



Szent István Egyetem
Gödöllő

**CELLULÁZ ÉS HEMICELLULÁZ GÉNEK IZOLÁLÁSA
A *THERMOBIFIDA FUSCA* TM51 TÖRZSBŐL**

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Béki Emese

Gödöllő
2004.

A doktori iskola neve: Biológia Tudományi Doktori Iskola

Tudományága: Biológia

Vezetője: Dr. Tuba Zoltán
tanszékvezető egyetemi tanár
Szent István Egyetem, Mezőgazdasági- és Környezettudományi
Kar, Növénytani és Növényélettani Tanszék

Témavezető: Dr. Hornok László
az MTA levelező tagja, tanszékvezető egyetemi tanár
Szent István Egyetem, Mezőgazdasági- és Környezettudományi
Kar, Mezőgazdasági Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék

Társ-témavezető: Dr. Kukolya József
egyetemi adjunktus
Szent István Egyetem, Mezőgazdasági- és Környezettudományi
Kar, Mezőgazdasági Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék

.....

Dr. Tuba Zoltán
a doktori iskola vezetője

.....

Dr. Hornok László
témavezető

Előzmények, kitűzött célok

A növényi sejtfalat alkotó lignocellulóz, amelyből a becslések szerint 4×10^{10} tonna keletkezik évente, a legnagyobb mennyiségben termelődő szerves anyag a Földön. Ennek köszönhetően számos mikroorganizmus kitüntetett célpontja, amelyek elsődlegesen szén-, és energiaforrásként hasznosítják a növényi maradványokat. Ezen felül a lignocellulóz napjainkban egyre inkább magára vonja az üzemanyagok és vegyszerek előállítására alkalmas, megújuló források után kutató biotechnológusok figyelmét is.

A lignocellulóz legnagyobb mennyiségben jelenlevő komponense a β -D-1,4-glikozidos kötésekkel kapcsolódó glükóz egységekből felépülő cellulóz. Természetes formájában a cellulóz hosszú, kristályos mikrofibrillumokból épül fel, amelyekben hidrogén-híd kötések kapcsolják össze az egyes molekulákat. Ezek a cellulóz rostok főként hemicellulózokat és lignint tartalmazó mátrixba ágyazódnak. A hemicellulóz a cellulóz után a sejtfal második legnagyobb mennyiségben jelenlevő komponense. Az állandó összetételű cellulóztól eltérően a hemicellulóz felépítése igen változatos a különböző növényekben. A legjelentősebb hemicellulóz a xilán, amelyben a xilóz egységek β -D-1,4-glikozidos kötésekkel vannak összekapcsolva. A xilán mellett a mannán a másik említésre méltó hemicellulóz frakció, amely mannóz vagy mannóz és glükóz monomerekből β -D-1,4-glikozidos kötésekkel kapcsolódó lineáris polimer. A xilánra és mannánra is jellemzőek a növénycsoportonként eltérő, változatos felépítésű oldalláncok. A sejtfal szerkezetét végül a lignin teszi szilárdná, amely egy komplex, fenilpropán egységekből felépülő polimer.

A sejtfalat alkotó poliszacharidok lebontásához egy sor hidroláz enzimre van szükség. A legegyszerűbb szerkezetű cellulóz hidrolíziséhez például három különböző funkciójú enzim egyidejű jelenléte szükséges. Az endoglükánázok első lépésként véletlenszerűen hasítják a cellulóz lánc amorf régióit. Az így szabaddá váló láncvégekről az exoglükánázok (más néven cellobiohidrolázok) hasítanak le cellobióz egységeket, amelyeket a hidrolízis utolsó lépéseként a cellobiáz (más néven β -glükozidáz) enzimek bontanak le glükózzá. A növényeket alkotó hemicellulóz heterogenitásából következően a lebontását végző enzimrendszer is igen összetett. A celluláz rendszerhez hasonlóan az endoxilanáz és endomannanáz enzimek a xilánt és a mannánt a lánc belsejében, véletlenszerű módon hasítják. A képződő xilo- és mannooligoszacharidok hasítását pedig β -xilozidáz és β -mannozidáz enzimek végzik xilóz és mannóz végterméket adva. A különböző oldalláncok eltávolítását α -L-arabinofuranozidáz, α -glükuronidáz, acetilxilán észteráz, acetilmannán észteráz és α -galaktozidáz enzimek végzik.

Ebből a rövid áttekintésből látható, hogy azok a mikroszervezetek, melyek tápanyag- és energiaforrásként a lignocellulóz lebontására vállalkoznak, nehéz feladat előtt állnak. Az általunk vizsgált *Thermobifida fusca* (korábbi nevén *Thermomonospora fusca*) baktérium összetett poliszacharid–hidroláz enzimrendszerének köszönhetően képes a lignocellulóz hidrolízisére, a komposztálás termofil fázisában aktív szerepet játszik a növényi maradványok lebontásában. Egy amerikai kutatócsoport (Wilson és munkatársai) már közel 20 éve folytat kísérleteket e baktérium poliszacharid–hidroláz enzimrendszerének megismerésére. A szakirodalomból ismert négy endoglükanáz, két exoglükanáz, egy cellobiáz, két endoxilanáz és egy endomannanáz enzimet kódoló gének szekvenciája. A kutatócsoport munkájának köszönhetően vált a *T. fusca* a *Thermobifida*-nemzetség legrészletesebben jellemzett fajává, s egyben az aerob, termofil lignocellulózbontó baktériumok modellszervezetévé.

A Szent István Egyetem Mezőgazdasági Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszékén figyelemreméltó előzményei vannak a *T. fusca*hoz kapcsolódó kutatásoknak. A Tanszéken fellelhető saját izolálású, lignocellulózbontó mikroszervezetekből álló törzsgyűjtemény egyik tagja a *T. fusca* TM51 törzs, mely az előzetes vizsgálatok során kiemelkedő celluláz és hemicelluláz aktivitást mutatott. A törzs poliszacharid–hidroláz enzimrendszerének vizsgálatakor kapott endoglükanáz zimogram összetettebb mintázatot mutatott, mint az a korábbi ismereteink alapján várható volt. Az eddig leírt négy endoglükanáz enzimmel szemben mi öt-hat különböző endoglükanáz együttes jelenlétére utaló zimogramot kaptunk. További SDS–PAGE vizsgálatok segítségével kimutattunk olyan hemicelluláz enzimeket (β -mannozidáz, β -xilozidáz) is, melyek meglétét más, a *T. fusca* enzimrendszerével nagy hasonlóságot mutató mikroszervezetekben már igazolták, de a *T. fusca*ban való előfordulásukra irodalmi utalást nem találtunk.

Ezen előzetes ismeretek tükrében, a doktori értekezésemben tárgyalt kutatómunka fő célkitűzése:

celluláz és hemicelluláz enzimeket kódoló gének izolálása a *Thermobifida fusca*ból, ezen belül:

- expressziós génkönyvtár létrehozása a *T. fusca* TM51 törzsből,
- a teljes könyvtár tesztelése cellulóz és hemicellulóz szubsztrátokon,
- az izolált gének nukleotid sorrendjének meghatározása és elemzése, valamint a géntermékek jellemzése.

