

SZAKDOLGOZAT

Sebők Dóra

2024



**Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Budai Campus
Élelmiszertudományi és Technológiai intézet
Biomérnök alapképzési szak**

***Yarrowia* törzsek lipáz termelésének léptéknövelése és
részleges tisztítása**

Belső konzulens: Sipiczki Gizella
egyetemi tanársegéd

Dr. Bujna Erika
egyetemi docens

Belső konzulens intézete/tanszéke:
MATE, Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet,
Biomérnök és Erjedésipari Technológia Tanszék

Készítette: Sebők Dóra

Budapest

2024

TARTALOMJEGYZÉK

1. Bevezetés és célkitűzések	3
2. Szakirodalmi áttekintés	5
2.1 Élesztőgombák	5
2.2 <i>Yarrowia</i> nemzetség	6
2.2.1 <i>Yarrowia lipolytica</i>	7
2.2.2 <i>Yarrowia yakushimensis</i>	9
2.3 Lipáz enzim	10
2.4 Mikrobiális lipáz enzim tisztítása	14
Kromatográfia	15
3. Anyagok és módszerek	17
3.1 Anyagok	17
3.1.1 Felhasznált mikroorganizmusok	17
3.1.2 Alkalmazott tápközegek	17
3.1.3 Enzimaktivitás méréshez használt oldatok	18
3.1.4 Kicsapás során felhasznált anyagok	19
3.2 Felhasznált eszközök	20
3.3 Módszerek	20
3.3.1 Enzim fermentáció	20
3.3.2 Optikai denzitás mérése	20
3.3.3 pH mérés	21
3.3.4 Extracelluláris lipázaktivitás meghatározása	21
3.3.5 Szerves oldószeres kicsapás	22
3.3.6 Ammónium szulfátos kicsapás	22
3.3.7 Anyagmérleg	22
4. Eredmények és értékelésük	23
4.1 Ráztatott lombikos fermentáció	23
4.2 Léptéknövelés	25
4.3 Szerves oldószeres kicsapás	27
4.3.1. Lipáz aktivitás alakulása <i>Yarrowia yakushimensis</i> esetén	27
4.3.2. Lipáz aktivitás alakulása <i>Yarrowia lipolytica</i> esetén	29
4.4 Ammónium-szulfátos kicsapás	30

4.4.1.Lipáz aktivitás alakulása <i>Yarrowia yakushimensis</i> esetén	30
4.4.2. Lipáz aktivitás alakulása <i>Yarrowia lipolytica</i> esetén	31
5. Következtetések és javaslatok	33
6. Összefoglalás	35
7. Hivatkozások	37

1. Bevezetés és célkitűzések

Az élesztőket számos ipari folyamatban hasznosítják, többek között alkohol tartalmú italok, valamint biomassza és különféle anyagszere termékek szintetizálására. Az utóbbi kategóriába tartoznak a különböző enzimek, pigmentek, cukoralkoholok, aromavegyületek, szerves savak és az etanol is. A *Yarrowia* nemzetség különleges biológiai és metabolikus tulajdonságai révén rendkívül hasznos az ipari fermentációkban, enzimátikus folyamatokban és a környezeti szennyezők csökkentésében. A folyamatosan növvő élelmiszer- és agráripari szektorok miatt a fenntartható ipari gyakorlatok iránti igény egyre nagyobb, és az új, hatékonyabb, környezetkímélő biotechnológiai megoldások keresése folyamatos. A *Yarrowia* fajok közül a *Yarrowia lipolytica* már széleskörűen alkalmazott az élelmiszeriparban és a gyógyszeriparban egyaránt. A *Yarrowia yakushimensis* a klád egyik legfrissebb tagja, így még kevésbé ismert és tanulmányozott ezáltal az ipari alkalmazhatósága vitatott.

