* gén azonosítása, klónozása, molekuláris és funkcionális jellemzése különböző, magas extracelluláris enzimtermeléssel rendelkező járomspórás gombákban. Az izolált gének kifejeződésének vizsgálata heterológ rendszerben.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Alkalmazott törzsek

A vizsgálatokban összesen 95 járomspórás gombatörzs, közülük 16 *Gilbertella persicaria*, 9 *Rhizomucor miehei*, 17 *Rhizomucor pusillus*, 13 *Rhizopus oryzae*, 11 *Rhizopus stolonifer* var. *stolonifer*, 6 *Rhizopus stolonifer* var. *reflexus*, 3 *Rhizopus stolonifer*, 2 *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*, 1 *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus*, 1 *Rhizopus niveus* és 16 *Mucor* (*M. circinelloides* f. *jansenii*, *M. circinelloides* f. *lusitanicus*, *M. corticolus*, *M. guillermondii*, *M. indicus*, *M. microsporus*, *M. minutus*, *M. nederlandicus*, *M. psychrophilus*, *M. racemosus* f. *chibinensis*, *M. racemosus* f. *sphaerosporus*, *M. strictus*, *M. amphibiorum*, *M. azygosporus*, *M. fragilis*, *M. zonatus*) izolátum extracelluláris β -glükózidáz termelését teszteltük. A törzsek a Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar Mikrobiológiai Tanszékének törzsgyűjteményében álltak rendelkezésünkre (Szeged Microbiological Collection, <http://www.sci.u-szeged.hu/microbiology/>). A felhasznált törzsek részletes adatait, valamint az azonosításukhoz szükséges kódokat az **1. sz. melléklet** tartalmazza. Az izolátumok fenntartása malátás táptalajon történt két havonkénti átoltással, a törzseket 4 °C hőmérsékleten tároltuk.

A β -glükózidáz enzimet kódoló gén azonosításához és klónozásához a *R. miehei* NRRL 5282 izolátumot használtuk. A gén klónozásakor az *Escherichia coli* TOP10F⁻ vagy XL1-Blue jelzésű baktériumtörzseket használtuk.

A transzformációs kísérletekhez az MS12 *M. circinelloides* kettős auxotróf (α -izopropilmalát izomeráz, *leuA*⁻ és orotidin-5'-monofoszfát dekarboxiláz, *pyrG*⁻ mutáns) törzset (Velayos és mtsi., 1997) használtuk.

4.2. Táptalajok és tápoldatok

Malátás táptalaj: 0,5% élesztőkivonat, 0,5% malátaoldat, 1% D-glükóz, 2% agar

Minimál tápoldat/táptalaj (YNB): 0,05% YNB (Yeast Nitrogen Base), 0,15% (NH₄)₂SO₄, 0,15% Nátrium-L-glutaminát, 1% D-glükóz, táptalaj előállításához 1,5% agar

Cellobiózos minimál tápoldat: 0,05% YNB, 0,15% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,15% Nátrium-L-glutaminát, 1% cellobióz (Sigma)

Szilárd fázisú tápközeg: 5 g búzakorpa (kereskedelmi forgalomban kapható), 5 ml desztillált víz

Fermentációs táptalaj: 130 g búzakorpa (kereskedelmi forgalomban kapható), 130 ml desztillált víz

LB-táptalaj (1000 ml, pH 7,0): 1% NaCl, 1% tripton, 0,5% élesztőkivonat, 1,5% agar

LB-tápoldat: 1% NaCl, 1% tripton, 0,5% élesztőkivonat

Élesztőkivonat-glükóz tápoldat/táptalaj (YEG): 1% D-glükóz, 0,5% élesztőkivonat, 1% KH_2PO_4 , táptalaj előállításához 1,5% agar

Élesztőkivonat-pepton-glükóz tápoldat (YPG): 1% D-glükóz, 1% pepton, 0,5% élesztőkivonat

4.3. Felhasznált oldatok, pufferek és reagensek

Az enzimek tisztításánál és jellemzésénél alkalmazott oldatok

Acetát puffer (0,1 M, pH 5,0): 0,1 M nátrium-acetát, 96%-os ecetsav a megfelelő pH eléréséig.

Acetát puffer (50 mM, pH 5,0): 50 mM nátrium-acetát, 96%-os ecetsav a megfelelő pH eléréséig. Az oldatot 0,22 μm pórusméretű szűrőn (Millipore) átszűrt vízzel készítettük.

Eluáló puffer (pH 5,0): 50 mM nátrium-acetát, 96%-os ecetsav a megfelelő pH eléréséig.

McIlvaine-féle pufferoldat (McIlvaine, 1921): 0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,1 M citromsav $\times \text{H}_2\text{O}$.

Dinitro-szalicilsav reagens: 1% dinitro-szalicilsav, 1% NaOH, 0,2% fenol, 0,05% Na_2SO_3

Poliakrilamid gél előhívására használt oldatok

Coomassie festőoldat: 0,0025% Coomassie Brilliant Blue R-250, 40% metanol, 7% ecetsav (96%-os koncentrációjú).

1. előhívó oldat: 40% metanol, 7% ecetsav (96%-os koncentrációjú).
2. előhívó oldat: 5% metanol, 3,5% ecetsav (96%-os koncentrációjú).

Kompetens *E. coli* sejtek készítéséhez és transzformációjához felhasznált oldatok

CaCl₂ oldat: 0,1 M CaCl₂.

Glicerín oldat: 70% glicerín desztillált vízben oldva.

TCM puffer: 10 mM trisz-(hidroxi-metil)-amino-metán (Tris; pH 7,5), 10 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂.

X-Gal (Fermentas): 20 mg ml⁻¹ dimetilformamidban oldva.

IPTG (Fermentas): 20 mg ml⁻¹ steril desztillált vízben oldva.

Ampicillin (Sigma): 50 mg ml⁻¹ törzsoldat steril desztillált vízben oldva.

E. coli sejtekből történő plazmid DNS tisztításához használt oldatok

Oldat 1: 5 mM glükóz, 25 mM Tris (pH 8,0), 10 mM etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA).

Oldat 2: 0,2 M NaOH, 1% SDS.

Nátrium-acetát puffer: 3 M nátrium-acetát törzsoldat, 75% jégcetben és 25% desztillált vízben oldva (pH 4,5).

Mini Plus vagy Midi Plus (Viogene) plazmid izoláló készletek.

A genomi DNS izolálásához használt anyagok

Lízis puffer: 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 20 mM EDTA, 1% N-lauril-szarkozin.

RNáz (Sigma): 10 mg ml⁻¹ törzsoldat 10 mM Tris-HCl és 15 mM NaCl oldatban oldva.

PCI: fenol - kloroform - izoamilalkohol 25:24:1 arányú keveréke.

CI: kloroform - izoamilalkohol 24:1 arányú keveréke.

CsCl gradiens centrifugáláshoz: 47,75% CsCl, 1,5%-os bisz-benzimid (10 mg ml⁻¹).

DNS gélelektroforézishez használt anyagok

TAE puffer: 40 mM Tris-ecetsav (pH 7,6), 1 mM Na₂EDTA.

Etídium-bromid törzsoldat (Sigma): 10 mg ml⁻¹ desztillált vízben oldva.

Mintapuffer (pH 8,0): 40% szacharóz, 0,25 M brómfenolkék, 0,2 M EDTA.

Protoplasztikus és transzformációhoz felhasznált oldatok

Protoplasztáló oldat: 10 mM nátrium-foszfát puffer, 0,8 M szorbitol, 1,5% csigaenzim.

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

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

PMC puffer: 40% polietilén-glikol 4000 (PEG 4000), 10 mM MOPS, 0,6 M szorbitol, 50 mM CaCl₂.

DNS blottoláshoz használt oldatok

SDS oldat: 10% SDS.

Depurináló oldat: 0,25 M HCl.

Denaturáló oldat: 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl.

Neutralizáló oldat (pH 8,0): 0,5 M Tris, 1,5 M NaCl.

20x SSC (pH 7,0): 3 M NaCl, 0,3 M nátrium-citrát.

Hibridizáláshoz használt oldatok és reagensek

Hibridizációs puffer: 5x SSC, 0,1% Na-lauril-szarkozin, 0,02% SDS, 1% blokkoló reagens (Roche).

1. detektáló puffer (pH 7,5): 0,1 M maleinsav, 0,15 M NaCl.

2. detektáló puffer: 1,4 % blokkoló reagens (Roche) 1. detektálási pufferben.

3. detektáló puffer (pH 9,5): 0,1 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, 50 mM MgCl₂.

4.4. Tenyésztési körülmények a β -glükozidáz termelés teszteléséhez

A kiemelkedő β -glükozidáz termelést mutató izolátumok azonosításához folyadék és szilárd fázisú fermentációs tenyésztési körülményeket alkalmaztunk.

A folyadék fázisban végzett enzimaktivitás vizsgálatoknál a 15 ml cellobiózos minimál tápoldatot tartalmazó Erlenmeyer lombikokat 10⁶ mennyiségű spórával oltottuk be, majd az egyes izolátumoknak megfelelő növekedési hőmérsékleten (18 °C, 25 °C vagy 37 °C), folyamatos rázatás mellett (200 rpm), 6 napig inkubáltuk a tenyészeteket. A folyadék tenyészetek fermentlevéből naponta 500 μ l mennyiségű mintát vettünk, melyet ezután 30 percig 16200g-n centrifugáltunk, majd a felülúszót -20 °C-on az enzimaktivitás mérésekig tároltuk.

A szilárd fázisú fermentációs teszteknel desztillált vízzel nedvesített búzakorpát használtunk tápközegként, melyet minden törzs esetében 10⁶ mennyiségű spórával oltottunk be. Az egyes tenyészeteket az izolátumoknak megfelelő növekedési hőmérsékleten (25 °C vagy 37 °C) inkubáltuk 6 napig. A szilárd fázisú fermentáció alatt

naponta egy-egy tenyészetben vizes kivonást végeztünk. Az egyes lombikokba 30 ml steril desztillált vizet mértünk, melyet ezután 4 °C hőmérsékleten, 3 órán át állni hagytunk. A kivonat szűrése után a szűrletből 1 ml mennyiséget 16200g-n 10 percig centrifugáltunk, majd az így kapott nyers enzim kivonatot -20 °C-on az enzimaktivitás mérésekig tároltuk. A méréseket minden esetben hígított kivonatokban végeztük el, annak érdekében, hogy az esetlegesen jelen levő szennyező anyagok ne zavarják a reakció eredményének megjelenítését.

4.5. A β -glükózidáz enzimek vizsgálatához alkalmazott módszerek

4.5.1. A β -glükózidáz aktivitásának meghatározása

Az enzim hidrolitikus aktivitásának meghatározása

A β -glükózidáz enzim hidrolitikus aktivitását *para*-nitrofenil- β -D-glükopiranozid (*p*NPG, Sigma) kromogén szubsztrát felhasználásával állapítottuk meg. A mintákból 180 μ l mennyiséget mikrotiter lemezre vittünk fel, majd ehhez 20 μ l 7 mM koncentrációjú *p*NPG-t adtunk. Az elegyet 50 °C-on, 30 percig inkubáltuk, majd a reakciót 50 μ l 0,1 M-os nátrium-karbonáttal állítottuk le. A felszabadult *p*-nitrofenolt ASYS Jupiter HD (ASYS Hitech) mikrotiter lemez leolvasó segítségével 405 nm hullámhosszon mértük. Egy U az az enzim mennyiség, amely percenként 1 μ mol *p*-nitrofenolt szabadít fel adott reakció körülmények között.

Az enzim szintetikus aktivitásának meghatározása

A szintetikus aktivitás eredményeként keletkező oligoszacharidok és glikokonjugátumok detektálását és mennyiségi meghatározását izokratikus HPLC (nagyfelbontású folyadék kromatográfia) technika segítségével végeztük. A méréseket egy moduláris HPLC berendezésen (Shimadzu) vittük véghez, mely a következő műszer összeállítást tartalmazta: SCL-10AVP vezérlő, LC20-AD pumpa, DGU-14A gáztalanító, SIL-10ADVP mintaadagoló, CTO-10ASVP oszlop termosztát, RID-10A detektor. Az oszlopra (YMC-Pack Polyamine II; 250 x 4,6 mm, S-5 μ m, 12 nm; YMC) minden esetben 10 μ l mennyiségű mintát vittünk fel, majd az eluálást 35 °C hőmérsékletűre beállított oszlop termosztát mellett, 1 ml perc⁻¹ áramlási sebességgel végeztük. A vizsgálatok során „A” eluensként acetonitrilt, míg „B” eluensként 0,22 μ m pórusméretű szűrőn átszűrt desztillált vizet használtunk, melyeket a gyártó (YMC) utasításának megfelelően 60:40

(A:B) arányban alkalmaztunk. A különböző reakcióelegyekben keletkezett termékek detektálása refraktív index detektorral történt.

A kalibrációhoz ismert koncentrációjú sztenderd vegyületekből (glükóz, cellobióz, cellotrióz, cellotetraóz és laktóz; Sigma) nyolc lépcsőben, felező léptékű hígítási sort készítettünk (50 mg ml⁻¹-től 195 µg ml⁻¹-ig), majd a mérést követően a kalibráció kiértékelését, és a kalibrációs egyenes szerkesztését a HPLC berendezés szoftverének segítségével végeztük.

4.5.2. Az enzimek vizsgálata nyers kivonatban

A kísérletekben a tesztek során jó β-glükozidáz termelőnek bizonyuló izolátumok esetén, szilárd fázisú fermentálás utáni nyers kivonatokban vizsgáltuk az enzimet. A reakcióelegyeket 30 percig inkubáltuk 50 °C-on. Az inkubációs idő letelte után a reakciót 2 ml Na-karbonáttal állítottuk le, majd a felszabadult *p*-nitrofenol intenzitását 405 nm hullámhosszon mértük (DU-65 Spektrofotométer, Beckman).

Az etanol és glükóz hatásának vizsgálata

A reakcióelegyek összetétele:

Etanol: 0,1 U ml⁻¹ enzim, 0,7 mM *p*NPG, 0,1 M acetát puffer (pH 5,0), 5, 10, 15, 20, 25, 30% etanol;

Glükóz: 0,1 U ml⁻¹ enzim, 0,7 mM *p*NPG, 0,1 M acetát puffer (pH 5,0), 1% glükóz;

Glükóz és etanol gátlás: 0,1 U ml⁻¹ enzim, 0,7 mM *p*NPG, 0,1 M acetát puffer (pH 5,0), 1% glükóz, 10% etanol.

Savtolerancia vizsgálatok

A reakcióelegy összetétele: 0,1 U ml⁻¹ enzim, 0,7 mM *p*NPG, 0,1 M acetát puffer (pH 4,0 vagy pH 6,0).

Hőmérséklet tolerancia vizsgálatok

Az enzimeket 60 °C, vagy 75 °C hőmérsékleteken kezeltük 5 percig, majd jeges vízfürdőben szobahőmérsékletűre hűtöttük. Ezután a következő reakcióelegyet állítottuk össze: 0,1 U ml⁻¹ kezelt enzim, 0,7 mM *p*NPG, 0,1 M acetát puffer (pH 5,0). Kontrollként a nem hőkezelt nyers extraktumot használtuk.

Cellobióz védő hatás vizsgálatok

A nyers enzimek kivonatokhoz 10% koncentrációban cellobiózt adtunk, majd az elegyet 60 °C vagy 75 °C hőmérsékleteken inkubáltuk 5 percig, végül jeges vízfürdőben szobahőmérsékletűre hűtöttük. Ezután a következő reakcióelegyet állítottuk össze: 0,1 U ml⁻¹ kezelt enzim, 0,7 mM *p*NPG, 0,1 M acetát puffer (pH 5,0).

4.5.3. A β-glükozidázok tisztításának folyamata

A β-glükozidáz nagy mennyiségben történő tisztításához 3 literes, fermentációs táptalajt tartalmazó Erlenmeyer lombikokban szilárd fázisú fermentációt végeztünk, melyben az egyes lombikokat 3 ml 10⁶ ml⁻¹ koncentrációjú spóraszuszpenzióval oltottuk be. A tenyészeteket az izolátumoknak megfelelő növekedési hőmérsékleten (25 °C vagy 37 °C) 6 napon keresztül inkubáltuk; a rendszerbe minden második napon 60 ml steril desztillált vizet juttattunk.

Az inkubációs idő letelte után 800 ml 0,1 M-os acetát puffert (pH 5,0) adtunk a tenyészetekhez, majd 12 órán át tartó, 4 °C-on történő inkubálás után 0,5 mm pórusátmérőjű szűrőn durvaszűrést végeztünk. Ezután a szűrletet két egymást követő lépésben centrifugáltuk (5040g, 15 perc; SORVALL-RC-5B, GSA rotor). A kapott felülúszót, azaz a nyers kivonatot használtuk tovább. A nyers kivonatban ammónium-szulfáttal történő frakcionált kisózást végeztünk, végig jeges vízfürdőben tartva az oldatot, melyet a teljes feloldás után 4 °C-on, 12 órán át állni hagytunk. Az oldat centrifugálása (5040g, 15 perc; SORVALL-RC-5B, GSA rotor) után a keletkezett csapadékot a lehető legkisebb térfogatú acetát pufferben (0,1 M, pH 5,0) vettük fel. A 75 és 85% telítettség között kapott frakció csapadéka mutatta a legmagasabb *p*NPG hidrolízist, így ezzel a koncentrált enzimek kivonattal dolgoztunk tovább. A kisozási lépések utáni tömény enzimek kivonatot további tisztítását Sephadex G-100 töltetű oszlopon (Sigma; 4 - 150 kDa; 27 x 400 mm) végeztük. Az oszlopot előzetesen 50 mM-os acetát pufferrel (pH 6,0) mostuk, majd ugyanezzel a pufferrel 0,5 ml perc⁻¹ áramlási sebesség mellett eluáltunk. A legmagasabb enzimaktivitást mutató frakciókat egyesítettük, majd Macro-Prep HQ anioncserélő oszlopra (BioRad; 12,6 x 40 mm) vittük fel, melyet előzőleg 50 mM-os acetát pufferrel (pH 6,0) mostunk. Az enzimet 1 ml perc⁻¹ átfolyási sebességgel, 0 - 1 M NaCl lineáris gradiensben történő változtatásával eluáltuk. A β-glükozidáz izolálás végső lépését Sephacryl S-200HR oszlopon (GE Healthcare; 5 - 250 kDa; 16 x 60 mm) végeztük. Az

oszlopot előbb eluáló pufferrel (pH 5,0) mostuk, majd ugyanezzel a pufferrel 0,5 ml perc⁻¹ áramlási sebesség mellett eluáltunk.

A tisztítási folyamat minden lépése után, *p*NPG kromogén szubsztrát alkalmazásával, a 4.5.1. fejezetben leírt módon mértük az egyes frakciókban a β -glükózidáz hidrolitikus aktivitását. A tisztítási lépések utáni fehérjekoncentráció meghatározását Qubit Fluorometer (Invitrogen) és Quant-iT Protein Assay Kit (Invitrogen) segítségével végeztük a gyártó utasításainak megfelelően. A műszer kalibrálását 0 ng μ l⁻¹, 200 ng μ l⁻¹ és 400 ng μ l⁻¹ koncentrációjú fehérje standard oldatok felhasználásával végeztük.

Az izolált fehérje tisztaságát és molekulatömegét denaturáló poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) alkalmazásával vizsgáltuk. Az elválasztást vertikális futtató kádban (XCell SureLock Mini-Cell, Novex) elhelyezett NuPage Bis-Tris gélen (Invitrogen), NuPage 2-N-morfolin-etánszulfonsav (MES) SDS futtató puffer (Invitrogen) felhasználásával, a gyártó utasításainak megfelelően végeztük. Az elektroforézis után a gél egy éjszakán át 0,0025% koncentrációjú Coomassie Brilliant Blue R-250 festőoldatban lassan rázatva festettük. Ezt követően az 1. előhívó oldatban egy órán, majd a 2. előhívó oldatban négy órán keresztül lassú keverés mellett mostuk. A háttér kitisztulása után a gél UVP BioDoc-IT rendszer segítségével fotóztuk.

A tisztított fehérje azonosítása érdekében a tripszinnel történő emésztést követően kapott peptideket (Hellman és mtsi., 1995) HPLC-ESI ioncsapda tömegspektrométer alkalmazásával vizsgáltuk. A folyadékkromatográfia - tömegspektrometria (LC-MS) analízist az MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpontjában működő Proteomikai Kutatócsoport segítségével végeztük.

4.5.4. Reakcióelegyek a hidrolitikus aktivitás jellemzéséhez

Az inkubálási idő letelte után, *p*-nitrofenol szubsztrát alkalmazása esetén a reakciót 2 ml Na-karbonáttal állítottuk le, majd a felszabadult *p*-nitrofenol intenzitását 405 nm hullámhosszon mértük (DU-65 Spektrofotométer, Beckman). A kísérleteket három párhuzamos, független méréssel végeztük.

A hőmérséklet optimum és stabilitás vizsgálata

A hőmérséklet optimum vizsgálatához alkalmazott reakcióelegy: 0,1 U ml⁻¹ enzim, 0,7 mM *p*NPG, 0,1 M acetát puffer (pH 5,0). Az elegyeket 20, 30, 40, 50, 60, 70 és 80 °C

hőmérsékleten inkubáltuk 30 percig. A hőstabilitás vizsgálatához alkalmazott reakcióelegy: 0,1 U ml⁻¹ enzim, 0,1 M acetát puffer (pH 5,0). A 20, 30, 40, 50, 60, 70 és 80 °C hőmérsékleten, 4 órán át történő inkubálást követően 0,7 mM *p*NPG szubsztrátot adtunk az elegyekhez, majd 50 °C-on inkubáltunk tovább 30 percig.

A pH optimum és stabilitás vizsgálata

A pH optimum vizsgálatához alkalmazott reakcióelegy: 0,1 U ml⁻¹ enzim, 0,7 mM *p*NPG, 50 mM McIlvaine-féle pufferoldat (pH 2,2 - 8,0; McIlvaine, 1921). Az elegyeket 30 percig inkubáltuk 50 °C-on. A pH stabilitás vizsgálatához alkalmazott reakcióelegy: 0,1 U ml⁻¹ enzim, 50 mM McIlvaine-féle pufferoldat (pH 2,2 - 8,0). A reakcióelegyeket 24 órán át 4 °C-on tartottuk, majd 0,7 mM *p*NPG szubsztrát hozzáadását követően 30 percig inkubáltunk 50 °C-on.

Alkoholok enzimaktivitásra gyakorolt hatásának vizsgálata

A reakcióelegyek összetétele: 0,1 U ml⁻¹ enzim, 0,7 mM *p*NPG, 0,1 M acetát puffer (pH 5,0), 5, 10, 15, 20, 25% (v/v%) etanol, vagy metanol, vagy izopropanol. A reakcióelegyeket 30 percig inkubáltuk 50 °C-on.

Különböző mono- és diszacharidok hatásának vizsgálata

A reakcióelegyek összetétele: 0,1 U ml⁻¹ enzim, 0,7 mM *p*NPG, 0,1 M acetát puffer (pH 5,0), 10, 20, 30, 40, 50 mM glükóz, vagy 5, 10, 15, 20% (m/v%) laktóz, arabinóz, fruktóz, galaktóz, szacharóz, xilóz. A reakcióelegyeket 30 percig inkubáltuk 50 °C-on.

Lehetséges gátlószerek vizsgálata

A reakcióelegyek összetétele: 0,1 U ml⁻¹ enzim, 0,7 mM *p*NPG, 0,1 M acetát puffer (pH 5,0), 5 mM HgCl₂, CuSO₄, ZnCl₂, MnCl₂, CaCl₂, MgSO₄, NaCl, KCl, CoCl₂, vagy 10 mM NBS, dimetil-szulfoxid (DMSO), EDTA, SDS, vagy 10 - 100 mM glükonsav- δ -lakton. A reakcióelegyeket 30 percig inkubáltuk 50 °C-on.

Szubsztrát specifitás vizsgálatok

A különböző szacharidok hidrolízisének vizsgálatokor a cellobióz, szacharóz, szalicin, trehalóz, amigdalín, cellulóz, pusztulán, laminarin, szoforóz, laktóz, maltóz, β -D-glükán és pachyman szubsztátokat teszteltük a következő reakcióelegyben: 0,1 U ml⁻¹ enzim, 0,1 M acetát puffer (pH 5,0), 0,2% (m/v%) szacharid szubsztrát. A

reakcióelegyet 30 percig inkubáltuk 50 °C-on. Az inkubálást követően a nem redukáló szacharidokat tartalmazó reakcióelegyekhez 1:1 arányban dinitro-szalicilsav reagenst adtunk, majd 15 perc forralás után ASYS Jupiter HD (ASYS Hitech) mikrotiter lemez leolvasó segítségével 570 nm hullámhosszon mértünk. Az eredmények megfelelő kiértékeléséhez elkészítettük a glükóz kalibrációs egyenesét, melynek egyenlete: $y = 1,1556x - 0,0112$. A kalibrációs pontok illeszkedésének pontossága 99,98%. A redukáló diszacharidokból felszabaduló glükózt glükóz oxidáz/peroxidáz reagens (Sigma) felhasználásával határoztuk meg a gyártó utasításainak megfelelően.

Az aril-glikozid szubsztrátok hidrolízisének vizsgálatakor a *p*-nitrofenil-N-acetil- β -D-glükózaminid, *p*-nitrofenil- α -D-maltohexaozid, *p*-nitrofenil- β -D-cellobiozid, *p*-nitrofenil- α -D-galaktopiranozid, *p*-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid, *p*-nitrofenil- α -D-mannopiranozid, *o*-nitrofenil- β -D-glükopiranozid, *p*-nitrofenil- β -D-xilopiranozid és *p*-nitrofenil- α -D-glükopiranozid (Sigma) szubsztátokat teszteltük a következő reakcióelegyben: 0,1 U ml⁻¹ enzim, 0,1 M acetát puffer (pH 5,0), 0,7 mM aril-glikozid szubsztrát. A reakcióelegyet 30 percig inkubáltuk 50 °C-on, majd a felszabadult *p*-nitrofenolt ASYS Jupiter HD (ASYS Hitech) mikrotiter lemez leolvasó segítségével 405 nm hullámhosszon mértük. Az eredmények kiértékelésekor a *p*NPG bontása során kapott optikai denzitás értékeket alkalmaztuk kontrollként.

Enzimkinetikai vizsgálatok

A telítési görbe felvételéhez a következő reakcióelegyet állítottuk össze: 0,1 U ml⁻¹ enzim, 0,1 - 2 mM *p*NPG, 0,1 M acetát puffer (pH 5,0). A reakcióelegyet 30 percig inkubáltuk 50 °C-on. A telítési görbe logaritmikus szakaszának Lineweaver-Burk-féle linearizálása után határoztuk meg a Michaelis-Menten állandó (K_m) és a V_{max} értékeket (Lineweaver és Burk, 1934).

4.5.5. Reakcióelegyek a szintetikus aktivitás jellemzéséhez

Az inkubálást követően a reakciót minden esetben 5 perc 100 °C-on történő forralással állítottuk le, majd a mintákat a mérésekig szobahőmérsékleten tároltuk. A kísérleteket jelen esetben is három párhuzamos, független méréssel végeztük. Az inkubációs hőmérséklet vizsgálatán kívül a reakcióelegyet 50 °C-on, 24 órán át inkubáltuk.

Inkubációs hőmérséklet és idő

A reakcióelegyek összetétele: 1 U ml⁻¹ enzim, 50 mM acetát puffer (pH 5,0), 35% (m/v%) cellobióz. A reakcióelegyeket 30, 40, 50, 60 és 70 °C hőmérsékleteken 12, 24 és 72 óráig, illetve 50 °C-on 1 hétig inkubáltuk.

A cellobióz szubsztrát koncentráció változtatása

A reakcióelegyek összetétele: 1 U ml⁻¹ enzim, 50 mM acetát puffer (pH 5,0), 0 - 40% (m/v%) cellobióz (5 egységenként változtatva).

A szintézis vizsgálata különböző pH tartományokon

A reakcióelegyek összetétele: 1 U ml⁻¹ enzim, 50 mM McIlvaine-féle pufferoldat (pH 3,0 - 8,0), 35% (m/v%) cellobióz.

A szintézis vizsgálata etanol jelenlétében

A reakcióelegyek összetétele: 1 U ml⁻¹ enzim, 50 mM acetát puffer (pH 5,0), 30% (v/v%) etanol és 10% (m/v%) cellobióz, vagy 10% (m/v%) glükóz, vagy 90 mM pNPG.

Laktóz szubsztrát alkalmazása

A reakcióelegyek összetétele: 1 U ml⁻¹ enzim, 50 mM acetát puffer (pH 5,0), 0 - 40% (m/v%) laktóz (5 egységenként változtatva).

Transzgalaktozidáz aktivitás vizsgálata

A reakcióelegyek összetétele: 1 U ml⁻¹ enzim, 50 mM acetát puffer (pH 5,0), 90 mM *p*-nitrofenil-β-D-galaktopiranozid és 10% (m/v%) szacharóz, vagy 30% (v/v%) etanol.

4.5.6. Antioxidáns aktivitású fenolok felszabadítása glikozidokból

A fenolos vegyületek glikozidos kötésből történő felszabadításának vizsgálatához 5 g fagyasztva szárított gyümölcstörkölyből 60 ml desztillált vízzel kivonatot készítettünk, melyből 5 ml térfogatot 1 U mennyiségű tisztított *R. miehei* R8 β-glükozidázzal kezeltünk 50 °C hőmérsékleten. A reakcióelegyből az inkubációs idő első, második és ötödik órájában 1 - 1 ml térfogatú mintát vettünk.

A fenolos vegyületek detektálásához és mennyiségi meghatározásához a Tüzen és Özdemir (2003) által alkalmazott lineáris gradiens HPLC módszer módosított változatát

használtuk. A méréseket egy moduláris HPLC berendezésen (Shimadzu) vittük véghez, mely a következő műszer összeállítást tartalmazta: SCL-10AVP vezérlő, LC20-AD pumpa, DGU-14A gáztalanító, SIL-10ADVP mintaadagoló, CTO-10ASVP oszlop termosztát, SPD-10AVP UV-VIS detektor. Az oszlopra (Prodigy ODS 3 C18; 100 Å, 5 µ, 250 x 4,6 mm; Phenomenex) minden esetben 10 µl mennyiségű mintát vittünk fel, majd az eluálást 25 °C hőmérsékletűre beállított oszlop termosztát mellett, 1 ml perc⁻¹ áramlási sebességgel végeztük. Az elúció során az „A” (ecetsav:desztillált víz, 2:98) és a „B” (ecetsav:acetonitril:desztillált víz, 2:30:68) oldatok keverékét alkalmaztuk mozgó fázisként. A HPLC analízis teljes futási ideje 40 perc volt, melyben az „A” oldat arányát 90%-ról 0%-ra, míg a „B” oldat arányát 10%-ról 100%-ra változtattuk 30 perc alatt, majd a maradék 10 percben a „B” oldatot 100%-ban alkalmaztuk. A reakcióelegyben található fenolos vegyületek detektálását 220 nm hullámhosszon végeztük.

A kalibrációhoz ismert koncentrációjú sztenderd vegyületekből (galluszsav, 4-hidroxi-benzoésav, vanillinsav, sziringsav, *p*-kumársav, fahéjsav és kvercetin; Sigma) nyolc lépcsőben, felező léptékű hígítási sort készítettünk (10 mg ml⁻¹-től 39 µg ml⁻¹-ig), majd a mérést követően a kalibráció kiértékelését, és a kalibrációs egyenes szerkesztését a HPLC berendezés szoftverének segítségével végeztük.

4.6. A β-glükozidáz gén vizsgálatához alkalmazott módszerek

4.6.1. Genomi DNS izolálás

A genomi DNS tisztításához a YEG tápoldatban 5 napig rázatott tenyészetből a micéliumot leszűrtük és folyékony nitrogén jelenlétében dörzsmozsárban elporítottuk. A feltárás után, a micélium minden grammjához 2,5 ml lízis puffert adtunk. Ezt követően az elegyet üvegbottal óvatosan addig kevertük, amíg homogén nem lett, majd RNáz hozzáadása után 20 percig 65 °C-on, időnként óvatosan megkeverve inkubáltuk. Ezután hagytuk kihűlni szobahőmérsékletűre, majd centrifugáltuk (10 perc, 8000g, 4 °C, SORVALL-RC-5B, GSA rotor), hogy a sejttörmelékeltávolítsuk. A felülúszóhoz azonos mennyiségű PCI-t adtunk, majd 4 °C-on, enyhe kevertetés (45 rpm) mellett 2 - 3 órán keresztül, a fázisok elkeveredéséig kevertettük. Centrifugálás után (8000g, 15 perc, 4 °C, SORVALL-RC-5B, GSA rotor) a vizes fázist azonos mennyiségű CI-vel mostuk. Újabb centrifugálást (8000g, 15 perc, 4 °C, SORVALL-RC-5B, GSA rotor) követően a vizes fázishoz 2,5 térfogat mennyiségű izopropanolt adva DNS-t kicsaptuk. Centrifugálás

(13000g, 20 perc, 4 °C, SORVALL-RC-5B, GSA rotor) után a mintát beszárítottuk, majd desztillált vízben visszaoldottuk. A vizes fázist esetenként CsCl gradiens centrifugálással (177326g, 40 óra 20 °C, 70.1 Ti rotor/ Beckhman C8-70M) tovább tisztítottuk (Iturriaga és mtsi., 1992).

4.6.2. A kísérletek során alkalmazott indítószekvenciák

A *R. miehei bgl* gén izolálásához és klónozásához felhasznált indítószekvenciákat a 3. táblázatban tüntettük fel.

A hibridizációs kísérletekhez a BGL1 és BGL2 indítószekvenciák, valamint a „PCR DIG Probe Synthesis Kit” (Roche) alkalmazásával készítettük a génpróbát.

3. táblázat. A *R. miehei bgl* gén izolálásához és klónozásához alkalmazott indítószekvenciák. Az aláhúzott szakaszok a restrikciós hasítóhelyeket jelölik.

Indítószekvencia	Szekvencia (5' - 3')	Felhasználás	
BGL1	GGCTCGAGGGYYTNGAYATG	<i>R. miehei bgl</i> gén szakasz felszaporítása	
BGL2	GGCTGCAGACNARRTANGGRAA		
BGL3	GGCTCAGGCACTGTTCGAC	inverz-PCR	
BGL4	GCCTTCGTCTTGTCCCAACTTGTA		
BGL5	GACGTCCTCTTTGGTGATGTCAAC		
BGL6	AGCTGGTTGTAGCTACACATAATG		
BGL7	GTCTTTCCTACACCACCTTTGAGT		
BGL8	GTTACCAATGTAGTGTGTTGGCAGT		
BGL9	AGTACACTTTGCATATTGGTGCTA		
BGL10	CGGCTACGCCTTGCATAGCTGAC		
BGL17	CTCGCGGCCGCTTAGTAAAGATAGCTACGGCGCT		<i>R. miehei bgl</i> gén felszaporítása
BGL19	GGATCGATATGTTTGCAAAGACTGCGTTG		

4.6.3. Alkalmazott PCR technikák és reakciókörülmények

A *bgl* gén izolálásához alkalmazott PCR (polimeráz láncreakció) technikákat T3 Thermocycler (Biometra), valamint MJ Mini (Bio-Rad) készülékeken végeztük.

A *R. miehei bgl* gén szakasz felszaporítása

A reakcióelegyet 25 µl végtérfogatban állítottuk össze a következők szerint: 50 ng genomi DNS, 0,2 mM dNTP mix (Fermentas), 1x *Dupla-Taq* puffer (Zenon), 2,5 mM MgCl₂ (Zenon), 0,2 µM - 0,2 µM primer (BGL1-BGL2; 3. táblázat), 2 U *Dupla-Taq* DNS polimeráz (Zenon).

Az alkalmazott reakciókörülmények:

94 °C	2 perc	}	1 ciklus	kezdeti denaturáció
94 °C	30 másodperc		}	5 ciklus
40 °C	1 perc	primer kötődés		
72 °C	2 perc	láncszintézis		
94 °C	30 másodperc	denaturáció		
51 °C	1 perc	}	25 ciklus	primer kötődés
72 °C	2 perc			láncszintézis
72 °C	10 perc			1 ciklus

A teljes *R. miehei bgl* gén felszaporítása

A teljes *R. miehei bgl* gén, valamint a gént határoló régiók meghatározásához inverz-PCR (IPCR) technikát alkalmaztunk (Ochman és mtsi., 1988). A tisztított genomi DNS-ből 10 - 10 µg mennyiségeket, egyenként 120 µl össztérfogatban, *XbaI*, *HindIII*, *PstI* és *XhoI* (Fermentas) restrikciós enzimekkel daraboltunk. Egy éjszakán át történő inkubálás után az emésztett DNS-t PCI 25:24:1 arányú oldattal tisztítottuk, majd ezt követően a felülúszót CI 24:1 arányú eleggyel extraháltuk. A vizes fázisból 2,5 térfogat mennyiségű 96%-os etanollal kicsaptuk a DNS-t (2 óra, -20 °C), melyet centrifugálást követően (16000g, 20 perc; Heraeus Pico 17, Thermo Scientific) 70%-os etanollal mostunk. Az ismételt centrifugálással (16000g, 5 perc; Heraeus Pico 17, Thermo Scientific) ülepitett DNS-t vákuum alatt szárítottuk, melyet ezután 17 µl steril desztillált vízbe visszaoldottunk, majd a DNS fragmenteket T4 ligáz enzim (Fermentas) segítségével önmagukkal ligáltuk (4 °C, 18 óra). A cirkularizált DNS-t ezután PCI és CI felhasználásával tisztítottuk, 96%-os etanollal kicsaptuk, majd centrifugálást követően (16000g, 20 perc; Heraeus Pico 17, Thermo Scientific) 70%-os etanollal mostuk, melyet ismételt ülepités (16000g, 5 perc; Heraeus Pico 17, Thermo Scientific) után 10 µl mennyiségű steril desztillált vízben szuszpendáltunk fel. Az így kapott DNS mintákat használtuk templátként az IPCR vizsgálatokban, melyek reakcióelegyeit 25 µl végtérfogatban, a következők szerint állítottunk össze: 50 ng cirkularizált DNS, 0,4 mM dNTP mix (Fermentas), 1x *Dupla-Pfu* puffer (2 mM MgSO₄-al kiegészítve; Zenon), 0,6 µM - 0,6 µM primer, 2 U *Dupla-Pfu* DNS polimeráz (Zenon). Az IPCR során alkalmazott reakciókörülmények:

94 °C	2 perc	}	1 ciklus	kezdeti denaturáció
94 °C	15 másodperc		}	10 ciklus
55 °C	30 másodperc	primer kötődés		
68 °C	3 perc	láncszintézis		
94 °C	15 másodperc	denaturáció		
55 °C	30 másodperc	}	20 ciklus	primer kötődés
68 °C	3 perc + 5 másodperc			láncszintézis
	ciklusonként			
68 °C	7 perc		1 ciklus	végző láncszintézis

4.6.4. DNS elválasztás agaróz gélen

A nukleinsav mintákhoz mintapuffert adtunk, majd a várt fragmentek és a gél méretétől illetve a kísérlettől függően 0,7 - 2,5%-os gélben, 80 - 110 V feszültséggel, 1 - 4 órán keresztül végeztük az elválasztást. Mind az agarózgél elkészítéséhez, mind futtatópuffernek TAE oldatot használtunk. Az elválasztott molekulákat etídium-bromidos festést ($0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$) követően, UV fényben detektáltuk. A fragmentek méretének meghatározásához 1 kb-os DNS létra (Fermentas) molekulasúly markert használtunk.

