



***Aspergillus carbonarius*-ből izolált extracelluláris β -D-glükozidáz
működési mechanizmusának vizsgálata**

doktori (PhD) értekezés tézisei

Jäger Szilvia

Témavezető: Dr. Kiss László

**Investigation the mechanism of action of an extracellular
 β -D-glucosidase from *Aspergillus carbonarius***

theses of doctoral (PhD) dissertation

Szilvia Jäger

Supervisor: Dr. László Kiss

Debreceni Egyetem, TTK, Biokémiai Tanszék

University of Debrecen, Faculty of Sciences, Department of Biochemistry

Debrecen, 2003

1. BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉSEK

Az utóbbi évtizedekben egyre nagyobb mértékű érdeklődés mutatkozik a glikozid hidroláz enzimek iránt. Ez egyrészt a modern biotechnológiai eljárásokban a megújuló növényi biomassza hasznosításában betöltött szerepükkel indokolható, másrészt annak köszönhető, hogy ezek az enzimek az élő szervezetben rengeteg biológiai folyamatban központi jelentőséggel bírnak. Mozgósítják a tartalék energiaforrásként raktározott poliszacharidokat, részt vesznek a glikolipidek és glikoproteinek oligoszacharid oldalláncainak metabolizmusában, ami nagy jelentőségű a sejtek közötti jelátviteli folyamatokban illetve az extracelluláris fehérjék transzportjában. A humán gyógyászatban a glikozid hidrolázokat kódoló gének hibája felelős sok genetikusan öröklődő betegségért ill. a glikozid hidrolízis specifikus inhibitorai potenciális gyógyszerként szolgálhatnak, pl. diabétesz vagy vírusfertőzések esetén.

A glikozidáz enzimeknek a természetben betöltött szerepük mellett ipari felhasználásuk is jelentős. A cellulóz a legnagyobb mennyiségben előforduló, megújuló növényi biomasszából származó szénhidrát forrás, melyben hatalmas potenciális lehetőségek rejlenek; alapanyaga lehet az élelmiszer, üzemanyag ill. vegyiparoknak. Az alkalmazási területek közül a legfontosabb a bioetanol, mint környezetbarát üzemanyag vagy adalék alkalmazása, melynek használatával a modern kort fenyegető környezetvédelmi problémákat csökkenteni lehetne. A cellulóz biokonverziójának egyik ígéretes ága a cellulóz enzimatis hidrolízise glükózzá. Az eljárás kiinduló anyaga a hatalmas mennyiségben rendelkezésre álló, megújuló biomassza. Az enzimatis hidrolízis során celluláz enzimrendszert alkalmaznak, mellyel elkerüljük a melléktermék képződést és magasabb glükóz hozamot érnek el, mint a hagyományos savas hidrolízises eljárással. A cellulózból történő etanol előállítás sikere nagyrészt a lignocellulóz előkezelésén, nagyon hatékony celluláz enzimkomplex alkalmazásán és olyan mikroorganizmusokon múlik, amik hatékonyan fermentálják a glükózt etanollá. A celluláz enzimrendszerben a β -glükozidázok szerepe a köztitermék cellobióz lebontása, ami gátló hatású az enzimrendszer többi tagjára nézve. Ilyen módon a β -glükozidázok szerepe nem elhanyagolható a cellulóz enzimatis hidrolízisében. Számos példa mutatja, hogy *Aspergillus* eredetű β -glükozidázokat sikeresen alkalmaztak cellulóz hidrolízis során, növelve ezzel az enzimatis lebontás hatékonyságát.

Kiterjesztve az új enzimforrások kutatását, munkám során *A. carbonarius* által termelt β -D-glükozidáz enzimet vizsgáltam. Erről az enzimről az irodalomban még nincs információ, viszont potenciálisan használható biotechnológiai eljárásokban.