A lipáz enzimek a szerin-hidrolázok csoportjába tartoznak, amelyek a különböző zsírokat, valamint olajokat hidrolizálják, s a hidrolízisük során az észterköteket bontják. A természetben mindenütt megtalálhatóak, számos növény, állat és mikroorganizmus képes szintetizálni őket. A lipáz enzimek a növények tekintetében különösen a magok csírázásában, továbbá magának a gyümölcsnek az érési folyamatában hasznosulnak. Emberi és állati szervezetekben az emésztőrendszerben termelődnek, a nyálban, a gyomorban és a hasnyálmirigyben. Az ipar leginkább mikrobiális lipázokat alkalmaz, mivel az adott mikroorganizmusok könnyen tenyésztethetők és használhatók. A lipáz a gombák, valamint a baktériumok esetében gyakran extracelluláris formában van jelen, de sejtfalkötött vagy intracelluláris előfordulása is lehetséges. Az extracelluláris térbe juttatott enzim feladata az, hogy a lipid szubsztrátot lebontsa olyan kisebb molekulákká, amelyeket a sejt már hasznosításra alkalmas módon fel tud venni a környezetéből.

A *Y. lipolytica* élesztőgombával kapcsolatos kutatások az elmúlt években e faj sokoldalú felhasználását támasztották alá, ezért meggyőződésem, hogy a nemzetség további eddig kevésbé ismert fajtái is hasznosak lehetnek az ipar számára.

A munkám során a *Yarrowia lipolytica* és a *Yarrowia yakushimensis* élesztőtörzsek lipáz termelésének tanulmányozása mellett az extracelluláris enzim kicsapásának optimalizálását végeztem el, amely a biotechnológiai kutatások és ipari alkalmazások szempontjából jelentős. Dolgozatom célja a *Yarrowia lipolytica* és a *Yarrowia yakushimensis*

törzsek közötti különbségek feltárása, mind a lipáz termelés szempontjából, mind a termelési paraméterek, valamint a különböző kicsapási technikák tekintetében.

Ezen célok eléréséhez az alábbi részfeladatok megvalósítását terveztem:

- Rázatot lombikos és laboratóriumi méretű fermentor használatának összehasonlítása lipáz enzim fermentációjának a szempontjából, azonos paraméterek alkalmazása mellett.
- Lipáz enzim kicsapásának optimalása különböző szerves oldószerek, valamint ammónium-szulfát alkalmazása során.

Az alapvető kérdés az, hogy milyen feltételek mellett érhető el a legmagasabb enzimaktivitás a vizsgált *Yarrowia* törzseknél, és milyen különbségek figyelhetők meg az egyes törzsek viselkedésében a fermentáció során, valamint milyen vegyszert érdemes választani kicsapáshoz, munkám során ezen kérdésekre kerestem a választ.

2. Szakirodalmi áttekintés

2.1 Élesztőgombák

Az élesztőgombák eukarióta, általában egysejtű vagy dimorf szervezetek. Ivartalan úton elsősorban sarjadzással vagy hasadással szaporodó gombák, ivaros alakjuk, amennyiben ismert, nem termőtestben képződik. Az élesztőgombák a gombák ökoszisztémájának elterjedt tagjai, napjainkban körülbelül 1500 feljegyzett fajuk van. Nemzetségi besorolásuk nem egységes; élesztőgombákat fellelhetünk tömlősgombák, és bazídiumos gombák törzsében is (Kurtzman és munkatársai, 2011).

Az élesztők részt vesznek a komplex szerves anyagok lebontásában, biomassza előállításában, tápanyagok mineralizációjában, valamint a nitrogén- és kénkörforgásban. Elsődleges vagy másodlagos lebontóként funkcionálnak az ökoszisztémákban (Buzzini és munkatársai, 2017). Az élesztők különböző típusú ökológiai kölcsönhatásokat tartanak fenn más szervezetekkel (növényekkel, más gombákkal, állatokkal, algákkal stb.), többek között mutualisták, paraziták és kórokozók formájában is (Péter és munkatársai, 2017). Élesztők optimális hőmérséklete laboratóriumi közegben 20-30 °C közé esik, az optimális pH 4-6 között változhat, de ez függ a hőmérséklettől, az oxigéntartalomtól és az adott élesztő törzstől is (Walker, 1998).

