

DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**β -GALAKTOZIDÁZ AKTIVITÁSOK VIZSGÁLATA JÁROMSPÓRÁS
GOMBÁKBAN**

VOLFORD BETTINA

Témavezetők:

DR. TAKÓ MIKLÓS
EGYETEMI ADJUNKTUS

DR. NAGY GÁBOR
TUDOMÁNYOS MUNKATÁRS

BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA



SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR
MIKROBIOLÓGIAI TANSZÉK

2023
Szeged

BEVEZETÉS

A járomspórás gombák talajban, állati és növényi bomló szerves anyagokon előforduló fonalas gombák. Számos orvosi, ipari, biotechnológiai és mezőgazdasági szempontból fontos fajt találunk közöttük. Az ide tartozó Mucoromycota csoport egyes tagjai különböző biotechnológiai folyamatokban alkalmazott extracelluláris enzimek (pl. lipázok, proteázok) termelőjeként ismertek.

A β -galaktozidáz enzim a glikozidos kötést hidrolizálja a diszacharid laktóz molekulában. Hidrolitikus aktivitása mellett transzgalaktozilációs reakciók katalizálására is képes, melynek eredményeként prebiotikus hatású oligoszacharidok keletkezhetnek. Biológiai jelentőségükön kívül fontos szerepet töltenek be egyes élelmiszeripari folyamatokban is. Fontosak például laktózzal kapcsolatos kikristályosodás megelőzésében tejtermékekben és fagyasztott élelmiszerekben, ezáltal megakadályozva a termék minőségének leromlását. Hidrolitikus aktivitását ezen kívül laktózmentes termékek előállítására, illetve a sajtgyártás során melléktermékként keletkező tejsavó kezelésére alkalmazzák. Napjainkban a legtöbb kereskedelmi forgalomban elérhető β -galaktozidáz mikrobiális forrásból származik. A mikrobiális eredetű β -galaktozidázok nagy ipari jelentőséggel bírnak, ugyanis egyszerűen kezelhetők és más enzimmforrásokhoz képest a mikroorganizmusok nagyobb hozamot biztosítanak. A termofil mikroorganizmusokból származó enzimek nagyobb hőstabilitással rendelkeznek, ezáltal ipari alkalmazásuk előtérbe került kedvező tulajdonságaiknak köszönhetően. Az ipari és biotechnológiai fejlesztésekhez ugyanakkor szükség van a hidrolitikus és/vagy szintetikus reakciók katalizálása szempontjából előnyös tulajdonságokkal rendelkező új enzimek azonosítására.

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

CÉLKITŰZÉSEK

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

Ennek érdekében az alábbi feladatok elvégzését foglalmaztuk meg:

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

MÓDSZEREK

β -Galaktozidáz termelés vizsgálata

- 5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktopiranozid (X-gal) bontás szilárd tápközegen
- Süllyesztett fermentáció (SmF) laktóz és búzakorpa szubsztrátokkal
- Búzakorpa-alapú szilárd fázisú fermentáció (SSF)

A β -galaktozidáz aktivitás meghatározása

- Hidrolitikus aktivitás mérése *o*-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid szubsztráttal (*o*NPG)

Enzimatisz szintézis vizsgálatok

- Reakcióelegyek oligoszacharidok enzimatisz szintézisére laktóz, sovány tejpor, laktóz-fruktóz és *o*NPG-szukróz kiindulási cukrokon
- Szénhidrátartalom elemzése nagyhatékonyságú folyadékromatográfiával kapcsolt tandem tömegspektrometriával (HPLC-MS/MS)

Probiotikumok növekedésére gyakorolt hatás tesztelése

- Oligoszacharid-dúsított minták probiotikumok növekedésére gyakorolt hatásának vizsgálata folyadék tenyészetben

β -Galaktozidáz tisztítás és jellemzés

- Kisózás ammónium-szulfáttal
- Méretkizárásos és ioncserélő kromatográfia
- Fehérjekoncentráció meghatározás fluorométerrel
- Denaturáló poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE)
- Zimogram analízis
- Hőmérséklet és pH optimum és tolerancia vizsgálat
- Szubsztrátspecificitás vizsgálat