Módszerek

Expressziós génkönyvtár készítése a *Thermobifida fusca* TM51 törzsből

Az expressziós génkönyvtár elkészítéséhez a saját izolálású *Thermobifida fusca* TM51 törzset (Kukolya et al., 1997) használtuk fel. A kísérletekben referencia törzsként a *T. fusca* ATCC 27730 szerepelt. A génkönyvtár készítéshez gazdaként használt *Streptomyces lividans* TK24 törzset és a pIJ699 vektort Nagy István (Janssens Laboratory of Genetics, Katholieke Universiteit Leuven, Kardinaat, Belgium) bocsátotta rendelkezésünkre. A protoplaszt készítést a *S. lividans*-ból, a protoplasztok transzformálást, a transzformánsok regenerálást és szelektálását Hunter (1985) útmutatása szerint végeztük. A transzformánsok endoglükánáz és endoxilánáz aktivitásának kimutatására 0.5% karboximetilcellulózt (CMC), ill. 0.2% xilánt tartalmazó agarlemezekon Kongó-vörös festést alkalmaztunk. A β -mannozidáz és β -xilozidáz aktivitások kimutatására 1 mM koncentrációjú metilumbelliferil- β -mannopiranozid (MU β M), ill. metilumbelliferil- β -D-xilopiranozid (MU β X) szubsztrátot használtunk, és az aktivitásokat UV fény alatt vizsgáltuk.

A β -mannozidáz enzimet kódoló *manB* és az endoglükánázt kódoló *celG* gének klónozása és szekvencia analízise

A plazmidba klónozott mannozidáz és endoglükánáz gének nukleotid sorrendjét a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézetben működő, Gene Analyzer 3100 (Applied Biosystems) berendezéssel határoztuk meg. A szekvencia összehasonlításokat a GCG programcsomaggal végeztük. A ManB és Cel5B fehérjék doménszerkezetét az Ncbi, Pfam and InterPro adatbankok segítségével vizsgáltuk. A *T. fusca*-ból klónozott mannozidázgén (*manB*) és endoglükánázgén (*cel5B*) nukleotid sorrendjét adatbázisban helyeztük el (GenBank), ahol a következő génbanki azonosítószám alatt található: AY298814 (*cel5B*), AF489440 (*manB*).

A rekombináns ManB enzim szubsztrátspecifitásának vizsgálata és biokémiai jellemzése

A tiszta enzim szubsztrátspecifitásának meghatározására különböző *p*-nitrofenil (*p*NP) származékokat használtuk fel. A felszabaduló *p*-nitrofenol mennyiségét fotometriásan határoztuk meg 400 nm hullámhosszon. Az enzimkinetikai vizsgálatokhoz *p*-nitrofenil- β -mannopiranozid (*p*NP β M) szubsztrátot használtunk hat különböző koncentrációban (0.5 – 5 M tartományban). A K_m és V_{max} értékek meghatározását GraFit software program segítségével végeztük. Az inhibíciós állandó (K_i) meghatározásához szintén hat különböző koncentrációban (0.5 – 5 M tartományban) alkalmaztunk az inhibitorként használt mannózt és glükonolaktont. A K_i meghatározásához is a

Grafit software programot használtuk. Az enzim hőmérséklet- és pH-optimumának meghatározását Kurakake és Komaki (2001) eljárása alapján végeztük el.

A rekombináns ManB enzim transzmannozidáz aktivitásának vizsgálata

Az enzim transzmannozidáz aktivitásának vizsgálatához az enzimet 25mM *p*NPβM (mint donor) és 25 mM *p*-nitrofenil-α-mannopiranozid (*p*NPαM) (mint akceptor) együttes jelenlétében inkubáltuk 0.1 M Na-foszfát pufferben (pH=7.0) szobahőmérsékleten. A reakciótermékeket HPLC-vel (nagyhatékonyságú folyadék kromatográfia) (Hewlett Packard 1090 II készülék: törésmutató különbségi detektor, automata mintavevő, ChemStation) azonosítottuk. Az 1, 12, 24 és 48 óra elteltével vett mintákból 20–20 μl-eket vittünk fel. Az elválasztás Hypersil APS (aminopropilszilika, 5 μm, 4.6 × 100 mm) oszlopon történt. Az elúciót acetonitril és víz 9:1 arányú keverékével végeztük.

A rekombináns Cel5B enzim szubsztrátspecifitásának vizsgálata és biokémiai jellemzése

A tiszta enzim szubsztrátspecifitásának meghatározására a következő oligo- és poliszacharidokat használtuk fel: *p*NP-cellobiozid, *p*NP-glükózid, *p*NP-xilozid, *p*NP-mannozid, alacsony viszkozitású CMC, MN300 cellulóz, Avicel cellulóz, xilán (birchwood, valamint oat-spelt), mannán (LBG), lichenin, laminarin és pustulan (Sigma). Az 1ml végtérfogatú (0.1 M foszfát puffer, pH=7.0) reakcióelegy a 0.25 μg tiszta Cel5B enzim mellett 10 mg-t tartalmazott az egyes poliszacharidokból vagy 20 mM mennyiségű *p*NP-glükózidot. Az inkubáció leteltével (70°C, 20 min) a poliszacharid szubsztrátok esetében az enzim aktivitást a felszabaduló redukálócukrok mennyiségének mérésével, Miller (1959) módszere alapján számoltuk. A *p*NP-glükózidokkal végzett aktivitási tesztekben a reakciót 2 ml 0.2 M Na-borát puffer (pH=10.0) hozzáadásával állítottuk le. A felszabaduló *p*-nitrofenol mennyiségét fotometriásan határoztuk meg 400 nm hullámhosszon.

A rekombináns enzim hatásmechanizmusát (endo jellegű aktivitását) viszkozimetriával bizonyítottuk (Irwin et al., 1993). 10 ml 0.2% CMC-t tartalmazó oldatot 0.25 μg Cel5B enzimmel együtt inkubáltuk, s meghatároztuk a reakció időt, mely az oldat 50%-os relatív viszkozitás csökkenéséhez volt szükséges.

A Cel5B enzim endoglükanáz aktivitásának vizsgálatához karboximetil-cellulóz-remazol brilliant blue (CMC-RBB, Löewe Biochemica) szubsztrátot használtunk. A reakció körülmények a következők voltak: 0.25 μg koncentrált fehérje minta, 200 μl 20 mg ml⁻¹ koncentrációjú CMC-RBB szubsztrát és 590 μl 0.1 M koncentrációjú foszfát puffer (pH=7.0). A reakcióelegyet 15 percig 60°C-on inkubáltuk, majd a 1 M HCl oldattal blokkoltuk. A sav hatására az enzim által el nem

bontott CMC-RBB kicsapódott, a csapadékot centrifugálással eltávolítottunk. A hidrolízis következtében szabaddá váló RBB festék mennyiségét fotometriásan határoztuk meg 600 nm hullámhosszon. Az enzim hőmérséklet- és pH-optimumának meghatározását Kurakake és Komaki (2001) eljárása alapján végeztük el.