Céljaink a következők voltak:

- az *A. carbonarius* által termelt β -glükózidáz izolálása, a gomba enzimtermelésének összehasonlítása más, ismert *Aspergillus* fajok β -glükózidáz termelésével; emellett a β -glükózidáz biokémiai jellemzése és tulajdonságainak összehasonlítása más, ismert *Aspergillus* fajok β -glükózidázainak tulajdonságaival
- az enzim tiszta formában történő kinyerése
- a β -glükózidáz működési mechanizmusának vizsgálata, ezen belül a szubsztrát kötőhely tanulmányozása különböző inhibitorok alkalmazásával. Terveztük az aktív centrum felépítésében részt vevő és katalitikus szerepet játszó aminosav oldalláncok vizsgálatát kinetikai módszerekkel és specifikus kémiai módosító reagensekkel. Célul tűztük ki az N-brómacetil- β -D-glükopiranozilamin, mint aktív centrum specifikus inaktivátor molekula szintézisét és affinitás jelölőként való kipróbálását.

2. ALKALMAZOTT VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

Kísérleteimhez a három *Aspergillus* törzs (*A. carbonarius*, *A. niger* és *A. phoenicis*) által termelt β -glükózidáz enzimeket kétféle tenyésztési módszerrel nyertem; folyékony, glükóz C-forrást tartalmazó táptalajon illetve szilárd, búzakarpa C-forrást tartalmazó táptalajon tenyésztettem a törzseket. Az enzimek tisztítására az elválasztástechnika modern módszereit alkalmaztam, nevezetesen hidrofób kromatográfiát, méretkizárásos kromatográfiát és kromatofókuszálást. Az enzimpreparátumok tisztaságát SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel ellenőriztem. Az *A. carbonarius* β -glükózidáz moltömegének meghatározása SDS-PAGE és méretkizárásos kromatográfia segítségével történt.

Az enzimaktivásokat spektrofotometriás módszerrel határoztam meg. A kinetikai és inhibíciós kinetikai vizsgálatoknál a klasszikus enzimkinetikai módszereket alkalmaztam. A kinetikai paraméterek meghatározásánál a szükséges nem lineáris illesztéseket GraFit illesztő programmal végeztem. Ugyanezt a programot alkalmaztam a kinetikai paraméterek pH függés vizsgálatánál a disszociálható oldalláncok savi disszociációs állandóinak meghatározására a szabad enzim molekulában (pK_{E1} , pK_{E2}) és az enzim–szubsztrát komplexben (pK_{ES1} , pK_{ES2}) valamint a pH független kinetikai paraméterek meghatározására a diprotikus enzim modell alapján. Szintén nem lineáris illesztéssel határoztam meg az inaktivációs méréseknél a módosított csoportok pK értékeit.

A katalitikus aminosav oldalláncok típusának felderítését és az enzim katalitikus működésében betöltött szerepüket csoportspecifikus kémiai módosító reagensekkel vizsgáltam. A módosítási reakciókat inaktivációs kinetikai módszerekkel értékeltem ki, az adott esetre alkalmazható kinetika szerint. Kompetitív ligand alkalmazásával bizonyítottam a módosított csoportok aktív centrumbeli lokalizációját.

Az affinitás jelölési vizsgálatokhoz használt reaktív szubsztrát analóg molekula szintézisének a preparatív szerves kémia mikro és makro módszereivel dolgoztam. A preparátum tisztaságát vékonyréteg kromatográfiás módszerrel ellenőriztem, szerkezetbizonyítását NMR módszerrel hajtottam végre.

3. AZ ÉRTEKEZÉS ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEI

Kutatómunkám során fungális eredetű, *Aspergillus carbonarius*-ból izolált β -glükozidáz enzimet tanulmányoztam. Mivel erről az enzimről nincs információ az irodalomban, a dolgozat fő részét képező működési mechanizmus vizsgálatok mellett fontos volt a β -glükozidáz tisztítása, kinetikai és biokémiai jellemzése.