β -Galaktozidáz-kódoló gének vizsgálatához alkalmazott módszerek

- Genomi és plazmid DNS tisztítása
- Agaróz gélelektorforézis, DNS visszanyerése agaróz gélből
- RNS tisztítás gombasejtekből
- cDNS szintézis
- Polimeráz lánreakció (PCR, RT-qPCR, RT-PCR)
- CRISPR-Cas9 technika
- Vektorkonstrukciók létrehozása
- Polietilén-glikol (PEG)-mediált protoplaszt transzformáció
- Baktérium transzformáció
- *In silico* elemzések (BLAST, ProtParam, HMMTOP, TMPred, Motif Scan-MyHits, SignalP)

EREDMÉNYEK

Azonosítottunk β -galaktozidáz termelő járomspórás gombatörzseket. (Volford és mtsai., 2021)

A Szeged Mikrobiológiai Gyűjteményben (SZMC) elhelyezett *Lichtheimia*, *Mortierella*, *Mucor*, *Rhizomucor*, *Rhizopus* és *Umbelopsis* gombákból 99 izolátum enzimtermelését teszteltük X-gal tartalmú kromogén táptalajon. Összesen 66, főként *Lichtheimia*, *Rhizomucor* és *Umbelopsis* törzs esetén tapasztaltunk detektálható enzimtermelést. Eredményeink alapján a *Lichtheimia ramosa* SZMC 11360, *Lichtheimia corymbifera* SZMC 11361, *Lichtheimia hyalospora* SZMC 11364, *Rhizomucor miehei* SZMC 11005, *R. miehei* SZMC 11014, *Rhizomucor pusillus* SZMC 11025, *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* SZMC 13619, *Mortierella echinosphaera* SZMC 11251, *Umbelopsis longicollis* SZMC 11208 és *Umbelopsis ramanniana* var. *angulispora* SZMC 11234 törzsek bizonyultak legjobb β -galaktozidáz termelőnek az alkalmazott tenyésztési körülményen.

Egyes izolátumoknál fokozott β -galaktozidáz termelést azonosítottunk laktózt és/vagy búzakorpát tartalmazó fermentációs körülményeken. (Volford és mtsai., 2021)

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

Prebiotikus oligoszacharidokat állítottunk elő nyers β -galaktozidázokkal többféle reakciókörülményen. (Volford és mtsai., 2021)

Részleges tisztítást követően vizsgáltuk a *L. ramosa* és *R. pusillus* gombákból búzakorpa-alapú SSF rendszerben nyert, β -galaktozidáz-aktív kivonatok transzgalaktozidáz aktivitását. A tesztekben négyféle reakciókörülménybe vittünk be különböző, glikozil donorként és/vagy akceptorként funkcionáló vegyületeket. Laktóz, sovány tejpor, laktóz-fruktóz és *o*NPG-szukróz-alapú reakcióelegyet állítottunk össze, majd az inkubációt követően HPLC-MS/MS módszerrel vizsgáltuk az oligoszacharidok minőségét és mennyiségét enzimet tartalmazó és enzimmentes mintákban. Tri- és tetraszacharidokat egyaránt tudtunk kimutatni a reakcióelegyekben, azaz a részlegesen tisztított enzimkivonatok képesek oligoszacharid szintézis katalizálására. Szubsztráttól függően galaktooligoszacharid (GOS) és különböző fruktooligoszacharid (FOS), például laktoszukróz vagy izoraffinóz, jelenlétét mutattuk ki. Megállapítottuk, hogy mindkét vizsgált enzim jelentős transzgalaktozidáz aktivitással rendelkezik, és a *R. pusillus* nyers β -galaktozidáz teljes szintetikus kapacitása a *L. ramosa* enzim esetén tapasztaltnál nagyobb. Eredményeink alapján feltételezzük, hogy a vizsgálatunkban tisztított nyers β -galaktozidáz-aktív koktélok transzfruktozilációs aktivitással is rendelkezhetnek, amely felelős lehet az *o*NPG-szacharóz keverékkel végzett reakciókban megjelenő egyes FOS komponensekért.