Eredmények és megvitatásuk

A *Thermobifida fusca* β -mannozidáz enzime

Az aerob, termofil lignocellulóz bontó baktériumok modellszervezeteként ismert *T. fusca* poliszacharid-hidroláz enzimrendszere összetett, aktívan kutatott terület. A *T. fusca* TM51 törzsből készített expressziós génkönyvtár klónjainak különböző hidroláz aktivitását vizsgálva azonosítottunk egy β -mannozidáz enzimet kódoló gént, amely eddig ebből a mikroszervezetből még nem volt ismert.

A 2523 bp-ból álló nyitott leolvasási keret (ORF) egy 840 aminosavból álló feltételezett fehérjét kódol. A fehérje számított molekulatömege 94.194 kDa, izoelektromos pontja pedig 4.87. A β -mannozidázt kódoló *manB* szekvencia analízise során tapasztaltunk érdekes eltéréseket a többi *Thermobifida* génhez képest. A potenciális riboszómakötőhely 63 bp távolságra helyezkedik el a start kódtól az 5' nem kódoló régió irányába, ami szokatlanul nagy távolság a *T. fusca* cellulázgénjeihez hasonlítva (7-13 bp a start kódtól) (Spiridonov és Wilson, 1998).

A CelR transzkripciósz regulátor fehérje operátor szekvenciája (TGGGAGCGCTCCCA) a *T. fusca*-ból ismert összes extracelluláris celluláz és xilanáz promóter régiójában jelen van (Spiridonov és Wilson, 1998). A *manB* szabályozó régiójának számítógépes szekvencia elemzése során mi egy másik potenciális regulátor fehérje operátor szekvenciát találtunk. Az AACCGGTT DNS szakasz két példányban van jelen a *manB* promóter régiójában (-115 bp). Egy svájci kutatócsoportnak köszönhetően rendelkezésünkre állnak a *T. fusca*-ból származó endomannanáz enzimről is adatok (Hilge et al., 1998). A gén promóter régiójában a *manB*-hez hasonlóan jelen van a már említett motívum, így feltételezhető, hogy ez a szekvencia fontos szerepet játszik a két gén szimultán szabályozásában.

Az indukciós vizsgálatok is azt mutatják, hogy a cellulázok és hemicellulázok szabályozása részben kapcsolt, ugyanis cellulóz szénforráson a xilanázgének expressziója is beindul (Spiridonov és Wilson, 1998). Ezzel szemben a β -mannozidáz csak mannán szénforráson szintetizálódott. A promóter analízis és az indukciós kísérletek eredményei egyaránt azt jelzik, hogy a mannán

lebontást végző enzimek szabályozása feltételezhetően elkülönül a cellulázok és xilanázok szabályozásától, s számunkra még ismeretlen módon zajlik.

A β -mannozidáz (ManB) N-terminálisán nem található meg az extracelluláris enzimekre jellemző szignál peptid szekvencia. A származtatott aminosav szekvencia számítógépes elemzése során kiderült, hogy a ManB egy moduláris fehérje, amely tartalmaz egy N-terminális cukorkötő domént (2-162 aa), egy immunoglobulinszerű β -szendvics térszerkezetű domént (208-312 aa) és egy TIM barrel domént (314-616 aa). A fehérje C-terminálisán található még egy ismeretlen funkciójú domén (623-817 aa) (Pfam és InterPro adatbank, Apweiler et al., 2001).

A ManB enzim nagyfokú hasonlóságot mutat a glikozil-hidrolázok 2. (GH2) családjába tartozó más β -mannozidáz enzimekhez (Coutinho és Henrissat, 1999). Ebben a családban a β -mannozidáz aktivitású enzimek mellett β -galaktozidáz és β -glükuronidáz enzimek is megtalálhatók. Az aminosav szekvencia elemzése során a ManB a legnagyobb homológiát a *Cellulomonas fimi* Man2A β -mannozidáz enzimével adta, ami egyáltalán nem meglepő, mivel a két mikroszervezet közeli rokonsági kapcsolatban áll, s igen figyelemreméltóak a hasonlóságok a két baktérium poliszacharid-hidroláz enzimrendszerében is (Warren, 1996). Erre újabb bizonyíték a *T. fusca*-ból izolált *manB*, ami igazolja munkánk egyik feltevését, miszerint a *C. fimi*-ből izolált enzimének homológ párjai nagy valószínűséggel jelen vannak a *T. fuscaban* is.

A *Streptomyces lividans* által termelt heterológ enzim hőmérséklet–optimuma 55°C, pH–optimuma pedig 7.17 volt. A ManB enzim hőstabilitása viszonylag alacsony, mivel 60°C-on, 10 min inkubációt követően az aktivitásának mindössze felét őrizte meg.

Az enzim biokémiai tulajdonságait vizsgálva az első szembetűnő eltérés a *T. fusca*-ból jellemzett hidrolázokhoz képest az enzim hőmérséklet–optimuma volt (55°C), ami jóval alulmaradt a termofil szervezetből származó más cellulázokhoz és hemicellulázokhoz képest. Erre magyarázatként az enzim lokalizációja szolgálhat, mivel az eddig publikált, kivétel nélkül extracelluláris enzimekkel szemben a β -mannozidáz enzim intracelluláris. A közelmúltban jelent meg egy cikk (Spiridonov és Wilson, 2001), amelyben a *T. fusca* celluláz rendszerének egyetlen intracelluláris tagját, egy β -glükozidáz enzimet jellemeztek. Ennek az enzimnek a hőmérséklet–optimuma (50°C) hasonló volt a mi enzimünk hőmérséklet–optimumához. A β -glükozidáz enzim intracelluláris lokalizációját a szignál peptid hiányán túl az is bizonyította, hogy a *bglABC* operon a β -glükozidáz (*bglC*) mellett két cukor permeáz fehérjét kódoló gént (*bglA* és *bglB*) is tartalmazott, és géncsoportosulásba rendeződött egy cukorkötő fehérjét (*sbpA*) és egy transzkripciószabályozó fehérjét (*celR*) kódoló génnel. A *T. fusca*-ból származó *bglA* és *bglB* által

kódolt fehérjék nagyfokú hasonlóságot mutattak a *Streptomyces reticuliból* származó két cellobióz permeázzal (*cebF* és *cebG*) (Schlosser és Schrempf, 1996).