3.1. Az *A. carbonarius* β -glükozidáz termelésének összehasonlítása különböző *Aspergillus* törzsek β -glükozidáz termelésével

Az enzimforrásként választott, s az irodalomban kevésbé ismert *A. carbonarius* β -glükozidáz termelését két másik ismert *Aspergillus* faj, az *A. niger* és *A. phoenicis* β -glükozidáz termelésével hasonlítottam össze. Mindhárom törzs extracelluláris β -glükozidázt termelt. A kísérletek során kétféle táptalajon tenyésztettem a három különböző törzset; szilárd fázisú búzakorpa C-forrást, és folyékony, glükóz C-forrást tartalmazó táptalajt alkalmaztam. Az enzim termelés a maximumot a folyékony táptalaj esetén a 9. napon, a szilárd táptalaj esetén a 10. napon érte el. A folyékony fázisú fermentáció esetén a β -glükozidáz termelés csak a glükóz teljes felhasználása után indult meg, ez a katabolit represszió jelensége. Mindkét esetben folyamatosan nőtt a β -glükozidáz mennyisége a fermentáció során az utolsó napig. Glükóz C-forráson az *A. phoenicis* bizonyult a legjobb β -glükozidáz termelőnek, a legmagasabb enzim aktivitás, hozam és produktivitás értékekkel, míg a legjobb specifikus aktivitás értéket az *A. niger* mutatta. Búzakorpa C-forráson az *A. niger* volt a legjobb enzimtermelő.

3.2. Az *A. carbonarius* β -glükózidázának tisztítása és biokémiai tulajdonságainak összehasonlítása különböző *Aspergillus* törzsek β -glükózidázaival

A β -glükózidázok tiszta formában való kinyerésére három lépéses tisztítási eljárást dolgoztam ki, mely hidrofób kromatográfiából, méretkizárásos kromatográfiából és kromatofókuszálásból állt. Az *A. carbonarius* β -glükózidáz esetén a tisztítási folyamat végén az enzim 102-szeresére tisztult és 60 %-s hozammal kaptam vissza. Az enzimoldat tisztaságát SDS-PAGE-1 igazoltam. A β -glükózidázokat tisztításuk során a táptalajban levő poliszacharidokon és színanyagokon kívül szennyező fehérjéktől is el kellett választani. Ezek közül kihívást jelentett a gomba által termelt különböző hidroláz enzimek, a β -D-galaktozidáz, β -D-xilozidáz és α -L-arabinozidáz elválasztása.

Mindhárom törzs által termelt enzimről megállapítottam, hogy csak β -glükózidáz aktivitással rendelkezik, azaz szűk szubsztrát specificitású. Meghatároztam az enzimek izoelektromos pontját kromatofókuszálással. Az *A. carbonarius* által termelt β -glükózidáz savas jellegű fehérje, mivel izoelektromos pontja pH 4.2. Vizsgáltam a pH és a hőmérséklet hatását az enzim működésre és stabilitásra *pNP-Glc* és cellobióz szubsztrátokkal. Az *A. carbonarius* β -glükózidázának hőmérséklet optimuma mindkét szubsztráttal 60 °C volt és két óra inkubálás után 50 °C-ig őrizte meg stabilitását. pH optimuma *pNP-Glc* szubsztráttal pH 5.0, cellobióz szubsztráttal pH 4.0-4.5 volt és pH 4.0-8.0 tartományban bizonyult stabilnak. Az *A. niger*-ből és *A. phoenicis*-ből izolált β -glükózidázok hasonló tulajdonságokkal rendelkeztek illetve nem volt különbség a kétféle táptalajon termelt enzimek között sem.

Meghatároztam az enzimek jellemző kinetikai paramétereit *pNP-Glc* és cellobióz szubsztrátokkal. A paraméterek az *A. carbonarius* β -glükózidáza esetén a következők voltak, *pNP-Glc* szubsztrátra: $K_m=0.67$ mM és $V_{max}=224$ mkatal/kg, cellobióz szubsztrátra: $K_m=3$ mM és $V_{max}=243$ mkatal/kg. Az *A. niger* és *A. phoenicis* által termelt β -glükózidázok a K_m értékekben nagy hasonlóságot mutattak az *A. carbonarius* enziméhez, a vizsgált három β -glükózidáz biokémiai tulajdonságai közel azonosak (2. táblázat). Cellobióz szubsztrát alkalmazásakor a K_m értékek 3.4–6.2-szer nagyobbak voltak, mint a *pNP-Glc* szubsztrát esetén, a V_{max}/K_m adatok pedig 24-65 %-ai voltak a *pNP-Glc* szubsztrátra mért értékeknek. A két szubsztrát esetén tehát jelentős eltérést mutattak az enzimek mind affinitásban, mind hatékonyságban; a *pNP-Glc* felé nagyobb affinitással rendelkeztek és hatékonyabban is hidrolizálták. Ez azt jelzi, hogy a *p*-nitro-fenol aglikon sokkal jobb távozó csoport. Az *A. carbonarius* β -glükózidáz esetén SDS-PAGE alkalmazásával megállapítottam, hogy az enzim mőtömege 108 kDa.