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

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

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

Meghatároztuk a tisztított *L. ramosa* és *R. pusillus* enzimaktivitások néhány biokémiai jellemzőjét. A *L. ramosa* enzim működésének optimális hőmérsékletet 50 °C, míg a *R. pusillus* β -galaktozidázét 55 °C körül állapítottuk meg. Érdekes kiemelni, hogy a *L. ramosa* β -galaktozidáz 60 °C és 70 °C hőmérsékleteken is az aktivitásának legalább 50%-át mutatta. Négy órás előinkubációt követően mindkét enzim nagyfokú stabilitást mutatott a működési optimum hőmérsékletig. Mindkét vizsgált β -galaktozidáz aktivitás esetén pH 6,0 körüli működési optimumot azonosítottunk. A *L. ramosa* és *R. pusillus* β -galaktozidázok pH 6,0 feletti inkubációs körülményeken nagymértékű stabilitást mutattak, előbbi enzimmél több, mint 80%, míg az utóbbi esetén több, mint 90% relatív aktivitással. Az enzimek mérsékelt toleranciával rendelkeztek a környezet enyhén savanyú (pH 4,0-5,0) kémhatásával szemben. Az enzimek szubsztrátspecifitását is meghatároztuk, melyhez többféle kromogén szubsztrátot alkalmaztunk. A vizsgálat során mindkét vizsgált β -galaktozidáz széles szubsztrátspecifitást mutatott, és hatékonyabban hidrolizálta a *p*-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid (*p*NPG) szubsztrátot az *o*NPG szubsztráthoz viszonyítva. α -Galaktozid kötést tartalmazó szubsztrátra és egyes β -glükozidok esetében kiemelkedő bontást figyeltünk meg.

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

A kiváló β -galaktozidáz termelőnek bizonyult *L. ramosa* gombát vontuk be a vizsgálatokba. A *Lichtheimia* genom adatbázisban homológ szekvencia keresést hajtottunk végre *Trichoderma atroviride* β -galaktozidáz aminosav szekvencia felhasználásával. Két olyan

feltételezett fehérjét azonosítottunk (β Gal1 és β Gal2), melyek nagyfokú hasonlóságot mutattak a *Trichoderma* β -galaktozidázzal. A két feltételezett β -galaktozidáz fehérje méretben, aminosav hosszúságban és izoelektromos pontban is eltér. Mindkettőben azonosítottuk a glikozid hidroláz 35 családra jellemző domént. Az azonosított *L. ramosa* β -galaktozidáz gének kifejeződésének vizsgálatához reverz transzkripció kapcsolt kvantitatív valós idejű PCR (RT-qPCR) technikát alkalmaztunk. A búzakorpát tartalmazó táptalajon a β -gal1 kifejeződése a 6. napon, míg a β -gal2 kifejeződése az 5. és a 6. napokon emelkedett; fermentációs tesztekben az 5-6. napokon mértünk legnagyobb enzimaktivitást.

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

Gének funkcionális vizsgálatakor járomspórás gombákban gyakran alkalmaznak uracil auxotróf törzseket a transzformációs kísérletekhez, melyhez előzetesen szükség van az uracil bioszintézisben szerepet játszó *pyrG* gén elrontására. *L. ramosa* esetében ugyanakkor nem rendelkezünk hatékony transzformációs rendszerrel. Munkánkban optimalizáltuk és adaptáltuk a PEG-mediált protoplaszt transzformációt *L. ramosa* fonalas gombára, majd sikerrel létrehoztunk 16 *L. ramosa* uracil auxotróf mutáns törzset. Jellemeztük a további vizsgálatokhoz kiválasztott törzs növekedését és β -galaktozidáz aktivitását. A *pyrG* gén elrontásának hatására a gomba növekedése lelassult a szülői törzshöz képest, azonban a β -galaktozidáz aktivitása nem változott.