4.6.5. DNS izolálás agaróz gélből

A visszaizolálni kívánt DNS fragmentumokat tartalmazó gél részletet steril szikével UV lámpa alatt vágtuk ki a 0,7 - 0,8 % agarózt tartalmazó gélből. A DNS-t a „DNA Extraction Kit” (Fermentas) vagy a „Gel-M Gel Extraction System Kit” (Viogene) készletek segítségével nyertük ki a gyártó utasításainak megfelelően.

4.6.6. Génklónozás során alkalmazott módszerek

A restriktációs emésztéseket és ligálásokat sztenderd módszerek szerint végeztük (Sambrook és mtsi., 1989). A DNS szakaszokat pBluescript II SK+ (Stratagene), vagy a pUC18 (Fermentas) klónozó vektorokba T4 DNS ligáz (Fermentas) segítségével, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ hőmérsékleten, 16 órán át történő inkubálással építettük. Az IPCR vizsgálatok során kapott DNS szakaszokat az „InsT/Aclone PCR Product Cloning Kit” (Fermentas) készletben található pTZ57R/T vektorba építettük, a gyártó utasításainak megfelelően.

Az *E. coli* sejtekből történő plazmid DNS tisztításához a „Viogene Mini-M Plasmid DNA Extraction System” (Viogene), illetve a „Viogene Midi-V100 Plasmid DNA Extraction System” (Viogene) készleteket használtuk a gyártó utasításainak megfelelően.

Vektorok izolálásához néhány esetben az általunk készített 1-es és 2-es jelű oldatokat is alkalmaztuk. Az *E. coli* sejteket ampicillin tartalmú LB tápoldatban, $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ hőmérsékleten, 12 órán át inkubáltuk. Az Eppendorf csőben történő centrifugálást követően ($16000g$, 2 perc; Heraeus Pico 17, Thermo Scientific) a sejteket $150 \mu\text{l}$ 1-es oldatban szuszpendáltuk, majd 10 percig szobahőmérsékleten állni hagytuk. Az elegyhez $200 \mu\text{l}$ 2-es oldatot adtunk, melyet ezután 5 percig jeges vízfürdőben inkubáltunk, majd $150 \mu\text{l}$ 3 M-os nátrium-acetát hozzáadása után 25 percig $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ -on állni hagytuk. Ezt

követően centrifugáltuk (16000g, 10 perc; Heraeus Pico 17, Thermo Scientific), majd a felülúszóhoz 2,5 térfogat izopropanolt adtunk. A 25 perc centrifugálás (16000g; Heraeus Pico 17, Thermo Scientific) után a kicsapódott DNS-t 300 µl 70%-os etanollal óvatosan mostuk, ismét centrifugáltuk (16000g, 5 perc; Heraeus Pico 17, Thermo Scientific), majd beszáritás után 50 µl mennyiségű steril desztillált vízben feloldottuk.

4.6.7. Kompetens *Escherichia coli* sejtek készítése

Az *E. coli* TOP10F⁻ vagy XL1-Blue jelzésű baktériumtörzsek LB tápközegben, 16 órán át nevelt tenyészetéből 1 ml mennyiséget 100 ml LB tápoldatba oltottunk, majd a baktérium tenyészetet $A_{660}=0,5 - 0,6$ érték eléréséig 37 °C-on, 200 rpm rázatás mellett inkubáltuk. Centrifugálást (2160g, 10 perc, 4 °C; SORVALL-RC-5B, SS-34 rotor) követően a sejteket a frissen leoltott tenyészet térfogatával azonos mennyiségű, 0,1 M-os CaCl₂ oldatban felfuszpendáltuk. Centrifugálás (2160g, 10 perc, 4 °C; SORVALL-RC-5B, SS-34 rotor) után az előző lépést megismételtük, majd 1 órás jeges vízfürdőben történő inkubációt követően ismét centrifugáltuk a sejteket (2160g, 10 perc, 4 °C; SORVALL-RC-5B, SS-34 rotor). A kiülepedett sejteket 1/20-nyi térfogatú hideg, 20% (v/v%) glicerint tartalmazó, 0,1 M-os CaCl₂ oldatban felfuszpendáltuk, majd -70 °C hőmérsékleten fagyasztva tároltuk.

4.6.8. Az *Escherichia coli* sejtek transzformációja

200 µl fagyasztva tárolt kompetens sejtet jégen felolvasztottunk, majd 100 µl TCM puffert és 5 - 10 µl ligátumot (PCR terméket tartalmazó plazmidot) adtunk hozzá. Ezután az elegyet 25 percig jégen, majd 3,5 percig 37 °C-on inkubáltuk. 10 percig szobahőmérsékleten állni hagytuk, majd ezt követően a sejteket IPTG és X-Gal jelenlétében, ampicillin tartalmú LB táptalajra szélesztettük. A Petri-csészéket 37 °C-on, 16 órán át inkubáltuk, majd az inszert DNS-t is tartalmazó plazmidokat hordozó transzformánsokra szelektáltunk (kék-fehér szelekciónál a fehér telepekre).

4.6.9. Szekvenciák meghatározása és elemzése

A különböző gombákból származó β-glükozidáz enzim aminosavszekvenciáinak összehasonlítását a „Multalin 5.4.1.” program segítségével végeztük

(<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>). A vizsgálatainkban elemzett DNS szakaszok szekvenálását az MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpontjában (ABI 373 típusú automata szekvenátor, Applied Biosystems) végeztettük.

A nukleotid szekvenciák analízisét nemzetközi adatbázisokban (NCBI, National Center for Biotechnology Information; EMBL, European Molecular Biology Laboratory) fellelhető szekvencia adatokkal, a BLAST és FASTA programok felhasználásával végeztük (Altschul és mtsi., 1997). Az enzimek jellemzéséhez a „ProtParam” (Gasteiger és mtsi., 2005), míg a szignál peptid meghatározásához a „SignalP” (Bendtsen és mtsi., 2004) programokat alkalmaztuk. A domain keresést és meghatározást a „Motif Scan (MyHits)” program segítségével végeztük (Pagni és mtsi., 2007). A fehérje szerkezet meghatározás vizsgálatok, árpa ExoI (NCBI azonosító: AAD23382) templát felhasználásával, a „Swiss-Modell” (Arnold és mtsi., 2006) alapján készültek; a háromdimenziós látványterv, valamint a fehérje szekvencia és szerkezet összehasonlítás a „Structure based Sequences Alignment Program” (STRAP; <http://www.charite.de/bioinf/strap/>) alkalmazásával készült. A programokhoz a svájci „ExPasy” szerveren (<http://www.expasy.ch>) keresztül férünk hozzá.

A filogenetikai vizsgálatok elvégzéséhez szükséges β -glükozidáz enzimek aminosav szekvenciáit az NCBI GenBank adatbázisból nyertük. A járomspórás gomba feltételezett β -glükozidáz enzimek aminosav szekvencia adatait a *M. circinelloides* (DoE Joint Genome Institute; *M. circinelloides* CBS277.49 v2.0; <http://genome.jgi-psf.org/Mucci2/Mucci2.home.html>), a *Phycomyces blakesleeanus* (DoE Joint Genome Institute *P. blakesleeanus* NRRL1555 v2.0; <http://genome.jgi-psf.org/Phybl2/Phybl2.home.html>) és a *Rh. oryzae* (Broad Institute; *Rh. oryzae* Database; http://broadinstitute.org/annotation/genome/rhizopus_oryzae/MultiHome.html) izolátumok genomszekvencia adatbázisaiban értük el. Az általunk kiválasztott kulcsoportok a glikozid hidroláz 3. család (Harvey és mtsi., 2000) főcsoportjait képviselik. A szekvenciákat a következő stratégia szerint illesztettük: először egy előzetes illesztés alapján számolt Neighbour-Joining fa alapján kijelöltünk nagyobb szekvencia-hasonlóságot mutató csoportokat, amelyeket ezután külön-külön illesztettünk a ProbCons algoritmussal (Do és mtsi., 2005). A ProbCons-al való illesztés során 10 tanulási ciklust és 25 utólagos iteratív finomító lépést engedélyeztünk. Ezután, a kapott illesztéseket "profile" módban illesztettük a MUSCLE algoritmus segítségével (Edgar, 2004). A kapott illesztésből MrBayes 3.1.2 program segítségével becsültünk törzsfákat (Ronquist és Huelsenbeck, 2003). A legjobban illeszkedő evolúciós modellt az analízis során Reversible-Jump MCMC (Markov Chain

Monte Carlo) algoritmus segítségével becsültük. A Markov láncokat hárommillió generáción át futtattuk, minden századik generációt elmentve mintaként. A „burn-in” értékét 10000 fában állapítottuk meg, és a „poszt-burn-in” fákból 50% többségi konszenzus filogramot számoltunk; 0,95 feletti poszterior valószínűséget fogadtunk el szignifikáns támogatottságnak.

4.6.10. Southern-hibridizáció

A *R. miehei* β -glükózidáz gén kópiaszámának meghatározásához Southern-hibridizációs vizsgálatokat végeztünk. A tisztított genomi DNS-ből 5 μ g mennyiségeket 12 órán át *Sma*I, *Sca*I, *Pvu*II, *Xba*I, *Kpn*I és *Apa*I restriktív enzimekkel emésztettünk, ezt követően az emésztett mintákat 0,8%-os agaróz/TAE gélen választottunk el.

Agaróz gélelektroforézist követően a gélt depurináló oldatban 20 percig kezeltük, majd desztillált vizes öblítést követően denaturáló oldatba helyeztük. 30 perces denaturáló kezelést követően a gélt 30 percre neutralizáló oldatba tettük. Az így előkezelt gélt 16 órán keresztül 20x SSC oldat segítségével blottoltuk a hibridizációs membránra (Hybond-N+, Fluka), majd a DNS-t UV fény (2 - 3 perc) segítségével rögzítettük.

A hibridizációs membránt legalább két órán át, kevésbé szigorú körülmények között 55 °C-on, míg szigorúbb feltételek esetén 65 °C-on hibridizációs pufferrel előhibridizáltuk, majd 16 órán át 55 °C, vagy 65 °C-on, jelölt próbát tartalmazó hibridizációs oldattal (20 ng ml⁻¹) hibridizáltunk. A próba jelöléséhez minden esetben a nem radioaktív digoxigenines jelölést alkalmaztuk (PCR DIG Probe Synthesis Kit, Roche) a gyártó utasításainak megfelelően. A jelölt próbát használat előtt minden esetben denaturáltuk (10 perc 100 °C-os, majd 10 perc jégben történő inkubáció). A hibridizációs membránt szobahőmérsékleten kétszer 5 percig 2x SSC, 0,1% SDS oldattal, majd kétszer 15 percig 0,5x SSC, 0,1% SDS oldattal 55 °C-on (kevésbé szigorú körülmények), vagy 0,1x SSC, 0,1% SDS oldattal 65 °C-on (szigorúbb feltételek) mostuk. Ezt követően az 1. detektáló pufferrel 1 percig, majd a 2. detektáló pufferrel 30 percig, majd a 2. detektáló pufferhez adott 4 μ l alkalikus foszfát antitest-konjugátummal (Anti-Digoxigenin-AP, Roche) újabb 30 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten. Kétszer tizenöt perces mosást (1. puffer) követően a detektálást 3. pufferhez adott 200 μ l NBT/BCIP (DIG DNA Labeling and Detection Kit, Roche) reagenssel végeztük.

4.6.11. Az expressziós vektor szerkesztése

A *R. miehei* β -glükózidáz enzimet kódoló gén kifejeződésének vizsgálatára a pTM8 jelzésű plazmidot szerkesztettük. Az elkészített vektorban a *gpdI* (gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz gén, EMBL azonosító: AJ293012) promóter és terminális (*gpdIP* és *gpdIT*; Wolff és Arnau, 2002) régióinak szabályozása alá helyeztük a *R. miehei bgl* gént. Az expressziós vektor építéséhez a pPT43 (Papp és mtsi., 2006) plazmidot használtuk, amely a *gpdI* promóter és terminális régióit tartalmazza pBluescript II SK+ (Stratagene) klónozó vektorba építve. A transzformánsoknak hordozniuk kell egy (vagy több) szelekciót biztosító gént. Rendelkezésünkre állt egy leucin és uracil auxotrófiával markerezett *M. circinelloides* mutáns törzs (MS12), illetve az uracil auxotrófiát komplementáló gént hordozó plazmid: az orotidin-5'-monofoszfát dekarboxilázt kódoló *pyrG* gén (Benito és mtsi., 1992) pSP73 (Fermentas) vektorba építve (pTM7; Lukács és mtsi., 2009).

A teljes *R. miehei bgl* gént *NotI* és *ClaI* restrikciós helyeket tartalmazó indítoszekvenciák (BGL17 és BGL19, 3. táblázat) segítségével izoláltuk, majd pBluescript II SK+ (Stratagene) vektorba klónoztuk. Ezt követően *ClaI* és *XbaI* enzimekkel a *bgl* gént kivágtuk, melyet ezután pPT43 plazmidba építettünk. Az így kapott vektor *PvuII* enzimmel történő emésztése után megkaptuk a *M. circinelloides gpdI* promóter és terminális régióival összeépített *bgl* gént, melyet ezután a pTM7 jelzésű plazmidba építettünk.

4.6.12. A *Mucor circinelloides* protoplasztok képzése

A protoplasztáláshoz a *M. circinelloides* MS12 leucin és uracil auxotróf törzsének sporangiospóráit élesztőkivonat-glükóz táptalaj (YEG) felszínére helyezett celofánkorongra vittük fel oltó korong segítségével, majd a Petri-csészéket 16 - 20 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk (Nagy és mtsi., 1994). A celofánon nevelt fiatal telepeket a protoplasztáló oldatba helyeztük, majd 2 - 3 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk. A sejtfal oldására saját készítésű, *Helix pomatia* lítikus enzimet („csigaenzim”) alkalmaztunk. A protoplasztáló enzimoldat a protoplasztok stabilizálása érdekében 0,8 M szorbitolt tartalmaz. A protoplasztokat steril gézen történő szűrés után centrifugáltuk (2160g, 15 perc, 4 °C, Hettich Rotanta 460R), majd 2 ml SMC pufferrel történő mosás és centrifugálás (2160g, 15 perc, 4 °C, Hettich Rotanta 460R) után 200 μ l SMC pufferben vettük fel.

4.6.13. A *Mucor circinelloides* protoplasztok transzformációja

Az általunk alkalmazott módszer a van Heeswijk és Roncero (1984) által leírt polietilén-glikol (PEG) mediált transzformáció módosítása. Kétszáz μl protoplasztsuszpenzióhoz egységenként 10 μl (kb. 5 μg) pTM8 plazmid DNS-t, valamint 20 μl PMC puffert adtunk. A mintákat fél órán át jégen tartottuk, ezt követően további 2,5 ml PMC puffert adtunk hozzá, majd 25 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. A protoplasztokat 20 ml SMC pufferrel felhígítottuk, majd centrifugáltuk (2160g, 15 perc, 4 °C, Hettich Rotanta 460R). A kiülepedett protoplasztokat 5 ml, 0,8 M szorbitolt tartalmazó YPG tápoldatban vettük fel, majd fél órán át 25 °C-on inkubáltuk (protoplasztok regenerációja). Ismételt centrifugálást (2160g, 15 perc, 4 °C, Hettich Rotanta 460R) követően a kiülepített sejteket kis mennyiségű SMC pufferben (0,5 ml) felvettük, majd 0,8 M szorbitollal kiegészített YNB fedő agarral (1% agar tartalmú) összekeverve 0,8 M szorbitolt tartalmazó YNB alaptáptalajokra (2% agar tartalmú) öntöttük. A Petri-csészéket a transzformáns telepek megjelenéséig (4 - 5 nap) szobahőmérsékleten inkubáltuk. A transzformánsokat a recipiens törzs uracil auxotrófiájának komplementációjával szelektáltuk. A szelekció, valamint a transzformánsok fenntartása során alkalmazott YNB táptalajokat 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ leucinnal egészítettük ki.

5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

5.1. Járomspórás gombák β -glükózidáz termelésének tesztelése

A β -glükózidáz termelés vizsgálatakor a *Gilbertella*, *Mucor*, *Rhizomucor* és *Rhizopus* nemzetségek 95 izolátumát teszteltük szénforrásként 1% cellobiózt tartalmazó minimál tápoldatban. Az eredmények alapján (1. sz. melléklet) kiválasztottuk az egyes nemzetségek tagjai közül a legjobb enzimtermelőket, így összesen 16 (6 *Mucor*, 4 *Rhizomucor*, 3 *Rhizopus* és 3 *Gilbertella*) izolátummal dolgoztunk tovább. A 16 törzs esetén, folyadék tenyészetben meghatározott térfogati aktivitás értékeket a 4. táblázatban tüntettük fel. A legnagyobb enzimaktivitást a *Rhizopus oryzae* izolátum mutatta (28,15 U ml⁻¹) folyékony tápközegben. Érdeemes megemlíteni, hogy egy *Trichoderma viride* törzs β -glükózidáz termelésének folyadék tenyészetben történő tesztelésekor, búzakorpa szubsztrát és szójaliszt nitrogénforrás alkalmazása mellett a legnagyobb enzimaktivitásra mindössze 19,92 U ml⁻¹ térfogati aktivitást tapasztaltak (Haq és mtsi., 2006).

A folyadék tenyésztés alapján kiválasztott 16 törzs extracelluláris β -glükózidáz aktivitását szénforrásként búzakorpát tartalmazó közegben is megvizsgáltuk, ugyanis a fonalas gomba eredetű β -glükózidáz enzimek szilárd fázisú fermentációs rendszerekben nagyobb mennyiségben termelődhetnek, amihez a cello-oligoszacharidokban gazdag mezőgazdasági hulladék búzakorpa jól alkalmazható szubsztrát (Sun és mtsi., 2008). A búzakorpán történő tenyésztés során meghatározott enzimaktivitás értékeket ugyancsak a 4. táblázatban tüntettük fel. A szilárd fázisú fermentáció a folyadék tenyészetnél általában jelentősen nagyobb enzimaktivitást eredményezett. A folyadék tenyészet cellobióz tartalma és a búzakorpa cellulóz tartalma (11 m/m%) alapján számított (Amrein és mtsi., 2003; He és mtsi., 2006) termékhozamban több mint tízszeres növekedés figyelhető meg *Gilbertella persicaria*, *Rhizomucor miehei* (C15, R11, R17), *Mucor fragilis*, *M. racemosus* f. *chibinensis* és *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* izolátumok esetén, búzakorpa szubsztrát alkalmazásakor. A szilárd fázisú tenyészetben történő növekedés a természetes körülményekhez közelebb áll, így feltételezhetően az enzimek szekréciónja is a természetes állapotban tapasztalt enzimtermeléshez hasonló, továbbá a szilárd fázisú fermentáció alatt a hidrolitikus enzimek felszabadulhatnak a katabolit represszió hatása alól, ami ezen enzimek magasabb szintű kifejeződéséhez is vezethet (Hu és mtsi., 2009). Az *Aspergillus oryzae* β -glükózidáz folyadék tenyészetben sejtfalhoz kötött állapotban található, míg szilárd fázisú fermentációban a tápközegbe szekretálódik (Oda és mtsi., 2006).

4. táblázat. A tesztek során jelentős β -glükozidáz aktivitással rendelkező járomspórás gomba izolátumok.

Izolátum	Kód ^a	Törzsgyűjtemény kódja	Térfogati aktivitás		Hozam		
			Folyadék tenyészet	Szilárd fázisú fermentáció	Folyadék tenyészet	Szilárd fázisú fermentáció	
			U ml ⁻¹		U g ⁻¹ cellobióz	U g ⁻¹ cellulóz	U g ⁻¹ búzakorpa
<i>Gilbertella persicaria</i>	G1	ATCC 201107	2,54	70,9	254	3864	425,4
<i>Gilbertella persicaria</i>	G2	ATCC 201108	2,74	59	274	3215	354
<i>Gilbertella persicaria</i>	G14	SZMC 11098	3,16	58,6	316	3193,7	351,6
<i>Mucor amphibiorum</i>	M81	CBS 763.74	1,04	1	104	54,5	6
<i>Mucor azygosporus</i>	M82	CBS 292.63	0,77	1,6	77	87,2	9,6
<i>Mucor fragilis</i>	M13	CBS 236.35	0,85	41,6	85	2267,2	249,6
<i>Mucor guillermondii</i>	M83	CBS 174.27	1,78	1	178	54,5	6
<i>Mucor racemosus</i> f. <i>chibinensis</i>	M84	CBS 636.67	0,24	6,2	24	337,9	37,2
<i>Mucor corticolus</i>	M21	SZMC 12031	5,78	94,9	578	5172,1	569,4
<i>Rhizomucor miehei</i>	C15	SZMC 11029	1,25	29,7	125	1618,7	178,6
<i>Rhizomucor miehei</i>	R8	NRRL 5282	3,70	38,3	370	2087,4	229,8
<i>Rhizomucor miehei</i>	R11	NRRL 5901	0,46	29,2	46	1591,4	175,2
<i>Rhizomucor miehei</i>	R17	ETH M4918	2,15	42	215	2289	252
<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>oligosporus</i>	Rh31	NRRL 2710	0,85	18,4	85	1002,8	110,4
<i>Rhizopus oryzae</i>	Rh28	NRRL 2908	28,15	17,8	2815	970,1	106,8
<i>Rhizopus niveus</i>	Rh40	CBS 403.51	9,92	15,1	992	823	90,6

A 4. napon mért *M. azygosporus*, illetve a 2. napon mért *M. fragilis* enzimaktivitás értékeken kívül a feltüntetett aktivitások az inkubációs idő hatodik napján meghatározott értékek. A folyadék tenyészetekben a *Rh. oryzae*, a *Rh. niveus*, valamint a *Gilbertella* és *Mucor* izolátumokat 25 °C, míg a *Rh. microsporus* var. *oligosporus* és a *Rhizomucor* törzseket 37 °C optimális növekedési hőmérsékleteken inkubáltuk. A szilárd fázisú fermentációk esetében a legnagyobb enzimaktivitás értékeket a tenyésztési hőmérséklettől függetlenül tüntettük fel. ^a A dolgozatban történő azonosításhoz szükséges kód.

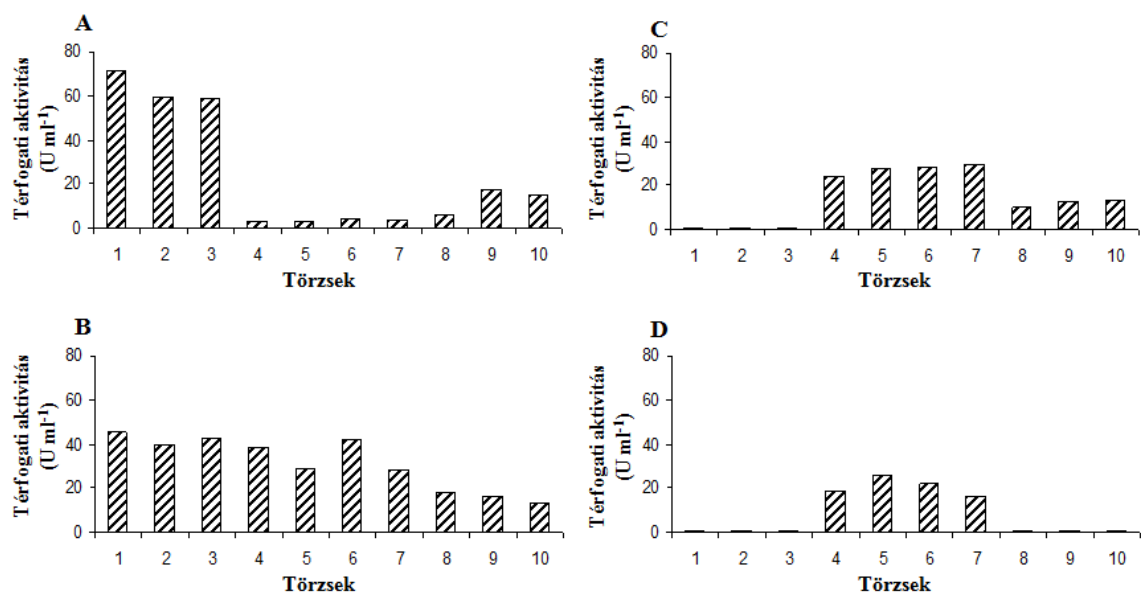
Az *Aspergillus niger* NIAB 280 törzs β -glükózidáz termelését cellobiózt, kukoricacsövet, α -cellulózt és búzakorpát szubsztrátként tartalmazó szilárd fázisú rendszerekben is megvizsgálták, ahol a búzakorpát tartalmazó tenyészetben tapasztalták a legmagasabb térfogati aktivitást (35 U ml^{-1}) és termékhozamot (462 U g^{-1} búzakorpa; Rajoka és mtsi., 2006). Az általunk elvégzett tesztekben a *G. persicaria* G1 és a *Mucor corticolus* törzsek ugyancsak magas enzimaktivitást és termékhozamot ($425,4 \text{ U g}^{-1}$ és $569,4 \text{ U g}^{-1}$ búzakorpa) mutattak ugyanezen a szubsztráton (4. táblázat). Az *Aspergillus awamori*, *A. oryzae* és *A. niger* izolátumok búzakorpán történő β -glükózidáz termelésének tesztelésekor egyedül az *A. oryzae* és az *A. niger* együttes tenyésztése során tapasztaltak ennél lényegesen nagyobb termékhozamot (1475 U g^{-1} búzakorpa; Raza és mtsi., 2011).

A jó β -glükózidáz termelést mutató izolátumok közül 10 törzs esetében az inkubációs hőmérséklet enzimtermelésre gyakorolt hatását is megvizsgáltuk (4. ábra). $25 \text{ }^\circ\text{C}$ -on kiemelkedő enzimtermelést a *G. persicaria*, valamint a *Rhizopus niveus* és a *Rh. oryzae* izolátumok mutattak. A *G. persicaria* optimális növekedési hőmérséklete a $25 - 30 \text{ }^\circ\text{C}$ közötti tartományban található. A *R. miehei*, illetve a *Rh. microsporus* var. *oligosporus* termofil gombák (optimális növekedési hőmérsékletük $30 \text{ }^\circ\text{C}$ felett van) ezen a hőmérsékleten lassan növekednek, β -glükózidáz termelésük pedig meglehetősen alacsonynak mutatkozott (4A. ábra).

A tenyészetek $30 \text{ }^\circ\text{C}$ -on történő inkubálása során a *Gilbertella* és a *R. miehei* (R8 és R17) izolátumok bizonyultak a legjobb termelőnek. A kísérletekben alkalmazott négy hőmérséklet közül a *Rhizomucor* törzseknél itt tapasztalható a legmagasabb enzimaktivitás. A *Rh. oryzae* és a *Rh. niveus* izolátumok kivonataiban a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ -on mért aktivitáshoz hasonló értékeket kaptunk. Általánosan azt tapasztaltuk, hogy $30 \text{ }^\circ\text{C}$ hőmérsékleten mind a szobahőmérsékletet (mezofil), mind a magasabb hőmérsékletet kedvelő (termofil) törzsek egyaránt jó β -glükózidáz termelést mutattak (4B. ábra).

$40 \text{ }^\circ\text{C}$ -on a termofil *R. miehei* izolátumok kivonatai mutatták a legnagyobb aktivitást, ezen belül is a C15 klinikai izolátum bizonyult a legjobb termelőnek. Érdeemes megemlíteni, hogy jelentős enzimtermelést sikerült kimutatni a *Rh. oryzae*, a *Rh. microsporus* var. *oligosporus*, valamint a *Rh. niveus* gombák kivonataiban is (4C. ábra).

A termofil *R. miehei* izolátumokat $50 \text{ }^\circ\text{C}$ hőmérsékleten is teszteltük, ahol ugyancsak kiemelkedő β -glükózidáz termelést tapasztaltunk; az R11 törzs mutatta a legmagasabb enzimaktivitást (4D. ábra). Az $50 \text{ }^\circ\text{C}$ hőmérsékleten, búzakorpa szubsztráton tenyésztett *R. miehei* YH-10 izolátumnál szintén magas enzimtermelést tapasztaltak (Yoshioka és Hayashida, 1980).



4. ábra. Járomspórás gombák β -glükozidáz termelése 25 °C (A), 30 °C (B), 40 °C (C) és 50 °C (D) hőmérsékleten, búzakorpán tenyésztve (az inkubációs idő hatodik napján mért enzimaktivitás értékek). 1 – *Gilbertella persicaria* G1; 2 – *G. persicaria* G2; 3 – *G. persicaria* G14; 4 – *Rhizomucor miehei* R8; 5 – *R. miehei* R11; 6 – *R. miehei* R17; 7 – *R. miehei* C15; 8 – *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus*; 9 – *Rhizopus oryzae*; 10 – *Rhizopus niveus*.

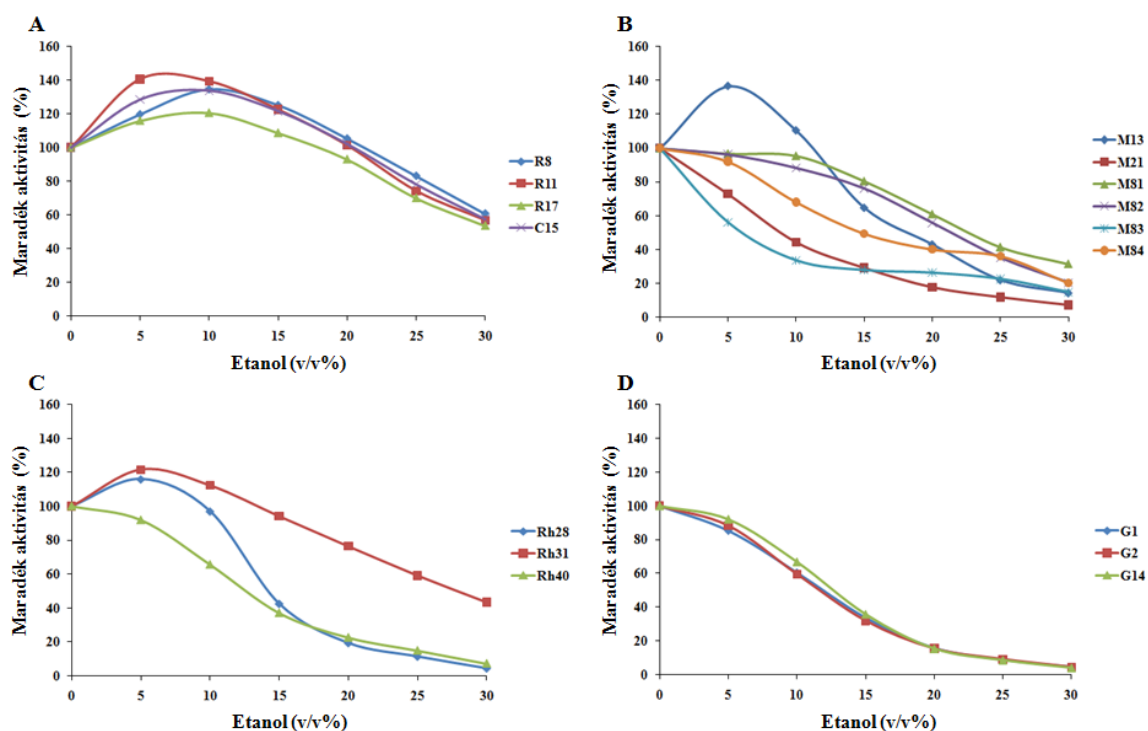
5.2. A β -glükozidáz enzimek vizsgálata nyers kivonatban

A β -glükozidáz enzimek további tisztításra és részletes jellemzésre történő kiválasztásához különböző előkísérletek elvégzését tartottuk szükségesnek, melyeknél az etanol, a glükóz (kompetitív gátlószer), a savas pH, valamint a hőmérséklet enzimaktivásra gyakorolt hatását vizsgáltuk. A kísérletek során, szilárd fázisú fermentációt követően, a 4. táblázatban felsorolt izolátumok nyers enzimkivonataiban jelen levő β -glükozidáz enzimeket teszteltük.

Az etanol és glükóz hatásának vizsgálata

A β -glükozidázok etanol érzékenységének vizsgálata a borgyártás folyamataiban történő alkalmazhatóság szempontjából fontos (Cabaroglu és mtsi., 2003). A *Rhizomucor*, a *Rh. oryzae* (Rh28), a *Rh. microsporus* var. *oligosporus* (Rh31) és a *M. fragilis* (M13) izolátumok által termelt β -glükozidázok esetén alacsony koncentrációjú etanol alkalmazásakor jelentős enzimaktivitás emelkedést tapasztaltunk (5. ábra). Érdeemes megemlíteni, hogy a *Rhizomucor* enzimeknél magas etanol koncentráció (30%, v/v) esetén is megmaradt az enzimek aktivitásának 60%-a. Az egyéb *Mucor* és *Rhizopus*, illetve a *Gilbertella* izolátumok enzimaktivitását már alacsony koncentrációban is gátolta az etanol.

Az etanol enzimaktivitásra gyakorolt hatásával részletesen az 5.4.6. fejezetben foglalkozunk.



5. ábra. A *Rhizomucor* (A), *Mucor* (B), *Rhizopus* (C) és *Gilbertella* (D) β -glükózidázok aktivitásának változása különböző koncentrációjú etanol jelenlétében.

A glükóz (1%, m/v) erős gátlószernek bizonyult a *Gilbertella*, *Rhizopus* és *Rhizomucor* β -glükózidázok esetében (5. táblázat). A vizsgált törzsek közül a *Mucor* izolátumok enzimjeinél tapasztaltunk enyhe toleranciát a glükózzal, különösen a *M. guillermondii*, a *M. fragilis* és a *M. corticolus* izolátum esetében (30,8%, 30,2% és 36,8% maradék aktivitás). A glükóz enzimaktivitásra gyakorolt gátló hatásával részletesen az 5.4.4. fejezetben foglalkozunk.

Az etanol, mint a transzglükózidáz aktivitás akceptora, befolyásolhatja a hidrolízis termékeként keletkező glükóz kompetitív gátló hatását, ennek következtében a két anyag együttes hatását is megvizsgáltuk azoknál az enzimeknél, melyeknél az előző kísérletekben enzimaktivitás emelkedést tapasztaltunk etanol jelenlétében. A tesztek során vizsgált izolátumoknál minden esetben alacsonyabb gátlást tapasztaltunk glükóz (1%, m/v) és etanol (10%, v/v) együttes jelenlétében, mint glükóz egyedüli alkalmazásakor (6. táblázat). Érdemes megemlíteni, hogy etanol hozzáadása után a glükóz gátló hatása a *R. miehei* (R8, C15) és a *Rh. oryzae* izolátumok esetében érvényesült a legkevésbé. Az etanol jelenlétében történő transzglükózidáz aktivitás vizsgálatával részletesen az 5.5.2. fejezetben foglalkozunk.

5. táblázat. A glükóz, a savas pH és a hőkezelés hatása az izolátumok enzimaktivitására. A maradék aktivitás a kezeletlen kontroll (100%) aktivitásának százalékos aránya.

Izolátumok	Maradék aktivitás (%)			
	Glükóz ^a	pH 4,0 ^b	75 °C ^c	75 °C ^d
<i>Gilbertella persicaria</i> G1	8	43,3	2,9	2,2
<i>Gilbertella persicaria</i> G2	7,5	44,1	0,5	7,5
<i>Gilbertella persicaria</i> G14	8,3	44,2	1	0
<i>Mucor amphibiorum</i>	25,0	79,4	5,7	12,8
<i>Mucor azygosporus</i>	22,0	62,4	6,4	0
<i>Mucor fragilis</i>	30,2	98,4	2,1	0,7
<i>Mucor guillermondii</i>	30,8	27	7,4	13,3
<i>Mucor racemosus</i> f. <i>chibinensis</i>	15,7	119,6	6,8	0,36
<i>Mucor corticolus</i>	36,8	74,2	0,2	3,4
<i>Rhizomucor miehei</i> C15	13,0	89,6	10,7	92,8
<i>Rhizomucor miehei</i> R8	13,8	79,7	29,1	60
<i>Rhizomucor miehei</i> R11	12,8	105,6	7,5	82,8
<i>Rhizomucor miehei</i> R17	13,9	113,9	4,4	79,8
<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>oligosporus</i>	14,7	104,2	8	26,1
<i>Rhizopus oryzae</i>	13,5	88,5	10,5	11,1
<i>Rhizopus niveus</i>	6,2	45,1	12,6	8,1

^aGlükóz koncentráció: 10 mg ml⁻¹. ^bMaradék aktivitás a pH 6,0 értéken mért aktivitás százalékos aránya.

^cNyers extraktum 5 perces tartó hőkezelése. ^dCellobióz hozzáadásával 5 perces hőkezelés.

6. táblázat. Az etanol enzimaktivásra gyakorolt hatása glükóz jelenlétében. A relatív aktivitás az 1% (m/v%) glükózt tartalmazó kontroll (100%) aktivitásának százalékos aránya (etanol koncentráció: 10 v/v%).