2. táblázat. A különböző *Aspergillus* törzsek által termelt β -glükozidázok *p*NP-Glc és cellobióz szubsztrátra vonatkozó kinetikai paramétereit*

Törzs	<i>p</i> NP-Glc			cellobióz		
	K_m (mM)	V_{max} (mkatal/kg)	V_{max}/K_m (kat/kg·M)	K_m (mM)	V_{max} (mkatal/kg)	V_{max}/K_m (kat/kg·M)
<i>A. carbonarius</i>	0.67	224	335	2.99	243	81
<i>A. niger</i>	0.48	372	775	2.97	595	200
<i>A. phoenicis</i>	0.58	267	461	2.0	404	202

*Az értékek a búzakorpa C-forráson előállított enzimekre vonatkoznak.

3.3. Az *A. carbonarius* által termelt β -glükozidáz működési mechanizmusának vizsgálata

3.3.1. A szubsztrátkötő hely vizsgálata

Az általam vizsgált *A. carbonarius* β -glükozidáz szűk szubsztrát specifikus enzim, azaz csak β -glükozidos kötést hidrolizál. Ez a tény arra utal, hogy a szubsztrát piranozid gyűrűjén található hidroxil csoportok térállása abszolút, bármilyen eltérés valószínűleg eszenciális hidrogén kötések kialakulását gátolja meg.

A szubsztrátkötő hely felderítését inhibíciós kinetikai vizsgálatokkal végeztem. A szubsztrát glikon részével való kölcsönhatásról adnak felvilágosítást a glükózzal és a glükonsav(1-5)laktonnal végzett inhibíciós kísérletek. A glükóz jó gátló hatása arra utal, hogy ellentétben a tanszéken korábban vizsgált β -glükozidázokkal, az aktív centrumnak a cukorrészlet kialakuló kölcsönhatása ugyanolyan fontos, mint a hidrofób aglikonnal létrejövő kölcsönhatás. Az aldonsav-laktonok a glikozidázok nagyon specifikus, átmeneti állapot analóg inhibitorai. A glükonsav(1-5)lakton igen jó gátló hatása bizonyíték arra nézve, hogy az átmeneti állapotban a szubsztrát félszék konformációt vesz fel. Az 1-tio-glükozid típusú inhibitorok alkalmazása rámutatott, hogy az aglikon kötőhely hidrofób jellegű, hiszen a hidrofil aglikon csoportot tartalmazó inhibitor esetén gyengébb kötődés jött létre.

3.3.2. A kinetikai paraméterek pH függésének vizsgálata

A kinetikai paraméterek pH függés vizsgálatának eredményei szerint az enzim működése összhangban van a diprotikus enzim modellel, azaz a szubsztrát hidrolízisében két ionizálható aminosav oldallánc vesz részt, melyek közül az egyiknek deprotonálnak, a másiknak protonálnak kell lennie a hatékony működés érdekében. Ezen vizsgálat jelentősége, hogy segítségével következtetni lehet az enzim működésében, azaz az enzim-szubsztrát