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

A kísérletekben olyan vektorkonstrukciókat hoztunk létre, melyek lehetővé teszik az egyes *L. ramosa* β -galaktozidáz gének túlműködését, azaz annak vizsgálatát, hogy a gének kópiaszámának növelése hatással van-e a gomba β -galaktozidáz termelésére. A vektorok a bakteriális szelekcióhoz szükséges ampicillin rezisztenciát biztosító gént, a *Lichtheimia pyrG* gént és a *Lichtheimia* β -galaktozidázt kódoló gént egyaránt hordozzák. A létrehozott vektorkonstrukciókkal megkezdtük a transzformációs kísérleteket. Munkánk során *L. ramosa* β -galaktozidáz fehérjék heterológ rendszerben történő termeltetését lehetővé tevő vektorkonstrukciókat is létrehoztunk. A vektorok segítségével reményeink szerint nagy hozamban termeltethetők a *Lichtheimia* β -galaktozidázok *Pichia pastoris*-alapú rendszerben. A

transzformációs kísérleteket megkezdtük, jelenleg a transzformánsok ellenőrzése, majd a termeltetési rendszer kialakítása és optimalizálása van folyamatban.

ÖSSZEFOGLALÁS

1. Azonosítottunk jó β -galaktozidáz termelő járomspórás gombákat. Eredményeink értékes adatokkal szolgálnak az eddig még nem vizsgált *Lichtheimia*, *Mortierella* és *Umbelopsis* csoportok β -galaktozidáz termelő képességéről.
2. Süllyesztett és szilárd fázisú rendszerekben vizsgáltuk a legaktívabb törzsek enzimtermelését. Laktózt és/vagy búzakorpát tartalmazó fermentációs körülményeken fokozott enzimhozamot azonosítottunk egyes izolátumoknál. Vizsgálatainkkal bővültek ismereteink induktorok jelenlétében történő enzimhozamokról, az enzimek termeltetési lehetőségeiről. Tudomásunk szerint elsőként végeztünk olyan süllyesztett fermentációs vizsgálatokat, amelyekben laktózt és búzakorpát együtt alkalmaznak β -galaktozidáz termelés induktorként.
3. Elemeztük részlegesen tisztított β -galaktozidáz-aktív kivonatok transzgalaktozidáz aktivitását többféle kiindulási cukor jelenlétében. A kísérletekben azonosítottuk a *L. ramosa* és *R. pusillus* gombák β -galaktozidázainak transzgalaktozilációs aktivitását, valamint transzfruktozilációt katalizálni képes enzimek termelését is igazoltuk. Eredményeink alapján az azonosított szintetikus aktivitások magas prebiotikus indexű funkcionális oligoszacharid keverékek előállításához járulhatnak hozzá, melyek egészségvédő adalékok lehetnek bizonyos termékekben.
4. Izoláltunk búzakorpa-alapú szilárd fázisú fermentációs rendszerben termelt *L. ramosa* és *R. pusillus* β -galaktozidáz enzimeket, és elemeztük néhány gyakorlati szempontból jelentős biokémiai tulajdonságukat. Kutatásunkban elsőként izoláltunk β -galaktozidáz enzimet *L. ramosa* gombából.
5. Azonosítottunk *L. ramosa* β -galaktozidáz kódoló géneket, jellemeztük a kódolt fehérjéket. Génkifejeződés vizsgálatokat végeztünk különböző fermentációs körülményeken. Kutatásaink elsőként mutattak rá β -galaktozidáz kódoló genetikai elemekre és fermentációs körülményeken való kifejeződésükre járomspórás gombákban.
6. Általánosan alkalmazható transzformációs rendszert dolgoztunk ki *L. ramosa* gombában, valamint β -galaktozidáz homológ és heterológ termeltetésére alkalmas vektorkonstrukciókat is szerkesztettünk.