Izolátumok	Relatív aktivitás (%)
<i>Rhizomucor miehei</i> R8	217,4
<i>Rhizomucor miehei</i> R11	203,1
<i>Rhizomucor miehei</i> R17	194,2
<i>Rhizomucor miehei</i> C15	215,4
<i>Rhizopus oryzae</i>	222,2
<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>oligosporus</i>	149,7
<i>Mucor fragilis</i>	155,6

Sav- és hőmérséklet tolerancia vizsgálatok

A savas pH enzimaktivásra gyakorolt hatásának vizsgálatához pH 4,0 értékre beállított acetát puffert használtunk. A maradék aktivitás kiszámításakor a pH 6,0 értéken mért aktivitás adatokhoz viszonyítottunk. A *R. miehei* R11 és R17, a *Rh. microsporus* var. *oligosporus* és a *M. racemosus* f. *chibinensis* törzsek β -glükozidázainál enyhe enzimaktivitás emelkedést tapasztaltunk pH 4,0 értéken, ami ezen enzimek acidofil jellegét sugallja (5. táblázat); az enzimek homogenitásig történő tisztítása, valamint pH optimum és stabilitás tartományainak pontos megállapítása folyamatban van. Az eddig ismert járomspórás gomba β -glükozidázok pH optimuma pH 5,0, vagy ennél kissé magasabb tartományokban van, továbbá széles pH stabilitással rendelkeznek, így ezen enzimek savas körülmények között végbemenő biotechnológiai folyamatokban szintén alkalmazhatók (Yoshioka és Hayashida, 1980; Borgia és Mehnert, 1982; Petruccioli és mtsi., 1999; Takii

és mtsi., 2005). Az alkohol- és a savtolerancia a bogyártás során íz- és aromaanyag felszabadítóként alkalmazott enzimek fontos tulajdonsága. A savas pH a *M. guilliermondii* és a *R. miehei* R17 izolátumok β -glükózidázainak enzimaktivitását gátolta a legerőteljesebben. A *G. persicaria* izolátumok által termelt enzimek közepes savtoleranciát mutattak.

A hőmérséklet tolerancia vizsgálatoknál 75 °C-on 5 percig hőkezeltük a nyers kivonatokat, mely a legtöbb törzsnél számottevő enzimaktivitás csökkenést okozott (5. táblázat). A legmagasabb maradék enzimaktivitást a *R. miehei* R8 törzsnél figyelhettük meg (29,1%).

Cellobióz védő hatás vizsgálatok

A β -glükózidáz enzimek rendszerint egy hőmérséklet toleranciában szerepet játszó szénhidrát láncsal rendelkeznek, melynek hasítása a hőstabilitás csökkenését eredményezi (Woodward és Wiseman, 1982). A helyes konformáció megtartásával a szubsztrát megvédheti az enzimet a hőinaktivációtól (Harnpicharnchai és mtsi., 2009). Ennek vizsgálatához 5 mM cellobióz jelenlétében megismételtük a 75 °C-os hőkezelést (5. táblázat). A *R. miehei* izolátumok ebben a rendszerben termotoleránsnak bizonyultak; mind a négy törzsnél 60% feletti maradék aktivitást tapasztaltunk. A többi izolátum enzimaktivitását számottevően nem befolyásolta a cellobióz hozzáadása.

5.3. A β -glükózidáz enzimek izolálása

A β -glükózidázok tisztítását a *R. miehei* R8, a *M. corticolus* M21, a *G. persicaria* G1 és a *Rh. niveus* Rh40 izolátumokból kezdtük meg. A gombatörzsek búzakorpán történő tenyésztésével nagy enzimaktivitású nyers kivonatokat sikerült előállítanunk, melyekből négy lépésben SDS-PAGE homogenitásig tisztítottuk a termelt enzimeket. Az egyes tisztítási lépések utáni összfehérje koncentrációk, valamint a csapadékokban és felülúszókban kimutatott β -glükózidáz aktivitás értékeit a **2. sz. mellékletként** csatolt táblázatok tartalmazzák.

Ammónium-szulfátos kicsapás. A nyers kivonat ammónium-szulfáttal történő frakcionált kicsapását követően a legnagyobb enzimaktivitást a 70% és 85% sókoncentrációk közötti tartományon kapott csapadékban mutattuk ki.

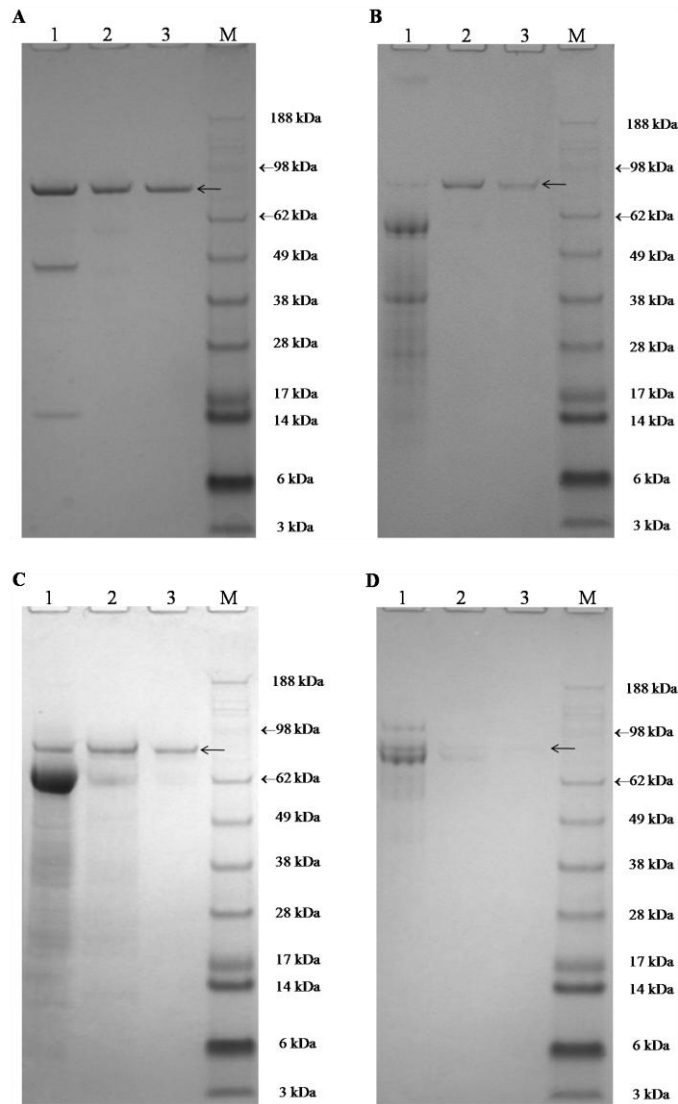
Méretkizárásos és anioncserélő kromatográfia. A kicsapási lépések után a legnagyobb enzimaktivitást mutató tömény frakció további tisztítása méretkizárásos és

anioncserélő kromatográfiai módszerekkel történt három lépésben (Sephadex G-100, Macro-Prep HQ anioncserélő oszlop, Sephacryl S-200HR). A tisztítási folyamat minden lépése után összfehérje koncentrációt, valamint enzimaktivitást mértünk. A tisztított enzimek specifikus aktivitására *R. miehei*, *M. corticolus*, *Rh. niveus* és *G. persicaria* izolátumoknál rendre 62,2, 118,5, 70,6 és 121,1 U mg⁻¹ értékeket mértünk a negyedik lépés után.

Az egyes tisztítási lépések során létrehozott kivonatokban, illetve frakciókban található fehérjék elválasztását SDS poliakrilamid gélen végeztük. Az elektroforetikus elválasztás és a festés után a β -glükozidáz enzim tisztulása az enzimaktivitás értékek és a kapott mintázat összehasonlításával követhető. A különböző kromatográfiai módszerek utáni legnagyobb enzimaktivitású frakciókban található fehérjék denaturáló gélelektroforézist követő elektroforetikus mintázata a 6. ábrán látható.

A jelen vizsgálatokkal egy időben folytatott molekuláris elemzések során izolált *R. miehei* R8 β -glükozidáz génből levezethető aminosavsorrend alapján következtetni tudunk az enzimek feltételezett molekulaméretére. A harmadik kromatográfiai lépést követő, legmagasabb aktivitást mutató frakciók elektroforetikus elválasztása után a 75 - 80 kDa körül kivehető határozott sávokat feltételezzük a keresett enzimfehérjéknek, melyek közül a *R. miehei* izolátumból tisztítottak az LC-MS analízisét is elvégeztük. A kapott LC-MS eredményekkel az 5.7.2. fejezetben foglalkozunk részletesen. Tudomásunk szerint munkánkat megelőzően mindössze a *M. racemosus* (oldott és sejtfalkötött; kb. 91 kDa; Borgia és Mehnert, 1982), a *M. circinelloides* LU M40 (94,8 kDa; Petruccioli és mtsi., 1999), a *Rh. oryzae* MIBA348 (105 kDa; Takii és mtsi., 2005), valamint a *R. miehei* YH-10 (Yoshioka és Hayashida, 1980) járomspórás gombákból tisztítottak β -glükozidázokat. Az utóbbi izolátumnál szintén két enzimet azonosítottak, melyeknek molekulatömegére vonatkozóan nincs rendelkezésünkre álló adat.

A tisztított *R. miehei* és *G. persicaria* β -glükozidázok izoelektromos pontjait Novex pH 3,0 - 10,0 IEF (Invitrogen) gél felhasználásával állapítottuk meg, mely az előbbi izolátum enzimjénél 4,6, míg az utóbbi törzsnél 4,9 körüli értéknek bizonyult. Az eddig tisztított egyéb járomspórás gomba β -glükozidázok izoelektromos pontjairól nincs pontos adatunk, azonban szintén savas tartományban mért értékkel rendelkező enzimeket azonosítottak az *Aspergillus kawachii* (4,5; Iwashita és mtsi., 1998), az *Aspergillus aculeatus* (3,5; Sakamoto és mtsi., 1985), az *A. niger* (3,2; Yan és Lin, 1997), valamint az *Acremonium persicinum* (4,3; Pitson és mtsi., 1997) által termelt enzimeknél is.



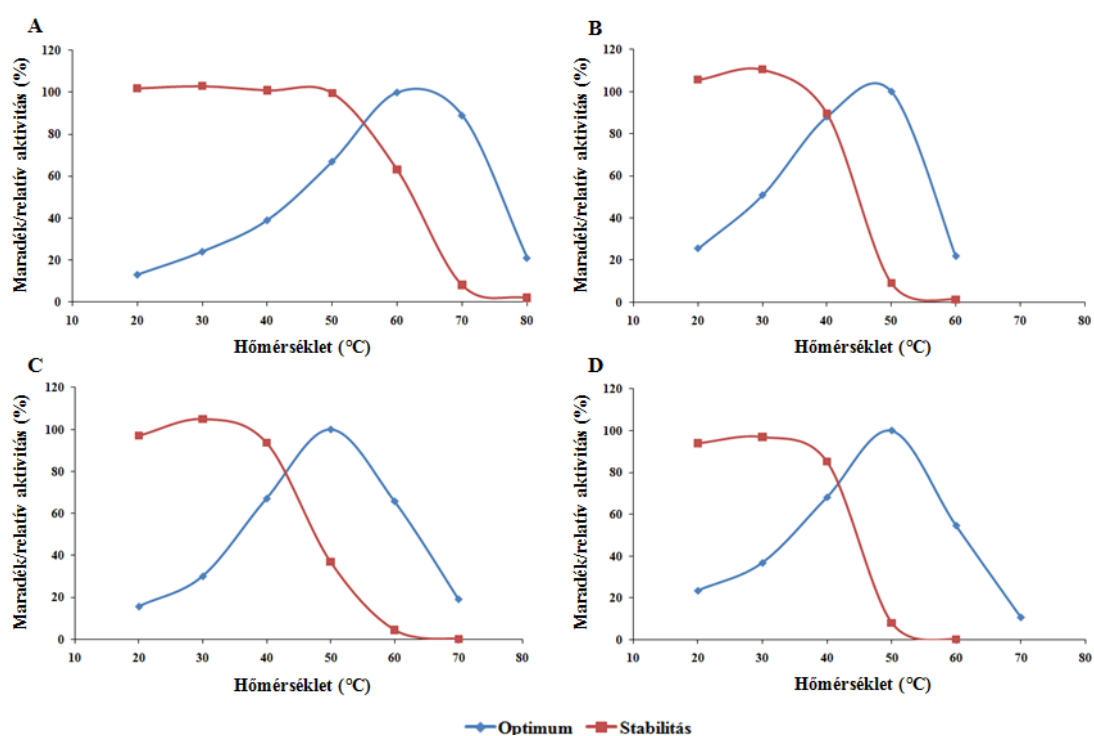
6. ábra. A *Rhizomucor miehei* (A), a *Mucor corticolus* (B), a *Rhizopus niveus* (C) és a *Gilbertella persicaria* (D) β -glükózidáz enzimek tisztulásának folyamata denaturáló gélelektroforézissel követve. 1: Sephadex G-100 után; 2: Macro-Prep HQ anioncserélő után; 3: Sephacryl S-200HR után; M: SeeBlue Plus 2 molekulaméret sztenderd (Invitrogen). A nyíl a tisztított β -glükózidáz enzimeket jelöli.

5.4. A β -glükózidáz enzimek biokémiai jellemzése

A tisztított *R. miehei* R8, *M. corticolus* M21, *Rh. niveus* Rh40 és *G. persicaria* G1 β -glükózidáz enzimek biokémiai jellemzését az enzim hidrolitikus aktivitására ható számos tényező figyelembe vételével végeztük. Az enzimaktivitás változását *p*NPG szubsztrát, valamint dinitro-szalicilsav és glükóz oxidáz/peroxidáz reagensek felhasználásával követtük.

5.4.1. Hőmérséklet optimum és stabilitás

Az enzimaktivitás hőmérsékleti optimumának és stabilitásának megállapítását 20 °C és 80 °C közötti hőmérsékleti tartományban végeztük. Az optimum méréseknél a maradék aktivitást százalékban adtuk meg, 100%-nak tekintve a legmagasabb értéket. A stabilitási vizsgálatoknál relatív aktivitást határoztunk meg, a viszonyítási alap az azonos hőmérsékleten 30 perces reakcióidővel mért érték volt. A vizsgált törzsek által termelt β -glükozidáz enzim hőmérsékleti optimumára eltérő eredményeket kaptunk (7. ábra); az optimum elérése után az enzimaktivitás gyorsan lecsökkent.



7. ábra. A *Rhizomucor miehei* (A), a *Mucor corticolus* (B), a *Rhizopus niveus* (C) és a *Gilbertella persicaria* (D) izolátumok által termelt β -glükozidáz enzimek hőmérséklet optimuma és stabilitása.

A termofil *R. miehei* izolátum által termelt β -glükozidáz enzim aktivitásának optimumát 65 °C körül állapítottuk meg (7A. ábra). Az optimális hőmérsékleten az enzim nem bizonyult stabilnak, ezért a későbbiekben 50 °C hőmérsékleten végeztük a méréseket. A vizsgált β -glükozidázok közül a *Rhizomucor* enzim termotoleránsnak mutatkozott.

A *M. corticolus*, a *Rh. niveus* és a *G. persicaria* enzimek hőmérsékleti optimumát egyaránt 50 °C körül határoztuk meg (7B, C, D. ábra). A *M. corticolus* és a *G. persicaria* enzimekkel összehasonlítva a *Rh. niveus* β -glükozidáz kissé magasabb hőmérsékleti stabilitást mutatott. Az előbbi két enzim 40 °C hőmérsékletig megőrzi stabilitását, viszont

50 °C felett az enzim már nem stabil, a 4 órás inkubáció alatt elveszítette aktivitását. A *Rh. niveus* esetében azonban 50 °C-on még 35% relatív enzimaktivitás értéket tapasztaltunk. Tisztított és jellemzett járomspórás gomba β -glükózidáz enzimeknél a *M. circinelloides* esetén 40 °C, míg a *Rh. oryzae* MIBA348 izolátumnál 50 °C hőmérsékleteken állapították meg az optimumot (Petruccioli és mtsi., 1999; Takii és mtsi., 2005); az enzimek 60 °C körüli inaktivációs hőmérséklettel rendelkeztek.

5.4.2. pH optimum és stabilitás

Az enzimaktivitások pH optimumát és stabilitását a pH 2,2 és pH 8,0 közötti tartományban vizsgáltuk.

A vizsgált izolátumok által termelt β -glükózidáz enzimek pH optimuma a pH 5,0 - 5,5 tartományba esett (7. táblázat). A tesztek során pH 7,5 értéken már nem tapasztaltunk enzimaktivitást egyik enzimmél sem. A *R. miehei* β -glükózidáz azonban alacsony pH értéken (pH 3,0) is megőrizte aktivitásának 20%-át, melyet a többi enzimmél nem tapasztaltunk. A legtöbb mikrobiális forrásból származó β -glükózidáz pH optimuma savas értékeken található, azonban aktivitásukat széles pH tartományban megőrzik. A tisztított *Rh. oryzae* β -glükózidáz pH optimumát 5,0, míg a *M. circinelloides* linamaráz enzimét pH 5,5 körül határozták meg (Takii és mtsi., 2005; Petruccioli és mtsi., 1999). Érdeemes megemlíteni, hogy a *R. miehei* YH-10 gombatorzs által termelt β -glükózidáz esetében pH 8,0 körüli optimumot regisztráltak (Yoshioka és Hayashida, 1980), mely nagymértékben eltér az általunk vizsgált *R. miehei* izolátumnál tapasztalt pH 5,0 értéktől.

7. táblázat. A különböző izolátumok által termelt β -glükózidáz enzimek pH optimuma és stabilitása.

	<i>Rhizomucor miehei</i>	<i>Mucor corticulus</i>	<i>Rhizopus niveus</i>	<i>Gilbertella persicaria</i>
Optimum	5,0	5,0	5,5	5,5
Stabilitás	4,0 - 6,0	4,5 - 7,0	4,5 - 7,0	4,5 - 7,0

A *Rhizomucor* β -glükózidáz pH 4,0 - 6,0, míg a többi vizsgált enzim pH 4,5 - 7,0 tartományban az azonos pH értéken, 30 perces reakcióidővel mért aktivitás 80 - 100%-át megőrizte, azaz stabilnak bizonyult (7. táblázat). Az eddig vizsgált járomspórás gomba β -glükózidázok 2,5 - 10,0 (*R. miehei* YH-10; Yoshioka és Hayashida, 1980), 3,0 - 7,1 (*M. circinelloides*; Petruccioli és mtsi., 1999), valamint 3,8 - 7,1 (*Rh. oryzae*; Takii és mtsi., 2005) tartományokon aktívak.

5.4.3. Szubsztrát specifitás vizsgálatok

A β -glükózidáz a β -(1 \rightarrow 4) glükózidos kötéseket hidrolizálja, ugyanakkor képes lehet a β -(1 \rightarrow 2), a β -(1 \rightarrow 3) és a β -(1 \rightarrow 6) kötések bontására is. Az enzimek szubsztrát specifitásának elemzésekor különböző kötéssel kapcsolódó oligo- és poliszacharidok, illetve aril-glikozidok jelenlétében vizsgáltuk az általunk tisztított *R. miehei*, *M. corticolus*, *Rh. niveus* és *G. persicaria* enzimek hidrolizáló képességét. A szubsztráttól függően az enzimek aktivitását a felszabadult glükóz (dinitro-szalicilsav vagy glükóz oxidáz/peroxidáz reagensek), vagy *p*-nitrofenol (405 nm) fotometriás mérésével állapítottuk meg. Kontrollként a cellobióz és a *p*NPG hidrolízisének tapasztalt optikai denzitás értéket vettük alapul.

A hidrolízis mértéke elsősorban a β -(1 \rightarrow 4) kötések tartalmazó szacharidokon bizonyult jelentősnek, azonban enyhe enzimaktivitást a β -(1 \rightarrow 2) kötések tartalmazó szoforóz esetében is sikerült kimutatnunk (8. táblázat). Egyik enzimnél sem volt mérhető aktivitás szacharóz, szalicin, trehalóz, amigdalinn, β -D-glükán, pusztulán (oldhatatlan β -glükán), pachyman és laminarin (oldható β -1-3 glükán) esetében.

8. táblázat. Különböző szubsztrátok *Rhizomucor miehei* (R8), *Mucor corticolus* (M21), *Rhizopus niveus* (Rh40) és *Gilbertella persicaria* (G1) β -glükózidázokkal végzett hidrolízisének mértéke.

Szubsztrát	Kötés típusa	Hidrolízis mértéke (%)			
		R8	M21	Rh40	G1
Szacharidok					
Cellobióz	β -(1 \rightarrow 4) glükozid	100	100	100	100
Laktóz	β -(1 \rightarrow 4) galaktozid	23	n. a.	n. a.	n. a.
Cellulóz	β -(1 \rightarrow 4) glükozid	2	1	5	3
Szoforóz	β -(1 \rightarrow 2) glükozid	6	7	17	15
Maltóz	α -(1 \rightarrow 4) glükozid	14	n. a.	n. a.	n. a.
Aril-glikozidok					
<i>p</i> -nitrofenil- β -D-glükopiranozid	β -glükozid	100	100	100	100
<i>p</i> -nitrofenil- α -D-glükopiranozid	α -glükozid	14	1	7	1
<i>p</i> -nitrofenil-N-acetil- β -D-glükózaminid	β -glükozid	14	0,2	0,4	0,2
<i>p</i> -nitrofenil- β -D-cellobiozid	β -glükozid	12	12	6	15
<i>p</i> -nitrofenil- α -D-galaktopiranozid	α -galaktozid	17	1	5	0,7
<i>p</i> -nitrofenil- β -D-galaktopiranozid	β -galaktozid	69	0	2	0

n. a.: nincs adat

A β -glükózidáz enzimek néhány képviselője a laktózt glükózra és galaktózra hidrolizálja, azaz galaktozidáz aktivitással is rendelkezik (Ishikawa és mtsi., 2005). Vizsgálataink során a *R. miehei* enzim számottevő mértékben hidrolizálta a β -galaktozid kötéssel rendelkező laktóz és *p*-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid szubsztrátokat is (8. táblázat). A *Mucor*, a *Rhizopus* és a *Gilbertella* enzimekkel egyedül a szintetikus *p*-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid szubsztrát hasítását teszteltük, ahol nem, vagy csak nagyon enyhe mértékben tapasztaltunk enzimaktivitást. Érdeemes megemlíteni, hogy a *R. miehei* β -glükózidáz kisebb mértékben az α -glükózid kötést tartalmazó maltóz és *p*-nitrofenil- α -D-glükopiranozid szubsztrátokat is képes hidrolizálni. Tudomásunk szerint eddig csak néhány, α -glükózid kötést is bontani képes gomba β -glükózidázt izoláltak; a *Botrytis cinerea* és az *A. oryzae* esetében találtak hasonló tulajdonsággal rendelkező enzimet (Gueguen és mtsi., 1995; Riou és mtsi., 1998). A β -glükózidáz enzimek N-acetilglükózaminidáz aktivitással is rendelkezhetnek (Mayer és mtsi., 2006), melynek vizsgálatát *p*-nitrofenil-N-acetil- β -D-glükózaminid alkalmazásával végeztük (Borooah és mtsi., 1961). A tesztek során a *R. miehei* és a *Rh. niveus* β -glükózidáz enzimeknél tapasztaltunk kismértékű hidrolízist.

Az eredmények alapján feltételezhető, hogy a *R. miehei* által termelt enzim a széles szubsztrát specifitású β -glükózidázok csoportjába tartozik. Az eddig izolált járomspórás gomba β -glükózidázok az enzimaktivitás meghatározásához általánosan alkalmazott cellobióz és a *p*NPG szubsztrátokat ugyancsak jól hidrolizálják (Yoshioka és Hayashida, 1980; Borgia és Mehnert, 1982; Petruccioli és mtsi., 1999; Takii és mtsi., 2005). További szubsztrátok bontását részletesen csak a *Rh. oryzae* MIBA348 és a *M. racemosus* izolátumok által termelt enzimeknél vizsgálták. Az általunk tesztelt szubsztrátok közül a *Rhizopus* enzim a szalicint és az amigdalint kis mértékben hidrolizálta, míg maltózon, laktózon és *p*-nitrofenil- α -D-glükopiranozidon nem volt mérhető enzimaktivitás (Takii és mtsi., 2005). A *Mucor* enzim vizsgálatakor nem mutattak ki hidrolízist maltóz, szacharóz, cellulóz, trahalóz és laktóz szacharid szubsztrátok alkalmazása esetén (Borgia és Mehnert, 1982). A cianogén glükózidok hasítását a *M. circinelloides* LU M40 járomspórás gombatorzs esetén jellemezték részletesen, ahol a prunazin, az amigdalín, a szambunigrin és a taxifillin szubsztrátokon figyeltek meg jelentős enzimaktivitást (Petruccioli és mtsi., 1999). Az általunk elvégzett tesztekben egyik vizsgált enzimmél sem tapasztaltunk számottevő hidrolízist amigdalín szubsztrát jelenlétében, ezért folyamatban van további cianogén glükózidok bontásának tanulmányozása.

5.4.4. Mono- és diszacharidok enzimaktivitásra gyakorolt hatása

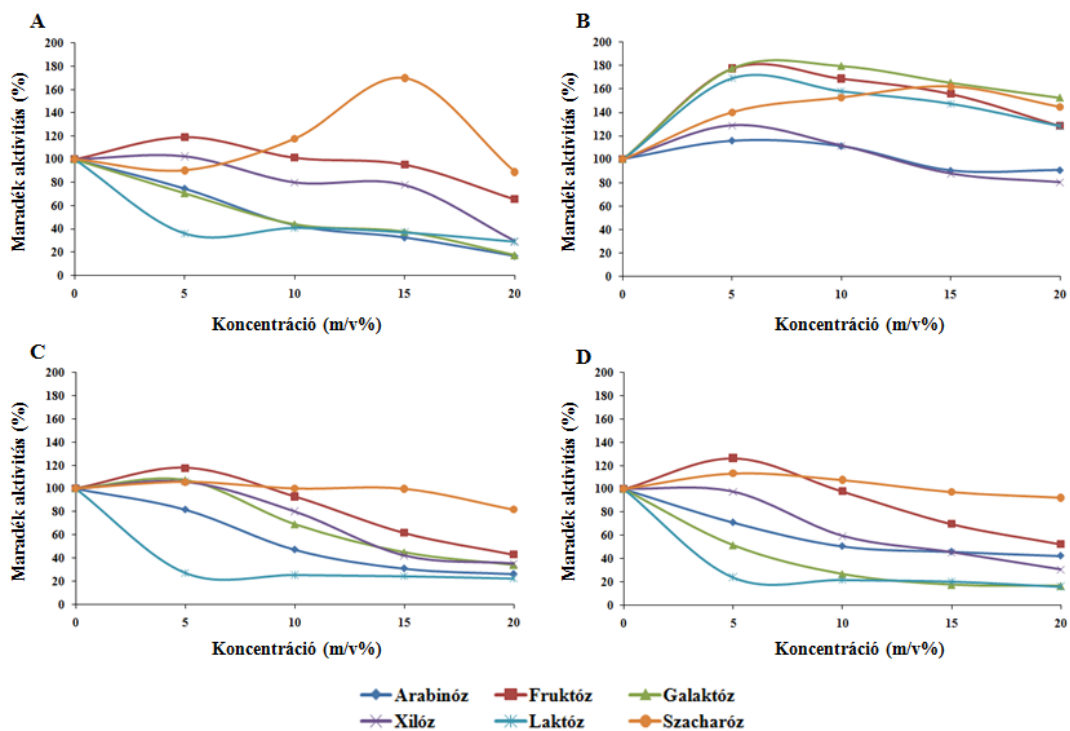
A különböző mono- és diszacharidok hidrolitikus aktivitásra gyakorolt hatását glükóz, laktóz, arabinóz, fruktóz, galaktóz, szacharóz és xilóz különböző koncentrációban történő alkalmazásával vizsgáltuk.

Ismert, hogy legtöbbször a hidrolízis fő termékeként keletkező glükóz nagyon erős kompetitív gátlást fejt ki a gomba β -glükozidáz enzimekre (Woodward és Wiseman, 1982; Kwon és mtsi., 1992; Watanabe és mtsi., 1992). A nyers kivonatokkal végzett vizsgálatoknál a glükóz már 1% (m/v%) koncentrációban is jelentősen gátolta az egyes izolátumok enzimjeit (5. táblázat). Az általunk tisztított és jellemzett enzimek nem, vagy csak meglehetősen alacsony glükóz toleranciát mutattak, közülük egyedül a *M. corticolus* β -glükozidáz emelhető ki, mely 20 mg ml⁻¹ glükóz jelenlétében kezdeti hidrolitikus aktivitásának 31%-át megőrizte. A glükózra számított gátlási állandó (K_i) *R. miehei* esetén 8 mM értéknek bizonyult, melyet 1,2 mM és 1,6 mM koncentrációjú pNPG szubsztrát alkalmazása mellett, a Dixon-féle eljárással határoztuk meg (Dixon, 1953). A többi vizsgált enzimmél a glükózra számított gátlási állandó meghatározása folyamatban van.

Az eddig izolált járomspórás gomba β -glükozidáz enzimeknél tudomásunk szerint nem határoztak meg glükózra gátlási állandót, azonban számos egyéb fonalas gomba enzimet már ebből a szempontból is jellemeztek. Irodalmi adatok szerint a legtöbb fonalas gomba β -glükozidáz glükóz gátlási állandója a 0,5 - 100 mM közötti tartományban található (Eyzaguirre és mtsi., 2005). Az *A. oryzae* esetén 2,9 mM (Langston és mtsi., 2006), a *Trichoderma reesei* enzimeknél 3,25 mM (Chauve és mtsi., 2010), míg a *Penicillium decumbens* gombánál 0,24 - 0,29 mM (Mamma és mtsi., 2004) gátlási állandót állapítottak meg. Az *A. niger* esetén pNPG szubsztráttal 2,7 mM, míg cellobióz alkalmazásával 3,4 mM gátlási állandót határoztak meg (Chauve és mtsi., 2010). Néhány biotechnológiai folyamat nagy glükóz toleranciájú enzimeket igényel, azonban csak kevés ilyen tulajdonsággal rendelkező β -glükozidáz ismert, melyek közül az *A. oryzae* által termelt HGT-BG enzimmél 1,36 M gátlási állandót határoztak meg (Riou és mtsi., 1998).

A laktóz, arabinóz, fruktóz, galaktóz, szacharóz és xilóz enzimaktivitásra gyakorolt hatásának vizsgálatokor az adott mono- vagy diszacharidot 5 - 20% (m/v%) koncentrációban alkalmaztuk (8. ábra). A *R. miehei*, *Rh. niveus* és *G. persicaria* enzimeknél az alacsony koncentrációban alkalmazott fruktóz enyhén fokozta, a szacharóz jelenléte viszont a *Rhizomucor* enzim aktivitását jelentősen, míg a *Rh. niveus* és *G. persicaria* enzimekét kisebb mértékben növelte. A laktóz már 5% (m/v%)

koncentrációban, az arabinóz és a galaktóz azonban csak nagyobb mennyiségben alkalmazva gátolta az enzimek hidrolitikus aktivitását. A laktóz esetén valószínűleg a szubsztrát hidrolízise során felszabadult glükóz gátolhat, melynek jellemzése további vizsgálatokat igényel, ugyanis a *Rh. niveus* és a *G. persicaria* enzimeknél nem tapasztaltunk aktivitást *p*-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid szubsztráton.



8. ábra. Mono- és diszacharidok *Rhizomucor miehei* (A), *Mucor corticolus* (B), *Rhizopus niveus* (C) és *Gilbertella persicaria* (D) izolátumok által termelt β -glükozidáz enzimekre gyakorolt hatása.

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 (8B. ábra). A szacharidok 20% (m/v%) koncentrációban történő alkalmazásakor sem csökken az enzimaktivitás a kontroll reakcióban mérhető érték alá. Az *A. oryzae* gomba által termelt β -glükozidáz (HGT-BG) enzimnél szintén nem tapasztaltak gátló hatást 15% (m/v%) fruktóz, galaktóz, szacharóz, laktóz, arabinóz és xilóz jelenlétében (Riou és mtsi., 1998). A fruktóz és szacharóz a nem redukáló cukrok közé tartozik. Aktivitást emelő hatásuk abból adódhat, hogy egy ellentétes irányú reakció is végbemegy, melyben az enzim a keletkező glükózt hozzákapcsolja a jelenlévő cukrokhoz, így csökken a termékátlás.

5.4.5. Lehetséges gátlószerek vizsgálata

Különböző fém sók (HgCl_2 , CuSO_4 , ZnCl_2 , MnCl_2 , CaCl_2 , MgSO_4 , NaCl , KCl , CoCl_2), fehérjeszerkezetre ható gátlószerek (NBS, DMSO, EDTA, SDS), valamint a glükonsav- δ -lakton β -glükozidáz aktivitásra gyakorolt hatását is megvizsgáltuk. A fém sók és reagensek tisztított *R. miehei*, *M. corticolus*, *Rh. niveus* és *G. persicaria* enzimek hidrolitikus aktivitására gyakorolt hatását a 9. táblázatban tüntettük fel.

A felhasznált fém sók és reagensek eltérő mértékben módosították a tisztított enzimek aktivitását. A Hg^{2+} és Cu^{2+} nagyon erős gátlószerek bizonyult, ezért feltehetőleg a megfelelő enzim működéshez tiol-csoport jelenléte is szükséges (Wallecha és Mishra, 2003). A tiol-csoport az aktív β -glükozidázok globuláris szerkezetének fenntartásában lehet nélkülözhetetlen (Riou és mtsi., 1998), azonban néhány gomba enzim esetén a katalízisben betöltött szerepe is jelentős (Mata és mtsi., 1993; Wallecha és Mishra, 2003). A reagensek közül erős gátlást az NBS jelenlétében tapasztaltunk, mely a triptofán katalízisben betöltött szerepét valószínűsíti (Riou és mtsi., 1998; Sharmila és mtsi., 1998). A Zn^{2+} és a Cu^{2+} részleges vagy teljes gátlása savas (Asp és Glu) és bázikus (Arg, Lys és His) aminosavak aktív centrumban történő jelenlétére is utalhat (Geiger és mtsi., 1999; Varrot és mtsi., 2000, Ng és mtsi., 2010). A Na^+ és a K^+ a *R. miehei* β -glükozidáz aktivitását enyhén fokozta, a többi vizsgált enzimet azonban jelentősen nem befolyásolta. A Ca^{2+} jelenléte számottevően nem befolyásolta egyik vizsgált enzim működését sem.

A kelátor vegyületek közé tartozó EDTA enyhe enzimaktivitást fokozó hatása azt valószínűsíti, hogy a *M. corticolus*, a *Rh. niveus* és a *G. persicaria* enzimek nem függenek aktív centrumban elhelyezkedő fémion kofaktortól. Hasonló tulajdonsággal rendelkeznek az *Ac. persicinum* (Pitson és mtsi., 1997), a *M. circinelloides* (Petruccioli és mtsi., 1999), a *Penicillium citrinum* (Ng és mtsi., 2010) és az *A. oryzae* (Riou és mtsi., 1998) β -glükozidázok is, melyeknél a kelátor vegyületek szintén nem csökkentették az enzimek aktivitását. Az általunk vizsgált *R. miehei* enzimet viszont enyhe mértékben gátolta az EDTA, továbbá a Mg^{2+} megközelítőleg 50%-kal növelte az enzim aktivitását, ami ezen kation enzimaktivitásában betöltött fontos szerepére utalhat. A Yoshioka és Hayashida (1980) által vizsgált *R. miehei* YH-10 β -glükozidáz aktivitását azonban a Mn^{2+} , a Zn^{2+} , a Cu^{2+} és a Ca^{2+} kationok mellett a Mg^{2+} sem befolyásolta számottevően. A Mn^{2+} egyedül az általunk vizsgált *Rh. niveus* enzim aktivitására volt jelentősebb serkentő hatással. A Mn^{2+} jelenléte az enzim stabilitását nem érinti, azonban a működésben fontos szerepet tölthet be (pl. a környezeti feltételeknek megfelelően szabályozhatja az enzim aktivitását). A Mn^{2+}

jelentős enzimaktivitást növelő hatását az *Aspergillus sojae*, az *A. oryzae* és a *Trichoderma harzianum* β -glükózidázok vizsgálatakor is megfigyelték (Kimura és mtsi., 1999; Riou és mtsi., 1998; Yun és mtsi., 2001).

9. táblázat. A fém sók és reagensek tisztított β -glükózidázok enzimaktivitására gyakorolt hatása.

Fém só vagy reagens	Maradék aktivitás (%)			
	<i>Rhizomucor miehei</i>	<i>Mucor corticolus</i>	<i>Rhizopus niveus</i>	<i>Gilbertella persicaria</i>
Kontroll	100	100	100	100
HgCl ₂	3	2	15	2
CuSO ₄	8	8	21	5
ZnCl ₂	10	35	71	63
MnCl ₂	100	112	129	101
CaCl ₂	101	101	107	108
MgSO ₄	148	109	113	103
NaCl	116	104	99	102
KCl	123	103	91	93
CoCl ₂	103	97	123	116
NBS	1	3	5	1
DMSO	98	71	109	106
EDTA	89	112	116	114
SDS	3	74	116	33

Az SDS a *R. miehei*, a *G. persicaria* és a *M. corticolus* β -glükózidázok aktivitását gátolta, míg a *Rh. niveus* izolátumnál 16%-kal fokozta a pNPG hidrolízist. Az SDS gátló hatása szintén tiol-csoport aktív centrumban történő jelenlétét feltételezi.

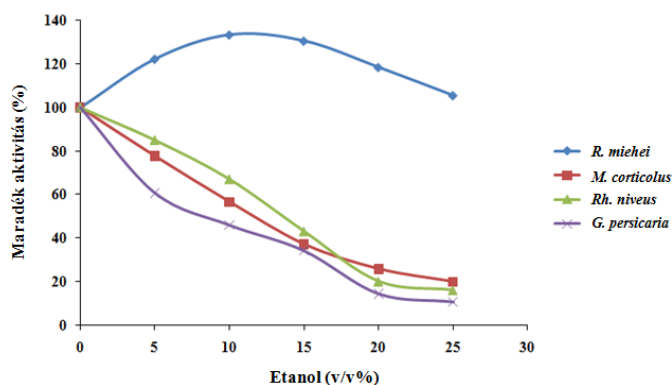
A legtöbb gomba β -glükózidáz a glükonsav- δ -lakton hatására nagyon érzékeny. Ez a kompetitív gátlószer a szőlőt fertőző gombák által (pl. *B. cinerea*) termelt glükóz oxidáz hatására glükózból keletkezik, mely a bogyártás során maximálisan 2 g liter⁻¹ koncentrációban fordulhat elő (Dubourdieu és mtsi., 1985). Egyéb gomba β -glükózidázokhoz hasonlóan (Rapp, 1989; Copa-Patino és Broda, 1994; Pitson és mtsi., 1997; Petruccioli és mtsi., 1999), a glükonsav- δ -lakton már alacsony koncentrációban (1 g liter⁻¹) alkalmazva is nagymértékben gátolta az általunk vizsgált enzimek aktivitását.