komplex kialakulásában és a szubsztrát hidrolízisében részt vevő, ionizálható katalitikus csoportok jellegére. A V_{\max} pH függése felvilágosítást ad a szubsztrát hidrolízisében részt vevő aminosav oldalláncokról, a V_{\max}/K_m pH függése az enzim hatékonyságára, a szubsztrát megkötésére utal. Vizsgálataim során a *p*NP-Glc-re vonatkozó kinetikai paraméterek pH függését tanulmányoztam. A V_{\max}/K_m pH függésének vizsgálatakor az aminosav oldalláncok disszociációs állandóira kapott értékek $pK_{E1}=2.8$ illetve $pK_{E2}=5.93$ voltak. Ezek az értékek arra engednek következtetni, hogy egy ionizált karboxilát csoport mellett egy protonált karboxil csoport vesz részt az ES komplex kialakításában. Az említett ionizált karboxilát igen alacsony pK értéke ($pK_{E1}=2.8$) szerint ez egy erősen savas jellegű csoport. A V_{\max} pH függésének vizsgálata szerint a katalízisben részt vevő oldalláncok pK értékei: $pK_{ES1}=2.24$ és $pK_{ES2}=6.14$. Ezek a csoportok hasonlóak a V_{\max}/K_m pH függésénél megállapított csoportokhoz. Ezeknek az oldalláncoknak a savassága a szubsztrát kötődése révén úgy változik, hogy a disszociált csoport még disszociáltabb lesz a protonált oldallánc pedig gyengébben savassá válik, ami a katalízis szempontjából kedvező.

3.3.3. Karboxil oldalláncok kémiai módosítása

A fenti eredményekből kiindulva konkrétan meg kívántam vizsgálni a karboxil csoportok lehetséges szerepét az enzim működésében. Megállapítottam, hogy az *A. carbonarius* β -glükózidáza valóban tartalmaz olyan karboxil csoportokat, melyek eszenciálisak az enzim működése szempontjából, s ezek Asp vagy Glu aminosavak karboxil oldalláncai. Ezek közül legalább az egyik az enzim aktív centrumában található és szerepe a szubsztrát hasításában van.