SUMMARY

The β -galactosidase enzyme hydrolyzes the glycosidic bond in the disaccharide lactose molecule. The enzyme is also capable of catalyzing transgalactosylation reactions, resulting in the potential formation of prebiotic oligosaccharides. The β -galactosidase plays an important role in some food industry processes, and most commercially available β -galactosidases are derived from microbial sources. There are many excellent enzyme-producing strains among zygomycetes, but their β -galactosidase production is still an understudied area. In this work, we aimed to conduct a detailed investigation of the β -galactosidase activity of zygomycete fungi belonging to the orders Mucorales and Mortierellales.

The following results have been achieved: 1) β -Galactosidase-producing zygomycetes strains have been identified. Our results provide useful data on the β -galactosidase production of *Lichtheimia*, *Mortierella* and *Umbelopsis* fungi that have not yet been investigated. 2) Increased β -galactosidase production was identified in some isolates under fermentation conditions containing lactose and/or wheat bran. Our knowledge has expanded about enzyme yields achieved in the presence of inducers, and on the possibilities of liquid and solid-state production of the enzymes. As we know, this study is the first that has performed submerged fermentation experiments using lactose and wheat bran together as a β -galactosidase production inducer. 3) Prebiotic oligosaccharides were produced with crude β -galactosidases under various reaction conditions. Transgalactosylation activity of the *Lichtheimia ramosa* and *Rhizomucor pusillus* β -galactosidases was identified, and the production of enzymes capable of catalyzing transfructosylation was also confirmed. The synthetic activities identified may contribute to the production of functional oligosaccharide mixtures with a high prebiotic index, which then can be used as health-protective additives in certain products. 4) The *L. ramosa* and *R. pusillus* β -galactosidases have been isolated, and some of their practically important biochemical properties have been studied. This is the first report on a β -galactosidase isolated from *Lichtheimia* fungi. 5) *L. ramosa* β -galactosidase coding genes have been identified, and the encoded proteins have been characterized. Gene expression studies were also performed. This research revealed β -galactosidase coding genetic elements in zygomycetes and investigated of their expression under fermentation conditions. 6) A generally applicable transformation system was developed in *L. ramosa*, and plasmids suitable for both homologous and heterologous productions of β -galactosidase were also constructed.

A DOKTORI ELJÁRÁS ALAPJÁT KÉPEZŐ PUBLIKÁCIÓK

Volford, B., Varga, M., Szekeres, A., Kotogán, A., Nagy, G., Vágvölgyi, Cs., Papp, T., Takó, M. (2021) β -Galactosidase-producing isolates in Mucoromycota: Screening, enzyme production, and applications for functional oligosaccharide synthesis. *Journal of Fungi* 7, 229. **IF: 5,724**

Kotogán, A., Furka, Zs.T., Kovács, T., **Volford, B.**, Papp, D.A., Varga, M., Huynh, T., Szekeres, A., Papp, T., Vágvölgyi, Cs., Mondal, K.C., Kerekes, E.B., Takó, M. (2022) Hydrolysis of edible oils by fungal lipases: An effective tool to produce bioactive extracts with antioxidant and antimicrobial potential. *Foods* 11, 1711. **IF: 5,2**

A DOLGOZAT ALAPJÁT KÉPEZŐ SZAKMAI ANYAGOK

Folyóiratcikkek:

Volford, B., Varga, M., Szekeres, A., Kotogán, A., Nagy, G., Vágvölgyi, Cs., Papp, T., Takó, M. (2021) β -Galactosidase-producing isolates in Mucoromycota: Screening, enzyme production, and applications for functional oligosaccharide synthesis. *Journal of Fungi* 7, 229. **IF: 5,724**

Absztraktok:

Volford, B., Takó, M., Vágvölgyi, Cs., Papp, T., Nagy, G. (2022) Characterization of beta-galactosidase coding genes of *Lichtheimia ramosa*. In: Kiss, O. (szerk.) 19th Wellmann International Scientific Conference: Book of Abstracts. p. 65.