A cellulóz és hemicellulóz szubsztrátoknak az extracelluláris térben diszacharidokká történő lebontása általánosan elterjedt folyamat a *Thermobifidák* és más komposztlakó aktinomicéták körében, amelyek egy sor extracelluláris celluláz, xilanáz és mannanáz enzimet termelnek. Másrészt a poliszacharid lebontás utolsó lépését katalizáló cellobiáz, β -mannozidáz és β -xilozidáz enzimek gyakran sejthez kötöttek (Stoll et al., 1999). Ez a stratégia a mikroszervezetek számára több szempontból is előnyös. Egyrészt segít megelőzni a felszabaduló cukrok más komposztlakó mikroszervezetek által történő elfogyasztását, amelyek a megfelelő enzim és transzport rendszer hiányában képtelenek a cellobióz, xilobióz és mannobióz hasznosítására. A cellobióz intracelluláris metabolizációjának másik előnye, hogy a cellobióz felvétele kisebb energia befektetést igényel a sejt részéről, mint a glükóze (Thurston et al., 1993). A *T. fuscaból* és *S. reticuliból* ismert cellobióz permeázok mellett xilobióz és mannobióz permeázokról is beszámoltak már *Aureobasidium pullulansból* (Lubomir és Peter, 1998). Valószínűsíthető, hogy hasonló mechanizmus támogatja a mannobióz felvételét a *Thermobifidákban* is.

A szubsztrátspecifitász vizsgálatakor az enzim csak β -D-mannozidáz aktivitást mutatott. Ez a szűk szubsztrátspecifitász hasonlóan igaz a *Thermotoga neapolitanaból* leírt β -mannozidáz esetében is (Duffaud, 1997).

Az enzimkinetikai paraméterek *pNP β M*-t használva szubsztrátumként a következők voltak: $K_m=0.18$ mM és $V_{max}=5.58$ U mg^{-1} . Az inhibíciós állandó (K_i) mannózra nézve 5.5 mM volt. A glükonolakton nem volt hatással az enzim aktivitásra.

Amikor a ManB enzimet különböző alkoholok (metil-, etil-, propil-, és butil-alkohol) és *pNP β M* jelenlétében inkubáltuk, az enzim mannozil csoportot helyezett át *pNP β M*-ről az alkoholokra alkil-mannozidokat képezve. Transzglikoziláz aktivitást tudtunk kimutatni akkor is, ha a ManB enzimet *pNP β M* és *pNP α M* együttes jelenlétében inkubáltuk. Ebben az esetben a *pNP β M*-ről helyezett át az enzim mannozil csoportot a *pNP α M*-ra.

Köztudott, hogy a szénhidrátok a sejtek fő energiaforrásai és egyben szerkezeti elemei. Mindezek mellett ezek a biomolekulák fontos szereplői számos molekuláris felismerési folyamatnak a sejtek közötti kommunikációban és szignál transzdukcióban (Varki, 1993). Ez az oka, hogy figyelemreméltó érdeklődés övezi a szénhidrát alapú gyógyszergyártást és olyan technikák kifejlesztését, amelyek célja az oligoszacharidok elemzése és szintézise. A szénhidrátok klasszikus kémiai úton történő előállítása nem mindig nyújt megfelelő megoldást a kérdésre, mivel a keletkező termék mennyisége gyakran csekély, ezzel szemben maga a szintézis folyamata idő- és

költségigényes, s technikai megoldása sem túl egyszerű feladat. Napjainkban az érdeklődés középpontjába került a szénhidrátok enzimek által katalizált szintézise, amely új alternatívaként jelentkezett a kémiai úton történő oligoszacharid gyártás mellett. Az enzimek által történő szintézis két módon valósítható meg: glikozil-transzferáz és glikozil-hidroláz enzimekkel (Withers, 2001). A glikozil-transzferázok ilyen irányú hasznosítását korlátozza, hogy az általuk szubsztrátként használt anyagok költsége magas, ill. maguk az enzimek sem állnak korlátlan mennyiségben a rendelkezésünkre. Ezzel szemben a glikozil-hidrolázok jelen vannak a legtöbb élő szervezetben, s az általuk használt szubsztrátok is viszonylag alacsony költségűek. Kérdés, hogyan tudja megvalósítani egy hidroláz enzim az aktivitásával ellentétes glikozilálás vagy más néven fordított hidrolízis folyamatát?

A glikozil-hidrolázok a glikozidos kötések hasítását kétféle mechanizmus szerint vihetik véghez: inverzióval vagy retencióval (Warren, 1996). A két különböző mechanizmusú reakciónak köszönhetően a keletkező termékben eltérő lesz az anomer szénatom konfigurációja: inverzió esetén α -D-glikozidok, míg retenció esetén β -D-glikozidok keletkeznek. A retencióval hasító enzimek esetében a hidrolízis két lépcsőn keresztül valósul meg. Első lépésként egy kovalens kötéssel összekapcsolt szubsztrát–enzim intermedier keletkezik, majd a deprotonált víz molekula az anomer szénatomot megtámadva elhasítja a glikozil-észter intermediert. Abban az esetben, ha a víz helyett akceptorként például egy cukor molekula van jelen, a retencióval hasító hidroláz enzim transzglikozilálást fog végezni (Moracci et al., 2001).

A problémát az jelenti, hogy a keletkező termék az enzim szubsztrátjaként szolgál, így maga el is bontja a szintetizált oligoszacharidokat. A *T. fusca* β -mannozidáz enzimének is van transzmannozidáz aktivitása, ami bizonyítja, hogy ez az enzim a glikozidos kötések hidrolízisét retencióval végzi, mivel ez előfeltétele a transzglikoziláz aktivitásnak. A transzmannozidáz aktivitás igen alacsony volt, az enzim a rendelkezésre álló oligoszacharidoknak csupán 1-2%-át alakította át diszachariddá.

Az elmúlt két-három évben számos publikáció jelent meg, amelyekben olyan kísérletekről számoltak be, melyek a glikozil-hidrolázok transzglikozidáz aktivitásának kiaknázását célozták meg, nem kevés sikerrel (Zechel és Withers, 2001; Mayer et al., 2001; Moracci et al., 2001; Trincone et al., 2000; Mayer et al., 2000; Malet és Planas, 1998). Withers (2001) alkotta meg először a biokatalizátorok egy új osztályát, glikoszintázok elnevezéssel. A glikoszintázok olyan módosult aktivitású hidroláz enzimek, amelyek hatékonyan szintetizálnak oligoszacharidokat, de nem hidrolizálják őket. Mindez annak köszönhető, hogy a hidrolízis során nukleofil partnerként működő glutaminsavat helyspecifikus mutagenézissel kicserélik (általában alaninra), így az enzim elveszti hidroláz aktivitását. A ManB esetében is járható út lenne az enzim ily módon történő

alkalmassá tétele oligoszacharid gyártásra, mivel szűk aglikon specificitása miatt ígéretes jelölt mannooligoszacharidok szintézisére.