5.4.6. Alkoholok enzimaktivitására gyakorolt hatása

A nyers kivonatokkal elvégzett vizsgálatok eredményeiből kiindulva, különböző alkoholok enzimaktivitására gyakorolt hatását a tisztított *R. miehei*, *M. corticolus*, *Rh. niveus* és *G. persicaria* β -glükózidáz enzimekkel is tanulmányoztuk. Az enzimaktivitás változását különböző koncentrációjú etanol hozzáadásával vizsgáltuk, továbbá a *Rh. niveus* és a *G. persicaria* enzimek esetében a metanol és az izopropanol hatását is teszteltük.

A *R. miehei* által termelt β -glükózidáz aktivitását a nyers kivonattal folytatott vizsgálatokban tapasztaltnál lényegesen nagyobb mértékben növelte a hozzáadott etanol; az enzimaktivásban 30% emelkedés figyelhető meg 10% (v/v%) etanol hatására (9. ábra). Hasonló hatást tapasztaltak egy *A. niger* törzs által termelt β -glükózidáz enzim esetében is (Yan és Lin, 1997). A többi általunk vizsgált izolátumnál már 5% (v/v%) etanol jelenlétében is enzimaktivitás csökkenés figyelhető meg. Az etanol 25% (v/v%) koncentrációban a *R. miehei* β -glükózidáz aktivitását 5%-kal növelte, azonban a többi vizsgált enzim esetén mindössze a kontroll aktivitás érték 15 - 25%-át tapasztaltuk.

Az etanol jelenlétében megfigyelt enzimaktivitás emelkedést valószínűleg a felszabadult glükóz mennyiségének, így gátló hatásának csökkenése okozza, ami az adott enzim glikozil-transzferáz aktivitását feltételezi (Pemberton és mtsi., 1980). A *Fusarium oxysporum* gomba által termelt enzim hidrolitikus aktivitása szintén jelentős emelkedést mutatott bizonyos alkoholok jelenlétében, továbbá a reakcióelegyek vizsgálata során különböző alkil-glükózid vegyületek keletkezését is kimutatták (Christakopoulos és mtsi., 1994a). Etanol hatására történő enzimaktivitás emelkedést tapasztaltak a *Hanseniaspora vineae* (Vasserot és mtsi., 1989), a *Dekkera intermedia* (Blondin és mtsi., 1983) és a *Candida molischiana* (Gonde és mtsi., 1985) által termelt β -glükózidázok esetében is.



9. ábra. Különböző koncentrációjú etanol hatása a homogenitásig tisztított β -glükózidázok enzimaktivitására.

A *G. persicaria* enzimmél metanol 5% (v/v%) koncentrációban történő alkalmazásakor enyhe (5%), míg a *Rh. niveus* β -glükózidáz esetében ennél lényegesen nagyobb (15%) emelkedést tapasztaltunk a hidrolitikus aktivitásban. Az izopropanol a vizsgált enzimek aktivitását nagymértékben csökkentette. Folyamatban van a tisztított *R. miehei* és *M. corticolus* β -glükózidáz aktivitásának metanol és izopropanol jelenlétében

történő tanulmányozása, illetve további alkoholok enzimaktivitásra gyakorolt hatásának vizsgálata is.

5.4.7. Az enzimek jellemző kinetikai paramétereit

A tisztított β -glükózidázok jellemző kinetikai paramétereinek megállapításakor az enzim-szubsztrát komplex bomlási sebességi állandójának értékét (Michaelis-Menten állandó, K_m), valamint az ehhez szükséges reakció sebességét határoztuk meg (V_{max}), melyhez *p*NPG szubsztátot alkalmaztunk. A vizsgálatokat optimális feltételek mellett (30 perc, pH 5,0, 50 °C) végeztük; a mérési eredmények megjelenítéséhez a Lineweaver-Burk-féle reciprok ábrázolást alkalmaztuk (Lineweaver és Burk, 1934). A különböző izolátumok által termelt enzimek kinetikai paramétereiben jelentős eltéréseket tapasztaltunk (10. táblázat).

10. táblázat. A különböző járomspórás gomba izolátumok által termelt β -glükózidázok *p*NPG szubsztátra vonatkozó kinetikai paramétereit.

Izolátum	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol ml}^{-1} \text{perc}^{-1}$)	V_{max}/K_m
<i>Rizomucor miehei</i>	0,12	5,15	42,9
<i>Mucor corticolus</i>	0,22	5,58	25,4
<i>Rhizopus niveus</i>	0,35	4,05	11,6
<i>Gilbertella persicaria</i>	1,84	2,72	1,5

A legalacsonyabb K_m értéket a *R. miehei* β -glükózidáz mutatta (0,12 mM), vagyis itt tud az enzim-szubsztrát komplex a legstabilabban megmaradni, azonban a magas reakciósebesség miatt (V_{max} : 5,15 $\mu\text{mol ml}^{-1} \text{perc}^{-1}$) ez az enzim hidrolizálta a leghatékonyabban a *p*NPG szubsztátot (legmagasabb V_{max}/K_m arány). Hasonlóan alacsony K_m értékkel rendelkező enzimeket írtak le a *F. oxysporum* (0,093 mM; Christakopoulos és mtsi., 1994a), a *T. reesei* (0,09 mM; Korotkova és mtsi., 2009), a *Penicillium brasilianum* (0,09 mM; Krogh és mtsi., 2010) fonalas-, valamint a *Pichia pastoris* (0,12 mM; Turan és Zheng, 2005) és a *Saccharomyces cerevisiae* (0,095 mM; Woodward és Wiseman, 1982) élesztőgombáknál is. Érdeemes megemlíteni, hogy a *R. miehei* esetében, egy korábbi tanulmányban, ettől jelentősen eltérő, 0,58 mM K_m értéket állapítottak meg szintén *p*NPG szubsztáton (Woodward és Wiseman, 1982). A leggyorsabb hidrolízist a *M. corticolus* enzim esetén tapasztaltuk (V_{max} : 5,58 $\mu\text{mol ml}^{-1} \text{perc}^{-1}$). A vizsgált enzimek közül a *G. persicaria* β -glükózidáz mutatta a legmagasabb K_m

értéket (1,84 mM), vagyis az enzim-szubsztrát komplex stabilitás itt a legkisebb. Hasonló K_m értékkel rendelkező enzimet írtak le az *Aspergillus wentii* (1,6 mM; Srivastava és mtsi., 1984) gombánál is. A legalacsonyabb reakciósebesség értéket ugyancsak a *G. persicaria* β -glükózidáz esetén tapasztaltuk, így a legalacsonyabb V_{max}/K_m értékkel is ez az enzim rendelkezett.

Az eddig tanulmányozott járomspórás gomba β -glükózidázok közül a *M. racemosus* enzimmél vizsgáltak még *p*NPG szubsztrátra vonatkozó kinetikai jellemzőket, ahol a K_m 0,31 mM, míg a V_{max} 8,7 nmol perc⁻¹ μ g⁻¹ értéknek bizonyult (Borgia és Mehnert, 1982). A *M. corticolus* és a *Rh. niveus* enzimekhez közeli K_m értékkel rendelkező β -glükózidázt izoláltak a *Trichoderma harzianum* C-4 (0,2 mM; Yun és mtsi., 2001), az *Ac. persicinum* (0,3 mM; Pitson és mtsi., 1997), az *A. oryzae* (0,29 mM; Langston és mtsi., 2006), valamint az *A. aculeatus* és az *Aspergillus japonicus* (0,23 mM és 0,2 mM; Decker és mtsi., 2000) gombák esetén is. Az irodalmi adatokkal összehasonlítva feltételezhető, hogy általunk izolált *R. miehei*, *M. corticolus* és *Rh. niveus* β -glükózidázok meglehetősen jó affinitással kötődnek a *p*NPG szubsztráthoz. A tisztított enzimekre cellobióz szubsztráton jellemző kinetikai paraméterek megállapítása folyamatban van.

5.5. A β -glükózidáz enzimek szintetikus aktivitásának vizsgálata

A β -glükózidázok bizonyos körülmények között szintetikus aktivitásra is képesek, ami különböző vegyületek, például oligoszacharidok és glikokonjugátumok szintézisét teszi lehetővé (Legler, 1993; Wymer és Toone, 2000). Ezt a szintetikus aktivitást számos biotechnológiai folyamatban kihasználják (Bhatia és mtsi., 2002). A termékképződést több faktor befolyásolhatja (pl.: kiindulási szubsztrát koncentráció, pH, hőmérséklet; Plou és mtsi., 2007), így a cellobióz szubsztráton végbemenő szintetikus reakció optimalizálását ezen paraméterek figyelembe vételével végeztük. Az eddigi vizsgálataink egyedül a *R. miehei* R8 és a *M. corticolus* M21 tisztított β -glükózidáz enzimek szintetikus aktivitásának tanulmányozására terjedtek ki részletesen. Az enzimaktivitás jellemzésekor a különböző kísérletek alkalmával mindig csak egy paramétert változtattunk.

Az oligoszacharidok és glikokonjugátumok HPLC technika segítségével történő meghatározásánál minden méréskor az alkalmazott oszlop gyártója által javasolt eluens arányokkal dolgoztunk (YMC; <http://www.ymc-europe.com/ymceurope/>). Néhány mérés során a kapott szintetikus termék azonosítását, valamint mennyiségének meghatározását a megfelelő sztenderd vegyület hiányában nem tudtuk elvégezni. Ezekben az esetekben a

keletkezett termék a sztenderd vegyületekétől eltérő csúcsként jelent meg a kromatogramon, azonosításukat irodalmi adatok alapján, csak feltételesen tudtuk megvalósítani. A retenciós idő növekedésével a kromatogramokon észlelhető csúcsok szélesebbek és laposabbak, azonban a keletkezett oligoszacharidok mennyisége még a kiértékelhető tartományon belül maradt.

5.5.1. Szintetikus aktivitás vizsgálatok cellobióz szubsztráton

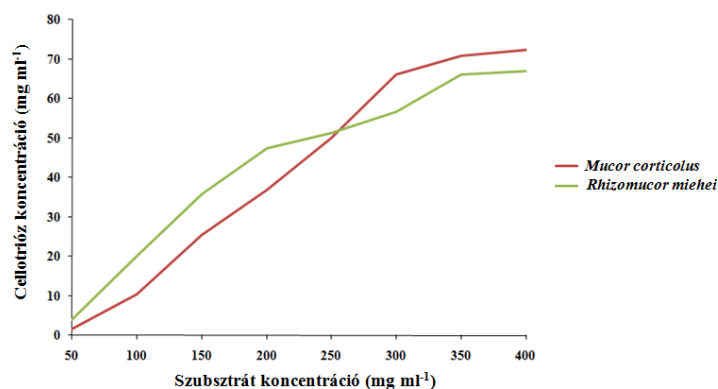
Az eredmények kiértékeléséhez a különböző reakcióelegyekben előforduló mono-, di-, illetve oligoszacharidok kalibrációs egyeneseinek elkészítését tartottuk elsődlegesnek. A kalibrációt kilenc pont felvételével készítettük el, amelyekben a sztenderd vegyületek mennyisége és a detektált jel lineáris összefüggést mutattak. A glükóz, cellobióz, cellotrióz és cellotetraóz retenciós ideje rendre 6,6, 7,9, 9,9 és 12,8 perc volt. Az egyenes egyenlete glükózra $y = 0,0193158x - 513,214$, cellobiózra $y = 0,169305x - 511,228$, cellotriózra $y = 0,0252691x - 1099,04$, valamint cellotetraózra $y = 0,0234071x - 1284,17$. A kalibrációs pontok illeszkedésének pontossága glükózra 99,79%, cellobiózra 99,81%, cellotriózra 99,81% és cellotetraózra 98,74%.

A kiindulási cellobióz szubsztrát koncentráció vizsgálata

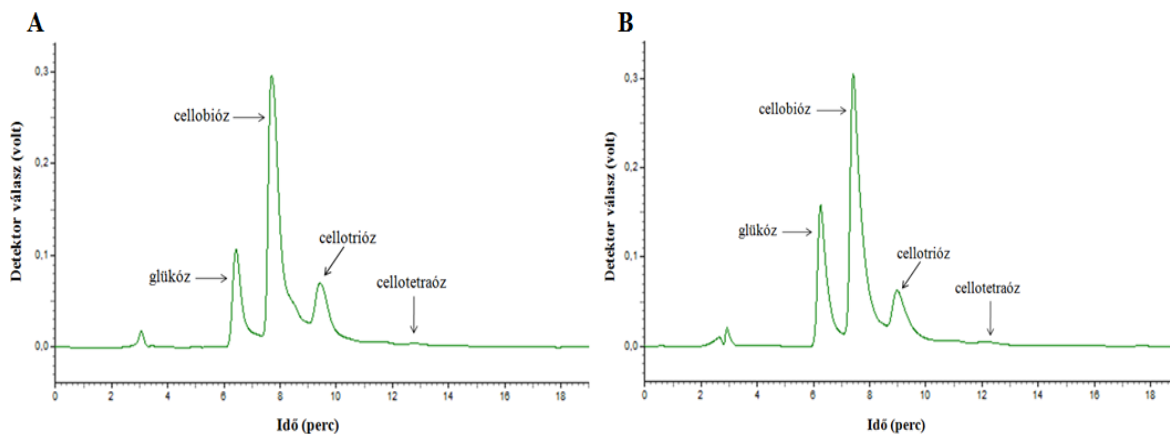
A kiindulási cellobióz koncentráció az oligoszacharidok szintézise szempontjából nagy jelentőséggel bír (Christakopoulos és mtsi., 1994b), ezért a cellobióz koncentráció változtatásával megvizsgáltuk az alkalmazott szubsztrát mennyiségének transzglükozilációra gyakorolt hatását. A hidrolitikus aktivitás vizsgálatok megállapított optimális hőmérsékleten (50 °C), 24 órán át végeztük az inkubálást, majd meghatároztuk a szintézis eredményeként keletkezett cellotrióz pontos mennyiségét az egyes reakcióelegyekben.

Diszacharid szubsztrát alkalmazásakor rendszerint trióz vegyület keletkezik elsőként, melynek gyors szintézisét feltételezhetően az akceptor diszacharid magas arányú jelenléte okozza (Berger és mtsi., 1995; Stevenson és mtsi., 1996). Az általunk végzett vizsgálatoknál a keletkezett cellotrióz mennyisége a donorként és akceptorként egyaránt funkcionáló cellobióz mennyiségével egyenes arányban növekedett. Magas szubsztrát koncentráció esetén (350 és 400 mg ml⁻¹) azonban már közel azonos cellotrióz mennyiségeket kaptunk, ezért a további vizsgálatokban 350 mg ml⁻¹ kiindulási cellobióz koncentrációt alkalmaztunk. A *F. oxysporum* (Christakopoulos és mtsi., 1994b), az *A.*

niger (Yan és Liao, 1998), a *Sclerotinia sclerotiorum* (Smaali és mtsi., 2007) és a *Stachybotrys microbispora* (Saibi és mtsi., 2007) gombák β -glükózidázainál szintén magas termék koncentrációt tapasztaltak nagy mennyiségű cellobióz reakcióelegyben történő jelenlétében. A 10. ábrán a kiindulási szubsztrát (cellobióz) koncentrációk függvényében tüntettük fel a *R. miehei* és a *M. corticolus* β -glükózidáz enzimek által szintetizált cellotrióz mennyiségeket. Magas kiindulási cellobióz koncentráció alkalmazásakor (300 mg ml^{-1} felett) kevés mennyiségű cellotetraóz jelenlétét is kimutattuk a reakcióelegyekben (11. ábra).



10. ábra. Növekvő kiindulási szubsztrát (cellobióz) koncentrációk alkalmazása esetén kapott cellotrióz mennyiségek.



11. ábra. A *Rhizomucor miehei* (A) és a *Mucor corticolus* (B) β -glükózidázzal végzett reakció termékeinek HPLC analízise 350 mg ml^{-1} szubsztrát koncentráció alkalmazásával (24 óras, 50°C -on történő inkubáció utáni adatok).

A diszacharid szubsztrát alacsony koncentrációban történő alkalmazásakor a keletkezett oligoszacharidok mennyisége minimális, ezért a diszacharid hidrolízis jellemzésével kapcsolatos vizsgálatok jól elvégezhetőek az ilyen rendszerekben (Santos és

mtsi., 1998; Ladero és mtsi., 2001; Bruins és mtsi., 2003). A szintézis vizsgálatakor alkalmazott magas szubsztrát koncentráció esetén azonban a β -glükozidáz mindkét aktivitását figyelembe kell venni (Gusakov és mtsi., 1984; Calsavara és mtsi., 1999).

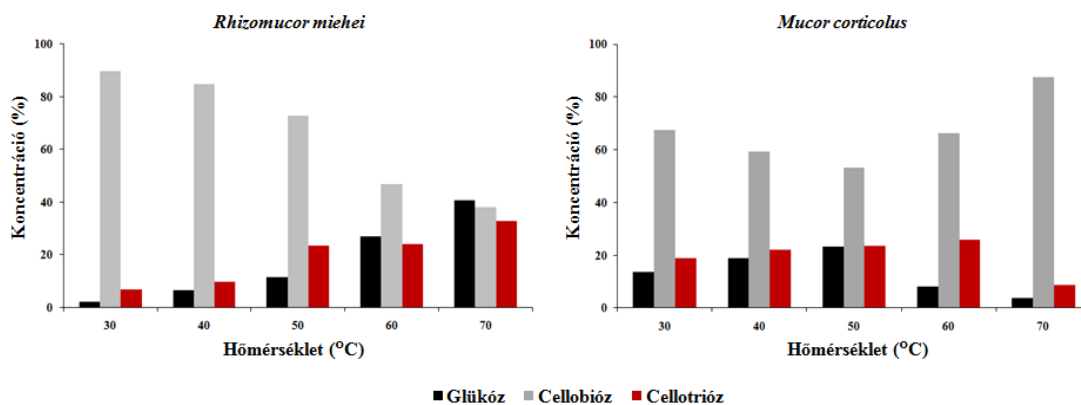
A szintézis vizsgálata a hőmérséklet és az inkubációs idő függvényében

A szintetikus aktivitás hőmérsékleti optimumának meghatározásához a vizsgálatokat nagy koncentrációban (350 mg ml^{-1}) alkalmazott cellobióz szubsztrát mellett végeztük. A reakcióelegyeket 30, 40, 50, 60 és 70 °C-on 12 és 24 órán át inkubáltuk, majd az inkubációs idő letelte után megvizsgáltuk a keletkezett termékek HPLC mintázatát, valamint meghatároztuk az egymáshoz viszonyított megoszlásukat. Érdeemes megemlíteni, hogy a szintetikus reakció mindkét enzim esetében tágabb hőmérsékleti tőrésrel rendelkezett, ugyanis mindegyik tartományon 24 óra inkubáció után lényegesen nagyobb termék koncentrációt sikerült meghatározni, mint 12 óra elteltével. A magas hőmérsékleten tapasztalt hőstabilitás feltételezhetően a nagy koncentrációban alkalmazott cellobióz szubsztrátnak köszönhető, ami jelentős hőinaktiváció elleni védelmet biztosíthat (5.2. fejezet; Harnpicharnchai és mtsi., 2009). Az enzimek hidrolitikus aktivitásának következtében változó mennyiségű glükóz is jelen volt a reakcióelegyekben.

A legnagyobb termék koncentrációt *R. miehei* β -glükozidáz esetében 70 °C, míg *M. corticolus* enzimnél 60 °C hőmérsékleten mértük (12. ábra). A *R. miehei* enzimnél 60 °C körül van egyensúlyban a hidrolitikus és transzglükozidáz aktivitás. Az 50 °C-on történő inkubálás alatt keletkezett cellotrióz mennyisége közel kétszerese a glükózénak, ami a reakció szintézis irányába történő eltolódására utal ezen a hőmérsékleten. A transzglükozidáz aktivitás jellemzésekor ezután minden esetben az 50 °C-os tartományban végeztük az inkubálást. A glükóz mennyiségének emelkedése magasabb hőmérsékleteken a reakció hidrolízis felé történő eltolódásának eredménye. A *M. corticolus* β -glükozidáz enzimnél a két aktivitás egyensúlyi állapota 50 °C körül figyelhető meg, azonban magasabb hőmérsékleten itt inkább a szintézis felé tolódik el a reakció. A keletkezett cellotrióz mennyisége 50 °C és 60 °C tartományokban hasonló mértékű, viszont 70 °C-on már jelentősen lecsökken.

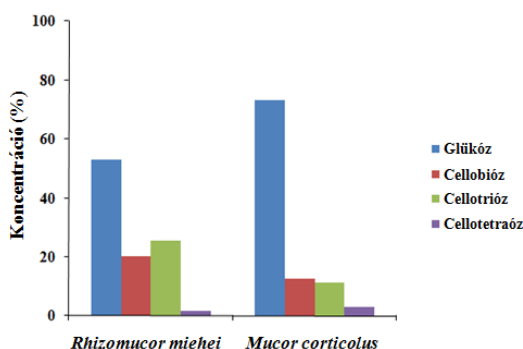
Cellotetraóz megjelenését a *R. miehei* enzimnél 50 - 70 °C, míg a *M. corticolus* enzimnél 40 - 60 °C hőmérsékleteken, 24 órán át történő inkubálás után figyeltük meg, azonban a nagyon alacsony koncentráció miatt a termékek százalékos megoszlásának kiszámításakor ezen oligoszacharidot nem vettük figyelembe. A *S. microbispora* β -glükozidáz esetén ugyancsak 24 óra elteltével tapasztaltak cellotetraóz koncentráció

emelkedést (Saibi és mtsi., 2007), melynél a cellobióz hidrolízis eredményeként felszabadult glükóz magas koncentrációja serkentette a cellobióz cellotriózzá, majd cellotetraózzá történő gyors átalakulását. A kapott eredmények alapján az általunk vizsgált cellotetraóz szintézis valószínűleg hasonló módon, transzglükozilációval történik, nem pedig két cellobióz egység összekapcsolásával. A transzglükoziláció feltételezett mechanizmusát az „Irodalmi áttekintés” című fejezetben található 2. ábrán szemléltettük.



12. ábra. A *Rhizomucor miehei* és a *Mucor corticolus* β -glükozidázzal végzett reakció termékeinek százalékos megoszlása a különböző hőmérsékleteken inkubált reakcióelegyekben (24 órás inkubáció utáni adatok).

A reakcióelegyekben található szacharidok mennyiségének vizsgálatát hét napig, 50 °C hőmérsékleten történő inkubálás után is elvégeztük, melyben mindkét enzimnél a glükóz magas arányban jelenik meg, ami azt jelzi, hogy a reakció hosszabb inkubációs idő elteltével a hidrolízis irányába tolódik el. A keletkezett termékek megoszlásának adatait a 13. ábra szemlélteti.



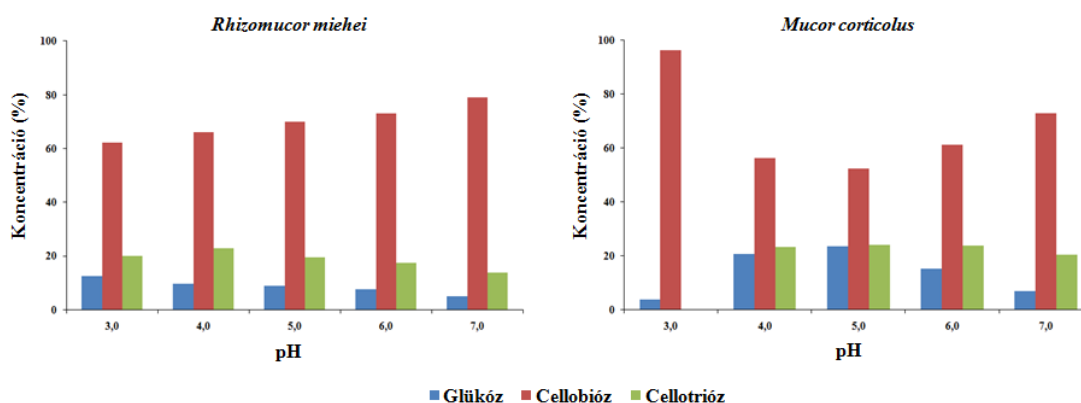
13. ábra. A *Rhizomucor miehei* és a *Mucor corticolus* β -glükozidázzal végzett reakció termékeinek százalékos megoszlása a reakcióelegyekben egy hetes inkubáció után.

Az inkubációs idő, valamint a kezdeti cellobióz koncentráció növelésével az eddig részletesen vizsgált egyéb gomba β -glükozidázok esetén is emelkedő glükóz koncentráció

figyehető meg (Christakopoulos és mtsi., 1994b; Yan és Liao, 1998; Smaali és mtsi., 2004a). A hidrolitikus aktivitás eredményeként valószínűleg a már előzőleg keletkezett oligoszacharidok mennyiségét is csökkenti az enzim. A *R. miehei* β -glükózidázzal elvégzett további vizsgálatokban megállapítottuk, hogy a szintézis folyamán képződő tri- és tetraszacharidok mennyisége 50 °C-on körülbelül 24 - 72 órán át tartó inkubálás után éri el maximumát. A 72 óra elteltével mért legmagasabb koncentráció értékek cellotriózra 86 mg ml⁻¹, cellotetraózra pedig 4,1 mg ml⁻¹.

A szintézis vizsgálata különböző pH tartományokon

Az oligoszacharid szintézis pH optimumának megállapításához eltérő pH értékre pufferelt reakcióelegyet készítettünk, melyekben a cellobióz szubsztrátot magas koncentrációban alkalmaztuk. Az inkubációs idő letelte után mindkét enzim esetén a pH 4,0 és 6,0 tartományok közé pufferelt reakcióelegyekben keletkezett a legtöbb cellotrióz, tehát a transzglükózidáz aktivitás optimuma ebben a pH tartományban feltételezhető (14. ábra). A termékek százalékos megoszlásának kiszámításakor a nagyon alacsony koncentrációban jelen levő cellotetraózt ugyancsak nem vettük figyelembe. A *R. miehei* β -glükózidáz meglehetősen alacsony pH értéken is jelentős szintetikus aktivitást mutat, az optimum görbéje tágabb a *M. corticolus* enzim esetében megfigyeltnél. A *M. corticolus* enzimmél meghatározott pH optimum görbéhez hasonlólt tapasztaltak a *S. sclerotiorum* β -glükózidáz enzimmal elvégzett vizsgálatokban is (Smaali és mtsi., 2007).



14. ábra. A *Rhizomucor miehei* és a *Mucor corticolus* β -glükózidáz által katalizált reakciók termékeinek százalékos megoszlása a különböző pH tartományokon inkubált reakcióelegyekben.

A gomba β -glükózidázok oligoszacharid szintézisét általában az optimális pH 5,0 - 6,0 tartományra pufferelt közegben tanulmányozzák (Christakopoulos és mtsi., 1994b; Yan és Liao, 1998; Kono és mtsi., 1999; Smaali és mtsi., 2004a, 2004b; Saibi és mtsi., 2007). A

hidrolitikus aktivitás tekintetében a két enzim szintén azonos pH optimummal rendelkezett (5.4.2. fejezet, 7. táblázat), azonban a *R. miehei* alacsonyabb pH tartományokon stabilabbnak bizonyult. A szintézis vizsgálatokor alkalmazott hosszabb inkubációs időt figyelembe véve feltételezhető, hogy a *R. miehei* enzimnél pH 3,0 értéken tapasztalt magasabb termék koncentráció ennek a tulajdonságnak tudható be.

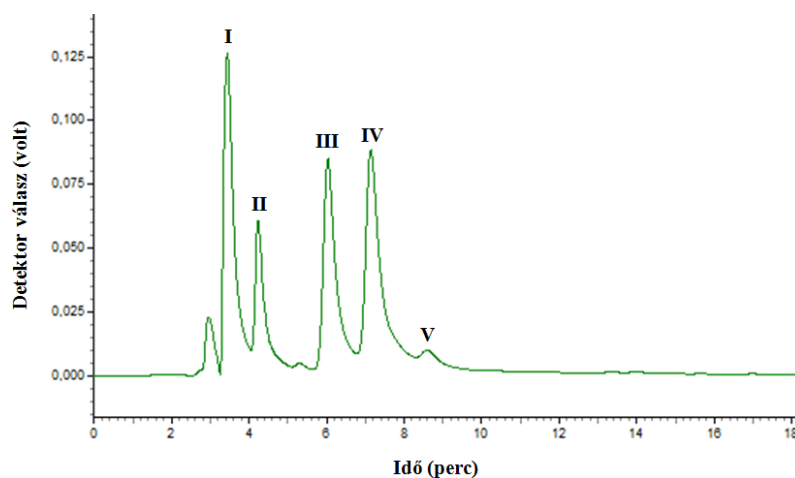
5.5.2. Szintetikus aktivitás vizsgálatok etanol jelenlétében

A β -glükózidázok különböző alkil-glükózidok szintézisét is katalizálhatják (Christakopoulos és mtsi., 1994a; Smaali és mtsi., 2007; Ito és mtsi., 2007), melyek könnyen lebontható, kitűnő emulgeáló, nedvesítő, és jó antimikrobiális tulajdonságokkal rendelkező felületaktív vegyületek (Ismail és mtsi., 1999). Az általunk vizsgált *R. miehei* β -glükózidáz hidrolitikus aktivitása jelentős mértékű növekedést mutatott etanol jelenlétében (5.4.6. fejezet, 9. ábra), mely valószínűleg az enzim nagyfokú transzglükózidáz aktivitásának tudható be (Pemberton és mtsi., 1980). Feltételezhető, hogy az etanol glükóz akceptorként viselkedik, így csökkentve a szabad glükóz mennyiségét, ezzel annak hidrolitikus aktivitásra gyakorolt gátló hatását. A szintetikus aktivitás vizsgálatát cellobiózt, vagy glükózt tartalmazó, etanollal kiegészített reakcióelegyekben, *R. miehei* β -glükózidáz enzimmel végeztük. Kizárólag etanolt magában foglaló kontrol minta vizsgálata során az etanol retenciós idejét 3,4 percnél állapítottuk meg.

A reakciók végtermékeinek elemzésekor, 4,2 perc retenciós időnél egy új, feltételezhetően szintetikus vegyület megjelenését tapasztaltuk a cellobiózt tartalmazó reakcióelegyekben, ahol kevés mennyiségű cellotrióz jelenlétét is kimutattuk (15. ábra; az etanol csúcsot „I”, a feltételezett szintetikus vegyületet „II”, a glükózt „III”, a cellobiózt „IV”, a cellotriózt pedig „V” jellel tüntettük fel a kromatogramokon). A reakciót 90 mM koncentrációjú *p*NPG glükóz donor és 30% etanol akceptor jelenlétében is megvizsgáltuk, ahol ugyancsak 4,2 perc retenciós időnél mutattuk ki termék megjelenését. A keletkezett szintetikus vegyületet a megfelelő sztenderd hiánya miatt pontosan nem tudtuk azonosítani, viszont irodalmi adatok alapján etil-glükózidnak feltételezzük (Christakopoulos és mtsi., 1994a).

A szintézis a glükóz szubsztrátot és akceptor etanolt tartalmazó reakcióelegyekben is végbemehet (Plou és mtsi., 2007), azonban termék megjelenését ezen körülmények között nem sikerült kimutatnunk. A kapott eredmények ismeretében további vizsgálatokat tervezünk elvégezni, ahol feltételezhetően az akceptor és a donor vegyületek

koncentrációjának emelésével, valamint a reakcióidő jelentős meghosszabbításával várható majd szintetikus termék keletkezése.



15. ábra. A *Rhizomucor miehei* β -glükozidáz által katalizált reakciók termékeinek HPLC mintázata 100 mg ml⁻¹ koncentrációjú cellobióz szubsztráton, 30% etanol jelenlétében.

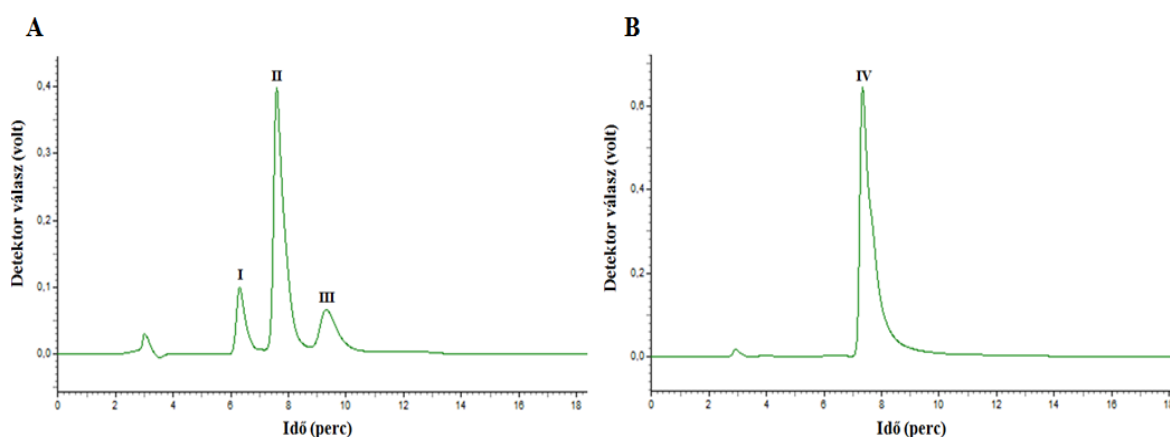
I: etanol; II: feltételezett szintetikus vegyület; III: glükóz; IV: cellobióz; V: cellotrióz

5.5.3. Szintetikus aktivitás vizsgálatok laktóz szubsztráton

A β -glükozidázok a laktóz transzglükozilációjával (Boon és mtsi., 1998; Bruins és mtsi., 2003), vagy transzgalaktozilációjával (Ishikawa és mtsi., 2005) különböző oligoszacharidok szintézisét is katalizálhatják. Számos transzgalaktozil-oligoszacharid prebiotikus tulajdonsággal rendelkezik (Ito és mtsi., 1990), így élelmiszeripari adalékanyagként történő alkalmazásuk kiemelkedő előnyt jelenthet (Sako és mtsi., 1999; Rabiú és mtsi., 2001).

A laktózon történő szintézis kimutatásának érdekében különböző mennyiségű, donorként és akzeptorként egyaránt funkcionáló laktóz szubsztrát jelenlétében inkubáltuk az enzimet. Az eredmények megfelelő kiértékeléséhez elkészítettük a laktóz kalibrációs egyenesét, melynek egyenlete: $y = 0,0176975x - 655,678$. A kalibrációs pontok illeszkedésének pontossága 99,63%. A laktóz retenciós ideje 7,9 perc, ami megegyezik a cellobióz retenciós idejével, azonban ilyen szubsztrátot ezekben a kísérletekben egyik reakcióelegy sem tartalmazott. A hidrolitikus aktivitás eredményeként keletkező galaktóz kalibrációját is elvégeztük. A galaktóz retenciós ideje egybeesik a glükózéval (6,3 perc), ennek következtében a hidrolízis során keletkező monoszacharidokat ezzel a módszerrel nem tudtuk elkülöníteni.

A *R. miehei* β -glükózidáz esetén a galaktóz/glükóz és a laktóz mellett, 9,3 perc retenciós időnél, egy feltételezhetően szintetikus oligoszacharid megjelenését mutattuk ki a reakcióelegyből (16A. ábra). A galaktóz/glükóz csúcsot „I” jellel, a feltételezett szintetikus vegyületet „III” jellel láttuk el a kromatogramon. A szintetikus vegyület valószínűleg egy triszacharid, amely a reakcióelegyben mérhető összes vegyület 18,4%-át adta. A mérések alapján csak a keletkezett szintetikus termék arányát tudjuk pontosan megadni, a glükóz, a galaktóz és a laktóz mennyiségét csak becsülni tudjuk.



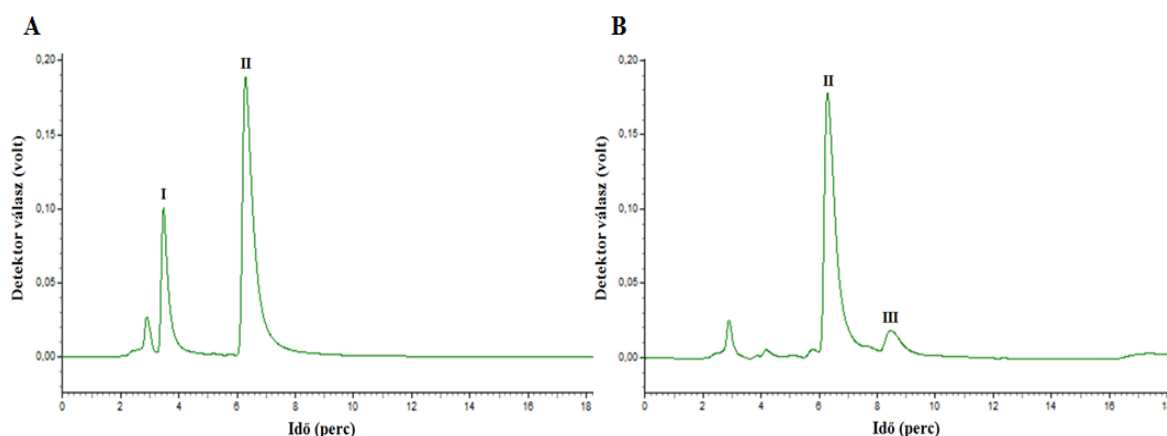
16. ábra. A *Rhizomucor miehei* (A) és a *Mucor corticolus* (B) β -glükózidázok által katalizált hidrolitikus és szintetikus reakciók termékeinek HPLC mintázata 350 mg ml⁻¹ koncentrációjú laktóz szubsztráton. I: glükóz és galaktóz; II: laktóz és valószínűleg galaktóz-diszacharid; III: feltételezett szintetikus triszacharid; IV: laktóz

A cellobióz szubsztrátnál tapasztalthoz hasonlóan jelen esetben is megfigyelhettük, hogy a szintézis eredményeként keletkező termék koncentrációja a laktóz mennyiségével egyenes arányban növekedett. A reakció alatt a β -galaktozidázok és egyes β -glükózidázok működése során már leírt galaktóz-diszacharid is létrejöhet (Bakken és mtsi., 1992; Bruins és mtsi., 2003). A galaktóz-diszacharid retenciós ideje feltételezhetően megegyezik a laktózéval, ezért a reakcióelegyben levő diszacharidokat nem tudtuk elkülöníteni. A kromatogramon ezt a csúcsot „II” jellel tüntettük fel. Érdeemes megemlíteni, hogy a Bruins és mtsi. (2003) által tanulmányozott *Pyrococcus furiosus* β -glükózidáznál a reakcióelegyben található diszacharidok 67%-a galaktóz-diszacharidnak bizonyult az inkubációs idő végén (2 nap).