Volford, B., Papp, Zs., Nagy, G., Kotogán, A., Vágvölgyi, Cs., Papp, T., Takó, M. (2021) Purification and characterization of β -galactosidase enzymes from *Lichtheimia ramosa* and *Rhizomucor pusillus*. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 68(S1), p. 128.

Volford, B., Varga, M., Kotogán, A., Szekeres, A., Vágvölgyi, Cs., Papp, T., Takó, M. (2020) Production of prebiotic oligosaccharides by beta-galactosidase active cocktails. In: A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2020. évi Nagygyűlése és a XIV. Fermentációs Kollokvium: Absztraktfüzet. p. 41.

Volford, B., Kotogán, A., Vágvölgyi, Cs., Papp, T., Takó, M. (2019) Analysis of extracellular beta-galactosidase activities in zygomycetes. In: Monostori, T. (szerk.) 17th Wellmann International Scientific Conference: Book of Abstracts. p. 86.

Volford, B., Kotogán, A., Papp, T., Vágvölgyi, Cs., Takó, M (2019) Screening of zygomycetes strains for beta-galactosidase production. In: Slavica, A., Teparić, R., Leboš, P.A., Kifer, D. (szerk.) Power of Microbes in Industry and Environment 2019: Book of Abstracts. p. 88.

EGYÉB PUBLIKÁCIÓK

Folyóiratcikkek:

Kotogán, A., Furka, Zs.T., Kovács, T., **Volford, B.**, Papp, D.A., Varga, M., Huynh, T., Szekeres, A., Papp, T., Vágvölgyi, Cs., Mondal, K.C., Kerekes, E.B., Takó, M. (2022) Hydrolysis of edible oils by fungal lipases: An effective tool to produce bioactive extracts with antioxidant and antimicrobial potential. *Foods* 11, 1711. **IF: 5,2**

Bamou, F.Z., Le, T.M., **Volford, B.**, Szekeres, A., Szakonyi, Zs. (2020) Synthesis and application of 1,2-aminoalcohols with neoisopulegol-based octahydrobenzofuran core. *Molecules* 25, 21. **IF: 4,412**

Le, T.M., Szilasi, T., **Volford, B.**, Szekeres, A., Fülöp, F., Szakonyi, Zs. (2019) Stereoselective synthesis and investigation of isopulegol-based chiral ligands. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 4050. **IF: 4,556**

Konferenciaközlemények:

Volford, B., Szekeres, A., Papp, T., Papp, Zs., Škrbić, B., Mondal, K.C., Vágvölgyi, Cs., Takó, M. (2019) Exoenzyme production of endophytic filamentous fungi derived from common yew (*Taxus baccata*) samples. In: Škrbić, B. (szerk.) Proceedings. 21st Danube-Kris-Mures-Tisza (DKMT) Euroregional Conference on Environment and Health. pp. 174-179.

Absztraktok:

Takó, M., Reznayák, B., **Volford, B.**, Kele, Z., Vágvölgyi, Cs., Papp, T., Nagy, G. (2023) A Glycoside Hydrolase Family 31 carbohydrase with alpha-glucosidase activity from *Lichtheimia ramosa*. In: 16th European Conference on Fungal Genetics: Programme & Abstracts. pp. 517-518.

Kovács, T., de Oliveira, Í.J.L., **Volford, B.**, Papp, D.A., Varga, M., Langó, B., Palágyi, A., Vágvölgyi, Cs., Krisch, J., Takó, M. (2022) Liberation of phenolics from sorghum samples using an enzyme cocktail with cellulolytic and lipolytic activities. In: FEMS Conference on Microbiology (FEMS Belgrade 2022): Abstract Book. pp. 796-797.