A feltételezett katalitikus karboxilsavak a ManB esetében a Glu530, mint nukleofil partner és a Glu443, mint katalitikus sav-bázis partner. Az eddig jellemzett β -mannozidáz enzimek a *Pyrococcus furiosus*ból (Bauer et al., 1996) származótól eltekintve a glikozil-hidrolázok 2. családjába tartoznak, amelyben ezek mellett β -galaktozidáz és β -glükuronidáz enzimek is megtalálhatóak. A β -mannozidázok konszenzus szekvenciái nem teljesen felelnek meg a glikozil-hidrolázok 2. családját jellemző konszenzus szekvenciáknak, ezért a családon belül azok egy alcsaládot képeznek. Bár a családon belül egy β -galaktozidáz (Gebler et al., 1992) és egy β -glükuronidáz (Wong et al., 1998) esetében már kísérletesen is meghatározták a katalitikus nukleofil helyét, β -mannozidáz enzimről ilyen információk nem álltak rendelkezésre egészen 2000-ig. A *C. fimi* β -mannozidáz enzimének esetében bizonyították először, hogy a Glu519 a katalitikus nukleofil (Stoll et al., 2000). Végso konklúzióként a szerzők megállapították, hogy a Glu519 konzervált aminosav nemcsak a β -mannozidázok körében, hanem az egész családon belül. Ez a megállapítás támpontot nyújthat a mi további kísérleteinkhez is, melyek elsődleges célja a ManB enzimben nukleofil partnerként működő katalitikus karboxilsav kicserélése, s az így módosított enzim transzmannotidáz aktivitásának vizsgálata.

A *Thermobifida fusca* új endoglükánáz enzime

Egyszerű kémiai összetétele ellenére a kristályos cellulóz lebontásához összetett hidroláz enzimrendszer szükséges. Egy teljes celluláz rendszer tagjait endoglükánáz, redukáló és nem redukáló végről hasító cellobiohidroláz, valamint cellobiáz enzimek képezik. A cellulóz bontására képes mikroszervezetekre jellemző, hogy a cellobiáz hidrolízisét végző cellobiáz és a két típusú cellobiohidroláz enzimek mellett több, ugyanazt a lépést katalizáló endoglükánáz enzimük is van. Így van ez a komposztlakó *Thermobifida fusca* esetében is, amelynek az irodalom szerint három endoglükánáz és egy exo/endoglükánáz enzime van (Hu és Wilson, 1988; Lao et al., 1991; Jung et al., 1993; Zhang et al., 1995; Irwin et al., 2000).

A *T. fusca* TM51 celluláz enzimrendszerét vizsgálva a kapott endoglükánáz zimogram összetettsége azt sugallta, hogy ennek a mikroszervezetnek további endoglükánáz enzime is lehetnek. Az E61 klón szekvencia elemzésének, valamint a heterológ gazdában termeltetett fehérje biokémiai vizsgálatainak eredményei alapján izoláltunk egy új, a glikozil-hidrolázok 5. családba (GH5) tartozó endoglükánázt kódoló gént (*cel5B*) a *Thermobifida fusca* TM51 törzsből. Az új

enzim, név szerint Cel5B (vagy E7 a korábbi nomenklatura szerint), a Cel5A mellett a GH5 család második, *T. fuscaból* származó tagja.

Az 1851 bp-ból álló nyitott leolvasási keret (ORF) egy 616 aminosavból álló feltételezett fehérjét kódol. A fehérje számított molekulatömege 67.665 kDa, izoelektromos pontja pedig 4.22. Az ORF G+C tartalma (65.47%) nem mutatott jelentős eltérést a teljes *T. fusca* genomra jellemző G+C aránytól (66.5%). A potenciális riboszómakötőhely (AGGA) a translációs iniciációs kodontól 22 bp távolságra helyezkedik el az 5' nem kódoló régió irányában (upstream). Az összes *T. fuscaból* származó celluláz gén 5' szabályozó régiójában található egy 14 bp hosszúságú fordítva ismétlődő szekvencia (TGGGAGCGCTCCCA), amely egy transzkripciós szabályozó fehérje (CelR) operátoraként szolgál (Spiridonov és Wilson, 1998) és biztosítja az enzimek összehangolt szabályozását. A *cel5B* esetében ennek az operátor szekvenciának egy tökéletlen példányát (CGGGAGCGCACCT) azonosítottuk az 5' szabályozó régióban a translációs start ponttól 67 bp távolságra.

A SignalP számítógépes program (Nielsen et al., 1997) a Cel5B esetében egy szekréción szignál peptid hasítóhelyet valószínűsít a 30. és a 31. aminosav között. A katalitikus domén előtt elhelyezkedő, 42 aminosav hosszúságú szignál peptid méretében és összetételében is hasonlóságot mutat más aktinomicétákból származó szignál szekvenciákkal. A további számítógépes aminosav homológia vizsgálatok alapján a Cel5B tartalmaz egy a 43. és 385. aminosav között elhelyezkedő, a GH5. családjába tartozó katalitikus domént, valamint egy a 476. aminosavtól kezdődő, 78 aminosav hosszúságú CBD 3 típusú cellulózkötő modult. A 385. és a 476. aminosav között helyezkedik el a katalitikus és szubsztrátkötő doméneket elválasztó feltételezett linker régió. Ez a 91 aminosav hosszúságú szakasz gazdag prolinban, szerinben és tirozinban, s tartalmaz egy jellegzetes, háromszor ismétlődő motívumot (PPTEPTE). A *T. fuscaból* ismert más cellulázok linker régióihoz hasonlítva e szakasz hosszúsága jelentősen felülmúlja a többi cellulázét.

Mivel a GH5 család összetétele igen változatos, találhatunk benne cellulóz 1,4- β -cellobiozidáz, β -mannozidáz, glükán 1,3- β -gükozidáz, lichenináz, glükán endo-1,6- β -glükozidáz, mannán endo-1,4- β -mannozidáz és xilán endo-1,4- β -xilanáz aktivitású enzimeket egyaránt, ezért egy sor szubsztráton teszteltük a Cel5B aktivitását. A szubsztrátspecificitás tesztekben a Cel5B csak a cellulózt hidrolizálta, s nem mutatott aktivitást xilán, mannán vagy más hemicellulóz szénforrásokon.

A CMC oldat viszkozitás csökkenésének mérése elterjedten használt módszer annak eldöntésére, hogy adott celluláz az endo- vagy exo-hatásmechanizmusú enzimek közé tartozik-e? Irwin és munkatársai (1993) is ezzel a módszerrel demonstrálták, hogy a *T. fusca* Cel6B enzime egy exoglükánáz, mivel ez az enzim nem okozott figyelemreméltó viszkozitás csökkenést a CMC

oldatban, míg a Cel9A, amely egy processzív endoglükánáza a *T. fusca*nak csak lassú viszkozitás csökkenést eredményezett. S végül, ha a CMC oldathoz kis mennyiségű Cel5A vagy Cel6A enzimet adtak – amelyekről már korábban bizonyították, hogy valódi endoglükánázok – az oldat viszkozitása gyorsan és erőteljesen csökkent. A mi kísérletünkben a Cel5B a Cel5A és Cel6A enzimekhez hasonló hatékonyságú viszkozitás csökkenést eredményezett, ami bizonyítja, hogy ez az enzim a *T. fusca* negyedik endo–hatásmechanizmusú glükánáza.