A *R. miehei* β -glükózidázzal termékként kapott feltételezett triszacharid a *M. corticolus* enzim esetében nem volt kimutatható, a kromatogramon a „IV” csúcs a reakcióba vitt laktózt jelöli (16B. ábra). Az enzimek szubsztrát specifitásának jellemzésekor a *R. miehei* β -glükózidáz erős galaktozidáz aktivitását mutattuk ki, mely a

M. corticolus enzimnél nem volt megfigyelhető (5.4.3. fejezet, 8. táblázat). A *M. corticolus* β -glükózidáz szabad glükóz/galaktóz vegyület hiányában laktózon történő oligoszacharid szintézisre sem képes.

A *R. miehei* β -glükózidáz transzgalaktozidáz aktivitásának kimutatásához 10% szacharóz és 90 mM *p*-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid szubsztrát jelenlétében inkubáltuk az enzimet. A reakcióelegy HPLC analízisekor egy feltételezhetően szintetikus vegyület (8,5 perc) megjelenését mutattuk ki (17B. ábra). A *p*-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid retenciós idejét 3,5 percnél állapítottuk meg (17A. ábra), mely azonban a hidrolízis eredményeként teljes mértékben lebomlott (17B. ábra). A szacharózt a *R. miehei* β -glükózidáz nem hidrolizálja (5.4.3. fejezet), így a termék egy galaktóz-glükóz-fruktóz triszacharid lehet. A kísérletet 10% etanol és 90 mM *p*-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid szubsztrát jelenlétében is elvégeztük, ahol az etanol és *p*NPG esetén tapasztalthoz hasonlóan (5.5.2. fejezet), szintén 4,2 perc retenciós időnél kaptunk terméket, mely azonban valószínűleg etil-galaktozid.



17. ábra. A *Rhizomucor miehei* által katalizált transzgalaktoziláció. A kontroll (A) és az enzimmel kiegészített (B) reakcióelegyek HPLC analízisét 24 órás inkubáció után végeztük.

I: *p*-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid; II: szacharóz; III: feltételezett szintetikus triszacharid

Az eredmények alapján feltételezhető, hogy a *R. miehei* esetében laktózon keletkezett triszacharid (16A. ábra) az egyes β -galaktozidázok, valamint β -galaktozidáz-szerű β -glükózidázok transzgalaktozidáz aktivitásának vizsgálatakor kimutatott galakto-oligoszacharid is lehet (Onishi és Tanaka, 1996; Del-Val és mtsi., 2001; Ishikawa és mtsi., 2005; Martinez-Villaluenga és mtsi., 2008). A pontos azonosítás érdekében a termék(ek) elválasztását, tisztítását, tömegspektrometriai analízisét, illetőleg NMR spektrumának felvételét tervezzük elvégezni.

5.6. Antioxidáns aktivitású fenolok felszabadítása glikozidokból

Egyes glikozidos fenolokban gazdag növényi maradványokból a szerkezet számára könnyen felvehető, magas antioxidáns aktivitással rendelkező fenolok állíthatók elő a β -glükózidáz enzim segítségével (Vattem és Shetty, 2002; Correia és mtsi., 2004), melynek vizsgálatához a fenolokat nagy mennyiségben tartalmazó, magas antioxidatív kapacitással rendelkező meggy gyümölcsöt alkalmaztuk (Moyer és mtsi., 2002; Vangdal és Slimestad, 2006). A meggy az érési folyamatokban és a cianogén glükozid vegyületek lebontásában fontos saját β -glükózidáz enzimmel is rendelkezik (Gerardi és mtsi., 2001), azonban külső forrásból származó, nagyobb mennyiségben hozzáadott enzim jelentős mértékben növelheti a szabad antioxidáns hatással rendelkező vegyületek mennyiségét. A kísérletek során a fagyasztva szárított gyümölcstörköly vizes kivonatát 1 U mennyiségű tisztított *R. miehei* R8 β -glükózidáz enzimmel, egy, kettő és öt órán át kezeltük 50 °C hőmérsékleten.

A vizsgálatokban a galluszsav, a 4-hidroxi-benzoészav, a vanillinsav, a sziringsav, a *p*-kumársav és a fahéjsav fenolsavak, valamint a kvercetin mennyiségének változását tanulmányoztuk az inkubációs idő függvényében. A fenolvegyületek mennyiségét HPLC technika segítségével határoztuk meg, melyhez jelen esetben is először a különböző sztenderd vegyületek kalibrációs egyeneseit készítettük el. A kalibráció során a sztenderd vegyületek mennyisége és a detektált jel lineáris összefüggést mutatott. A felsorolt fenolsavak retenciós ideje rendre 6,4, 15,6, 17,1, 18,1, 22,4 és 37,4 perc volt, a kvercetin retenciós idejét pedig 35,6 percnél állapítottuk meg. A kalibrációs egyenes egyenlete galluszsavra $y = 0,0000350177x + 0,366748$, 4-hidroxi-benzoészavra $y = 0,000069697x + 0,359884$, vanillinsavra $y = 0,0000771408x - 0,287718$, sziringsavra $y = 0,000042081x + 0,197231$, *p*-kumársavra $y = 0,0000235267x - 0,158756$, fahéjsavra $y = 0,000015567x - 1,07471$ és kvercetinre $y = 0,0000678911x + 0,900653$. A kalibrációs pontok illeszkedésének pontossága sorrendben 99,97%, 99,94%, 99,84%, 99,97%, 99,66%, 99,93% és 99,73%.

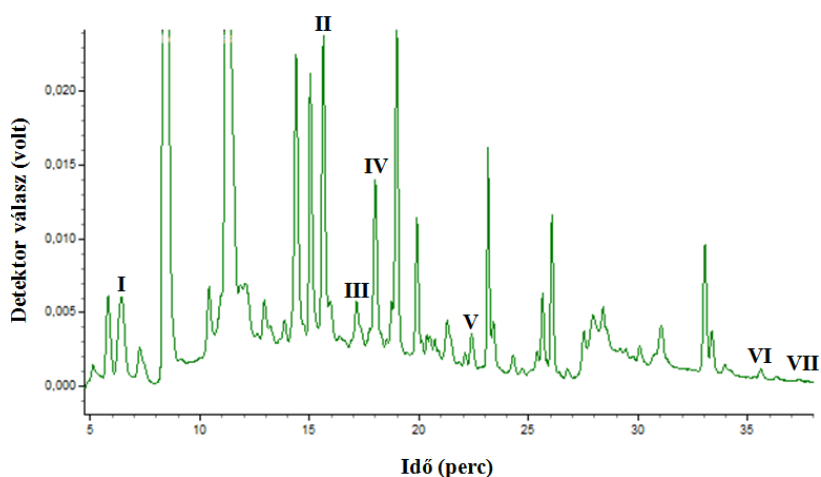
A β -glükózidáz enzimmel történő kezelés alatt a meggytörköly kivonatban található fenolos vegyületek mennyisége eltérő mértékben változott, azonban az inkubációs idő növelésével minden esetben koncentrációemelkedést tapasztaltunk (11. táblázat). Számottevő változás a 4-hidroxi-benzoészav, a vanillinsav és a sziringsav mennyiségében figyelhető meg, valamint hosszabb inkubálás után *p*-kumársav, kvercetin és fahéjsav jelenlétét is sikerült kimutatnunk. A kvercetin és a fahéjsav mennyiségét az alacsony

koncentráció miatt nem tudtuk pontosan meghatározni az általunk alkalmazott HPLC rendszerrel.

11. táblázat. A meggytörköly kivonatban található fenolos vegyületek mennyiségének változása *Rhizomucor miehei* β -glükózidázzal történő kezelés után ($\mu\text{g ml}^{-1}$).

Idő (h)	gallusz-sav	4-hidroxi-benzoésav	vanillin-sav	sziring-sav	<i>p</i> -kumársav
1	0	0,55	0	0,24	0
2	2,38	8,45	3,62	3,57	0
5	6,29	29,48	12,71	12,61	1,23

Az öt órán át tartó enzimes kezelést követően a reakcióelegyben található fenolos vegyületek HPLC mintázatát a 18. ábrán szemléltetjük. Az általunk vizsgált fenolokon kívül egyéb vegyületek is detektálhatók a reakcióelegyben, melyek közül néhány a kontroll mintákhoz viszonyítva új csúcsként jelenik meg. A vegyületek pontos azonosításához további sztenderdek kalibrálását tervezzük elvégezni.



18. ábra. A meggytörköly kivonatban található fenolos vegyületek HPLC mintázata *Rhizomucor miehei* β -glükózidázzal történő kezelés után (öt óra inkubálás).

I: galluszsav; II: 4-hidroxi-benzoésav; III: vanillinsav; IV: sziring-sav; V: *p*-kumársav; VI: kvercetin; VII: fahéjsav

Az antioxidáns hatású fenolos vegyületek glikozidos kötésből történő felszabadításához számos esetben az adott gyümölcstörköly közvetlen fermentációját végzik, melyben bizonyított, hogy a fermentációban résztvevő gomba által termelt β -glükózidáz nagymértékben hozzájárul ezen vegyületek koncentrációjának növeléséhez (Vattem és mtsi., 2005). A tisztított β -glükózidáz enzimmal történő közvetlen kezelés eredményeiből kiindulva a *R. miehei* gombával elvégzett szilárd fázisú fermentáció utáni kivonatokban is megvizsgáltuk a szabad fenolos vegyületek mennyiségét, ahol azonban

eddig nem tapasztaltunk jelentős koncentrációemelkedést. A járomspórás gombák közül tudomásunk szerint eddig a különböző ételek fermentációjához elterjedten alkalmazott *Rhizopus oligosporus* gombával végeztek ilyen irányú vizsgálatokat (Vattem és Shetty, 2002, Correia és mtsi., 2004; Randhir és mtsi., 2004; Vattem és mtsi., 2004).

5.7. A *Rhizomucor miehei* β -glükózidáz gén

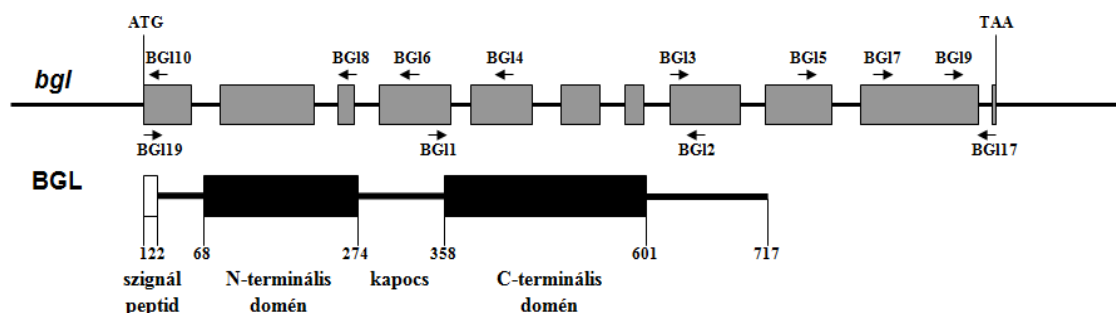
Az enzimek izolálásával és jellemzésével párhuzamosan a β -glükózidáz enzimet kódoló gének azonosítását, klónozását, molekuláris és funkcionális jellemzését, valamint a gének kifejeződésének vizsgálatát is megkezdtük. Az eddigi munkánk egyedül a termofil *R. miehei* R8 törzs β -glükózidáz enzimet kódoló gén (*bgl*) tanulmányozására terjedt ki részletesen, azonban folyamatban van a *Rh. niveus*, a *M. corticolus* és a *G. persicaria* gének vizsgálata is. β -Glükózidáz enzimet kódoló gént már számos fonalas gomba esetén izoláltak és klónoztak (Irodalmi áttekintés; 2.5. fejezet), azonban járomspórás gombáknál tudomásunk szerint ilyen jellegű vizsgálatokat eddig még nem végeztek.

5.7.1. A gén izolálása és jellemzése

A *bgl* gén izolálása érdekében, ismert gomba β -glükózidáz aminosav szekvenciák összehasonlítása alapján, a GLDM és az FPYLV szekvencia motívumoknak megfelelő BGL1 és a BGL2 jelzésű indítószekvenciákat terveztük, majd PCR technika segítségével a *R. miehei* törzs genomi DNS mintáiból felszaporítottunk egy 742 bázispár méretű DNS szakaszt. A teljes *R. miehei bgl* gén, valamint a gént határoló régiók meghatározásához IPCR technikát alkalmaztunk (Ochman és mtsi., 1988), az ehhez használt indítószekvenciák pozícióját a 19. ábra szemlélteti. A *R. miehei bgl* gén izolálásához és klónozásához alkalmazott indítószekvenciák nukleotid sorrendjét az „Anyagok és módszerek” című fejezetben található 3. táblázatban tüntettük fel.

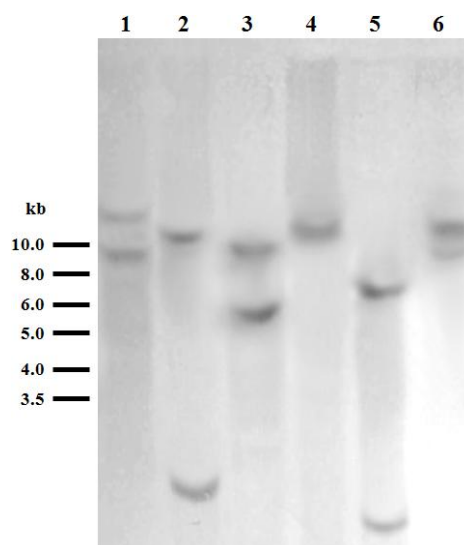
Az IPCR módszerrel egy 4063 bázispár méretű DNS szakaszt azonosítottunk; a nukleotid szekvencia elemzése után megállapítottuk, hogy a szakasz a *R. miehei* β -glükózidáz gént, valamint annak határoló régióit is tartalmazza. A teljes szekvenciát a **3. sz. mellékletben** (EMBL azonosító: AM922334) tüntettük fel. A kódoló szakaszt a szekvencia adatbázisokban található egyéb ismert gomba β -glükózidáz génekkel kapott homológia alapján határoztuk meg. A feltételezhetően 717 aminosav hosszúságú fehérjét (BGL) kódoló, összesen 2826 bázispár méretű *bgl* gén valószínűleg tíz, egyenként 70, 64,

68, 60, 76, 68, 77, 73, 82 és 34 bázispár hosszúságú intront is magában foglal (19. ábra). A *R. miehei* *bgl* gén kodonhasználatát a 4. sz. mellékletként csatolt táblázat tartalmazza.



19. ábra. A *Rhizomucor miehei* *bgl* gén és a kódolt BGL fehérje fontosabb részeinek vázlatos bemutatása. A nyilak az IPCR technika, valamint a klónozás során alkalmazott indítószekvenciák elhelyezkedését mutatják.

A PCR kísérletek alapján a *bgl* gén egy kópiában történő jelenléte valószínűsíthető, azonban a kópiaszám meghatározásához elvégzett Southern-hibridizációs vizsgálatok eredménye szerint a *R. miehei* genom feltételezhetően két kópiában tartalmazza a β -glükozidáz gént (20. ábra).



20. ábra. A *Rhizomucor miehei* genomi DNS kevésbé szigorú körülmények között végzett Southern-hibridizációs analízise (1: *Sma*I, 2: *Sca*I, 3: *Pvu*II, 4: *Xba*I, 5: *Kpn*I, 6: *Apa*I). A kísérletek során alkalmazott restriktációs enzimek a hibridizációs próbaként használt *bgl* génszakaszban nem rendelkeztek hasítóhellyel.

A nukleotid szekvencia elemzésekor a gént határoló régiókat is megvizsgáltuk, ahol az 578 nukleotid hosszúságú promóterben a start kodon előtt 69 nukleotiddal elhelyezkedve egy jellegzetes TATA motívumot (TATAAAA) találtunk. A promóter szakasz a -49 és a -385 pozíciókban két pirimidin gazdag szakaszt, valamint a -357 pozícióban egy feltételezett CAAT motívumot is tartalmaz. A start kodon előtt -126

(CCGGAG), -135 (CCCCAC) és -248 (CCGGGG) nukleotiddal elhelyezkedő motívumok valószínűleg karbon katabolit represszor fehérje kötőhelyek konszenzus szekvenciáinak (SYGGR) felelnek meg (Suto és Tomita, 2001). A terminális régióban, a stop kodontól 20 és 37 nukleotid távolságra elhelyezkedő szekvencia motívumokat feltételezett poliadenilációs helyként (AATAAA) azonosítottuk.

5.7.2. A kódolt aminosav szekvencia elemzése

A *R. miehei bgl* gén alapján levezethető feltételezett BGL fehérje molekulatömegét 78,7 kDa értéknek határoztuk meg. A fehérje „SignalP” programmal történő vizsgálata egy 22 aminosav hosszúságú szignál peptid (MFAKTALALLTAWSAMQGVAGG) jelenlétét mutatta, ami az enzim sejten kívüli térbe történő szekréciójának lehetőségét jelzi. A BGL fehérjében előforduló hidrofób aminosavak magas aránya ugyancsak extracelluláris jelleget valószínűsít (Wallecha és Mishra, 2003). Az érett BGL fehérje számított molekulatömege 76,5 kDa értéknek bizonyult.

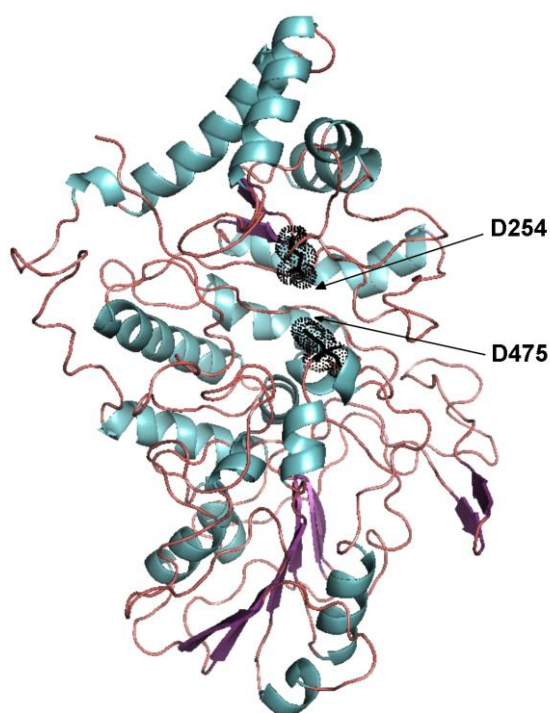
Szekvencia adatbázisokban történő homológiakeresés során a *R. miehei* BGL a glikozid hidrolázok 3. családjába tartozó gomba β -glükózidázokhoz mutatott nagyfokú hasonlóságot. Az ide sorolt enzimek jellegzetes két-doménes globuláris szerkezettel rendelkeznek (Varghese és mtsi., 1999), melynek megfelelően egy $(\alpha/\beta)_8$ hengert képző feltételezett N-terminális domént (68 - 274 aminosavak), valamint egy C-terminális $(\alpha/\beta)_6$ -szendvics domént (358 - 601 aminosavak) azonosítottunk a BGL fehérjében is (19. ábra). A két domént egy 84 aminosav hosszúságú szakasz kapcsolja egymáshoz. A glikozid hidrolázok 3. családjába tartozó enzimek „megtartó” glükózidázok, melyek a katalitikus folyamatok során különböző, nukleofilként és általános sav/bázis katalizátorként működő aminosavak jelenlétét igénylik az aktív centrumban. Összehasonlítva a *R. miehei* BGL-t ismert gomba β -glükózidázokkal, az SDW konzervált motívumban található D254 (Asp) aminosavat lehetséges katalitikus nukleofilként, míg a KHY motívumban elhelyezkedő H177 (His) aminosavat vélt H^+ donorként azonosítottuk (vö. Bhatia és mtsi., 2002; 12. táblázat). A gátlószerek vizsgálata során tapasztalt Zn^{2+} gátlás szintén az aszparaginsav aktív centrumban történő jelenlétét valószínűsíti (Ng és mtsi., 2010). Ugyancsak kiemelkedő gátló hatást tapasztaltunk az NBS esetén (5.4.5. fejezet, 9. táblázat), ami a triptofán (Riou és mtsi., 1998; Sharmila és mtsi., 1998), feltehetőleg az SDW motívumban található W255 (Trp) aminosav katalízisben betöltött jelentős szerepét feltételezi. A BGL

fehérje aminosav szekvenciájának tanulmányozásakor a konzervált COOH-terminális antiparallel hurok szekvenciát (PLFPPFGHGLS) is azonosítottuk (Harvey és mtsi., 2000).

12. táblázat. Néhány glikozid hidrolázok 3. családjába sorolt β -glükozidáz enzim konzervált aminosav motívumainak összehasonlítása. A feltételezett H⁺ donort (H) és a katalitikus nukleofil (D) piros színnel emeltük ki.

Az enzim eredete	Szénhidrát kötő hely	Katalitikus nukleofil	COOH-hurok	Forrás
<i>Rhizomucor miehei</i>	175-AK H YI-179	249-GLIM S DWG-256	589-PLFPPFGHGLS-598	Jelen dolgozat
<i>Aspergillus niger</i>	188-AK H YI-192	275-GFV M S D WA-282	644-PIYEFYGLS-653	Dan és mtsi., 2000
<i>Aspergillus aculeatus</i> BGL1	188-AK H YI-192	275-GFV M S D WG-282	644-PIYEFYGLS-653	Kawaguchi és mtsi., 1996
<i>Aspergillus kawachii</i> BGLA	188-AK H YI-192	275-GFV M S D WA-282	644-PIYEFYGLS-653	Iwashita és mtsi., 1999
<i>Trichoderma reesei</i>	188-AK H YI-192	262-GYV M T D WD-269	600-PRYEFYGLS-609	Barnett és mtsi., 1991
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	256-AK H FI-260	330-GYV M S D WW-337	680-PRFEFGFGLS-689	Li és Renganathan, 1998
<i>Piromyces</i> sp.	171-AK H YV-175	246-GFV M S D WW-253	586-PIFPPFGHGLS-595	Steenbakkers és mtsi., 2003
<i>Saccharomycopsis fibuligera</i> BGL1	202-VK H FI-206	290-GFV V S D WG-297	665-PRYAFYGLS-674	Machida és mtsi., 1988
<i>Candida pelliculosa</i>	201-AK H LI-204	294-GFV M T D WG-301	655-VRYEFYGLS-664	Kohchi és Tohe, 1985
<i>Flavobacterium meningosepticum</i>	167-VK H FA-171	242-GFIV T DYT-249	598-PLFPPFYGLS-607	Li és Lee, 1999
<i>Hordeum vulgare</i> ExoI	230-AK H FV-234	305-GFV I S D WE-312	614-PLFRLGYGLT-623	Harvey és mtsi., 2001

A vélt sav/bázis katalizátorra a megfelelő szekvenciárészek homológiájának hiánya miatt meglehetősen nehéz következtetni. A különböző alcsaládok valószínűleg egyedi sav/bázis katalizátorral rendelkeznek, melyek pontos azonosítása csak néhány távoli rokon enzim, mint például az ismert háromdimenziós szerkezettel rendelkező árpa β -glükán exohidroláz (ExoI; Varghese és mtsi., 1999; Hrmova és mtsi., 2001), vagy a *Flavobacterium meningosepticum* β -glükozidáz (Chir és mtsi., 2002) esetében történt meg. Az árpa ExoI és a *R. miehei* BGL összehasonlításakor az ExoI katalitikus savat tartalmazó PYTET (488 - 492 aminosavak) motívuma a *R. miehei* fehérje IVVDG (472 - 476 aminosavak) motívumával illeszkedett, melyben a D475 (Asp) aminosavat egy lehetséges sav/bázis katalizátornak feltételezzük. Ezt megerősíti, hogy az árpa ExoI fehérje alapján elkészített szerkezet modell predikció a feltételezett D254 katalitikus nukleofil és a D475 aminosavat is a megfelelő pozícióban mutatja (21. ábra). Ugyanakkor a kapott eredményeket az ExoI és a BGL közötti viszonylag alacsony hasonlóság miatt elővigyázatosan kell kezelni. A feltételezés bizonyításához a sav/bázis katalizátor kísérletes azonosítása szükséges.



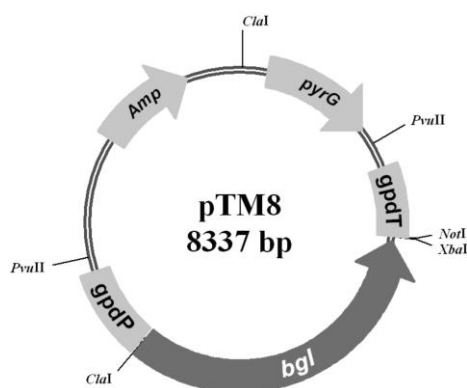
21. ábra. A *Rhizomucor miehei* β -glükózidáz szerkezetének szalagos ábrázolása. A modell elkészítéséhez az árpa β -glükán exohidroláz izoenzimét (ExoI) használtuk templátként.

A *R. miehei* R8 izolátum által termelt β -glükózidáz tisztítása és jellemzése során a tisztított fehérje LC-MS analízisét is elvégeztük, amely az ALHEIWTWPYAR és LGQDEGFPEMAIR peptid szekvenciák alapján az izolált enzimet a feltételezett *R. miehei* BGL fehérjeként azonosította, valamint megerősítette, hogy a tisztított enzimet a klónozott *bgl* gén kódolja. A homogenitásig tisztított *R. miehei* β -glükózidáz enzim elektroforetikus elválasztása után meghatározott 75 - 80 kDa körüli molekulatömeg (5.3. fejezet) ugyancsak megfelel a feltételezett aminosav szekvencia alapján becsült értéknek.

5.7.3. A gén kifejeződésének vizsgálata

A *R. miehei* β -glükózidáz enzimet kódoló gén (*bgl*) kifejeződésének vizsgálatához alkalmazott plazmidban (pTM8) a *M. circinelloides* *gpd1* gén promóter (*gpdP*) és terminális (*gpdT*) régióival építettük össze a teljes *bgl* gént (22. ábra), majd az elkészített vektort PEG mediált protoplaszt transzformációval bejuttattuk az MS12 *M. circinelloides* kettős auxotróf (*leuA*⁻ és *pyrG*⁻) törzsbe. Az alacsony transzformációs gyakoriság miatt csak három transzformáns izolátumot sikerült nyernünk a kísérletek során. A plazmid jelenlétét az egyes transzformánsokban PCR technika és szekvenálás segítségével bizonyítottuk. A plazmid fennmaradásához a transzformánsokat szelektív körülmények

közt kellett tenyészteni, mely azt jelzi, hogy a transzformációs kísérletek során bevitt plazmid nem épült be a genomba.



22. ábra. A *Rhizomucor miehei* β -glükózidáz gén kifejeződésének vizsgálatához használt pTM8 plazmid.

A *gpdI* gén promóterét indukáló glükóz a β -glükózidáz enzimek biokémiai jellemzése során erős kompetitív gátlószerek bizonyult (5.4.4. fejezet), így ezen szénforrást tartalmazó tápközegekben nem tudunk pontos enzimaktivitásbeli különbségeket megállapítani, ezért a recipiens MS12 és a transzformáns törzsek extracelluláris β -glükózidáz termelésének vizsgálatához búzakorpa és cellobióz szubsztrátokon tenyésztettük az egyes izolátumokat. A kísérletekben a β -glükózidáz termelés teszteléséhez is alkalmazott folyadék és szilárd fázisú fermentációs tápközegeket használtuk, azonban a cellobiózos minimál tápoldatot és a búzakorpa nedvesítéséhez felhasznált desztillált vizet $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ leucinnal is kiegészítettük. A recipiens törzsnél $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ uracilt is adtunk a tápközegekhez. A tenyészetek inkubálását, valamint a nyers fehérjekivonatok előállítását a folyadék és szilárd fázisú fermentációs teszteknel alkalmazott módon végeztük, a β -glükózidáz aktivitás meghatározásához pedig jelen vizsgálatokban is *pNPG* kromogén szubsztrátot alkalmaztunk.

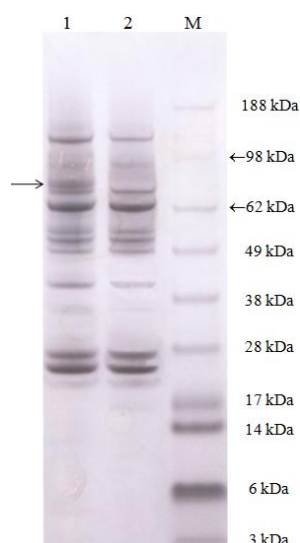
A recipiens gombatörzsnél meglehetősen alacsony extracelluláris β -glükózidáz aktivitást tapasztaltunk az alkalmazott tenyésztési körülmények közt (13. táblázat), jöllehet a *M. circinelloides* genomja négy feltételezett β -glükózidáz gént tartalmaz. A β -glükózidáz gén tanulmányozásához is használt *R. miehei* R8 törzs azonban kiemelkedő extracelluláris β -glükózidáz termeléssel rendelkezik. Az előzetes tesztek során folyadék tenyészetnél $3,7 \text{ U ml}^{-1}$, míg szilárd fázisú fermentáció esetén $38,3 \text{ U ml}^{-1}$ térfogati aktivitás értékeket állapítottunk meg (5.1. fejezet, 4. táblázat). Az általunk izolált transzformánsok fermentlevei és nyers kivonatai az eredeti MS12 törzsnél jelentősen magasabb

enzimaktivitást mutattak (13. táblázat), azonban a meghatározott értékek nem érik el a *R. miehei* R8 izolátumnál tapasztaltakat. A kapott eredmények egyik magyarázata az lehet, hogy a *Mucor* törzs esetleg kissé alacsonyabb hatékonysággal termeli és/vagy szekretálja a *R. miehei* izolátumból származó heterológ enzimet. Az is előfordulhat, hogy a *R. miehei* egy másik aktív β -glükozidáz enzimet is termel, azonban erre utaló eredményt az enzim homogenitásig történő tisztításakor nem kaptunk.

13. táblázat. Az eredeti és a transzformáns *Mucor circinelloides* törzsek β -glükozidáz aktivitása.

Törzs	Térfogati aktivitás (U ml ⁻¹)	
	Folyadék tenyészet	Szilárd fázisú fermentáció
<i>M. circinelloides</i> MS12	0,11	7,18
<i>M. circinelloides</i> MS12 + pTM8/1	0,37	23,3
<i>M. circinelloides</i> MS12 + pTM8/2	0,31	18,1
<i>M. circinelloides</i> MS12 + pTM8/3	0,34	19,6

A transzformáns MS12 + pTM8/1 és a recipiens MS12 törzs szilárd fázisú fermentálás utáni nyers kivonatainak részleges tisztítását is elvégeztük, melyet Sephadex G100 töltetű oszlopon, a 4.5.3. fejezetben leírt paraméterekkel vittünk véghez. A fehérjék elektroforetikus elválasztását követően (SDS-PAGE) egy új sáv megjelenését tapasztaltuk a transzformáns fehérjemintázatában (23. ábra). A sáv mérete megegyezik a homogenitásig tisztított *R. miehei* β -glükozidáz enzimmél meghatározott értékkel (75 - 80 kDa, 5.3. fejezet, 6A. ábra), ami szintén a *bgl* gén transzformánsokban történő kifejeződését jelzi.



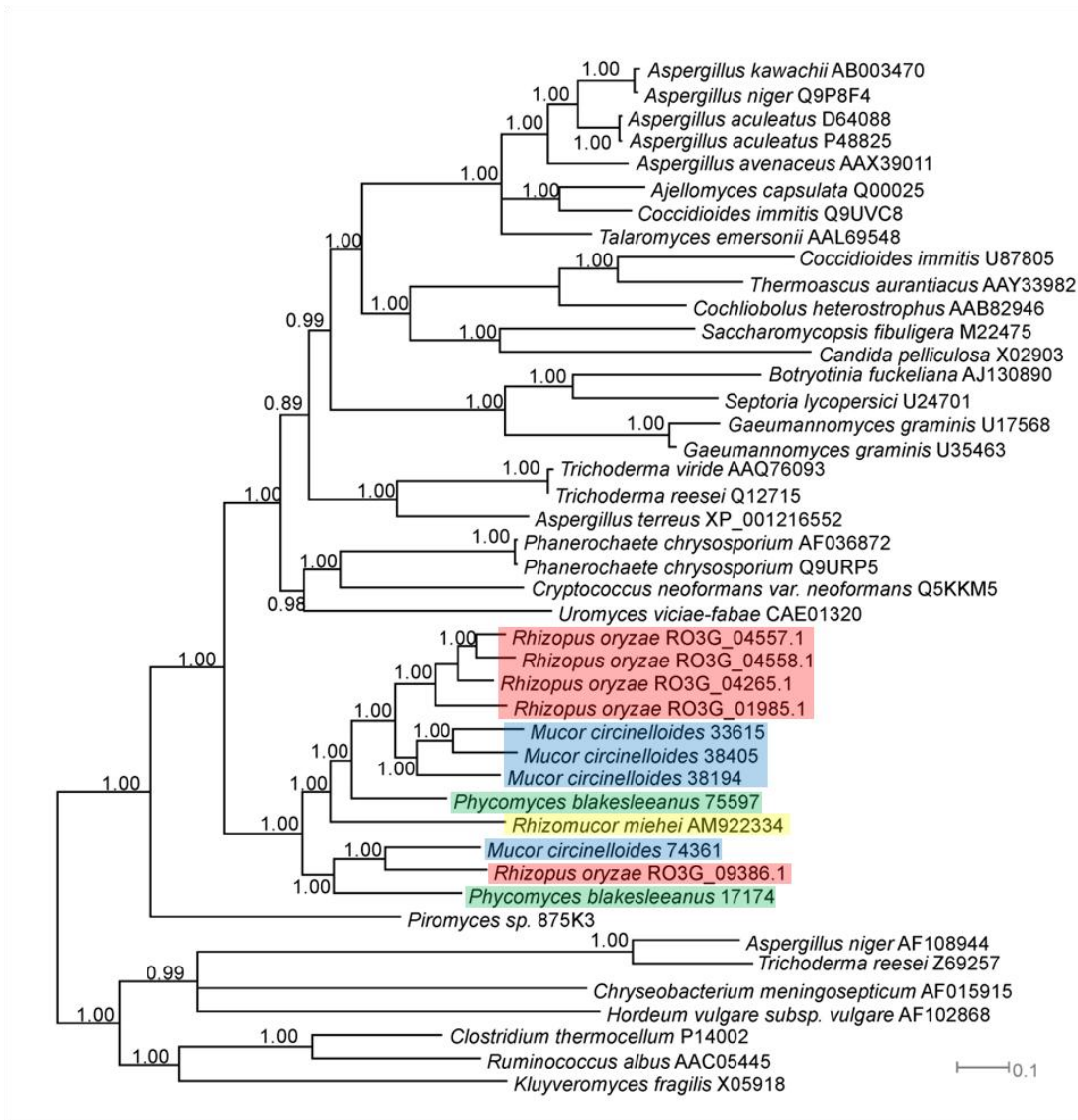
23. ábra. A transzformáns MS12 + pTM8/1 (1) és a recipiens MS12 törzs (2) nyers kivonatából részlegesen tisztított fehérjék elektroforetikus mintázata (M: SeeBlue Plus 2, Invitrogen). A nyíl a fehérjemintázatban megjelenő új sávot mutatja.

A transzformációs kísérletek során elért eredmények az általunk klónozott gén működőképességét, illetőleg a megfelelő enzim hatékony termelését egyaránt igazolják.

5.8. Gomba β -glükózidázok evolúciója

A *R. miehei* BGL aminosavszekvencia felhasználásával végzett keresés a *M. circinelloides* genomszekvencia adatbázisában négy, a *Phycomyces blakesleeanus* izolátumában kettő, a *Rh. oryzae* adatbázisában pedig öt nagyon hasonló hipotetikus fehérje génjét fedte fel. Az azonosított szekvenciák a glikozid hidrolázok 3. családján belül, a 4. alcsaládba sorolt, β -glükózidáz aktivitással rendelkező gomba enzimekkel mutatták a legmagasabb hasonlóságot (vö. Harvey és mtsi., 2000). A 4. alcsaládba tartozó gomba β -glükózidázok filogenetikai vizsgálatába e járomspórás gomba szekvenciákat is bevontuk. Külcsoportként néhány másik alcsaládba tartozó glükózidázt alkalmaztunk. A Reversible-Jump MCMC analízis alapján a MrBayes programban is megtalálható Whelan és Goldman (WAG) modell (Whelan és Goldman, 2001) bizonyult az adatokhoz legjobban illeszkedőnek (1,00 poszterior valószínűséggel). A vizsgálatok eredményeként kapott konszenzus fán szinte minden klád magas poszterior valószínűséggel rendelkezik (24. ábra), az elágazási rend pedig nagy mértékben kongruens a Harvey és mtsi. (2000) által megállapított törzsfáéval.

A kapott eredmények a járomspórás gomba β -glükózidázok monofiletikus eredetét mutatják. Érdeemes megemlíteni, hogy a *Phycomyces* 17174, a *Mucor* 74361 és a *Rhizopus* RO3G_09386.1 szekvenciák egy jól elkülönült (1,00 poszterior valószínűség) testvér kládot alkotnak a többi járomspórás gomba szekvenciával (24. ábra). Az elágazási rend alapján az valószínűsíthető, hogy a fent említett három szekvencia a *Mucor*, a *Rhizopus* és a *Phycomyces* fajok szétválását eredményező fajsztintű eseményeket megelőzve, egy korai duplikáció során különült el. A feltételezést alátámasztja az is, hogy a járomspórás gomba klád két alkládjára a fajok elágazásainak megfelel (Voigt és mtsi., 1999). Mivel a *R. miehei* elágazása előtt történt a duplikáció, ez ugyancsak alátámasztja, hogy a *R. miehei* a *bgl* gén egy még ismeretlen második kópiájával is rendelkezhet.



24. ábra. A glikozid hidrolázok 3. családján belüli 4. csoportba tartozó gombák filogenetikai analízise (50% többségi konszenzus filogram, a számok a Bayes-féle poszterior valószínűséget jelölik). A *Mucor circinelloides* (kék színnel kiemelt), a *Phycomyces blakesleeenanus* (zöld színnel kiemelt), és a *Rhizopus oryzae* (piros színnel kiemelt) aminosavszekvenciáikhoz a genomok adatbázisában történt homológia kereséssel jutottunk hozzá. A többi szekvencia az NCBI/EMBL adatbázisokból származik (az egyes fehérjék azonosítószámait a törzsfán jelöltük).