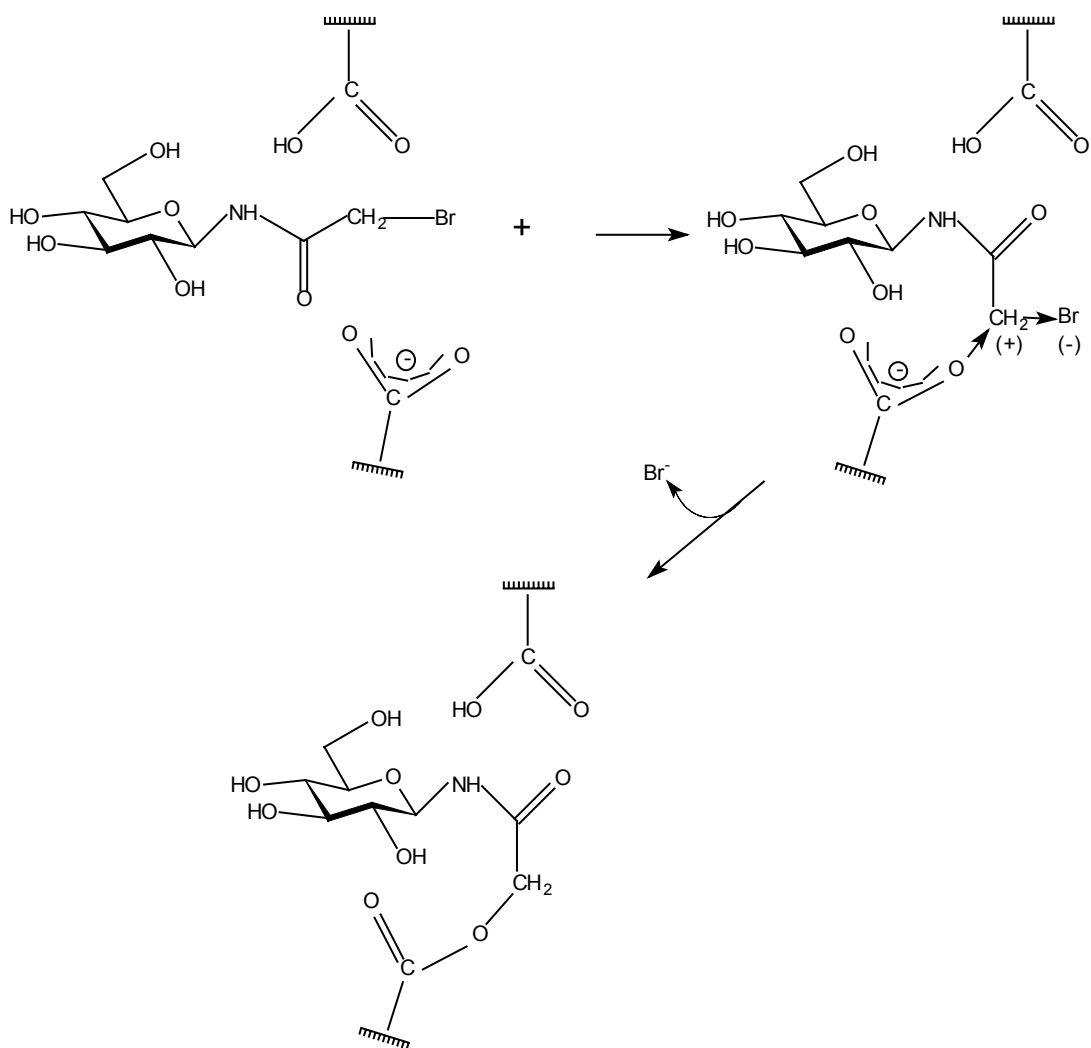
A vizsgálatok során két, karboxil csoportra specifikus reagenssel (vízoldható karbodiimid –1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid, EDAC– glicin-metil-észter jelenlétében és Woodward reagens K) végeztem kémiai módosítási reakciókat. Mindkét reagens inaktíválta az enzimet és a reakciók kinetikájának analízise azt mutatta, hogy a karbodiimid kétfázisú kinetika szerint, a WRK pszeudo–elsőrendű kinetika szerint inaktíválta a β -glükózidázt. A különbség oka, hogy az inaktíválás mechanizmusa eltérő a két reagens esetén. A WRK a szubsztráttal való nagyobb szerkezeti hasonlóságánál és hidrofób jellegénél fogva specifikus az aktív centrum karboxil csoportjaira. Ezzel szemben az EDAC esetén a valódi módosító reagens az EDAC által aktivált glicin-metil-észter, ami minden hozzáférhető karboxil csoportot módosít, így kevésbé specifikus. A vizsgálatok eredményéből arra lehet következtetni, hogy az *A. carbonarius* β -glükózidáza valóban tartalmaz olyan karboxil oldalláncokat melyek eszenciálisak az enzim működése szempontjából. Továbbá mindkét

esetben elvégeztem az inaktiválást egy kompetitív inhibitor jelenlétében is. Az inhibitornak az inaktiválásra kifejtett védőhatásával bizonyítottam a módosított csoportok aktív centrumbeli lokalizációját. A karbodiimides inaktiválás pH függéséből meghatározott savi disszociációs állandó $pK_A=4.61$, ami arra utal, hogy a módosított csoport egy Glu vagy egy Asp karboxil oldallánca. Figyelembe véve, hogy az inaktiválás a legnagyobb sebességgel az enzim pH optimuma környékén ment végbe (pH 4.5-5.5), és ezen a pH-n a nukleofil deprotonált, a protonáló aminosav oldallánc pedig protonált, feltételezhető, hogy az inaktivátor a katalitikus nukleofilt módosította. A módosított csoport szubsztrát hasításban betöltött szerepének igazolására vizsgáltam az inaktiválásnak az enzim kinetikai paramétereire gyakorolt hatását. Eredményeim szerint a blokkolt karboxil csoportnak a szubsztrát hasításában van szerepe, hiszen a WRK-val történő módosítás hatására a V_{max} értéke csökkent, míg a K_m gyakorlatilag változatlan maradt.