Kovács, T., de Oliveira, Í.J.L., **Volford, B.**, Papp, D.A., Varga, M., Mihály-Langó, B., Palágyi, A., Vágvölgyi, Cs., Takó, M., Krisch, J. (2022) Liberation of phenolic compounds from sorghum grain samples by zygomycetes fungal enzymes. In: A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2022. évi Nagygyűlése és a XV. Fermentációs Kollokvium: Absztraktfüzet. p. 32.

Kotogán, A., Furka, Zs., **Volford, B.**, Papp, T., Vágvölgyi, Cs., Takó, M. (2021) Immobilization of fungal lipases on Accurel MP1000 hydrophobic support. In: Kiss, O. (szerk.) 18th Wellmann International Scientific Conference: Book of Abstracts. p. 45.

Kovács, T., **Volford, B.**, Papp, D.A., Varga, M., Langó, B., Palágyi, A., Vágvölgyi, Cs., Krisch, J., Takó, M. (2021) Enzyme-assisted extraction of phenolics from sorghum samples. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 68(S1), pp. 86-87.

Kotogán, A., Furka, Zs., **Volford, B.**, Varga, M., Papp, T., Vágvölgyi, Cs., Takó, M. (2021) Enzymatic production of bioactive fatty acids from vegetable and fish oils. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 68(S1), p. 87.

Kiss, N., **Volford, B.**, Allaga, H., Homa, M., Kocsubé, S., Vágvölgyi, Cs. (2021) Characterization of a *Sporendonema casei* isolate, a rare fungal contaminant of cheese. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 68(S1), p. 81.

Bamou, Z., Le, T.M., **Volford, B.**, Szekeres, A., Szakonyi, Zs. (2020) Synthesis and application of 1,2-aminoalcohols with neoisopulegol-based octahydrobenzofuran core. In: Proceedings of The 24th International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry. p. 8476.

Volford, B., Papp, Zs., Papp, T., Škrbić, B., Szekeres, A., Vágvölgyi, Cs., Takó, M. (2019) Extracellular hydrolase activities of endophytic fungi isolated from *Taxus baccata*. In: Monostori, T. (szerk.) 17th Wellmann International Scientific Conference: Book of Abstracts. p. 87.

Kotogán, A., Talabér, T., **Volford, B.**, Papp, T., Vágvölgyi, Cs., Takó, M. (2019) Immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase enzyme on Accurel MP1000 hydrophobic support. In: Slavica, A., Teparić, R., Leboš, P.A., Kifer, D. (szerk.) Power of Microbes in Industry and Environment 2019: Book of Abstracts. p. 96.

Volford, B., Szekeres, A., Papp, T., Papp, Zs., Škrbić, B., Mondal, K.C., Vágvölgyi, Cs., Takó, M. (2019) Exoenzyme production of endophytic filamentous fungi derived from common yew (*Taxus baccata*) samples. In: Škrbić, B. (szerk.) Book of Abstracts. 21st Danube-Kris-Mures-Tisza (DKMT) Euroregional Conference on Environment and Health. p. 96.

Volford, B., Erdenebileg, S., Škrbić, B., Bencsik, O., Marik, T., Németh, A., Kredics, L., Vágvölgyi, Cs., Szekeres, A. (2019) Taxonomical characterisation of endophytic fungi isolated from Hungarian yew trees. In: Škrbić, B. (szerk.) Book of Abstracts. 21st Danube-Kris-Mures-Tisza (DKMT) Euroregional Conference on Environment and Health. p. 95.

Volford, B., Škrbić, B., Németh, A., Takó, M., Vágvölgyi, Cs., Szekeres, A. (2018) Antimicrobial effect of secondary metabolites extracted from endophytic fungi of *Taxus baccata*. In: Monostori, T. (szerk.) 16th Wellmann International Scientific Conference: Book of Abstracts. pp. 100-101.

Volford, B., Rakk, D., Endre, G., Škrbić, B., Vágvölgyi, Cs., Szekeres, A. (2018) Purification of secondary metabolites from the ferment broth of endophytic fungi of *Taxus baccata*. In: Monostori, T. (szerk.) 16th Wellmann International Scientific Conference: Book of Abstracts. pp. 98-99.