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A β -glükózidáz enzim a baktériumoktól kezdve a magasabb rendű emlősökön keresztül mindenütt jelen van, és számos életfolyamatban jelentős szerepet tölt be. Gombáknál a celluláz enzimrendszer fontos alkotója, ahol a rövid szálú oligoszacharidok és a cellobióz glükózzá történő hidrolízisét végzi. A β -glükózidázok meghatározott körülmények között szintetikus aktivitásra is képesek, ami különböző vegyületek, például oligoszacharidok és glikokonjugátumok szintézisét teszi lehetővé. Az enzim hidrolitikus és szintetikus aktivitását számos biotechnológiai folyamatban kihasználják.

A járomspórás gombák (Zygomycetes) Mucorales rendjébe tartozó fajok többsége talajban, bomló szerves anyagokon előforduló szaprotróf szervezet. A csoport számos képviselője különböző biotechnológiai folyamatokban alkalmazott extracelluláris enzimek termelőjeként, illetve értékes biológiai aktivitással rendelkező vegyületek sztereospecifikus hidroxilálójaként kerül ipari felhasználásra.

A fonalas gombák általában jó β -glükózidáz termelőként ismertek. Számos gomba enzimet izoláltak és elemeztek is, azonban a járomspórás gombákat ebből a szempontból kevésbé jellemezték. A járomspórás gomba β -glükózidázt kódoló génekről szintén kevés ismeret áll rendelkezésünkre. Munkánk fő célkitűzése az alapkutatásokban és a biotechnológiai fejlesztésekben felhasználható, jó extracelluláris β -glükózidáz termelő járomspórás gombák azonosítása, az enzimaktivitás detektálása és jellemzése volt. Célul tűztük ki továbbá a nagy extracelluláris aktivitással rendelkező járomspórás gombák által termelt β -glükózidázok homogenitásig történő tisztítását, az izolált enzimek hidrolitikus és szintetikus aktivitásának biokémiai jellemzését, illetőleg az enzimet kódoló gének azonosítását, valamint részletes molekuláris és funkcionális elemzését. Ezen célkitűzések alapján elvégzett vizsgálatok eredményei a következők:

1. Azonosítottunk jó extracelluláris β -glükózidáz termelő járomspórás gombákat.

Kezdeti vizsgálataink során a *Gilbertella*, *Mucor*, *Rhizomucor* és *Rhizopus* nemzetségek 95 izolátumának β -glükózidáz 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 -glükózidáz aktivitását búzakorpán is megvizsgáltuk. 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 R8 és R17 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.

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.

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* R11 és R17, *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* R8 törzs enzimjénél figyelhettük meg. A cellobióz szubsztrát a *R. miehei* β -glükózidázok esetében jelentős hőinaktivációtól védő hatást biztosított. Az elvégzett vizsgálatok eredményei alapján a *M. corticolus*, a *R. miehei* R8, a *G. persicaria* G1 és a *Rhizopus niveus* izolátumok által termelt β -glükózidáz enzimek homogenitásig történő tisztítását, illetve részletes jellemzését tűztük ki célul.

3. Izoláltuk a *R. miehei* R8, a *M. corticolus*, a *Rh. niveus* és a *G. persicaria* G1 törzsek által búzakorpa szubsztráton termelt β -glükózidáz enzimeket.

Az enzimek specifikus aktivitására rendre 62,2, 118,5, 70,6 és 121,1 U mg⁻¹ értékeket határoztunk meg a negyedik tisztítási lépés után. Az izolált enzimfehérjék molekulatömege az elektroforetikus elválasztást követően 75 - 80 kDa volt.

4. Elvégeztük a tisztított β -glükózidáz enzimek biokémiai jellemzését az enzim hidrolitikus aktivitására ható számos tényező figyelembevételével.

A termofil *R. miehei* által termelt β -glükózidáz enzim aktivitásának hőmérsékleti optimumát 65 °C, míg a többi izolátumét 50 °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) kötéseket tartalmazó szacharidokon bizonyult jelentősnek, azonban enyhe enzimaktivitást a β -(1 \rightarrow 2) kötést tartalmazó szoforóz esetében is sikerült kimutatnunk. A *R. miehei* β -glükózidáz számottevő mértékben hidrolizálta a β -galaktozid kötéssel rendelkező szubsztrátokat is, továbbá az enzim kisebb mértékű α -glükózidáz és N-acetilglükózaminidáz aktivitást is mutatott. Az eredmények alapján feltételezhető, hogy a *R. miehei* által termelt enzim a széles szubsztrát specifitású β -glükózidázok csoportjába tartozik. Az enzimek jellemzése során meghatároztuk a tisztított β -glükózidázok pNPG szubsztrátra vonatkozó kinetikai paramétereit is.

A tisztított enzimek nem, vagy csak meglehetősen alacsony glükóz toleranciát mutattak, közülük egyedül a *M. corticolus* β -glükózidáz 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 -glükózidáz által katalizált pNPG hidrolízis jelentős emelkedést mutatott laktóz, fruktóz, galaktóz és szacharóz jelenlétében, mely az enzim magas transzglükózidáz 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 transzglükózidáz aktivitását feltételezi.

5. Részletesen vizsgáltuk a *R. miehei* R8 és a *M. corticolus* β -glükózidáz enzimek szintetikus aktivitását különböző monoszacharid donor és akceptor vegyületek jelenlétében.

A transzglükózidáz aktivitás tanulmányozása során az enzimek szubsztrátjaként cellobiózt alkalmaztunk. 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 akzeptorként egyaránt funkcionáló cellobióz mennyiségével egyenes arányban növekedett. A legnagyobb termékmennyiséget mindkét enzimnél magas szubsztrát koncentráció alkalmazása mellett ($350 - 400 \text{ mg ml}^{-1}$) tapasztaltuk. A legtöbb cellotrióz a pH 4,0 - 6,0 tartományok közé puffertelt reakcióelegyekben, *R. miehei* β -glükózidáznál $70 \text{ }^\circ\text{C}$, míg *M. corticolus* enzimnél $50 \text{ }^\circ\text{C}$ hőmérsékleten keletkezett.

A laktóz szubsztráton történő szintézis tanulmányozásakor a *R. miehei* β -glükózidáz esetén egy feltételezhetően szintetikus triszacharid megjelenését mutattuk ki a reakcióelegyből. A *R. miehei* enzim transzgalaktozidáz aktivitását is azonosítottuk, így a keletkezett termék az egyes β -galaktozidázok, valamint a β -galaktozidáz-szerű β -glükózidázok transzgalaktozidáz aktivitásának vizsgálatok kimutatott galakto-oligoszacharid is lehet. A *R. miehei* enzimmel cellobióz vagy pNPG szubsztráton, etanol jelenlétében is tapasztaltunk termékképződést, melyet etil-glükózidnak feltételezünk.

6. Tanulmányoztuk különböző antioxidáns aktivitású fenolok *R. miehei* β -glükózidáz általi felszabadulását glikozidokból.

A vizsgálatok során 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.

7. A *R. miehei* R8 törzsből izoláltuk és jellemeztük az első, járomspórás gombából származó β -glükózidáz gént (*bgl*) és a szabályozó régióit. Génexpresszió vizsgálatokat végeztünk heterológ rendszerben.

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 fermentlevelei 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 fehérjét is bevontunk. A vizsgálatok eredményeként kapott konszenzus fa a járomspórás gomba β -glükózidázok monofiletikus eredetét mutatja.

A kutatási program eredményeként új információkkal bővültek ismereteink a járomspórás gombák β -glükózidáz termelésével kapcsolatban. Munkánk során számos új, jó extracelluláris β -glükózidáz termelő járomspórás gombatörzset azonosítottunk, valamint elméleti és gyakorlati szempontból is fontos ismereteket szereztünk a celluláz enzimrendszer részeként jelentős szerepet betöltő β -glükózidáz enzimről járomspórás gombákban. Eredményeink alapján ezek az enzimek alkalmazhatónak bizonyulhatnak antioxidáns aktivitással rendelkező növényi eredetű fenolok glikozidokból történő felszabadítására, feldúsítására, valamint a szintetikus aktivitásuk kihasználásával különböző oligoszacharidok és glikokonjugátumok szintézisére. Tudomásunk szerint elsőként izoláltunk és jellemeztünk járomspórás gombából származó β -glükózidáz gént, valamint elsőként azonosítottunk transzgalaktozidáz aktivitással rendelkező fonalas gomba β -glükózidázt.

7. SUMMARY

Beta-glucosidase enzymes can be found from bacteria through to higher mammals, and play important roles in several biological processes. Fungal β -glucosidases are parts of the cellulose degrading enzyme system, wherein they split the short chain oligosaccharides and cellobiose into glucose. Under defined conditions, they also have a synthetic activity, which can be used for the synthesis of a variety of compounds such as oligosaccharides and different glycoconjugates. Both synthetic and hydrolytic activities of the enzyme are utilized in several biotechnological and industrial processes.

Representatives of the Zygomycetes in the order Mucorales, are widely distributed in soil and plant debris, on dung and other moist organic matter contacting with soil. These fungi have practical significance from several medical and agricultural aspects; moreover, numerous species of the order are also used in different biotechnological and industrial applications due to their effective extracellular enzyme production.

Filamentous fungi are known to be good producers of β -glucosidases and a number of fungal glucosidases have been isolated and analyzed, but zygomycetes are poorly characterized from this aspect. Little information is available from the zygomycetes genes encoding β -glucosidase enzymes as well. The main objective of our study was the identification, detection and characterization of β -glucosidase activities in zygomycetes in order to find new producer strains, which are potentially useful in further basic studies and biotechnological applications. Moreover, we planned the purification and biochemical characterization of selected β -glucosidases with high extracellular enzyme activity, as well as the isolation, cloning and molecular analysis of the encoding genes. The results of the assays performed by the objectives are follows:

1. Several isolates of Zygomycetes have been identified as good extracellular β -glucosidase producer.

Determination of the extracellular β -glucosidase activity of 95 strains representing the genera *Gilbertella*, *Mucor*, *Rhizomucor* and *Rhizopus* was performed in minimal media containing 1% cellobiose as sole carbon source. The enzyme activities of the tested strains were found to be highly variable. Based on the liquid culture fermentation, six *Mucor*, four *Rhizomucor*, three *Rhizopus* and three *Gilbertella* isolates were chosen for solid-state fermentation studies, in which wheat bran was used as substrate. Solid-state fermentation generally resulted in significantly higher enzyme activities than the liquid cultures. The *Gilbertella persicaria* (58.6 - 70.9 U ml⁻¹ and 351.6 - 425.4 U g⁻¹ wheat bran) and the

Mucor corticolus (94.9 U ml⁻¹ and 569.4 U g⁻¹ wheat bran) isolates gave the highest volumetric activity and yield on wheat bran. Among the tested thermophilic *Rhizomucor miehei* isolates, the NRRL 5282 and ETH M4918 strains are outstanding in their β -glucosidase producing ability, where 38.3 U ml⁻¹ and 42 U ml⁻¹ volumetric activity was detected, respectively. Crude extracts after the solid-state fermentation of the *Rhizopus* isolates showed approximately the same volumetric activity (15.1 - 18.4 U ml⁻¹). The effect of cultivation temperature on enzyme production had also been analyzed, wherein significant differences could be observed among the tested strains.

2. In reference to the preliminary tests, effect of temperature, ethanol, glucose and acidic pH on enzyme activity have been tested in the crude extracts of the good β -glucosidase producer strains. Enzymes with acido- and thermotolerant properties have been identified among the tested β -glucosidases.

Addition of ethanol to 5 - 10% (v/v) increased the enzyme activity of the *Rhizomucor*, *Rh. microsporus* var. *oligosporus* and *M. fragilis* strains. Glucose at 10 mg ml⁻¹ concentration was less inhibitory to the enzymes of *Mucor fragilis*, *Mucor guilliermondii* and *M. corticolus* than to those of the other investigated strains. β -Glucosidases of the *Rhizopus* and *Rhizomucor* isolates showed excellent acid tolerance. Alcohol and acid tolerance is an important feature of enzymes used for aroma liberation in wine making. *R. miehei* isolate NRRL 5282 gave the highest residual activity in the heat tolerance test at 75 °C; furthermore, in the presence of a protective cellobiose substrate, the *Rhizomucor* enzymes proved to be thermotolerant. It is supposed that cellobiose, the substrate of the enzyme, was bound to the active site and protected the enzyme from heat inactivation by retaining the correct conformation. Based on the preliminary studies, our aim was the purification and detailed characterization of β -glucosidases produced by *M. corticolus* SZMC 12031, *R. miehei* NRRL 5282, *G. persicaria* ATCC 201107 and *Rhizopus niveus* CBS 403.51 isolates.

3. The β -glucosidases produced on wheat bran by *M. corticolus* SZMC 12031, *R. miehei* NRRL 5282, *G. persicaria* ATCC 201107 and *Rhizopus niveus* CBS 403.51 isolates have been purified.

For production and isolation of the extracellular β -glucosidases in high amount, strains were grown on wheat bran medium, and the enzymes were purified from the crude extract to electrophoretically homogeneous state by ammonium sulphate precipitation and gel filtration followed by anion exchange and size-exclusion chromatographies. After the fourth step, the purified *R. miehei*, *M. corticolus*, *Rh. niveus* and *G. persicaria* enzymes

had a specific activity of 62.2, 118.5, 70.6 and 121.1 U mg⁻¹ proteins, respectively. The molecular weight of all purified enzymes was estimated by SDS-PAGE and was found to be about 75 - 80 kDa.

4. Biochemical characterization of the purified β -glucosidases has been performed with respect to some parameters influencing the hydrolytic activity of the enzymes.

The temperature optimum of the enzymes proved to be about 50 °C, except for the *R. miehei* β -glucosidase which was about 65 °C. The optimum pH for the action of the enzymes was between 5.0 and 5.5; however, the *Rhizomucor* enzyme retained 20% of its initial activity at pH 3.0, which was not observed in the case of the enzymes of the other isolates. The enzymes had a relatively narrow pH stability range (pH 4.0 - 6.0 for *R. miehei*, and pH 4.5 - 7.0 for the other isolates), but it was within the range of most fungal β -glucosidases.

The enzymes efficiently hydrolyzed oligosaccharides having β -(1 \rightarrow 4) glycosidic bonds, but weak enzyme activity could also be observed on sophorose which have β -(1 \rightarrow 2) glycosidic bonds. The β -glucosidase purified from the *R. miehei* strain presumably belongs to the broad-specificity type, since it can hydrolyze the *p*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside substrate, and it showed moderate α -glucosidase and N-acetylglucosaminidase activities as well. Kinetic parameters of the purified β -glucosidases were also determined from Lineweaver - Burk plots by using *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside as substrate.

Glucose substantially inhibited the hydrolytic activity of the purified enzymes. The β -glucosidase from *M. corticolus* proved to be more tolerant to glucose preserving up to 31% of its initial activity in the presence of 20 mg ml⁻¹ glucose. The effect of other mono- and disaccharides on *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside hydrolysis was also investigated. In these tests, sucrose significantly increased the activity of the *R. miehei* and *M. corticolus* enzymes. As these enzymes do not hydrolyse sucrose, it is suggested that they have remarkable transglycosylation activity. Considerable inhibition was observed with 5% (w/v) lactose at the *Rh. niveus*, *G. persicaria* and *R. miehei* β -glucosidases; additionally, activity of these enzymes was slightly increased by 5% (w/v) fructose followed by a reduction at higher concentrations.

Various metal ions and potential inhibitors modified the activity of the purified enzymes. The results may indicate that thiol groups are required for the appropriate enzyme activity, and important function of tryptophan and aspartic acid in the catalysis

could be expected as well. Analysis of the effect of different alcohols showed that the hydrolytic activity of the *R. miehei* β -glucosidase was increased with 30% by 10% (v/v) ethanol, which suggests an extensive synthetic activity of the enzyme. It is supposed that ethanol is an acceptor for glucose, decreasing the amount and hereby the inhibitory effect of the free glucose.

5. Synthetic activity of the purified *R. miehei* and *M. corticolus* β -glucosidases has been studied in detail using various monosaccharide donor and acceptor compounds.

Transglucosylation capacity of the enzymes was tested using cellobiose as substrate. Analysis of the reaction mixtures revealed that cellotriose was the main product of the synthetic reaction on cellobiose that acts as glucose donor and acceptor. After a long incubation period, cellotetraose was also formed in these experiments. Some parameters influencing the transglucosylation of cellobiose were investigated in order to optimize the synthetic reaction (e.g. initial substrate concentration, pH, temperature). In case of both enzymes, the yield of oligosaccharides increased linearly with the increase of the initial cellobiose concentration, and the maximum oligosaccharide formation was observed at high initial substrate concentration (350 - 400 mg ml⁻¹). The maximum cellotriose concentration was detected between pH 4.0 and pH 6.0, and 70 °C and 50 °C appeared to be the optimal temperatures for the synthetic activity of the *R. miehei* and *M. corticolus* enzymes, respectively.

Besides its synthetic activity on cellobiose, the *R. miehei* β -glucosidase is also able to synthesize oligosaccharides by using lactose as substrate. It is supposed that the oligosaccharide produced is a trisaccharide. The transgalactosylation capacity of the *R. miehei* β -glucosidase was also identified; accordingly, the formed oligosaccharide may be a galacto-oligosaccharide as well, similar to that had been detected by the transgalactosidase activity of various β -galactosidases and β -galactosidase-like β -glucosidases. Additional product formation was observed on cellobiose or *p*NPG in the presence of ethanol, suggesting that the *R. miehei* β -glucosidase is able to synthesize alkyl-glucosides too. However, since we could not identify the synthetic compounds formed in the presence of lactose and ethanol accurately, calibration of the appropriate standards, and purification, mass spectrometry and NMR spectroscopy of the products are in progress.

6. Liberation of plant derived phenolic antioxidants from glycosides by the purified *R. miehei* β -glucosidase has been studied.

The hydrolytic activity of the β -glucosidase can be used to liberate phenolic aglycons from their glycosidic bonds, which increase the amount, and allow the bioavailability of these phenolic antioxidants. To investigate the production of free phenolic antioxidants by *R. miehei* β -glucosidase, sour cherry fruit, which has high antioxidant capacity and contains large quantities of phenolics was used. In these analyses, the crude extract of lyophilised sour cherry pomace was treated with the purified enzyme. The amount of the different phenolic antioxidants changed in different degrees; however, increasing concentration could be observed in the concentration of 4-hydroxybenzoic acid, vanillic acid and syringic acid during the incubation period.

7. Isolation and characterization of a β -glucosidase-coding gene (*bgl*) from the *R. miehei* NRRL 5282 isolate have been performed. Heterologous expression studies have also been carried out.

Isolation and cloning of the entire *R. miehei bgl* gene together with its flanking region was performed by using the IPCR method, and the coding sequence of the BGL protein was predicted by similarities to other known fungal β -glucosidase genes found in sequence databases. Comparison of the *R. miehei* BGL with database sequences showed it highly similar to fungal β -glucosidases classified as the subfamily 4 of the family 3 glycoside hydrolases. The putative N- and C-terminal catalytic domains of the predicted protein could be identified as well as the potential catalytic nucleophile and H⁺ donor residues. Mass spectrometry analysis of the purified *R. miehei* β -glucosidase identified the isolated protein as the predicted BGL and confirmed that the purified enzyme is encoded by the *bgl* gene. Additionally, a number of typical nucleotide sequence motifs were identified in the promoter and terminator regions of the gene.

Heterologous expression studies with the isolated *Rhizomucor* gene were performed in *Mucor circinelloides*. The expression vector contained the entire *bgl* gene of *R. miehei* fused with the promoter and terminator regions of the *M. circinelloides gpd1* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) gene. This plasmid was introduced into *M. circinelloides* by PEG-mediated protoplast transformation. After culturing on cellobiose and wheat bran, the transformant strains showed significantly higher β -glucosidase activity than the original *Mucor* strain. Moreover, denaturing gel electrophoresis of the proteins, which were partially purified from the crude extracts, revealed the presence of an extra band in the protein pattern of the transformants. The size of this band corresponded to that of the *Rhizomucor* BGL suggesting that the introduced gene had been expressed in the transformants.

Blast searches with the amino acid sequence of the *R. miehei* BGL revealed the existence of highly similar hypothetical proteins in the databases of other zygomycetes genomes. These sequences were involved in phylogenetic analyses carried out to address the evolution of fungal β -glucosidases of subfamily 4 within the family 3 glycoside hydrolases. The resulted consensus tree supports the monophyly of zygomycetes β -glucosidases.

Our studies provided new data in reference to the β -glucosidase production of zygomycetes fungi. A number of new producer stains have been identified. Moreover, significant theoretical and practical knowledge about the β -glucosidases of zygomycetes has been obtained for the additional basic studies and biotechnological applications. We suggest that these enzymes are applicable for liberation and enrichment of phenolic antioxidants from plant-derived compounds and for synthesis of oligosaccharides and different glycoconjugates by using their hydrolytic and synthetic activities, respectively. As we know, the *R. miehei bgl* is the first β -glucosidase gene from a zygomycete fungus that has been isolated and characterized, and this is the first study about a filamentous fungal β -glucosidase, which has good ability to catalyze both transglucosylation and transgalactosylation reactions.

IRODALOMJEGYZÉK

- AJISAKA, K., YAMAMOTO, Y. (2002) Control of the regioselectivity in the enzymatic syntheses of oligosaccharides using glycosidases. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* 14, 1-11.
- ALEXOPOULOS, C. J., MIMS, C. W., BLACKWELL, M. (1996). Introductory mycology. 4th ed., John Wiley and Sons, New York, pp. 127-171.
- ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHAFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., LIPMAN, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402.
- 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.
- ALVES, M. H., CAMPOS-TAKAKI, G. M., PORTO, A. L. F., MILANEZ, A. I. (2002) Screening of *Mucor* spp. for the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. *Braz. J. Microbiol.* 33, 325-330.
- AMOURI, B., GARGOURI, A. (2006) Characterization of a novel β -glucosidase from a *Stachybotrys* strain. *Biochem. Eng. J.* 32, 191-197.
- AMREIN, T. M., GRANICHER, P., ARRIGONI, E., AMADO, R. (2003) In vitro digestibility and colonic fermentability of aleurone isolated from wheat bran. *Lebensm. Wiss. U. Technol.* 36, 451-460.
- ANAND, L., VITHAYATHIL, P. J. (1989) Purification and properties of β -glucosidase from a thermophilic fungus *Humicola lanuginosa* (Griffon and Maublanc) Bunce. *J. Ferment. Bioeng.* 67, 380-386.
- ANDJELKOVIC, U., PICURIC, S., VUJICIC, Z. (2010) Purification and characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* external invertase isoforms. *Food Chem.* 120, 799-804.
- ARNOLD, K., BORDOLI, L., KOPP, J., SCHWEDE, T. (2006) The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* 22, 195-201.
- BAI, D. M., JIA, M. Z., ZHAO, X. M., BAN, R., SHEN, F., LI, X. G., XU, S. M. (2003) L(+)-Lactic acid production by pellet-form *Rhizopus oryzae* R1021 in a stirred tank fermentor. *Chem. Eng. Sci.* 58, 785-791.
- BAILEY, M. J., SIIKA-AHO, M. (1988) Production of microbial rennin. *Biotechnol. Lett.* 10, 161-166.
- BAKKEN, A. P., HILL, C. G., AMUNDSON, C. H. (1992) Hydrolysis of lactose in skim milk by immobilized β -galactosidase (*Bacillus circulans*). *Biotechnol. Bioeng.* 39, 408-417.
- BARNETT, C. C., BERKA, R. M., FOWLER, T. (1991) Cloning and amplification of the gene encoding an extracellular β -glucosidase from *Trichoderma reesei*: evidence for improved rates of saccharification of cellulosic substrates. *Nat. Biotechnol.* 9, 562-567.
- BARTON, N. W., FURBISH, F. S., MURRAY, G. T., GARFIELD, M., BRADY, R. O. (1990) Therapeutic response to intravenous infusions of glucocerebrosidase in patients with Gaucher's disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 1913-1916.
- BAUSE, E., LEGLER, G. (1980) Isolation and structure of a tryptic glycopeptide from the active site of β -glucosidase A₃ from *Aspergillus wentii*. *Biochim. Biophys. Acta* 626, 459-465.

- BEGUIN, P. (1990) Molecular biology of cellulose degradation. *Ann Rev. Microbiol.* 44, 219-248.
- BENDTSEN, J. D., NIELSEN, H., VON HEIJNE, G., BRUNAK, S. (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* 340, 783-795.
- BENITO, E. P., DÍAZ-MINGUEZ, J. M., ITURRIAGA, E. A., CAMPUZANO, V., ESLAVA, E. P. (1992) Cloning and sequence analysis of the *Mucor circinelloides* *pyrG* gene encoding orotidine-5'-monophosphate decarboxylase: use of *pyrG* for homologous transformation. *Gene* 116, 59-67.
- BERGER, J. L., LEE, B. H., LACROIX, C. (1995) Oligosaccharide synthesis by free and immobilized β -galactosidases from *Thermus aquaticus* YT-1. *Biotechnol. Lett.* 17, 1077-1080.
- BHAT, M. K. (2000) Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnol. Adv.* 18, 355-383.
- BHAT, M. K., BHAT, S. (1997) Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnol. Adv.* 15, 583-620.
- BHATIA, Y., MISHRA, S., BISARIA, V. S. (2002) Microbial β -glucosidases: cloning, properties, and applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* 22, 375-407.
- BHATIA, Y., MISHRA, S., BISARIA, V. S. (2005) Purification and characterization of recombinant *Escherichia coli*-expressed *Pichia etchellsii* β -glucosidase II with high hydrolytic activity on sophorose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66, 527-535.
- BISARIA, V. S., MISHRA, S. (1989) Regulatory aspects of cellulase biosynthesis and secretion. *CRC Cr. Rev. Biotechn.* 9, 61-103.
- BLONDIN, B., RATOMAHENINA, R., ARNAUD, A., GALZY, P. (1983) Purification and properties of the β -glucosidase of a yeast capable of fermenting cellobiose to ethanol: *Dekkera intermedia* Van der Walt. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 17, 1-6.
- BOEL, E., HUGE-JENSEN, B., CHRISTENSEN, M., THIM, L., FIIL, N. P. (1988) *Rhizomucor miehei* triglyceride lipase is synthesized as a precursor. *Lipids* 23, 701-706.
- BOON, M. A., JANSSEN, A. E. M., VAN DER PADT, A. (1999) Modelling and parameter estimation of the enzymatic synthesis of oligosaccharides by β -galactosidase from *Bacillus circulans*. *Biotechnol. Bioeng.* 64, 558-567.
- BOON, M. A., VAN DER OOST, J., DE VOS, W. M., JANSSEN, A. E. M., VAN'T RIET, K. (1998) Synthesis of oligosaccharides catalyzed by thermostable β -glucosidase from *Pyrococcus furiosus*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 75, 269-278.
- BORGES DE MELO, E., DA SILVEIRA GOMES, A., CARVALHO, I. (2006) α - and β -Glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity. *Tetrahedron* 62, 10277-10302.
- BORGIA, I. P., MEHNERT, W. D. (1982) Purification of a soluble and a wall-bound form of β -glucosidase from *Mucor racemosus*. *J. Bacteriol.* 149, 512-522.
- BORGIA, P., SYPHERD, P. S. (1977) Control of β -glucosidase synthesis in *Mucor racemosus*. *J. Bacteriol.* 130, 812-817.
- BOROOAH, J., LEABACK, D. H., WALKER, P. G. (1961) Studies on glucosaminidase. 2. Substrates for N-acetyl- β -glucosaminidase. *Biochem. J.* 78, 106-110.
- BOYCE, A., WALSH, G. (2007) Production, purification and application-relevant characterisation of an endo-1,3(4)- β -glucanase from *Rhizomucor miehei*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76, 835-841.
- BRADY, L., BRZOZOWSKI, A. M., DEREWENDA, Z. S., DODSON, E., DODSON, G., TOLLEY, S., TURKENBURG, J. P., CHRISTIANSEN, L., HUGE-JENSEN, B., NORSKOV, L., THIM, L., MENGE, U. (1990) A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature* 343, 767-770.

- BRUINS, M. E., STRUBEL, M., VAN LIESHOUT, J. F. T., JANSSEN, A. E. M., BOOM, R. M. (2003) Oligosaccharide synthesis by the hyperthermostable β -glucosidase from *Pyrococcus furiosus*: kinetics and modelling. *Enzyme Microb. Technol.* 33, 3-11.
- BUACHIDZE, T. S., TAVOBILOV, I. M., RODIONOVA, N. A., KVESITADZE, G. I. (1987) Isolation and purification of β -D-glucosidase from the thermophilic mutant *Aspergillus terreus*. *Appl. Biochem. Microbiol.* 23, 187-196.
- BUCKE, C. (1996) Oligosaccharide synthesis using glycosidases. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 67, 217-220.
- BURGER, M., BACON, E. E., BACON, J. S. D. (1961) Some observations on the form and location of invertase in the yeast cell. *Biochem. J.* 78, 504-511.
- CABAROGLU, T. SELLI, S., CANBAS, A., LEPOUTRE, J. P., GÜNATA, Z. (2003) Wine flavor enhancement through the use of exogenous fungal glycosidases. *Enzyme Microb. Technol.* 33, 581-587.
- CALSAVARA, L. P. V., DE MORAES, F. F., ZANIN, G. M. (1999) Modelling cellobiose hydrolysis with integrated kinetic models. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 79, 789-806.
- CANEVASCINI, G., MEYER, H. P. (1979) β -Glucosidase in the cellulolytic fungus *Sporotrichum thermophile* Apinis. *Exp. Mycol.* 3, 203-214.
- CASTRO, A. M., CARVALHO, M. L. A., LEITE, S. G. F., PEREIRA, N. JR. (2010) Cellulases from *Penicillium funiculosum*: production, properties and application to cellulose hydrolysis. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 37, 151-158.
- CASTRO, M. J. L., KOVENSKY, J., CIRELLI, A. F. (1997) Gemini surfactants from alkyl-glucosides. *Tetrahedron Lett.* 38, 3995-3998.
- CHAN, V. W. F., JORGENSEN, A. M., BORDERS, C. L. (1988) Inactivation of bovine thrombin by watersoluble carbodiimides: the essential carboxyl group has a pKa of 5.51. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 151, 709-716.
- CHAUVE, M., MATHIS, H., HUC, D., CASANAVE, D., MONOT, F., FERREIRA, N. L. (2010) Comparative kinetic analysis of two fungal β -glucosidases. *Biotechnol. Biofuels* 3(1), 3.
- CHEN, H., HAYN, M., ESTERBAUER, H. (1992) Purification and characterization of two extracellular β -glucosidases from *Trichoderma reesei*. *Biochim. Biophys. Acta* 1121, 54-60.
- CHEN, M., QIN, Y., LIU, Z., LIU, K., WANG, F., QU, Y. (2010) Isolation and characterization of a β -glucosidase from *Penicillium decumbens* and improving hydrolysis of corncob residue by using it as cellulase supplementation. *Enzyme Microb. Technol.* 46, 444-449.
- CHEN, M., XIA, L., XUE, P. (2007) Enzymatic hydrolysis of corncob and ethanol production from cellulosic hydrolysate. *Int. Biodeter. Biodegr.* 59, 85-89.
- CHIR, J., WITHERS, S., WAN, C. F., LI, Y. K. (2002) Identification of the two essential groups in the family 3 β -glucosidase from *Flavobacterium meningosepticum* by labelling and tandem mass spectrometric analysis. *Biochem. J.* 365, 857-863.
- CHRISTAKOPOULOS, P., GOODENOUGH, P. W., KEKOS, D., MACRIS, B. J., CLAEYSSENS, M., BHAT, M. K. (1994a) Purification and characterization of an extracellular β -glucosidase with transglycosylation and exo-glucosidase activities from *Fusarium oxysporum*. *Eur. J. Biochem.* 224, 379-385.
- CHRISTAKOPOULOS, P., KEKOS, D., MACRIS, B. J., GOODENOUGH, P. W., BHAT, M. K. (1994b) Optimization of β -glucosidase catalysed synthesis of trisaccharides from cellobiose and gentiobiose. *Biotechnol. Lett.* 16, 587-592.

- COENEN, T. M., SCHOENMAKERS, A. E., VERHAGEN, H. (1995) Safety evaluation of β -glucanase derived from *Trichoderma reesei*: summary of toxicological data. *Food Chem. Toxicol.* 33, 859-866.
- COLLINS, C. M., MURRAY, P. G., DENMAN, S., MORRISSEY, J. P., BYRNES, L., TEERI, T. T., TUOHY, M. G. (2007) Molecular cloning and expression analysis of two distinct β -glucosidase genes, *bg1* and *aven1*, with very different biological roles from the thermophilic, saprophytic fungus *Talaromyces emersonii*. *Mycol. Res.* 111, 840-849.
- COPA-PATINO, J. L., BRODA, P. (1994) A *Phanerochaete chrysosporium* β -D-glucosidase/ β -D-xylosidase with specificity for (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan linkages. *Carbohydr. Res.* 253, 265-275.
- CORREIA, R. T. P., McCUE, P., MAGALHAES, M. M. A., MACEDO, G. R., SHETTY, K. (2004) Production of phenolic antioxidants by the solid-state bioconversion of pineapple waste mixed with soy flour using *Rhizopus oligosporus*. *Process Biochem.* 39, 2167-2172.
- COUGHLAN, M. P. (1990) Cellulose degradation by fungi. In: Fogarty, W. M., Kelly, C. T. (eds.) *Microbial enzymes and biotechnology*. Elsevier Appl. Sci. Publ., London, pp. 1-35.
- COUGHLAN, M. P., McHALE, A. (1988) Purification of β -D-glucoside glucohydrolases of *Talaromyces emersonii*. *Methods Enzymol.* 160, 437-443.
- CZJZEK, M., CICEK, M., ZAMBONI, V., BEVAN, D. R., HENRISSAT, B., ESEN, A. (2000) The mechanism of substrate (aglycone) specificity in β -glucosidases is revealed by crystal structures of mutant maize β -glucosidase-DIMBOA, -DIMBOAGlc, and -dhurrin complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 13555-13560.
- DAN, S., MARTON, T., DEKEL, M., BRAVDO, B. A., HE, S., WITHERS, S. G., SHOSEYOV, O. (2000) Cloning, expression, characterization and nucleophile identification of family 3 *Aspergillus niger* β -glucosidase. *J. Biol. Chem.* 275, 4973-4980.
- DE HOOG, G. S., GUARRO, J., GENE, J., FIGUERAS, M. J. (2000) *Atlas of Clinical Fungi*, 2nd ed, vol. 1. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.
- DECKER, C. H., VISSER, J., SCHREIER, P. (2000) β -Glucosidases from five black *Aspergillus* species: study of their physico-chemical and biocatalytic properties. *J. Agric. Food Chem.* 48, 4929-4936.
- DECKER, C. H., VISSER, J., SCHREIER, P. (2001) β -Glucosidase multiplicity from *Aspergillus tubingensis* CBS 643.92: purification and characterization of four β -glucosidases and their differentiation with respect to substrate specificity, glucose inhibition and acid tolerance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55, 157-163.
- DEL-VAL, M. I., HILL, C. G., JIMENEZ-BARBERO, J., OTERO, C. (2001) Selective enzymatic synthesis of 6'-galactosyl lactose by Pectinex Ultra SP in water. *Biotechnol. Lett.* 23, 1921-1924.
- DIXON, M. (1953) The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochem. J.* 55, 170-171.
- DO, C. B., MAHABHASHYAM, M. S. P., BRUDNO, M., BATZOGLOU, S. (2005) PROBCONS: probabilistic consistency-based multiple sequence alignment. *Genome Res.* 15, 330-340.
- DONG, W., YINBO, Q. U., PEIJI, G. (1996) Transglycosylation of extracellular β -glucosidase of *Trichoderma pseudokoningii* S38 and its function in regulation of cellulase biosynthesis. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 42, 363-369.

- DOUGLAS, S. B., VULFSON, E. N. (1995) Application of enzymes to the synthesis of surfactants. *Trends Biotechnol.* 13, 164-172.
- DUBOURDIEU, D., DESPLANQUES, C., VILLETAZ, J. C., RIBEREAU-GAYON, P. (1985) Investigations of an industrial β -D-glucanase from *Trichoderma harzianum*. *Carbohydr. Res.* 144, 277-287.
- DUTHIE, G. G., GARDNER, P. T., KYLE, J. A. M. (2003). Plant polyphenols: Are they the new magic bullet? *Proc. Nutr. Soc.* 62, 599-603.
- EBERHART, B. M., BECK, R. S. (1970) Localization of the β -glucosidases in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* 101, 408-417.
- EDGAR, R. C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792-1797.
- EGGLESTON, G., COTE, G. L. (2003) Oligosaccharides in food and agriculture. In: Eggleston, G., Cote, G. L. (eds.) Oligosaccharides in food and agriculture. American Chemical Society, Washington, pp. 1-14.
- EI ASHRY, E. S., RASHED, N., SHOBIER, A. H. (2000) Glycosidase inhibitors and their chemotherapeutic value, Part 3. *Pharmazie* 55, 403-415.
- ESSERS, A. J. A., BENNIK, M. H. J., NOUT, M. J. R. (1995) Mechanisms of increased linamarin degradation during solid-substrate fermentation of cassava. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 11, 266-270.
- EYZAGUIRRE, J., HIDALGO, M., LESCHOT, A. (2005) β -Glucosidases from filamentous fungi. In: Yarema, K. J. (ed.) Handbook of carbohydrate engineering. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, pp. 645-686.
- FAURE, D., DESAIR J., KEIJERS, V., BEKRI, M. A., PROOST, P., HENRISSAT, B., VANDERLEYDEN, J. (1999) Growth of *Azospirillum irakense* KBC 1 on the aryl β -glucoside salicin requires either Sal A or Sal B. *J. Bacteriol.* 181, 3003-3009.
- FILHO, E. X. F. (1996) Purification and characterization of a β -glucosidase from solid-state cultures of *Humicola grisea* var. *thermoidea*. *Can. J. Microbiol.* 42, 1-5.
- FISCHER, L., BRONMANN, R., KENGEN, S. W. M., DE VOS, W. M., WAGNER, F. (1996) Catalytic potency of β -glucosidase from the extremophile *Pyrococcus furiosus* in glycoconjugate biosynthesis. *Biotechnology* 14, 88-91.
- FLEMING, L. W., DUERKSEN, J. D. (1967) Purification and characterization of yeast β -glucosidases. *J. Bacteriol.* 93, 135-141.
- FLITSCH, S. L. (2000) Chemical and enzymatic synthesis of glycopolymers. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4, 619-625.
- FREDRICKSON, D. S., SLOAN, H. S. (1972) Glucosyl ceramide lipidosis: Gaucher's disease. In: Stanbury, J. B., Wyngaarden, J. B., Fredrickson, D. S. (eds.) The metabolic basis of inherited disease. McGraw-Hill, New York, pp. 730-759.
- GAIKWAD, J. S., MAHESHWARI, R. (1994) Localization and release of β -glucosidase in the thermophilic and cellulolytic fungus, *Sporotrichum thermophile*. *Exp. Mycol.* 18, 300-310.
- 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, Clifton, pp. 571-607.
- GEBLER, J. C., TRIMBUR, D. E., WARREN, R. A. J., AEBERSOLD, R., NAMCHUR, M., WITHERS, S. G. (1995) Substrate induced inactivation of a crippled β -glucosidase mutant: identification of the labelled amino acid and mutagenic analysis of its role. *Biochemistry* 34, 14547-14553.