3.3.4. Az aktív centrumban található karboxil oldallánccok affinitás jelölése

A specifikus kémiai reagensekkel történő módosítások eredményeit tovább vizsgálva az aktív centrumban található karboxil csoport affinitás jelölését kívántam megvalósítani egy reaktív szubsztrát analóg molekulával, az *N*-brómacetil- β -D-glükopiranozil-aminnal, melynek affinitás jelölő tulajdonságát más β -glikozidázok esetén bizonyították. Az NBAGA-t szintetikus úton állítottam elő, az előállítás két lépésből állt. Az első lépésben brómecetsav-anhidridet szintetizáltam brómecetsavból és *N,N'*-diciklohexil-karbodiimidből, majd ezt követően a brómecetsav-anhidrid és β -D-glükopiranozil-amin reakciójával kaptam az NBAGA-t.

A szintetizált NBAGA alacsony koncentrációban hatékonyan inaktiválta az enzimet. Az inaktiválódás ebben az esetben is látszólagos elsőrendű kinetikával írható le. A módosítás aktív centrum specifikus (affin jelölő) jellegét kompetitív ligand segítségével bizonyítottam, melynek jelenlétében csökkent az inaktiválás sebessége. Az inaktiválás pH függése alapján nagyon valószínű, hogy a módosított karboxilát a katalitikus nukleofillel azonos. További bizonyíték, hogy a módosult oldallánca meghatározott pK_A érték ($pK_A=4.5$) összhangban volt a karbodiimid által módosított csoport pK_A értékével, ami megfelel a katalitikus nukleofil savi disszociációs állandójának. Ezek szerint a két reagens ugyanazt a karboxil csoportot módosította. Eredményeim egyeznek korábbi megfigyelésekkel, melyek szerint az inaktivátor a katalitikus nukleofilt módosítja. Ezek szerint az NBAGA-l történő inaktiválás feltételezett mechanizmusát mutatja be az 1. ábra.



1. ábra Az *A. carbonarius* β -glükózidáz *N*-brómacetil- β -D-glükopiranozil-aminnal történő inaktiválásának feltételezett mechanizmusa.

4. AZ EREDMÉNYEK HASZNOSÍTÁSÁNAK LEHETŐSÉGEI

Az *Aspergillus carbonarius* β -glükózidáza sokrétűen felhasználható a gyakorlatban:

A β -glükózidázok biotechnológiai alkalmazása igen jelentős, s így az *Aspergillus carbonarius* által termelt β -glükózidáz is felhasználható elsősorban biomassza lebontási folyamatokban ill. a cellulózból kiinduló glükózon át történő bioetanol gyártásban.

Az affin jelölési technika, melyet a β -glükózidáz működési mechanizmusának vizsgálatára alkalmaztunk, lehetőséget teremt a katalitikus aminosav azonosítására, pontmutációval történő cseréjére, s így a cellulóz hidrolízisének hatékonyabbá tételére. Emellett lehetőséget nyújt más β -glükózidázok esetén is a katalitikus csoportok azonosítására.

A katalitikus csoportok pontmutációs cseréjével lehetővé válik a enzim által katalizált reakció hidrolitikus aktivitásának megváltoztatása, azaz a transzferáz aktivitás megnövelése és a glükozil csoportnak más szénhidrát akceptorokra történő átvitele. Ez lehetővé teszi az így módosított enzimek komplex oligoszacharidok szintézisében történő felhasználását, amelyek a glikoproteinekben fontos szerepet töltenek be. Ezek kémiai szintézisének a védőcsoportok és regio- ill. kemoszelektív reagensek nehézkes alkalmazását helyettesítve az enzim specifitása alkalmazható.

5. PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A dolgozat témakörében megjelent közlemények:

1. **Jäger, Sz.**, Brumbauer, A., Fehér, E., Réczey, K. and Kiss, L.
Különböző *Aspergillus* fajok által termelt β -glükózidázok fermentációja és jellemzése.
Acta Biologica Debrecina **22** (2000), 135-139.
2. **Jäger, Sz.** and Kiss, L.
N-Bromoacetyl- β -D-glucopyranosylamine as affinity label for β -D-glucosidase from *Aspergillus carbonarius*.
Acta Biologica Debrecina **23** (2001) 1-3.
3. **Jäger, Sz.**, Brumbauer, A., Fehér, E., Réczey, K. and Kiss, L.
Production and characterization of β -glucosidases from different *Aspergillus* strains.
World Journal of Microbiology and Biotechnology **17** (2001), 455-461.
4. **Jäger, Sz.** and Kiss, L.
Investigation the active site of the extracellular β -D-glucosidase from *Aspergillus carbonarius*.
Archives of Biochemistry and Biophysics (2003) Közlés alatt.