Vigneshwari, A., **Volford, B.**, Erdenebileg, S., Bencsik, O., Marik, T., Németh, A., Kredics, L., Vágvölgyi, Cs., Szekeres, A. (2016) Fungal endophytes from the common yew tree (*Taxus baccata*) produce antimicrobial metabolites. In: Zhiyanski, M., Lazarova, S. (szerk.) Soil Biodiversity and Ecosystem Services: Meeting Programme and Abstracts. p. 40.

Erdenebileg, S., **Volford, B.**, Vigneshwari, A., Bencsik, O., Marik, T., Németh, A., Kredics, L., Vágvölgyi, Cs., Szekeres, A. (2016) Investigation of antimicrobial effects of endophytic fungal metabolites. In: Škrbić, B. (szerk.) 18th Danube-Kris-Mures-Tisa (DKMT) Euroregional Conference on Environment and Health: Book of abstracts. p. 95-95.

Erdenebileg, S., **Volford, B.**, Vigneshwari, A., Bencsik, O., Marik, T., Németh, A., Kredics, L., Vágvölgyi, Cs., Szekeres, A. (2016) Antimicrobial effects of fungal endophytes of *Taxus baccata*. In: Keszthelyi-Szabó, G. (szerk.) International Conference on Science and Technique Based on Applied and Fundamental Research: Book of Abstracts. p. 50.

Volford, B., Erdenebileg, S., Bencsik, O., Marik, T., Németh, A., Kredics, L., Vágvölgyi, Cs., Szekeres, A. (2016) Taxonomical characterisation of endophytic fungi isolated from Hungarian yew trees. In: Keszthelyi-Szabó, G. (szerk.) International Conference on Science and Technique Based on Applied and Fundamental Research: Book of Abstracts. p. 54.

Volford, B., Erdenebileg, S., Vigneshwari, A., Bencsik, O., Németh, A., Kredics, L., Vágvölgyi, Cs., Szekeres, A. (2016) Taxonomical characterisation of endophytic fungi of *Taxus baccata* and antimicrobial effects of their secondary metabolites. In: Márialigeti, K. (szerk.) A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2016. évi nagygyűlése és a XII. Fermentációs Kollokvium: Absztraktkötet. p. 66.

Szekeres, A., **Volford, B.**, Németh, A., Chandrasekaran, M., Kadaikunnan, S., Alharbi, N.S., Vágvölgyi, Cs. (2015) Isolation of fungal endophytes producing biologically active metabolites against plant pathogenic fungi. In: Stadler, M., Pirttilä, A.M. (szerk.) MiCROPe Satellite Workshop: Applications of Endophytes and Their Secondary Metabolites to Combat Phytopathogens. p. 30.

Összesített impakt faktor: 19,892

NYILATKOZAT

Alulírottak kijelentjük, hogy Volford Bettina szerepe meghatározó jelentőségű volt a

Volford, B., Varga, M., Szekeres, A., Kotogán, A., Nagy, G., Vágvölgyi, Cs., Papp, T., Takó, M. (2021) β -Galactosidase-producing isolates in Mucoromycota: Screening, enzyme production, and applications for functional oligosaccharide synthesis. *Journal of Fungi* 7, 229.

Kotogán, A., Furka, Zs.T., Kovács, T., **Volford, B.**, Papp, D.A., Varga, M., Huynh, T., Szekeres, A., Papp, T., Vágvölgyi., Cs., Mondal, K.C., Kerekes, E.B., Takó, M. (2022) Hydrolysis of edible oils by fungal lipases: An effective tool to produce bioactive extracts with antioxidant and antimicrobial potential. *Foods* 11, 1711.

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

Szeged, 2023. szeptember 13.

Prof. Dr. Vágvölgyi Csaba
Tanszékvezető

Dr. Takó Miklós
Témavezető

Dr. Nagy Gábor
Témavezető

Dr. Kovács-Kotogán Alexandra
Társszerző