Ennyi endoglükánáz enzim jelenléte első megközelítésben feleslegesnek tűnhet, mivel valamennyi enzim a cellulózlánc véletlenszerű hasítását végzi, szabad láncvégeket képezve a cellobiohidrolázok számára. Az ismert cellulázokkal végzett indukciós kísérletek azonban – melyekben jelentős eltérés volt tapasztalható az egyes *cel* gének indukálhatóságában – azt mutatják, hogy a különböző endoglükánázok szintézisével a baktérium alkalmazkodni tud a környezetében jelenlevő eltérő minőségű szubsztrátokhoz (Spiridonov és Wilson, 1998).

A *T. fusca* extracelluláris enzimeit termőszelők és széles pH tartományban aktívak, amelynek oka az őket termelő mikroszervezet természetes közegének jellemzőivel magyarázható. A *T. fusca* TM51 törzs izolálásakor például az istállótrágya komposzt pH értéke 8.0, hőmérséklete pedig 75°C volt. A Cel5B 66°C hőmérsékletig stabil volt, de nagyobb hőmérsékleten stabilitása gyorsan csökkent. A relatív instabilitástól függetlenül a Cel5B hőmérséklet–optimuma ~77°C, ami a CMC szubsztrát stabilizáló hatásának köszönhető. Ehhez hasonló, a szubsztráttal összefüggésbe hozható enzim stabilizálásról korábban más szerzők is beszámoltak már a *Bacillus* sp. CH43 és HR48 törzsekből származó endoglükánázok esetében (Mawazda et al., 2000). A Cel5B 77°C-os hőmérséklet–optimuma jól összhangban van a *T. fusca* többi endoglükánázának, endoxilánázának és endomannánázának hőmérséklet–optimumával, ami 70 - 80°C közötti tartományba esik (Irwin et al., 1994; Hilge et al., 1998), és távlatokat nyit az általunk újonnan leírt endoglükánáz ipari felhasználásra is.

A *T. fusca*ból napjainkig jellemzett cellulázok a glikozil-hidrolázok négy különböző családjába sorolhatók, a GH5, GH6, GH9 és GH48 családokba. A GH5, GH6 és GH9 családokban két-két *T. fusca* eredetű hidroláz képviselteti magát. Feltételezhető, hogy ez a celluláz rendszer, amely különböző GH családokba tartozó enzimpárokból áll, sorozatos génduplikáció eredményeként jött létre. Korábbi tanulmányok is alátámasztják ezt a hipotézist: a *Neocallimastix patriciarum* XYLA enzimének két homológ katalitikus doménje van (Gilbert et al., 1992), a *Bacillus* sp. N4 törzs két a GH2 családba tartozó endoglükánáza között 77% a hasonlóság (Fukumori et al., 1986) és a *Clostridium thermocellum* CelK és CbhA cellobiohidrolázai szintén több mint 80% homológiát mutatnak (Kataeva et al., 1999; Zverlov et al., 1999). Mindezek azt

jelzik, hogy ezek a szekvencia párok génduplikáció során keletkeztek. Másrészt viszont a *T. fusca* Cel9B és a *C. thermocellum* CbhA (Zverlov et al., 1998) enzimeik között megfigyelhető szekvencia azonosság alapján arra következtethetünk, hogy génátvitel játszódhatott le a két mikroszervezet között, s így a horizontális géntranszfer játszhatott szerepet a *T. fusca* összetett celluláz rendszerének kialakulásában. Munkánk során összevetettük a hét ismert *T. fusca* celluláz katalitikus doménjének aminosav szekvenciáját 18 baktériumból származó, a GH5, GH6, GH9 és GH48 családba tartozó 35 különböző celluláz katalitikus doménjeinek aminosav szekvenciáival. Ezek alapján az azonos családba tartozó *T. fusca* enzim párok nem állnak egymással túl szoros rokoni kapcsolatban, míg számos esetben figyelemreméltó hasonlóságot mutatnak taxonómiaiilag tőlük távol álló mikroszervezetek celluláz enzimeivel. Különösen említésre méltó, hogy a legtöbb esetben szoros kapcsolat volt megfigyelhető a *T. fusca* és a *C. fimi* cellulázai között.

A filogenetikai vizsgálat tehát megerősítette azt a feltevésünket, hogy a *T. fusca* cellulázainak keletkezésében a génduplikációval szemben a horizontális géntranszfer játszott szerepet. Ennek további bizonyítására alkalmas módszer az egyes celluláz gének G+C arányának összevetése a teljes genom G+C arányával (Garcia-Vallvé et al., 1999). Ilyen összehasonlítással demonstrálták Garcia-Vallvé és munkatársai (2000), hogy az *Orpinomyces joyonii* bendőlakó gomba egyik endoglükánáza egy szintén bendőlakó baktériumból a *Fibrobacter succinogenes*-ből származik, s horizontális géntranszfer útján került ebbe a mikroszervezetbe. A *T. fusca* hét celluláz génjének G+C tartalma nem mutatott szignifikáns eltérést a teljes genom G+C arányához viszonyítva. Ez arra utal, hogy e termofil aktinomicéta az összes celluláz génjére már nagyon régen tett szert, vagy ezek a celluláz gének taxonómiaiilag egymáshoz közel álló mikroorganizmusokból származnak. Mikor a kodon harmadik helyén álló bázisok G+C arányát hasonlítottuk össze, a hét cellulázgén közül csak a *cel9A* mutatott figyelemreméltó eltérést, ami jelzi, hogy a celluláz rendszernek ez a legkésőbb, de szintén nagyon régen érkezett tagja. A horizontális géntranszfer útján érkező gének forrásai lehetnek olyan, szintén komposztlakó, lignocellulóz-bontó aktinomicéták, mint a *Cellulomonas*ok és *Streptomyces*ek, melyek átlagos G+C aránya magasabb (70%), mint a *T. fusca* genom G+C aránya. Ezek a mikroszervezetek mivel, ugyanazon az élőhelyen osztoznak, kemény harcot folytatnak a számukra energia- és szénforrásként szolgáló, nehezen emészthető lignocellulózért. A sikeres harc kulcsa számukra egy hatékonyan működő lignocellulóz-bontó enzimszisztéma. A főként lignocellulózból álló növényi maradványok egy olyan zárt mikrokozmoszt hoznak létre, mely kizárólag olyan fajok számára nyújt élelteret, melyek képesek e nehezen emészthető tápanyagforrás hasznosítására. Ez a zárt rendszer egyben ideális helyszíne lehet az itt megtelepedni képes mikroszervezetek között megvalósuló genetikai információcserének.