- GEIGER, G., FURRER, G., FUNK, F., BRANDL, H., SCHULIN, R. (1999) Heavy metal effects on β -glucosidase activity influenced by pH and buffer systems. *J. Enzyme Inhib.* 14, 365-379.
- GERARDI, C., BLANDO, F., SANTINO, A., ZACHEO, G. (2001) Purification and characterisation of a β -glucosidase abundantly expressed in ripe sweet cherry (*Prunus avium* L.) fruit. *Plant Sci.* 160, 795-805.
- GHORAI, S., CHOWDHURY, S., PAL, S., BANIK, S. B., MUKHERJEE, S., KHOWALA, S. (2010) Enhanced activity and stability of cellobiase (β -glucosidase: EC 3.2.1.21) produced in the presence of 2-deoxy-D-glucose from the fungus *Termitomyces clypeatus*. *Carbohydr. Res.* 345, 1015-1022.
- GONDE, P., RATOMAHENINA, R., ARNAUD, A., GALZY, P. (1985) Purification and properties of the exocellular β -glucosidase of *Candida molischiana* (Zikes) Meyer and Yarrow capable of hydrolyzing soluble cellodextrins. *Can. J. Biochem. Cell. Biol.* 63, 1160-1166.
- GOTTFREDSSEN, S. E. (1990) Microbial lipases. In: Fogarty, W. M., Kelly, C. T. (eds.) Microbial enzymes and biotechnology. Elsevier Appl. Sci. Publ., London, pp. 255-274.
- GUEGUEN, Y., CHEMARDIN, P., ARNAUD, A., GALZY, P. (1995) Purification and characterization of an intracellular β -glucosidase from *Botrytis cinerea*. *Enzyme Microb. Technol.* 78, 900-906.
- GUEGUEN, Y., CHEMARDIN, P., PIEN, S., ARNAUD, A., GALZY, P. (1997) Enhancement of aromatic quality of muscat wine by the use of immobilized β -glucosidase. *J. Biotechnol.* 55, 151-156.
- GUNATA, Y. Z., BAYONOVE, C. L., BAUMES, R. L., CORDONNIER, R. E. (1985) The aroma of grapes I. Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma components. *J. Chromatogr.* 331, 83-90.
- GUNATA, Z., VALLIER, M. J., SAPIS, J. C., BAUMES, R., BAYONOVE, C. (1994) Enzymatic synthesis of monoterpenyl β -glucosides by various β -glucosidases. *Enzyme Microb. Technol.* 16, 1055-1058.
- GUSAKOV, A. V., SINITSYN, A. P., GOLDSTEINS, G. H., KLYOSOV, A. A. (1984) Kinetics and mathematical model of hydrolysis and transglycosylation catalyzed by cellobiase. *Enzyme Microb. Technol.* 6, 275-282.
- GUSAKOV, A. V., SINITSYN, A. P., KLESOV, A. A., GOLDSHTEINS, G. K. (1984) Reactions of hydrolysis and transglycosylation catalyzed by cellobiase. Kinetics and mathematical model of the process. *Biokhimiya* 49, 1110-1120.
- HACHMEISTER, K. A., FUNG, D. Y. C. (1993) Tempeh: a mold-modified indigenous fermented food made from soybeans and/or cereal grains. *Crit. Rev. Microbiol.* 19, 137-188.
- HAKULINEN, N., PAAVILAINEN, S., KORPELA, T., ROUVINEN, J. (2000) The crystal structure of β -glucosidase from *Bacillus circulans* sub sp. *alkalophilus*: ability to form long polymeric assemblies. *J. Struct. Biol.* 129, 69-79.
- HANSSON, T., KAPER, T., VAN DER OOST, J., DE VOS, W. M., ADLERCREUTZ, P. (2001) Improved oligosaccharide synthesis by protein engineering of β -glucosidase CelB from hyperthermophilic *Pyrococcus furiosus*. *Biotechnol. Bioeng.* 73, 203-210.
- HAQ, I., JAVED, M. M., SIDDIQ, Z., SALEEM, T. (2006) Triggering of β -glucosidase production in *Trichoderma viride* with nutritional and environmental control. *J. Appl. Sci. Res.* 2, 884-889.

- HARDIMAN, E., GIBBS, M., REEVES, R., BERGQUIST, P. (2010) Directed evolution of a thermophilic β -glucosidase for cellulosic bioethanol production. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 161, 301-312.
- HARHANGI, H. R., STEENBAKKERS, P. J. M., AKHMANOVA, A., JETTEN, M. S. M., VAN DER DRIFT, C., OP DEN CAMP, H. J. M. (2002) A highly expressed family 1 β -glucosidase with transglycosylation capacity from the anaerobic fungus *Piromyces* sp. E2. *Biochim. Biophys. Acta* 1574, 293-303.
- HARNPICHARNCHAI, P., CHAMPREDA, V., SORNLAKE, W., EURWILAICHITR, L. (2009) A thermotolerant β -glucosidase isolated from an endophytic fungi, *Periconia* sp., with a possible use for biomass conversion to sugars. *Protein Expr. Purif.* 67, 61-69.
- HARVEY, A. J., HRMOVA, M., DE GORI, R., VARGHESE, J. N., FINCHER, G. B. (2000) Comparative modelling of the three-dimensional structures of family 3 glycoside hydrolases. *Proteins* 41, 257-269.
- HARVEY, A. J., HRMOVA, M., FINCHER, G. B. (2001) Regulation of genes encoding β -D-glucan glucohydrolases in barley (*Hordeum vulgare*). *Physiol. Plantarum* 113, 108-120.
- HE, Y. H., LU, W. Q., LI, D. F., ZHANG, H. L., JIANG, H. Q. (2006) Effects of soluble and insoluble nonstarch polysaccharides isolated from wheat bran on endogenous amino acid loss at the terminal ileum of growing rats. *J. Anim. Vet. Adv.* 5, 143-149.
- HELLMAN, U., WERNSTEDT, C., GONEZ, J., HELDIN, C. H. (1995) Improvement of an "In-Gel" digestion procedure for the micropreparation of internal protein fragments for amino acid sequencing. *Anal. Biochem.* 224, 451-455.
- HENRISSAT, B., BAIROCH, A. (1996) Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem. J.* 316, 695-696.
- HENRISSAT, B., TEERI, T. T., WARREN, R. A. J. (1998) A scheme for designating enzymes that hydrolyse the polysaccharides in the cell walls of plants. *FEBS Lett.* 425, 352-354.
- HERNANDEZ, L. F., ESPINOSA, J. C., FERNANDEZ-GONZALEZ, M., BRIONES, A. (2003) β -Glucosidase activity in a *Saccharomyces cerevisiae* wine strain. *Int. J. Food Microbiol.* 80, 171-176.
- HERTOG, M. G., FESKENS, E. J., HOLLMAN, P. C., KATAN, M. B., KROMHOUT, D. (1993) Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary hart disease: the Zutphen elderly study. *Lancet* 342, 1007-1011.
- HESSELTINE C. W. (1960) *Gilbertella* gen. nov. (Mucorales). *Bull. Torrey Bot. Club.* 87, 21-30.
- HRMOVA, M., VARGHESE, J. N., DE GORI, R., SMITH, B. J., DRIGUEZ, H., FINCHER, G. B. (2001) Catalytic mechanisms and reaction intermediates along the hydrolytic pathway of a plant β -D-glucan glucohydrolase. *Structure* 9, 1005-1016.
- HU, S. C., HONG, K., SONG, Y. C., LIU, J. Y., TAN, R. X. (2009) Biotransformation of soybean isoflavones by a marine *Streptomyces* sp. 060524 and cytotoxicity of the products. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25, 115-121.
- HUGE-JENSEN, B., GAIALUZZO, D. R., JENSEN, R. G. (1987) Partial purification and characterization of free and immobilized lipases from *Mucor miehei*. *Lipids* 22, 559-565.
- IKEDA, Y., HAYASHI, H., OKUDA, N., PARK, E. Y. (2007) Efficient cellulase production by the filamentous fungus *Acremonium cellulolyticus*. *Biotechnol. Prog.* 23, 333-338.

- ISHIKAWA, E., SAKAI, T., IKEMURA, H., MATSUMOTO, K., ABE, H. (2005) Identification, cloning, and characterization of a *Sporobolomyces singularis* β -galactosidase-like enzyme involved in galacto-oligosaccharide production. *J. Biosci. Bioeng.* 99, 331-339.
- ISMAIL, A., SOULTANI, S., GHOUL, M. (1999) Enzymatic-catalyzed synthesis of alkylglycosides in monophasic and biphasic systems. I. The transglycosylation reaction. *J. Biotechnol.* 69, 135-143.
- ITO, J., EBE, T., SHIBASAKI, S., FUKUDA, H., KONDO, A. (2007) Production of alkyl glucoside from cellooligosaccharides using yeast strains displaying *Aspergillus aculeatus* β -glucosidase 1. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 49, 92-97.
- ITO, M., DEGUCHI, Y., MIYAMORI, A., MATSUMOTO, K., KIKUCHI, H., MATSUMOTO, K., KOBAYASHI, Y., YAJIMA, T., KAN, T. (1990) Effects of administration of galactooligosaccharides on the human faecal microflora, stool weight and abdominal sensation. *Microbiol. Ecol. Health Dis.* 3, 285-292.
- ITURRIAGA, E. A., DÍAZ-MINGUEZ, J. M., BENITO, E. P., ÁLVAREZ, M. I., ESLAVA, A. P. (1992) Heterologous transformation of *Mucor circinelloides* with the *Phycomyces blakesleeanus leu1* gene. *Curr. Genet.* 21, 215-223.
- IWASHITA, K., NAGAHARA, T., KIMURA, H., TAKANO, M., SHIMOI, K., ITO, K. (1999) The *bgl* gene of *Aspergillus kawachii* encodes both extracellular and wall bound β -glucosidases. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5546-5553.
- IWASHITA, K., TODOROKI, K., KIMURA, H., SHIMOI, H., ITO, K. (1998) Purification and characterization of extracellular and cell wall bound β -glucosidase from *Aspergillus kawachii*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62, 1938-1946.
- JÄGER, SZ., BRUMBAUER, A., FEHÉR, E., RÉCZEI, K., KISS, L. (2001) Production and characterization of β -glucosidases from different *Aspergillus* strains. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 17, 455-461.
- JIANG, X., GENG, A., HE, N., LI, Q. (2011) New isolate of *Trichoderma viride* strain for enhanced cellulolytic enzyme complex production. *J. Biosci. Bioeng.* 111, 121-127.
- JOO, A. R., JEYA, M., LEE, K. M., LEE, K. M., MOONA, H. J., KIM, Y. S., LEE, J. K. (2010) Production and characterization of β -1,4-glucosidase from a strain of *Penicillium pinophilum*. *Proc. Biochem.* 45, 851-858.
- JORGENSEN, H., ERIKSSON, T., BÖRJESSON, J., TJERNELD, F., OLSSON, L. (2003) Purification and characterization of five cellulases and one xylanase from *Penicillium brasilianum* IBT 20888. *Enz. Microb. Tech.* 32, 851-861.
- JUHÁSZ, T., SZENGYEL, Z., RECZEY, K., SIIKA-AHO, M., VIKARI, L. (2005) Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. *Proc. Biochem.* 40, 3519-3525.
- KAHKONEN, M. P., HOPIA, A. I., VUORELA, H. J., RAUHA, J. P., PIHLAJA, K., KUJALA, T. S., HEINONEN, M. (1999) Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* 47, 3954-3962.
- KARMAKAR, M., RAY, R. R. (2011) Current trends in research and application of microbial cellulases. *Res. J. Microbiol.* 6, 41-53.
- KAWAGUCHI, T., ENOKI, T., TSURUMAKIA, S., SUMITANIA, J., UEDA, M., OOIB, T., ARAI, M. (1996) Cloning and sequencing of the cDNA encoding β -glucosidase 1 from *Aspergillus aculeatus*. *Gene* 173, 287-288.
- KHAN, M. H., ALI, S., FAKHRUL-RAZI, A., ALAM, Z. (2007) Use of fungi for the bioconversion of rice straw into cellulase enzyme. *J. Environ. Sci. Heal. B* 42, 381-386.

- KHANDKE, K. M., VITHAYATHIL, P. J., MURTHY, S. K. (1989) Purification of xylanase, β -glucosidase, endocellulase, and exocellulase from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*. *Arch. Biochem. Biophys.* 274, 491-500.
- KIMURA, I., YOSHIOKA, N., TAJIMA, S. (1999) Purification and characterization of a β -glucosidase with β -xylosidase activity from *Aspergillus sojae*. *J. Biosci. Bioeng.* 87, 538-541.
- KIWADA, H., NIIMURA, H., FUJISAKI, Y., YAMADA, S., KATO, Y. (1985) Application of synthetic alkylglucoside vesicles as drug carriers. I. Preparation and physical properties. *Chem. Pharm. Bull.* 33, 753-759.
- KOHCHI, C., TOHE, A. (1985) Nucleotide sequence of *Candida pelliculosa* β -glucosidase gene. *Nucleic Acids Res.* 13, 6273-6282.
- KONO, H., WAELCHILI, M. R., FUJIWARA, M., ERATA, T., TAKAI, M. (1999) Regioselective syntheses of new tri- and tetrasaccharides from β -glucobioses by *Trichoderma viride* β -glucosidase and their structural analyses by NMR spectroscopy. *Carbohydr. Res.* 321, 67-74.
- KOROTKOVA, O. G., SEMENOVA, M. V., MOROZOVA, V. V., ZOROV, I. N., SOKOLOVA, L. M., BUBNOVA, T. M., OKUNEV, O. N., SINITSYN, A. P. (2009) Isolation and properties of fungal beta-glucosidases. *Biochemistry (Mosc.)* 74, 569-577.
- KROGH, K. B., HARRIS, P. V., OLSEN, C. L., JOHANSEN, K. S., HOJER-PEDERSEN, J., BORJESSON, J., OLSSON, L. (2010) Characterization and kinetic analysis of a thermostable GH3 β -glucosidase from *Penicillium brasilianum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86, 143-154.
- KUBICEK, C. P., MESSNER, R., GRUBER, F., MACH, R. L., KUBICEK-PRANZ, E. M. (1993) The *Trichoderma* cellulase regulatory puzzle: from the interior life of a secretory fungus. *Enz. Microb. Tech.* 15, 90-99.
- KUMAR, S., SINGH, S. P., MISHRA, I. M., ADHIKARI, D. K. (2009) Recent advances in production of bioethanol from lignocellulosic biomass. *Chem. Eng. Technol.* 32, 517-526.
- KUMBLE, K. D., KUMBLE, S., JAFFAR, M. B. (1992) Inactivation of β -glucosidase from *Arthrobotrys conoides* by diethylpyrocarbonate: evidence of histidine at the active site. *Indian J. Exp. Biol.* 30, 99-102.
- KWON, K. S., KANG, H. G., HAH, Y. C. (1992) Purification and characterization of two extracellular β -glucosidases from *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 97, 149-154.
- LADERO, M., SANTOS, A., GARCIA, J. L., GARCIA, O. F. (2001) Activity over lactose and ONPG of a genetically engineered β -galactosidase from *Escherichia coli* in solution and immobilized: kinetic modelling. *Enzyme Microb. Technol.* 29, 181-193.
- LANGSTON, J., SHEEHY, N., XU, F. (2006) Substrate specificity of *Aspergillus oryzae* family 3 β -glucosidase. *Biochim. Biophys. Acta* 1764, 972-978.
- LE MARCHAND, L., MURPHY, S. P., HANKIN, J. H., WILKENS, L. R., KOLONEL, L. N. (2000) Intake of flavonoids and lung cancer. *J. Natl. Cancer I.* 92, 154-160.
- LECLERC, M., ARNAUD, A., ROTAMAHENINA, R., GALZY, P. (1987) Yeast β -glucosidases. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 5, 269-295.
- LEGLER, G. (1993) Mechanism of enzymic glycoside hydrolysis and of glycosyl transfer by glucosidases and glycosyl transferases. *Carbohydr. Res.* 250, VII-XX.
- LI, B., RENGANATHAN, V. (1998) Gene cloning and characterization of a novel cellulose-binding β -glucosidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2748-2754.

- LI, Y. K., LEE, J. A. (1999) Cloning and expression of β -glucosidase from *Flavobacterium meningosepticum*: a new member of family B β -glucosidase - Homology to fungal β -glucosidases. *Enzyme Microb. Technol.* 24, 144-150.
- LIN, Y., CHEN, G., LING, M., LIANG, Z. (2010) A method of purification, identification and characterization of β -glucosidase from *Trichoderma koningii* AS3.2774. *J. Microbiol. Meth.* 83, 74-81.
- LINEWEAVER, H., BURK, D. (1934) The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.* 56, 658-666.
- LOTFI, A., GHANBARY, M. A. T., RANJBAR, G. A., ASGHARZADEH, A. (2010) Screening of some Zygomycetes for cellulase activity. *Afr. J. Biotechnol.* 9, 4211-4216.
- LOWE, D. A. (1992) Fungal enzymes. In: Arora, D. K., Elander, R. P., Mukerji, K. G. (eds.) Handbook of applied mycology, vol. 4., Fungal biotechnology. Marcel Dekker, New York, pp. 681-706.
- LUKÁCS, GY., PAPP, T., SOMOGYVÁRI, F., CSERNETICS, Á., NYILASI, I., VÁGVÖLGYI, CS. (2009) Cloning of the *Rhizomucor miehei* 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase gene and its heterologous expression in *Mucor circinelloides*. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 95, 55-64.
- LUSIS, A. J., BECKER, R. R. (1973) The β -glucosidase system of the thermophilic fungus *Chaetomium thermophile* var. *coprophile* n. var. *Biochim. Biophys. Acta* 329, 5-16.
- LYND, L. R., WEIMER, P. J., VAN ZYL, W. H., PRETORIUS, I. S. (2002) Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 506-577.
- LYND, L. R., WYMAN, C. E., GERNGROSS, T. U. (1999) Biocommodity engineering. *Biotechnol. Prog.* 15, 777-793.
- MAAS, R. H. W., BAKKER, R. R., EGGINK, G. WEUSTHUIS, R. A. (2006) Lactic acid production from xylose by the fungus *Rhizopus oryzae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72, 861-868.
- MACHIDA, M., OHTSUKI, I., FUKUI, S., YAMASHITA, I. (1988) Nucleotide sequences of *Saccharomycopsis fibuligera* genes for extracellular β -glucosidases as expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 3147-3155.
- MADYASTHA, K. M., SRIVATSAN, J. (1987) Novel transformations of progesterone by a *Mucor* sp. *Can. J. Microbiol.* 33, 361-365.
- MAHESHWARI, R., BHARADWAJ, G., BHAT, M. K. (2000) Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 461-488.
- MAMMA, D., HATZINIKOLAOU, D. G., CHRISTAKOPOULOS, P. (2004) Biochemical and catalytic properties of two intracellular β -glucosidases from the fungus *Penicillium decumbens* active on flavonoid glucosides. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 27, 183-190.
- MARCHESSAULT, R. H., SUNDARARAJAN, P. R. (1993) Cellulose. In: Aspinall, G. O. (ed.) The polysaccharides. Academic Press, New York, pp. 11-95.
- MARTINEZ-VILLALUENGA, C., CARDELLE-COBAS, A., CORZO, N., OLANO, A., VILLAMIEL, M. (2008) Optimization of conditions for galactooligosaccharide synthesis during lactose hydrolysis by β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* (Lactozym 3000 L HP G). *Food Chem.* 107, 258-264.
- MATA, I., CASTILLON, M. P., DOMINGUEZ, J. M., MACARRON, R., ACEBAL, C. (1993) Chemical modification of β -glucosidase from *Trichoderma reesei* QM9414. *J. Biochem.* 114, 754-759.
- MAYER, C., VOCADLO, D. J., MAH, M., RUPITZ, K., STOLL, D., WARREN, R. A. J., WITHERS, S. G. (2006) Characterization of a β -N-acetylhexosaminidase and a β -

- N-acetylglucosaminidase/ β -glucosidase from *Cellulomonas fimi*. *FEBS J.* 273, 2929-2941.
- McCUE, P., SHETTY, K. (2003) Role of carbohydrate-cleaving enzymes in phenolic antioxidant mobilization from whole soybean fermented with *Rhizopus oligosporus*. *Food Biotechnol.* 17, 27-37.
- McILVAINE, T. C. (1921) A buffer solution for colorimetric comparison. *J. Biol. Chem.* 49, 183-186.
- McNAUGHT, A. D. (1996) Nomenclature of carbohydrates (IUPAC Recommendations 1996) *Pure Appl. Chem.* 68, 1919-2008.
- MESSNER, R., KUBICEK, C. P. (1990) Evidence for a single, specific β -glucosidase in cell walls from *Trichoderma reesei* QM9414. *Enzyme Microb. Technol.* 12, 685-690.
- MORRISON, J., JACKSON, E. A., BUNNI, L., COLEMAN, D., M. C., HALE, A. P. (1990) cDNA cloning and expression of a *Talaromyces emersonii* β -glucosidase determinant in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 1049, 27-32.
- MOYER, R. A., HUMMER, K. E., FINN, C. E., FREI, B., WROLSTAD, R. E. (2002) Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. *J. Agric. Food Chem.* 50, 519-525.
- MURASHIMA, K., NISHIMURA, T., NAKAMURA, Y., KOGA, J., MORIYA, T., SUMIDA, N., YAGUCHI, T. KONO, T. (2002) Purification and characterization of new endo-1,4- β -D-glucanases from *Rhizopus oryzae*. *Enzyme Microb. Technol.* 30, 319-326.
- MURRAY, P., ARO, N., COLLINS, C., GRASSICK, A., PENTTILA, M., SALOHEIMO, M., TUOHY, M. (2004) Expression in *Trichoderma reesei* and characterisation of a thermostable family 3 β -glucosidase from the moderately thermophilic fungus *Talaromyces emersonii*. *Protein Expr. Purif.* 38, 248-257.
- NAGY, Á., VÁGVÖLGYI, CS., BALLA, É., FERENCZY, L. (1994) Electrophoretic karyotype of *Mucor circinelloides*. *Curr. Genet.* 26, 45-48.
- NAUMOFF, D. G. (2011) Hierarchical classification of glycoside hydrolases. *Biochemistry (Moscow)* 76, 622-635.
- NG, I. S., LI, C. W., CHAN, S. P., CHIR, J. L., CHEN, P. T., TONG, C. G., YU, S. M., HO, T. H. D. (2010) High-level production of a thermoacidophilic β -glucosidase from *Penicillium citrinum* YS40-5 by solid-state fermentation with rice bran. *Bioresour. Technol.* 101, 1310-1317.
- NIDETZKY, B., STEINER, W., CLAEYSSSENS, M. (1994) Cellulose hydrolysis by the cellulases from *Trichoderma reesei*: adsorptions of two cellobiohydrolases, two endocellulases and their core proteins on filter paper and their relation to hydrolysis. *Biochem. J.* 303, 817-823.
- OCHMAN, H., GERBER, A. S., HARTL, D. L. (1988) Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* 120, 621-623.
- 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.
- ONISHI, N., TANAKA, T. (1996) Purification and properties of a galacto- and gluco-oligosaccharide-producing β -glycosidase from *Rhodotorula minuta* IFO879. *J. Ferment. Bioeng.* 82, 439-443.
- OUTTRUP, H., BOYCE, C. O. L. (1990) Microbial proteinases and biotechnology. In: Fogarty, W. M., Kelly, C. T. (eds.). *Microbial enzymes and biotechnology*. Elsevier Appl. Sci. Publ., London, pp. 227-254.

- PAGNI, M., IOANNIDIS, V., CERUTTI, L., ZAHN-ZABAL, M., JONGENEEL, C. V., HAU, J., MARTIN, O., KUZNETSOV, D., FALQUET, L. (2007) MyHits: improvements to an interactive resource for analyzing protein sequences. *Nucleic Acids Res.* 35(Web Server issue), W433-W437.
- PAL, S., BANIK, S. P., GHORAI, S., CHOWDHURY, S., KHOWALA, S. (2010) Purification and characterization of a thermostable intra-cellular β -glucosidase with transglycosylation properties from filamentous fungus *Termitomyces clypeatus*. *Bioresour. Technol.* 101, 2412-2420.
- PALCIC, M. M. (1999) Biocatalytic synthesis of oligosaccharides. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10, 616-624.
- PALMERI, R., SPAGNA, G. (2007) β -Glucosidase in cellular and acellular form for winemaking application. *Enzyme Microb. Technol.* 40, 382-389.
- PANDEY, A., SAILAS, B., SOCCOL, C. R., NIGAM, P., KRIEGER, N., SOCCOL, V. T. (1999) The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 29, 119-131.
- PANDEY, M., MISHRA, S. (1995) Cloning and expression of β -glucosidase gene from the yeast *Pichia etchellsii*. *J. Ferment. Bioeng.* 80, 446-453.
- PANDEY, M., MISHRA, S. (1997) Expression and characterization of *Pichia etchellsii* β -glucosidase in *Escherichia coli*. *Gene* 190, 45-51.
- PAPP, T., VELAYOS, A., BARTÓK, T., ESLAVA, A. P., VÁGVÖLGYI, CS., ITURRIAGA, E. A. (2006) Heterologous expression of astaxanthin biosynthesis genes in *Mucor circinelloides*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69, 526-531.
- PEMBERTON, M. S., BROWN, R. D. JR., EMERT, G. H. (1980) The role of β -glucosidase in the bioconversion of cellulose to ethanol. *Can. J. Chem. Eng.* 58, 723-729.
- PEREZ-PONS, J.-A., REBORDOSA, X., QUEROL, E. (1995) Properties of a novel glucose-enhanced β -glucosidase purified from *Streptomyces* sp. (ATCC 11238) *Biochim. Biophys. Acta* 1251, 145-153.
- PERUGINO, G., TRINCONE, A., ROSSI, M., MORACCI, M. (2004) Oligosaccharide synthesis by glycosynthases. *Trends Biotechnol.* 22, 31-37.
- PETRUCCIOLI, M., BRIMER, L., CICALINI, A. R., FEDERICI, F. (1999) The linamarase of *Mucor circinelloides* LU M40 and its detoxifying activity on cassava. *J. Appl. Microbiol.* 86, 302-310.
- PITSON, S. M., SEVIOUR, R. J., McDOUGALL, B. M. (1997) Purification and characterization of an extracellular β -glucosidase from the filamentous fungus *Acremonium persicinum* and its probable role in β -glucan degradation. *Enzyme Microb. Technol.* 21, 182-190.
- PLOU, F. J., GOMEZ DE SEGURA, A., BALLESTEROS, A. (2007) Application of glycosidases and transglycosidases in the synthesis of oligosaccharides. In: Polaina, J., Maccabe A. P. (eds.) *Industrial Enzymes. Structure, Function and Applications*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 141-157.
- PRASAD, S., SINGH, A., JOSHI, H. C. (2007) Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. *Resour. Conserv. Recy.* 50, 1-39.
- RABIU, B. A., JAY, A. J., GIBSON, G. R., RASTALL, R. A. (2001) Synthesis and fermentation properties of novel galacto-oligosaccharides by β -galactosidases from *Bifidobacterium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2526-2530.
- RAJOKA, M. I., AKHTAR, M. W., HANIF, A., KHALID, A. M. (2006) Production and characterization of a highly active cellobiase from *Aspergillus niger* grown in solid state fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 22, 991-998.

- RAMARATHNAM, N., OSAWA, T., OCHI, H., KAWAKISHI, S. (1995) The contribution of plant food antioxidants to human health. *Trends Food Sci. Tech.* 6, 75-82.
- RANDHIR, R., VATTEM, D., SHETTY, K. (2004) Solid-state bioconversion of fava bean by *Rhizopus oligosporus* for enrichment of phenolic antioxidants and L-DOPA. *Innov. Food Sci. Emerg.* 5, 235-244.
- RANTWIJK, F., OOSTEROM, M. W., SHELDON, R. A. (1999) Glycosidase-catalysed synthesis of alkyl glycosides. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 6, 511-532.
- RAO, U. S., MURTHY, S. K. (1991) The effects of β -mercaptoethanol and sodium dodecyl sulfate on the *Humicola insolens* β -glucosidase. *Biochem. Int.* 23, 343-348.
- RAPP, P. (1989) 1,3- β -Glucanase, 1,6- β -glucanase and β -glucosidase activities of *Sclerotium glaucanicum*: synthesis and properties. *J. Gen. Microbiol.* 135, 2847-2858.
- RAZA, F., RAZA, N. A., HAMEED, U., HAQ, I. U., MARIAM, I. (2011) Solid state fermentation for the production of β -glucosidase by co-culture of *Aspergillus niger* and *A. oryzae*. *Pak. J. Bot.* 43, 75-83.
- RIOU, C., SALMON, J. M., VALLIER, M. J., GÜNATA, Z., BARRE, P. (1998) Purification, characterization, and substrate specificity of a novel highly glucose-tolerant β -glucosidase from *Aspergillus oryzae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3607-3614.
- ROJAS, A., AROLA, L. I., ROMEU, A. (1995) β -Glucosidase families revealed by computer analysis of protein sequences. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 35, 1223-1231.
- RONQUIST, F., HUELSENBECK, J. P. (2003) MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19, 1572-1574.
- ROSI, I., VINELLA, M., DOMIZIO, P. (1994) Characterization of beta-glucosidase activity in yeasts of oenological origin. *J. Appl. Bacteriol.* 77, 519-527.
- ROY, P., MISHRA, S., CHAUDHURI, T. K. (2005) Cloning, sequence analysis, and characterization of a novel β -glucosidase-like activity from *Pichia etchellsii*. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 336, 299-308.
- SAHA, B. C. (2004) Production, purification and properties of endoglucanase from a newly isolated strain of *Mucor circinelloides*. *Proc. Biochem.* 39, 1871-1876.
- SAIBI, W., AMOURI, B., GARGOURI, A. (2007) Purification and biochemical characterization of a transglucosylating β -glucosidase of *Stachybotrys* strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77, 293-300.
- SAKAMOTO, R., KANAMOTO, M., ARAI, M., MURAO, S. (1985) Enzymatic properties of three β -glucosidases from *Aspergillus aculeatus* No. F-50. *Agric. Biol. Chem.* 49, 1275-1281.
- SAKO, T., MATSUMOTO, K., TANAKA, R. (1999) Recent progress on research and applications of non-digestible galactooligosaccharides. *Int. Dairy J.* 9, 69-80.
- SALOHEIMO, M., KUJA-PANULA, J., YLOSMAKI, E., WARD, M., PENTTILA, M. (2002) Enzymatic properties and intracellular localization of the novel *Trichoderma reesei* β -glucosidase BGLII (Cel1A). *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4546-4553.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- SANTOS, A., LADERO, M., GARCIA-OCHOA, F. (1998) Kinetic modeling of lactose hydrolysis by a β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme Microb. Technol.* 22, 558-567.
- SANYAL, A., KUNDU, R. K., DUBE, S., DUBE, D. K. (1988) Extracellular cellulolytic enzyme system of *Aspergillus japonicus*. 2. Purification and characterization of an inducible extracellular β -glucosidase. *Enzyme Microb. Technol.* 10, 91-99.

- SAVOIE, J. M., GOURBIÈRE, F. (1987) The role of polysaccharidase enzymes in the organization of the fungal communities of a forest leaf litter. *Food Hydrocolloid*. 1, 519-520.
- SCALBERT, A., WILLIAMSON, G. (2000) Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* 130, 2073S-2085S.
- SCHIPPER, M. A. A. (1978) On the genera *Rhizomucor* and *Parasitella*. *Stud. Mycol.* 17, 53-71.
- SETHI, B., JAIN, M., CHOWDHARY, M., SONI, Y., BHATIA, Y., SAHAI, V., MISHRA, S. (2002) Cloning, characterization of *Pichia etchellsii* β -glucosidase II and the effect of media composition and feeding strategy on its production in a bioreactor. *Biotechnol. Bioproc. E.* 7, 43-51.
- SHARMILA, T., SREERAMULU, G., NAND, K. (1998) Purification and characterization of β -1-4,-glucosidase from *Clostridium papyrosolvans*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 27, 175-179.
- SHARON, N., OFEK, I. (2002) Fighting infectious diseases with inhibitors of microbial adhesion to host tissues. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 42, 267-272.
- SHINOYAMA, H., TAKEI, K., ANDO, A., FUJII, T., SASAKI, M., DOI, Y. (1991) Enzymatic synthesis of useful alkyl β -glucosides. *Agric. Biol. Chem.* 55, 1679-1681.
- SINGH, A., KUHAD, R. C., WARD, O. P. (2007) Industrial applications of microbial cellulases. In: Kuhad, R. C., Singh, A. (eds.) *Lignocellulose biotechnology: future prospects*. I. K. International Publishing House Ltd., New Delhi, pp. 345-358.
- SKORY, C. D., FREER, S. N. (1995) Cloning and characterization of a gene encoding a cell-bound, extracellular β -glucosidase in the yeast *Candida wickerhamii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 518-525.
- SKORY, C. D., FREER, S. N., BOTHAST, R. J. (1996) Expression and secretion of the *Candida wickerhamii* extracellular β -glucosidase gene, bglB, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 30, 417-422.
- SMAALI, I., MAUGARD, T., FERID, L., LEGOY, M. D., MARZOUKI, N. (2007) Efficient synthesis of gluco-oligosaccharides and alkyl-glucosides by transglycosylation activity of β -glucosidase from *Sclerotinia sclerotiorum*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23, 145-149.
- SMAALI, M. I., GARGOURI, M., LEGOY, M. D., MAUGARD, T., FARID, L., MARZOUKI, N. (2004a) A β -glucosidase from *Sclerotinia sclerotiorum*: biochemical characterization and use in oligosaccharide synthesis. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 112, 63-78.
- SMAALI, M. I., MICHAUD, N., MARZOUKI, N., LEGOY, M. D., MAUGARD, T. (2004b) Comparison of two β -glucosidases for the enzymatic synthesis of β -(1-6)- β -(1-3)-gluco-oligosaccharides. *Biotechnol. Lett.* 26, 675-679.
- SOHAIL, M., SIDDIQI, R., AHMAD, A., KHAN, S. A. (2009) Cellulase production from *Aspergillus niger* MS82: effect of temperature and pH. *New Biotechnol.* 25, 437-441.
- SOMKUTI, G. A., BABEL, F. J., SOMKUTI, A. C. (1969) Cellulolysis by *Mucor pusillus*. *Appl. Microbiol.* 17, 888-892.
- SOUZA, F. H. M., NASCIMENTO, C. V., ROSA, J. C., MASUI, D. C., LEONE, F. A., JORGE, J. A., FURRIEL, R. P. M. (2010) Purification and biochemical characterization of a mycelial glucose- and xylose-stimulated β -glucosidase from the thermophilic fungus *Humicola insolens*. *Proc. Biochem.* 45, 272-278.
- SPAGNA, G., BARBAGALLO, R. N., PALMERI, R., RESTUCCIA, C., GIUDICI, P. (2002) Properties of endogenous β -glucosidase of a *Saccharomyces cerevisiae*

- strain isolated from Sicilian musts and wines. *Enzyme Microb. Technol.* 31, 1030-1035.
- SRIVASTAVA, S. K., GOPALKRISHNAN, K. S., RAMACHANDRAN, K. B. (1984) Kinetic characterization of a crude beta-D-glucosidase from *Aspergillus wentii* Pt 2804. *Enzyme Microb. Technol.* 6, 508-512.
- STEENBAKKERS, P. J. M., HARHANGI, H. R., BOSSCHER, M. W., VAN DER HOOFT, M. M. C., KELTJENS, J. T., VAN DER DRIFT, C., VOGELS, G. D., OP DEN CAMP, H. J. M. (2003) β -glucosidase in cellulosome of the anaerobic fungus *Piromyces* sp. strain E2 is a family 3 glycoside hydrolase. *Biochem. J.* 370, 963-970.
- STEVENSON, D. E., STANLEY, R. A., FURNEAUX, R. H. (1996) Oligosaccharide and alkyl β -galactopyranoside synthesis from lactose with *Caldocellum saccharolyticum* β -glycosidase. *Enzyme Microb. Technol.* 18, 544-549.
- SUKUMARAN, R. K., SINGHANIA, R. R., PANDEY, A. (2005) Microbial cellulases-production, applications and challenges. *J. Sci. Ind. Res.* 64, 832-844.
- SUN, X., LIU, Z., QU, Y., LI, X. (2008) The effects of wheat bran composition on the production of biomass-hydrolyzing enzymes by *Penicillium decumbens*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 146, 119-128.
- SUTO, M., TOMITA, F. (2001) Induction and catabolite repression mechanism of cellulose in fungi. *J. Biosci. Bioeng.* 92, 305-311.
- SZABÓ, I. J., JOHANSSON, G., PETTERSSON, G. (1996) Optimized cellulase production by *Phanerochaete chrysosporium*: control of catabolite repression by fed-batch cultivation. *J. Biotechnol.* 48, 221-230.
- TAHERZADEH, M. J., FOX, M., HJORTH, H., EDEBO, L. (2003) Production of mycelium biomass and ethanol from paper pulp sulfite liquor by *Rhizopus oryzae*. *Bioresour. Technol.* 88, 167-77.
- TAKASHIMA, S., NAKAMURA, A., HIDAKA, M., MASAKI, H., UOZUMI, T. (1999) Molecular cloning and expression of the novel fungal β -glucosidase genes from *Humicola grisea* and *Trichoderma reesei*. *J. Biochem.* 125, 728-736.
- TAKII, Y., IKEDA, K., SATO, C., YANO, M., SATO, T., KONNO, H. (2005) Production and characterization of β -glucosidase from *Rhizopus oryzae* MIBA348. *J. Biol. Macromol.* 5, 11-16.
- THERON, M. M., LUES, J. F. R. (2010) Organic acids and food preservation. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton.
- TODARO, A., PALMERI, R., BARBAGALLO, R. N., PIFFERI, P. G., SPAGNA, G. (2008) Increase of trans-resveratrol in typical Sicilian wine using β -glucosidase from various sources. *Food Chem.* 107, 1570-1575.
- TOMME, P., WARREN, R. A., GILKES, N. R. (1995) Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Adv. Microb. Physiol.* 37, 1-81.
- TRICONE, A., PAGNOTTA, E. (1995) Efficient chemoselective synthesis of 3, 4', dihydroxypropiophenone 3-O- β -D-glucoside by thermophilic β -glycosidase from *Sulfolobus solfataricus*. *Biotechnol. Lett.* 17, 45-48.
- TURAN, Y., ZHENG, M. (2005) Purification and characterization of an intracellular β -glucosidase from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biochemistry (Mosc.)* 70, 1363-1368.
- TÜZEN, M., ÖZDEMİR, M. (2003) Chromatographic determination of phenolic acids in the snowdrop by HPLC. *Turk. J. Chem.* 27, 49-54.
- UMEZURIKE, G. M. (1977) The active site of β -glucosidase from *Botryodiplodia theobroome*: effects of pH and dioxan on enzyme catalysed reactions. *Biochem. J.* 167, 831-833.