Publikációk egyéb témákban:

5. Agócs, A., Herczegh, P., **Jäger, Sz.**, Kiss, L. and Batta, Gy.
Synthesis of 3-oxagranatane-type alkaloid analogs from carbohydrates.
Tetrahedron **57** (2001) 253-239.
6. Béki, E., Nagy, I., Vanderleyden, J., **Jäger, Sz.**, Kiss, L., Fülöp, L., Hornok, L. and Kukolya, J.
Cloning and heterologous expression of a β -D-mannosidase (EC 3.2.1.25) -encoding gene from *Thermobifida fusca* TM51.
Applied and Environmental Microbiology **69** (2003) 1944-1952.

A dolgozat témakörében bemutatott előadások és poszterek:

1. **Jäger, Sz.** és Kiss, L.
 β -Glükozidáz izolálása és tisztítása *Aspergillus carbonarius*-ból.
Magyar Poliszacharidkémiai Munkabizottsági Ülés, 1999, Budapest
2. **Jäger, Sz.** and Kiss, L.
Investigation of the mechanism of action of β -glucosidase enzymes.
International Student Conference of Vasile Goldis University, 1999, Arad, Románia
3. **Jäger, Sz.**, and Kiss, L.
Purification and characterization of extracellular β -glucosidase from *Aspergillus carbonarius*
Annual Meeting of the Committee of Carbohydrate Chemistry of the Hungarian Academy of Sciences, 1999, Mátrafüred
4. **Jäger, Sz.**, and Kiss, L.
Purification and characterization of extracellular β -glucosidase from *Aspergillus carbonarius*
26th Meeting of the Federation of European Biochemical Societies 1999, Nizza, Franciaország
5. **Jäger, Sz.**, and Kiss, L.
N-Bromoacetyl- β -D-glucopyranosylamine as affinity label for β -glucosidase from *Aspergillus carbonarius*.
Annual Meeting of the Committee of Carbohydrate Chemistry of the Hungarian Academy of Sciences, 2000, Mátrafüred

6. **Jäger, Sz.**, Brumbauer, A., Fehér, E., Réczey, K., és Kiss, L.

Különböző *Aspergillus* fajok által termelt β -glükózidáz enzimek fermentációja és jellemzése.

IX. Fermentációs kollokvium, MBKE Biotechnológiai Szakosztály és MTA Biomérnöki Munkabizottság, 2000, Debrecen

7. **Jäger, Sz.**, and Kiss, L.

N-Bromoacetyl- β -D-glucopyranosylamine as affinity label for β -glucosidase from *Aspergillus carbonarius*.

27th Meeting of the Federation of European Biochemical Societies 2001, Lisszabon, Portugália

8. **Jäger, Sz.**, és Kiss, L.

Aspergillus carbonarius β -glükózidázának izolálása, tisztítása és működési mechanizmusának vizsgálata.

Magyar Poliszacharidkémiai Munkabizottság Ülés, 2001, Budapest

9. Béki, E., Kukolya, J., Posta, K., **Jäger, Sz.**, Kiss, L., Hornok, L.

A *Thermobifida fusca* TM51 törzsből származó β -mannozidáz (EC 3.2.1.25) gén klónozása és jellemzése.

Az 50 éves Magyar Mikrobiológiai Társaság 2001 évi Jubileumi Nagygyűlése, 2001, Balatonfüred

10. **Jäger, Sz.**, Kiss, L.

N-Bromoacetyl- β -D-glucopyranosylamine as affinity label for β -glucosidase from *Aspergillus carbonarius*

DE TTK Biológus Napok 2001, Debrecen

11. **Jäger, Sz.**, és Kiss, L.

Aspergillus carbonarius extracelluláris β -glükózidáz aktív centrumának vizsgálata.

Debreceni Tudományos Napok, a Biológiai Tanszékcsoport Napja, 2002, Debrecen