Új tudományos eredmények:

1. A saját izolálású *Thermobifida fusca* TM51 törzsből elkészítettünk egy közel 2000 transzformánsból álló expressziós génkönyvtárat. A könyvtár különböző hidroláz aktivitásokra történő tesztelése során azonosítottunk egy β -mannozidáz, valamint egy endoglükánáz pozitív klónt.
2. Meghatároztuk a β -mannozidáz enzimet (ManB) és az endoglükánáz enzimet (Cel5B) kódoló gének (*manB* és *cel5B*) teljes nukleotid sorrendjét.
3. Heterológ gazdában (*Streptomyces lividans*) kifejeztettük *manB* és *cel5B* géneket, a rekombináns enzimeket tisztítottuk. Elvégeztük az enzimek biokémiai jellemzését: szubsztrátspecificitás, T_{opt} , pH_{opt} , V_{max} , K_m , K_i . A β -mannozidáz esetében vizsgáltuk az enzim transzmannotidáz aktivitását. A Cel5B esetében pedig elemeztük az enzim doménszerkezetét, filogenetikai kapcsolatait.
4. A ManB és Cel5B enzimek jellemzésével az aerob, termofil, lignocellulóz bontó baktériumok modellszervezetként ismert *Thermobifida fusca* összetett poliszacharid-hidroláz enzim rendszerét két új taggal bővítettük.

Irodalomjegyzék

- Apweiler, R., Attwood, T.K., Bairoch, A., Bateman, A., Birney, E., Biswas, M., Bucher, P., Cerutti, L., Corpet, F., Croning, M.D.R., Durbin, R., Falquet, L., Fleischmann, W., Gouzy, J., Hermjakob, H., Hulo, N., Jonassen, I., Kahn, D., Kanapin, A., Karavidopoulou, Y., Lopez, R., Marx, B., Mulder, N.J., Oinn, T.M., Pagni, M., Servant, F., Sigrist, C.J.A. and Zdobnov, E.M. 2001. The InterPro database, an integrated documentation resource for protein families, domains and functional sites. *Nucleic Acids Res.* 29:37–40.
- Bauer, M.W., Bylina, E.J., Swanson, R.V. and Kelly, R.M. 1996. Comparison of a beta-glucosidase and a beta-mannosidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. Purification, characterization, gene cloning, and sequence analysis. *J. Biol. Chem.* 271:23749–23755.
- Coutinho, P.M. and Henrissat, B. 1999. The modular structure of cellulases and other carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. In: Ohmiya, K., Hayashi, K., Sakka, K., Kobayashi, Y., Karita, S. and Kimura, T. (eds), *Genetics, biochemistry and ecology of cellulose degradation*. Uni Publishers, Tokyo, Japan, pp 15–23.
- Duffaud, G.D., McCutchen, C.M., Leduc, P., Parker, K.N. and Kelly, R.M. 1997. Purification and characterization of extremely thermostable beta-mannanase, beta-mannosidase, and alpha-galactosidase from the hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga neapolitana* 5068. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:169–177.
- Fukumori, F., Sashihara, N., Kudo, T. and Horikoshi, K. 1986. Nucleotide sequences of two cellulase genes from alkalophilic *Bacillus* sp. strain N-4 and their strong homology. *J. Bacteriol.* 168:497–485.
- Garcia-Vallvé, S., Palau, J. and Romeu, A. 1999. Horizontal gene transfer in glycosyl hydrolases inferred from codon usage in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Mol. Biol. Evol.* 16:1125–1134.

- Garcia-Vallvé, S., Romeu, A. and Palau, J. 2000. Horizontal gene transfer of glycosyl hydrolases of the rumen fungi. *Mol. Biol. Evol.* 17:352-361.
- Gebler, J.C., Aebersold, R. and Withers, S.G. 1992. Glu-537, not Glu-461, is the nucleophile in the active site of (lac Z) beta-galactosidase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 267:11126-11130.
- Gilbert, H.J., Hazlewood, G.P., Laurie, J.I., Orpin, C. G. and Xue, G.P. 1992. Homologous catalytic domains in a rumen fungal xylanase: evidence for gene duplication and procaryotic origin. *Mol. Microbiol.* 6:2065-2072.
- Hilge, M., Gloor, S.M., Rypniewski, W., Sauer, O., Heightman, T.D., Zimmermann, W., Winterhalter, K. and Piontek, K. 1998. High-resolution native and complex structures of thermostable beta-mannanase from *Thermomonospora fusca* - substrate specificity in glycosyl hydrolase family 5. *Structure* 6:1433-1444.
- Hu, Y.J. and Wilson, D.B. 1988. Cloning of *Thermomonospora fusca* genes coding for beta 1-4 endoglucanases E1, E2 and E5. *Gene* 71:331-337
- Hunter, I.S. 1985. Gene cloning in *Streptomyces*. In: Glover, D.M. (ed), DNA cloning: a practical approach. IRL Press Oxford, pp 19-44.
- Irwin, D.C., Spezio, M., Walker, L.P. and Wilson, D.B. 1993. Activity studies of eight purified cellulases: specificity, synergism and binding domain effects. *Biotech. Bioeng.* 42: 1002-1013.
- Irwin, D., Jung, E.D. and Wilson, D.B. 1994. Characterization and sequence of a *Thermomonospora fusca* xylanase. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:763-770.
- Irwin, D.C., Zhang, S. and Wilson, D.B. 2000. Cloning, expression and characterization of a family 48 exocellulase, Cel48A, from *Thermobifida fusca*. *Eur. J. Biochem.* 267:4988-4997.
- Jung, E.D., Lao, G., Irwin, D., Barr, B.K., Benjamin, A. and Wilson, D.B. 1993. DNA sequences and expression in *Streptomyces lividans* of an exoglucanase gene and an endoglucanase gene from *Thermomonospora fusca*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:3032-3043.
- Kataeva, I., Li, X.L., Chen, H., Choi, S.K. and Ljungdahl, L.G. 1999. Cloning and sequence analysis of a new cellulase gene encoding CelK, a major cellulosome component of *Clostridium thermocellum*: evidence for gene duplication and recombination. *J. Bacteriol.* 181:5288-5295.
- Kukolya, J., Dobolyi, C. and Hornok, L. 1997. Isolation and identification of thermophilic cellulolytic actinomycetes. *Acta Phytopath. Entomo. Hung.* 32:97-107.
- Kurakake, M. and Komaki, T. 2001. Production of beta-mannanase and beta-mannosidase from *Aspergillus awamori* K4 and their properties. *Curr. Microbiol.* 42:377-380.
- Lao, G., Ghangas, G.S., Jung, E.D. and Wilson, D.B. 1991. DNA sequences of three beta-1,4-endoglucanase genes from *Thermomonospora fusca*. *J. Bacteriol.* 173:3397-3407.
- Lubomir, K. and Peter, B. 1998. Disaccharides permeases: constituents of xylanolytic and mannanolytic systems of *Aureobasidium pullulans*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1425:560-566.
- Malet, C. and Planas, A. 1998. From β -glucanase to β -glucosynthase: glycosyl transfer to α -glycosyl fluorides catalyzed by a mutant endoglucanase lacking its catalytic nucleophile. *FEBS Lett.* 440:208-212.
- Mawadza, C., Hatti-Kaul, R., Zvauya, R. and Mattiasson, B. 2000. Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus* strains. *J. Biotechnol.* 83:177-187.
- Mayer, C., Jakeman, D.L., Mah, M., Karjala, G., Gal, L., Warren, R.A.J. and Withers, S.G. 2001. Directed evolution of new glycosynthases from *Agrobacterium* β -glucosidase: a general screen to detect enzyme for oligosaccharide synthesis. *Chem. and Biol.* 5:437-443.