- USAMI, S., KIRIMURA, K., IMURA, M., MORIKAWA, S. (1990) Cellular localization of the constitutive β -glucosidase in *Trichoderma viride*. *J. Ferment. Bioeng.* 70, 185-187.
- VÁGVÖLGYI, CS., VASTAG, M., ÁCS, K., PAPP, T. (1999) *Rhizomucor tauricus*: a questionable species of the genus. *Mycol. Res.* 103, 1318-1322.
- VAN HEESWIJK, R., RONCERO, M. I. G. (1984) High frequency transformation of *Mucor* with recombinant plasmid DNA. *Carlsberg Res. Commun.* 49, 691-702.
- VANGDAL, E., SLIMESTAD, R. (2006) Methods to determine antioxidative capacity in fruit. *J. Fruit Ornam. Plant Res.* 14, 123-131.
- VARGHESE, J. N., HRMOVA, M., FINCHER, G. B. (1999) Three dimensional structure of a barley β -D-glucan exohydrolase, a family 3 glycosyl hydrolase. *Structure* 7, 179-190.
- VARKI A. (1993) Biological roles of oligosaccharides: All of the theories are correct. *Glycobiology* 3, 97-130.
- VARROT, A., SCHULEIN, M., DAVIES, G. J. (2000) Insights into ligand-induced conformational change in Cel5A from *Bacillus agaradhaerens* revealed by a catalytically active crystal form. *J. Mol. Biol.* 297, 819-828.
- VASSEROT, H., CHEMARDIN, P., ARNAUD, A., GALZY, P. (1991) Purification and properties of the β -glucosidase of a new strain of *Candida molischiana* able to work at low pH values: possible use in the liberation of bound terpenols. *J. Basic Microb.* 4, 301-312.
- VASSEROT, Y., CHRISTIAENS, P., CHEMARDIN, P., ARNAUD, A., GALZY, P. (1989) Purification and properties of a β -glucosidase of *Hanseniaspora vineae* Van der Walt and Tscheuschner with the view to its utilization in fruit aroma liberation. *J. Appl. Bacteriol.* 66, 271-279.
- 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.
- VATTEM, D. A., GHAEDIAN, R., SHETTY, K. (2005) Enhancing health benefits of berries through phenolic antioxidant enrichment: focus on cranberry. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 14, 120-130.
- VATTEM, D. A., LIN, Y. T., LABBE, R. G., SHETTY, K. (2004) Antimicrobial activity against select food-borne pathogens by phenolic antioxidants enriched in cranberry pomace by solid-state bioprocessing using the food grade fungus *Rhizopus oligosporus*. *Proc. Biochem.* 39, 1939-1946.
- VATTEM D. A., SHETTY, K. (2002) Solid-state production of phenolic antioxidants from cranberry pomace by *Rhizopus oligosporus*. *Food Biotechnol.* 16, 189-210.
- VATTEM, D. A., SHETTY, K. (2003) Ellagic acid production and phenolic antioxidant activity in cranberry pomace mediated by *Lentinus edodes* using solid-state system. *Proc. Biochem.* 39, 367-379.
- VELAYOS, A., LOPEZ-MATAS, M. A., RUIZ-HIDALGO, M. J., ESLAVA, A. P. (1997) Complementation analysis of carotenogenic mutants of *Mucor circinelloides*. *Fung. Genet. Biol.* 22, 19-27.
- VOCADLO, D. WITHERS, S. (2000) Glycosidase-catalyzed oligosaccharide synthesis. In: Ernst, B., Hart, G. W., Sinay, P. (eds.) Carbohydrates in Chemistry and Biology. Wiley-VCH, Weinheim, pp. 723-844.

- VOIGT, K., CIGELNIK, E., O'DONNELL, K. (1999) Phylogeny and PCR identification of clinically important zygomycetes based on nuclear ribosomal-DNA sequence data. *J. Clin. Microbiol.* 37, 3957-3964.
- WALLECHA, A., MISHRA, S. (2003) Purification and characterization of two β -glucosidases from a thermo-tolerant yeast *Pichia etchellsii*. *Biochim. Biophys. Acta* 1649, 74-84.
- WANG, S. W., PARK, Y. S., LEE, J. S., HONG, S. I., KIM, S. W. (2004) Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 91, 153-156.
- WATANABE, T., SATO, T., YOSHIOKA, S., KOSHIJIMA, T., KUWAHARA, M. (1992) Purification and properties of *Aspergillus niger* β -glucosidase. *Eur. J. Biochem.* 209, 651-659.
- WHELAN, S., GOLDMAN, N. (2001) A general empirical model of protein evolution derived from multiple protein families using a maximum-likelihood approach. *Mol. Biol. Evol.* 18, 691-699.
- WITHERS, S. G. (2001) Mechanisms of glycosyl transferases and hydrolases. *Carbohydr. Polym.* 44, 325-337.
- WITHERS, S. G., STREET, I. P. (1988) Identification of a covalent α -D-glucopyranosyl enzyme intermediate formed on a β -glucosidase. *J. Am. Chem. Soc.* 110, 8551-8553.
- WOLFF, A. M., ARNAU, J. (2002) Cloning of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding genes in *Mucor circinelloides* (*Syn. racemosus*) and use of the *gpdI* promoter for recombinant protein production. *Fung. Gen. Biol.* 35, 21-29.
- WOOD, T. M. (1992) Fungal cellulases. *Biochem. Soc. Trans.* 20, 46-53.
- WOODWARD, J., WISEMAN, A. (1982) Fungal and other β -D-glucosidases - their properties and applications. *Enzyme Microb. Technol.* 4, 73-79.
- WYMER, N., TOONE, E. J. (2000) Enzyme-catalyzed synthesis of carbohydrates. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4, 110-119.
- YAN, T. R., LIAU, J. C. (1998) Synthesis of cellooligosaccharides from cellobiose with β -glucosidase II from *Aspergillus niger*. *Biotechnol. Lett.* 20, 591-594.
- YAN, T. R., LIN, C. L. (1997) Purification and characterization of a glucose-tolerant β -glucosidase from *Aspergillus niger* CCRC 31494. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61, 965-970.
- YANAI, T., SATO, M. (1999) Isolation and properties of β -glucosidase produced by *Debaryomyces hansenii* and its application in winemaking *Am. J. Enol. Vitic.* 50, 231-235.
- YOSHIOKA, H., HAYASHIDA, S. (1980) Production and purification of thermostable β -glucosidase from *Mucor miehei* YH-10. *Agric. Biol. Chem.* 44, 2817-2824.
- YUN, S. I., JEONG, C. S., CHUNG, D. K., CHOI, H. S. (2001) Purification and some properties of a β -glucosidase from *Trichoderma harzianum* type C-4. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65, 2028-2032.
- ZANOELO, F. F., POLIZELI, M. L. T. M., TERENCE, H. F., JORGE, J. A. (2004) β -Glucosidase activity from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* is stimulated by glucose and xylose. *FEMS Microbiol. Lett.* 240, 137-143.
- ZHANG, Z., MARQUARDT, R. R., WANG, G., GUENTER, W., CROW, G. H., HAN, Z., BEDFORD, M. R. (1996) A simple model for predicting the response of chicks to dietary enzyme supplementation. *J. Anim. Sci.* 74, 394-402.
- ZHENG, Z., SHETTY, K. (2000) Solid-state bioconversion of phenolics from cranberry pomace and role of *Lentinus edodes* β -glucosidase. *J. Agric. Food Chem.* 48, 895-900.

ZOUHAR, J., VEVODOVA, J., MAREK, J., DAMBORSKY, J., SU, X. D., BRZOBOHATY, B. (2001) Insights into the functional architecture of the catalytic centre of a maize β -glucosidase Zm-p 60.1. *Plant Physiol.* 127, 973-985.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt hálás köszönetemet fejezem ki témavezetőimnek, Prof. Dr. Vágvölgyi Csaba tanszékvezető egyetemi tanárnak, és Dr. Papp Tamás egyetemi docensnek, hogy munkámat szakdolgozó korom óta végtelen türelemmel és odaadással irányították, támogatták, hasznos elméleti és gyakorlati tanácsokkal segítették.

Külön hálával és köszönettel tartozom Dr. Krisch Judit főiskolai docensnek a sok hasznos tanácsért, ötletadó beszélgetésért és a közösen végzett munkáért, valamint Dr. Tserennadmid Rentsenkhand ösztöndíjas kutatónak az enzimológiai mérések során nyújtott segítségéért.

Köszönettel tartozom Dr. Manczinger László egyetemi docensnek az enzimológiai kutatásokban nyújtott hasznos szakmai tanácsaiért.

Köszönöm minden közvetlen munkatársamnak és barátaimnak, Dr. Galgóczy Lászlónak, Dr. Nyilasi Ildikónak, Dr. Lukács Gyöngyinek, Kocsubé Sándornak, Csernetics Árpádnak, Petkovits Tamásnak, Krizsán Krisztinának és Linka Beátának a laborban nyújtott segítségüket, melyekkel nagymértékben segítették munkámat.

Külön köszönettel tartozom Dr. Szekeres Andrásnak és Bencsik Ottónak a kromatográfiás kísérletek, valamint Nagy Lászlónak a filogenetikai vizsgálatok során nyújtott segítségükért.

Köszönettel tartozom hallgatóimnak, Farkas Elvirának, Lung Szabinának és Tóth Adélnak, akik végtelen lelkesedéssel és kitartással munkálkodtak jelen értekezésben is bemutatott témáikon.

Hálás vagyok Lele Máriának és Deákné Kulcsár Melindának a munkám során nyújtott technikai segítségért, valamint Dr. Palágyi Andrásnének, Kreisch Istvánnének és Szőnyi Jánosnének a munkámmal kapcsolatos hivatalos ügyek bonyolításáért.

Köszönetet mondok az SZTE TTIK Mikrobiológiai Tanszék minden további munkatársának és mindazoknak, akik bármilyen módon segítettek a dolgozatom elkészülését.

Hálásan köszönöm szüleimnek, testvéreimnek és feleségemnek a kitartó szeretetet, biztatást és türelmet, amivel mindvégig mellettem álltak. Hálás vagyok Petra kislányom gyermeki mosolyaiért, melyek hatalmas erőt biztosítottak dolgozatom elkészítéséhez.

MELLÉKLETEK

1. sz. melléklet. Járomspórás gombatorzsek fermentleveinek β -glükózidáz aktivitása cellobiózt tartalmazó minimál tápoldat alkalmazásakor. Az egyes nemzetségek tagjai közül a vastagon szedett izolátumokkal foglalkoztunk részletesen.

+: kis enzimaktivitás (A_{405} : 0,3 alatt)

++: közepes enzimaktivitás (A_{405} : 0,3 - 0,7)

+++ : nagy enzimaktivitás (A_{405} : 0,7 felett)

Fajnév	Törzsgyűjtemény kódja	Eredet	Fermentlé enzimaktivitása	Fajnév	Törzsgyűjtemény kódja	Eredet	Fermentlé enzimaktivitása
<i>Gilbertella persicaria</i>	ATCC 201107	őszibarack / Fresno, Kalifornia, USA	+++	<i>Rhizomucor pusillus</i>	IBP M.p./1	ismeretlen / Lengyelország	+
<i>Gilbertella persicaria</i>	ATCC 201108	őszibarack / Fresno, Kalifornia, USA	+++	<i>Rhizomucor pusillus</i>	FRR 1652	ismeretlen	+
<i>Gilbertella persicaria</i>	TJM 9A10	őszibarack / Parlier, Kalifornia, USA	++	<i>Rhizomucor pusillus</i>	NRRL 6304	gabona	+
<i>Gilbertella persicaria</i>	TJM 9A12	őszibarack / Parlier, Kalifornia, USA	++	<i>Rhizomucor pusillus</i>	NRRL 6401	Kalifornia, USA	+
<i>Gilbertella persicaria</i>	TJM 9B1/A	őszibarack / Clovis, Kalifornia, USA	++	<i>Rhizomucor pusillus</i>	NRRL 3638	vízartály / Wisconsin, USA	+
<i>Gilbertella persicaria</i>	TJM 9B1/B	őszibarack / Clovis, Kalifornia, USA	+	<i>Rhizomucor pusillus</i>	ATCC 46342	kukoricaliszt / Hollandia	+
<i>Gilbertella persicaria</i>	TJM 9B2	őszibarack / Clovis, Kalifornia, USA	+	<i>Rhizomucor pusillus</i>	ATCC 16459	lótrágya / Nevada, USA	+
<i>Gilbertella persicaria</i>	TJM 9B3	őszibarack / Clovis, Kalifornia, USA	++	<i>Rhizomucor pusillus</i>	ATCC 16458	levél / Kalifornia, USA	+
<i>Gilbertella persicaria</i>	TJM 9B4	őszibarack / Clovis, Kalifornia, USA	++	<i>Rhizomucor pusillus</i>	SZMC 11026	ismeretlen	+
<i>Gilbertella persicaria</i>	TJM 9B5	őszibarack / Clovis, Kalifornia, USA	+	<i>Rhizomucor pusillus</i>	SZMC 11027	klinikai izolátum / SZTE, Szeged	+

Fajnév	Törzsgyűjtemény kódja	Eredet	Fermentlé enzimaktivitása	Fajnév	Törzsgyűjtemény kódja	Eredet	Fermentlé enzimaktivitása
<i>Gilbertella persicaria</i>	TJM 9B6	őszibarack / Clovis, Kalifornia, USA	++	<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>oligosporus</i>	NRRL 2710	tempeh / Indonézia	++
<i>Gilbertella persicaria</i>	TJM 9B7	őszibarack / Clovis, Kalifornia, USA	++	<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>rhizopodiformis</i>	CBS 220.92	tüdő / Hollandia	+
<i>Gilbertella persicaria</i>	TJM 9B8	őszibarack / Clovis, Kalifornia, USA	++	<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>rhizopodiformis</i>	CBS 102.277	rhinocerebrális infekció	+
<i>Gilbertella persicaria</i>	TJM 17F2	nektarin / Reedley, Kalifornia, USA	+++	<i>Rhizopus niveus</i>	CBS 403.51	ismeretlen / Japán	++
<i>Gilbertella persicaria</i>	TJM 17F3	nektarin / Reedley, Kalifornia, USA	++	<i>Rhizopus oryzae</i>	TJM 7F2	cukkini / Kalifornia, USA	+
<i>Gilbertella persicaria</i>	TJM 22B8	nektarin / Reedley, Kalifornia, USA	++	<i>Rhizopus oryzae</i>	TJM 24B2	füge / Kalifornia, USA	+
<i>Mucor amphibiorum</i>	CBS 763.74	Németország	++	<i>Rhizopus oryzae</i>	SZMC 0495	Szőlészeti és Borászati Kut. Int.	+
<i>Mucor azygosporus</i>	CBS 292.63	USA	++	<i>Rhizopus oryzae</i>	SZMC 0502	Szőlészeti és Borászati Kut. Int.	+
<i>Mucor circinelloides</i> f. <i>jansenii</i>	CBS 243.67	Dél-Afrika	+	<i>Rhizopus oryzae</i>	MUFS R5	ismeretlen / Dél-Afrika	+
<i>Mucor circinelloides</i> f. <i>lusitanicus</i>	CBS 277.49	Katholieke University, Leuven	+	<i>Rhizopus oryzae</i>	SZMC 0497	lab. kontamináció / SZTE Mikrob. tsz.	+
<i>Mucor corticolus</i>	SZMC 12031	Szőlészeti és Borászati Kut. Int.	+++	<i>Rhizopus oryzae</i>	NRRL 1526	tempeh / Illinois, USA	+
<i>Mucor fragilis</i>	CBS 236.35	Németország	++	<i>Rhizopus oryzae</i>	NRRL 2908	Chinese yeast / Kína	+++
<i>Mucor guillermondii</i>	CBS 174.27	Oroszország	+++	<i>Rhizopus oryzae</i>	CBS 112.07	ismeretlen / Hollandia	+
<i>Mucor indicus</i>	CBS 226.29	Svájc	+	<i>Rhizopus oryzae</i>	CBS 260.28	Chinese yeast / Kína	+
<i>Mucor microsporus</i>	CBS 204.28	Franciaország	+	<i>Rhizopus oryzae</i>	SZMC 13635	RA 99-880, agy / Texas, USA	+

Fajnév	Törzsgyűjtemény kódja	Eredet	Fermentlé enzimaktivitása	Fajnév	Törzsgyűjtemény kódja	Eredet	Fermentlé enzimaktivitása
<i>Mucor minutus</i>	CBS 586.67	India	+	<i>Rhizopus oryzae</i>	CBS 109.939	zigomikózis / Toronto, Kanada	+
<i>Mucor nederlandicus</i>	CBS 735.70	ismeretlen	+	<i>Rhizopus oryzae</i>	CBS 146.90	zigomikózis / Hollandia	+
<i>Mucor psychrophilus</i>	CBS 288.71	Oroszország	+	<i>Rhizopus stolonifer</i>	TJM 5D9	nektarin / Tulare, Kalifornia, USA	+
<i>Mucor racemosus</i> f. <i>chibinensis</i>	CBS 636.67	ismeretlen	++	<i>Rhizopus stolonifer</i>	TJM 5D10	nektarin / Tulare, Kalifornia, USA	+
<i>Mucor racemosus</i> f. <i>sphaerosporus</i>	CBS 115.08	Norvégia	+	<i>Rhizopus stolonifer</i>	TJM 13F10	őszibarack / Hanford, Kalifornia, USA	+
<i>Mucor strictus</i>	CBS 576.66	Ausztria	+	<i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>reflexus</i>	SZMC 0503	Szőlészeti és Borászati Kut. Int.	+
<i>Mucor zonatus</i>	CBS 148.69	Németország	+	<i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>reflexus</i>	SZMC 0504	Szőlészeti és Borászati Kut. Int.	+
<i>Rhizomucor miehei</i>	NRRL 3169	Kalifornia, USA	+	<i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>reflexus</i>	SZMC 0498	lab. kontamináció / SZTE Mikrob. tsz.	+
<i>Rhizomucor miehei</i>	NRRL 5282	borsmenta komposzt / India	+++	<i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>reflexus</i>	CBS 117.43	árpa / Hollandia	+
<i>Rhizomucor miehei</i>	CBS 370.71	köpet / Hollandia	+	<i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>reflexus</i>	CBS 320.35	ismeretlen	+
<i>Rhizomucor miehei</i>	NRRL 5284	rothadó alma / USA	+	<i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>reflexus</i>	CBS 319.35	ismeretlen	+
<i>Rhizomucor miehei</i>	NRRL 5901	tehén placenta / Dakota, USA	++	<i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>	TJM 8A6	őszibarack / Fresno, Kalifornia, USA	+
<i>Rhizomucor miehei</i>	ETH M4918	komposzt / Svájc	+++	<i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>	TJM 8A7	őszibarack / Parlier, Kalifornia, USA	+
<i>Rhizomucor miehei</i>	SZMC 11028	köpet / Hollandia	+	<i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>	TJM 8A11	ismeretlen / Parlier, Kalifornia, USA	+
<i>Rhizomucor miehei</i>	SZMC 11029	humán mikózis / Ausztrália	++	<i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>	TJM 8B2	őszibarack / Turlock, Kalifornia, USA	+
<i>Rhizomucor pusillus</i>	NRRL 2543	állati mikózis / Anglia	+	<i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>	TJM 9C12	ismeretlen / Parlier, Kalifornia, USA	+
<i>Rhizomucor pusillus</i>	NRRL 6399	denevér ürülék / India	++	<i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>	TJM 9D1	őszibarack / Hanford, Kalifornia, USA	+

Fajnév	Törzsgyűjtemény kódja	Eredet	Fermentlé enzimaktivitása	Fajnév	Törzsgyűjtemény kódja	Eredet	Fermentlé enzimaktivitása
<i>Rhizomucor pusillus</i>	NRRL A-23448	ismeretlen	++	<i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>	TJM 13F11	őszibarack / Fresno, Kalifornia, USA	+
<i>Rhizomucor pusillus</i>	NRRL A-23504	ismeretlen	+	<i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>	CBS 609.82	ragi	+
<i>Rhizomucor pusillus</i>	NRRL A-13100	ismeretlen	+	<i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>	CBS 389.95	ismeretlen	+
<i>Rhizomucor pusillus</i>	ETH M4920	trachea váladék / Svájc	++	<i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>	CBS 347.49	tempeh / Indonézia	+
<i>Rhizomucor pusillus</i>	WRL CN(M)231	állati mikózis	+	<i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>	CBS 109.76	kenyér / Svájc	+
<i>Rhizomucor pusillus</i>	FRR 2490	ismeretlen / Ausztrália	+				

2. sz. melléklet. A tisztítási lépések részletes adatai (A: *Rhizomucor miehei* R8, B: *Mucor corticolus* M21, C: *Rhizopus niveus* Rh40, D: *Gilbertella persicaria* G1).

A

	Térfogat (ml)	Fehérje (mg ml ⁻¹)	Összfehérje (mg)	Térfogati aktivitás (μmol ml ⁻¹ perc ⁻¹)	Összaktivitás (μmol perc ⁻¹)	Specifikus aktivitás (U mg ⁻¹)	Tisztulás
Nyers kivonat	845	1,142	965	1,7	1436,5	1,5	1
Ammónium- szulfát	3,5	14,64	51,24	116,6	408,3	7,96	5,3
Sephadex G-100	15,7	0,494	7,76	9	141,3	18,1	12,1
Macro-Prep HQ	6,1	0,148	0,9	8,1	40,7	54,9	36,6
Sephacryl S200HR	2	0,096	0,19	5,9	10,7	62,2	41,5

B

	Térfogat (ml)	Fehérje (mg ml ⁻¹)	Összfehérje (mg)	Térfogati aktivitás (μmol ml ⁻¹ perc ⁻¹)	Összaktivitás (μmol perc ⁻¹)	Specifikus aktivitás (U mg ⁻¹)	Tisztulás
Nyers kivonat	880	1,298	1142,2	1,6	1390,4	1,2	1
Ammónium- szulfát	3,7	17,54	64,9	130,4	482,6	7,4	6,2
Sephadex G-100	15	0,472	7,1	7,2	108	15,3	12,8
Macro-Prep HQ	3,1	0,108	0,3	10,7	33,2	99,5	82,9
Sephacryl S200HR	2	0,062	0,12	7,3	13,1	118,5	98,8

C

	Térfogat (ml)	Fehérje (mg ml ⁻¹)	Összehérje (mg)	Térfogati aktivitás ($\mu\text{mol ml}^{-1} \text{perc}^{-1}$)	Összaktivitás ($\mu\text{mol perc}^{-1}$)	Specifikus aktivitás (U mg ⁻¹)	Tisztulás
Nyers kivonat	840	0,912	766,1	0,98	823,2	1,07	1
Ammónium- szulfát	3,5	9,08	31,78	82	287	9,03	8,4
Sephadex G-100	38	0,392	14,9	4,8	180,5	12,1	11,3
Macro-Prep HQ	4,5	0,056	0,25	2,6	11,7	46,8	43,7
Sephacryl S200HR	2	0,084	0,17	5,9	11,8	70,6	66

D

	Térfogat (ml)	Fehérje (mg ml ⁻¹)	Összehérje (mg)	Térfogati aktivitás ($\mu\text{mol ml}^{-1} \text{perc}^{-1}$)	Összaktivitás ($\mu\text{mol perc}^{-1}$)	Specifikus aktivitás (U mg ⁻¹)	Tisztulás
Nyers kivonat	565	5,98	3378,7	6,2	3486,1	1,03	1
Ammónium- szulfát	3	11,12	33,36	13	38,97	1,2	1,1
Sephadex G-100	33,6	0,286	9,6	5,5	184,8	19,3	18,7
Macro-Prep HQ	4,5	0,165	0,74	6,3	28,3	38,4	37,3
Sephacryl S200HR	2	0,017	0,034	2,1	4,14	121,1	117,6

3. sz. melléklet. A *Rhizomucor miehei* β-glükozidáz nukleotid és aminosav szekvenciája.

A *bgl* gént határoló régiókat kék, míg a feltételezett intronokat piros színnel emeltük ki.

```

atgctgctttgactgCGCCCCctCGgaggattctatacgtgCGcaacatcatctgtatgatctcaa      66
caaaggggacggtaaagtgcggaaatgCGtcccggaagtaccaaagggaaaacagcctcgcccc      132
actttttaagtcggttggtgcaacgaagcaaagaagtaagaaattctgcagtttggtcagctttt      198
tctttaccctacactatgtggcacaatgcaagaagagagagtaagcgtgagtatagtttaaagcgg      264
cggcggctgaaatagtgttcagttatacataatcatatttttagctttaagttagtcatagaaaa      330
cccggggtttgtcatggaaactgtgaaagtaccggtgtcatgtcgcacacgaaaaacaagacttt      396
cccgtttccctggaaaaacgcatcgaaaaagaaataatgcaacttgaaagcaaggaaccggagaatt      462
gcttacatgatgctgatttctcattcccttgagacaggaagaatataaaaagggggcgcgtag      528
attctctctctcgtttttcttcaacaaattttcgcagcaacttaattcgag atg ttt gca aag      590
                                                                 M F A K      4
act gcg ttg gct ctt ttg acc gcc tgg tca gct atg caa ggc gta gcc ggc      641
T A L A L L T A W S A M Q G V A G      21
ggc atc aat ttc cgt tcc tgg gac gaa gct cac gag ttg gcc aag gcc gtg      692
G I N F R S W D E A H E L A K A V      38
aca gac cag atg agt ctc gag caa tgg gtc aat att acc acc gtaaatctat      745
T D Q M S L E Q W V N I T T      52
attacattgcaacaaaacaaaaccctaaatatcaagttgctaacaaaaaaaaataaaaggc act      810
                                                                 G T      54
ggc tgg atg aaa tcc gag tgt gtt ggt aac aca cgc cca act aag aac cct      861
G W M K S E C V G N T R P T K N P      71
gac ttc cct tcg ctg tgt ctt gaa gat ggt cct cct ggt atc aga ttc ggt      912
D F P S L C L E D G P P G I R F G      88
gac aat gtt act gcc ggc gtt tct ggc atc act gcc gct gct tcg ttt gac      963
D N V T A G V S G I T A A A S F D      105
aag gaa cag ctc ctg aaa cgc ggt caa tat atg ggc aag gaa ttc cgt ggc      1014
K E Q L L K R G Q Y M G K E F R G      122
aaa ggt atc cac ttt gct ttg gga cct tgc gtc gat atc atg cgt gct cca      1065
K G I H F A L G P C V D I M R A P      139
cag act gga cgt ggc tgg gaa ggt ttt ggc gag gac cct tac ttg gct ggt      1116
Q T G R G W E G F G E D P Y L A G      156
gtc gct ggt gct ctc aca gtt gaa ggt atc cag agc cag ggc gtg gtaagtt      1168
V A G A L T V E G I Q S Q G V      171
tcagcctttttcgtttctcatcagtttcacgtgtaacttatcaattcaccttttttag att gcc      1231
                                                                 I A      173
act gcc aaa cac tac att ggt aac aac caa gaa act aac cgc aaa aac gtg      1282
T A K H Y I G N N Q E T N R K N      189
agtggtgtcttattgctcacttgatcaataactgctactcaatccttgtaattgatgtatttag      1347
                                                                 189
tcc acc tcc aat att agc agg cgt gcg ttg cac gaa atc tgg aca tgg cca      1398
S T S N I S R R A L H E I W T W P      206
tat gcc cgc atg att gaa gcc ggt att ggt gcc att atg tgt agc tac aac      1449
Y A R M I E A G I G A I M C S Y N      223
cag ctt cac gga acc tgg gcc tgc gaa gat gaa tac acg ctc aac acc atc      1500
Q L H G T W A C E D E Y T L N T I      240
ctc aag caa gag tac aac ttc cgt ggt ctc atc atg agc gat tgg ggt gca      1551
L K Q E Y N F R G L I M S D W G A      257
act cac tcg acg gct ccc gcc atc aat tcc ggt ctg gat atg acc atg cct      1602
T H S T A P A I N S G L D M T M P      274
gtaagttcaataatggtttcttagaagtcfaatcttaactgacgcgtatattctatttaag ggt gat      1668
                                                                 G D      276
ctt gag atg ggt gat aac tac act tac ttt ggt gtc aac atg aca aag gcc      1719
L E M G D N Y T Y F G V N M T K A      293
gtc cgg aac ggt gaa gtc act gaa gaa cgc gct cag gaa atg gcc aca cgt      1770
V R N G E V T E E R A Q E M A T R      310
atc att gcc gcc tac tac aag ttg gga caa gac gaa ggc ttc cct gaa atg      1821
I I A A Y Y K L G Q D E G F P E M      327

```

gct atc aga gcc ttc caa cgt gac gaa gct ccc tat gtg ccc gtg caa ggt 1872
A I R A F Q R D E A P Y V P V Q 343
acggttgtaatactatcaaccgatatttaaagcaaaatacatcatggctcacaacaatcgtaaanaa 1939
343
caaatagag gat cac gga aag ctc gtc cgc gaa atg ggt gct gct gcg tgc 1990
E D H G K L V R E M G A A A C 358
act ttg ctc aag aac gag gat aaa gtc ttg cct atc tcc agc tct gtc aag 2041
T L L K N E D K V L P I S S S V K 375
aag att gcc att atc ggc agt gat gct gga cca aac cct gtagtatgctctct 2095
K I A I I G S D A G P N P D 389
cgctcatccttttttagcgttcttccatgcactaagtcattttctgctgcacgtagt ggt ctc cac 2160
G L H 392
gat ccc gac tgt gtc gat caa ggc tgt gcc aag ggc aca acc gct atg ggt 2211
D P D C V D Q G C A K G T T A M 408
aggtcatccacttgaataactcgtatttttgacagttttatgaccgaaaatgcactttcttttacg 2278
408
tgtctcaggt ttg ggc tca ggc act gtc gac ttc cct tat ctt gtt act cct 2330
G W G S G T V D F P Y L V T P 423
ctg gac ggc att act gcc cgt gct ggc gat gat gtt gaa gtt gtg cac acc 2381
L D G I T A R A G D D V E V V H T 440
ttt gac gac tgg gac gaa gaa ggc gct gct gaa ttg gcc aaa gat gcc gat 2432
F D D W D E E G A A E L A K D A D 457
att gct ttc gtt ttc tcc atg acc aag gct ggt gaa gaa tac att gtc gtt 2483
I A F V F S M T K A G E E Y I V V 474
gat ggt aac cac gac cgg aag aac ctt tct ctt tgg aac aac ggt gac aat 2534
D G N H D R K N L S L W N N G D N 491
ttg gtaagttacctgtaactagtccacggtttgctaagcaacagtagtaatgtttcatggttatctc 2600
L 492
ttcttttacag atc cga gct gtt gct gac gcc aac gaa aac act gtc gtc gtc 2652
I R A V A D A N E N T V V V 506
att cac tct gtt ggt cct gtc gat atg cct tgg att gat cac ccc aac att 2703
I H S V G P V D M P W I D H P N I 523
aag gct gtc gtt tgg cct cac ttg cct ggt caa gaa act gga aac tct ctc 2754
K A V V W P H L P G Q E T G N S L 540
gcc gac gtc ctc ttt ggt gat gtc aac ccc tca ggg ccg tct tcc ata gca 2805
A D V L F G D V N P S G P S S I A 557
cca ttg gca ggt ctg cag agg act acg ctg ctg gtagatcagccctgactttacggca 2861
P L A G L Q R T T L L 568
agtattcagatattactttgttttgagtggacgctaactaacttaatgtaataaccag atc gag 2926
I E 570
tac acc gaa gag ctt aac gtc ggc tac cgc cac ttt gac gcc aat aac att 2977
Y T E E L N V G Y R H F D A N N I 587
gaa cct ctt ttc ccg ttc ggc cac ggt ctt tcc tac acc ttt gag tac 3028
E P L F P F G H G L S Y T T F E Y 604
aac aag ctc aag gtc aag aag ggc cgt aag aag gac aac tct ttg atc cgt 3079
N K L K V K K G R K K D N S L I R 621
gcc acc atc tat atc agg aac act ggc gaa gtc gac ggc gct gaa att cct 3130
A T I Y I R N T G E V D G A E I P 638
caa gct tac atc tcg ttc ccc gcg tgc gag cca cct aaa gtt ctc cgt ggt 3181
Q A Y I S F P A C E P P K V L R G 655
ttc gaa aag gtg ttc ctc aag gcc ggc aag cac gcc aag gtc gaa ttt aac 3232
F E K V F L K A G K H A K V E F N 672
ttt ggt gag acc gag ctc agc atc tgg gat cct gag acg gaa gaa tgg act 3283
F G E T E L S I W D P E T E E W T 689
gta ccc tct gga gag tac act ttg cat att ggt gct agc agc cgc gac att 3334
V P S G E Y T L H I G A S S R D I 706
cgt cag act gcc aag ttt agg ctgtaaacgtgtctagcttaatatgcagcgccgtagc 3392
R Q T A K F R L 714
tat ctt tac taa attattcaacagtaaaaagaaaataaaaataaaatgaaaaataaagtgagctt 3455
Y L Y - 717
tgaatgagtacatcacaaggcatgcaattttattccaaagtttaagataatatcaaatggaaaat 3522

gacaagatgtcaacgacagtgttgaataatacgtacagctctttgttcatagtgttccactctcatat 3589
ctatataaagtcactcgtccgggtatcctttgatgatctcttgtaaagtatacatccttcaggcttt 3656
actgtcttttgcgtatcatccaatatcctcgtcttctcttggcaagttccaattccatgtcctcc 3723
atatcctcattttccgtctcgtaatcgctttcttctggatcatcgtagtcattttcatcctcctctt 3790
ccaaggccttgctcctcttcgtcagtagtaacgtcgccttctcggagggtgtaaacacacttcct 3857
ttccccgatttctactggcgattgttctgaagctcgtgtacgacgactggctaagtccatggcctc 3924
agcacttagtctcttcgctttcttgagatgactggtcgacttgattgattcaccggctcctttcgt 3991
gatagaatcgatgaatcaatttgagccccaagctgtcaactgatcgaattcctgcagcccggggga 4058
tccac 4063

4. sz melléklet. Kodonhasználat a *Rhizomucor miehei* *bgl* génben. A *bgl* A oszlop az adott kodon arányát mutatja az aminosavat kódoló szinonim kodonokhoz viszonyítva, míg a *bgl* B oszlopban a kodon összes előfordulása olvasható a génben.

Kodon	Aminosav		<i>bgl</i> A	<i>bgl</i> B	Kodon	Aminosav		<i>bgl</i> A	<i>bgl</i> B
TTT	Phe	F	0,44	12	TAT	Tyr	Y	0,26	6
TTC	Phe	F	0,56	15	TAC	Tyr	Y	0,74	17
TTA	Leu	L	0,00	0	TAA	-	-	1,00	1
TTG	Leu	L	0,31	15	TAG	-	-	0,00	0
CTT	Leu	L	0,22	11	CAT	His	H	0,06	1
CTC	Leu	L	0,33	16	CAC	His	H	0,94	16
CTA	Leu	L	0,00	0	CAA	Gln	Q	0,55	11
CTG	Leu	L	0,14	7	CAG	Gln	Q	0,45	9
ATT	Ile	I	0,48	20	AAT	Asn	N	0,19	7
ATC	Ile	I	0,50	21	AAC	Asn	N	0,81	29
ATA	Ile	I	0,02	1	AAA	Lys	K	0,22	8
ATG	Met	M	1,00	19	AAG	Lys	K	0,78	27
GTT	Val	V	0,30	13	GAT	Asp	D	0,50	22
GTC	Val	V	0,52	23	GAC	Asp	D	0,50	22
GTA	Val	V	0,04	2	GAA	Glu	E	0,69	35
GTG	Val	V	0,14	6	GAG	Glu	E	0,31	16
TCT	Ser	S	0,24	8	TGT	Cys	C	0,56	5
TCC	Ser	S	0,26	9	TGC	Cys	C	0,44	4
TCA	Ser	S	0,09	3	TGA	-	-	0,00	0
TCG	Ser	S	0,12	4	TGG	Trp	W	1,00	16
CCT	Pro	P	0,56	20	CGT	Arg	R	0,43	13
CCC	Pro	P	0,22	8	CGC	Arg	R	0,27	8
CCA	Pro	P	0,17	6	CGA	Arg	R	0,03	1
CCG	Pro	P	0,05	2	CGG	Arg	R	0,07	2
ACT	Thr	T	0,46	22	AGT	Ser	S	0,05	2
ACC	Thr	T	0,31	15	AGC	Ser	S	0,24	8
ACA	Thr	T	0,15	7	AGA	Arg	R	0,07	2
ACG	Thr	T	0,08	4	AGG	Arg	R	0,13	4
GCT	Ala	A	0,43	29	GGT	Gly	G	0,49	34
GCC	Ala	A	0,45	30	GGC	Gly	G	0,39	27
GCA	Ala	A	0,06	4	GGA	Gly	G	0,11	8
GCG	Ala	A	0,06	4	GGG	Gly	G	0,01	1