- Mayer, C., Zechel, D.L., Reid, S.P., Warren, R.A.J. and Withers, S.G. 2000. The E358S mutant of *Agrobacterium* sp. β -glucosidase is a greatly improved glycosynthase. *FEBS Lett.* 466:40–44.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31:426-428.
- Moracci, M., Trincone, A. and Rossi, M. 2001. Glycosynthases: new enzymes for oligosaccharide synthesis. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic.* 11:155-163.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. and von Heijne, G. 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.* 10:1-6.
- Schlosser, A. and Schrempf, H. 1996. A lipid-anchored binding protein is a component of an ATP-dependent cellobiose/cellobiose-transport system from the cellulose degrader *Streptomyces reticuli*. *Eur. J. Biochem.* 242:332–338.
- Spiridonov, N.A. and Wilson, D.B. 1998. Regulation of biosynthesis of individual cellulases in *Thermomonospora fusca*. *J. Bacteriol.* 180:3529-3532.
- Spiridonov, N.A. and Wilson, D.B. 2001. Cloning and biochemical characterization of BglC, a beta-glucosidase from the cellulolytic actinomycete *Thermobifida fusca*. *Curr. Microbiol.* 42:295-301.
- Stoll, D., Stalbrand, H. and Warren, R.A. 1999. Mannan-degrading enzymes from *Cellulomonas fimi*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2598-2605.
- Stoll, D., He, S., Withers, S.G. and Warren, R.A. 2000. Identification of Glu-519 as the catalytic nucleophile in beta-mannosidase 2A from *Cellulomonas fimi*. *Biochem. J.* 3:833-838.
- Thurston, B., Dawson, K.A. and Strobel, H.J. 1993. Cellobiose versus glucose utilization by the ruminal bacterium *Ruminococcus albus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:2631-2637.
- Trincone, A., Perugino, G., Rossi, M. and Moracci, M. 2000. A novel thermophilic glycosynthase that effects branching glycosylation. *Bioorg. And Medic. Chem. Lett.* 10:365–368.
- Varki, A. 1993. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology.* 3:97-130.
- Warren, R.A.J. 1996. Microbial hydrolysis of polysaccharides. *Annu. Rev. Microbiol.* 50:183-212.
- Withers, S.G. 2001. Mechanisms of glycosyl transferases and hydrolases. *Carbohydr. Polym.* 44:325–337.
- Wong, A.W., He, S., Grubb, J.H., Sly, W.S. and Withers, S.G. 1998. Identification of Glu-540 as the catalytic nucleophile of human beta-glucuronidase using electrospray mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* 273:34057-34062.
- Zechel, D.L. and Withers, S.G. 2001. Dissection of nucleophilic and acid–base catalysis in glycosidases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5:643-649.
- Zhang, S., Lao, G. and Wilson, D.B. 1995. Characterization of a *Thermomonospora fusca* exocellulase. *Biochemistry* 34:3386-3395.
- Zverlov, V.V., Velikodvorskaya, G.V., Schwarz, W.H., Bronnenmeier, K., Kellermann, J. and Staudenbauer, W. 1998. Multidomain structure and cellulosomal localization of the *Clostridium thermocellum* cellobiohydrolase CbhA. *J. Bacteriol.* 180:3091-3099.
- Zverlov, V.V., Velikodvorskaya, G.A., Schwarz, W.H., Kellermann, J. and Staudenbauer, W.L. 1999. Duplicated *Clostridium thermocellum* cellobiohydrolase gene encoding cellulosomal subunits S3 and S5. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51:852-859.

PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

TUDOMÁNYOS CIKKEK, KÖZLEMÉNYEK:

Kukolya, J., **Béki, E.**, Posta, K. és Hornok, L. 2001. Termofil sugárgombák szerepe mezőgazdasági hulladékok lebontásában. In: *Innováció, a Tudomány és a Gyakorlat Egysége az ezredforduló Agráriumban*. Szerk.: Jávor A, Szemán L. pp. 293-303. Liceum Art, Debrecen-Gödöllő

Béki, E., Nagy, I., Vanderleyden, J., Jäger, S., Kiss, L., Fülöp, L., Hornok, L. and Kukolya, J. 2003. Cloning and heterologous expression of a beta-D-mannosidase (EC 3.2.1.25)-encoding gene from *Thermobifida fusca* TM51. *Applied and Environmental Microbiology* 69(4):1944-52.

Posta, K., **Béki, E.**, Kukolya, J. and Hornok, L. 2004. Cloning, characterization and phylogenetic relationships of *cel5B*, a new endoglucanase encoding gene from *Thermobifida fusca*. *Journal of Basic Microbiology* (közlésre elfogadva)

A DOKTORI KÉPZÉS ALATT MÁS TÉMÁBAN MEGJELENT CIKKEK, KÖLEMÉNYEK:

Jeney, A., **Béki, E.**, Mulé, G. and Hornok, L. 2004. Identification of growth stage specific transcript profiles in *fusarium proliferatum* (*Gibberella fujicuroi*, mating population D) by cDNA-AFLP analysis. *European Journal of Plant Pathology* 110(5-6):619-625.

KONFERENCIA ELŐADÁSOK, POSZTEREK:

Kukolya, J., **Béki, E.** and Hornok, L. 2000. Cloning and heterologous expression of cell wall degrading enzyme encoding genes of *thermobifida fusca*. A *Magyar Mikrobiológiai Társaság 2000. évi nagygyűlése*, Keszthely

Béki, E., Kukolya, J. és Hornok, L. 2001. A *Thermobifida fusca* TM51 törzsből származó β -mannozidáz (EC3.2.1.25) gén klónozása és jellemzése. A *Magyar Mikrobiológiai Társaság 2001. évi jubileumi nagygyűlése*, Balatonfüred

Posta, K., **Béki, E.**, Hornok, L. és Kukolya, J. 2002. A *Thermomonospora fusca* új endoglukanázt kódoló génjének klónozása és jellemzése. A *Magyar Mikrobiológiai Társaság 2002. évi nagygyűlése*, Balatonfüred

Kukolya, J., **Béki, E.**, Mehta, P. and Hornok, L. 2003. Identification of *Thermobifida* species by cellulase-hemicellulase zymography. A *Magyar Mikrobiológiai Társaság 2003. évi nagygyűlése*, Balatonfüred