Széles körben elterjedtek a Föld valamennyi bioformációjában. Élőhelyeik légköri, vízi és szárazföldi területekre oszthatók. Élesztőket kimutattak sós és édes vízből, erdei, mezőgazdasági és antropogén hatás miatt nehézfémekkel erősen szennyezett talajból is. Izolálták őket különböző termésekből, madarakból és emlősökből is (Segal-Kischinevsky és munkatársai, 2022). Az emberi szervezet természetes mikrobiomjának tagjai, fontos szerepük van a mikrobiom stabilitásában (Caetano és munkatársai, 2023).

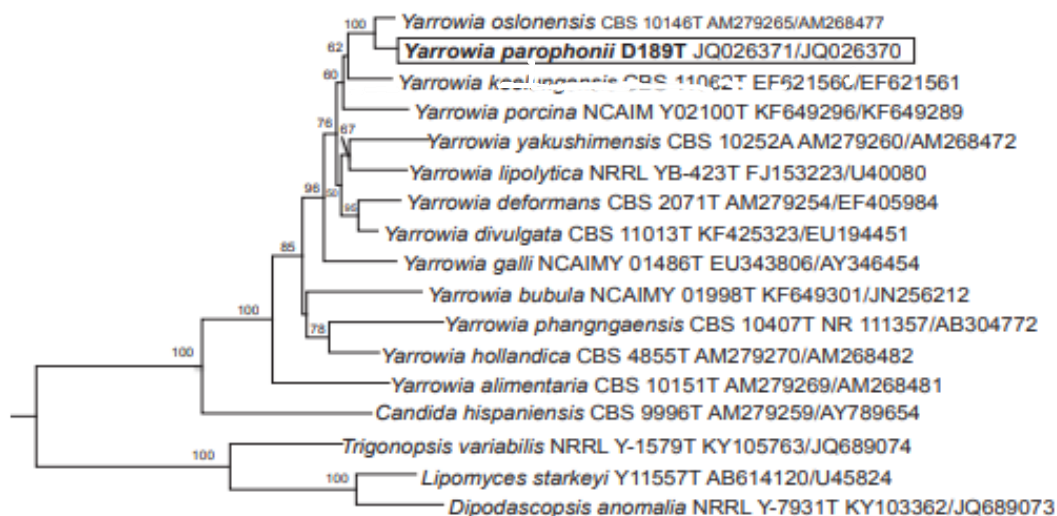
Az emberiség már jóval azelőtt felhasználta az élesztőgombákat, minthogy megértette volna működésüket. Már az ókorban is állítottak elő erjesztett italokat és élelmiszereket az élesztőgombák enzimatiszti potenciálját felhasználva, mely jelentős mértékben hozzájárult a társadalom fejlődéséhez és fenntarthatóságához (Legras és munkatársai, 2007). Régészeti bizonyítékok igazolják, hogy élesztők által erjesztett alkoholos italokat már időszámításunk előtt 8500-4000 között is előszeretettel fogyasztottak Kínában, Iránban és Egyiptomban, valamint a világ más területein is (Cavalieri és munkatársai 2003, McGovern, 2004).

Az élesztőkkel megvalósított hatékony erjesztési folyamatokhoz szükséges gyakorlati ismeretek generációról generációra szálltak, anélkül, hogy a folyamatokat irányító tudományos elveket részletesen ismerték volna. 1864-ben lejegyezték, hogy a *Saccharomyces cerevisiae*

előállít egy anyagot, mely sejtmentes médiumban képes a cukrokat alkohollá redukálni. Az anyagot ekkor még nem azonosították, de megállapították, hogy nitrogént tartalmaz és etanollal kicsapható (Straathof és Adlercreutz, 2000). Ez a kísérlet vezetett az enzimek megismeréséhez. Az első eukarióta szervezet, melynek teljes genomját szekvenálták a *Saccharomyces cerevisiae*. Goffeau és munkatársai (1996) felfedezése lehetőséget nyitott az eukarióta genom működésének és expresszálsának globális tanulmányozására, mely hatalmas lépést jelentett a biotechnológia számára.

2.2 *Yarrowia* nemzetség

A *Yarrowia* nemzetség, az *Ascomycota* törzsbe, a *Saccharomycetes* osztályba, *Saccharomycetales* rendbe, és a *Dipodascaceae* családba tartozik. A *Yarrowia* nemzetségről csupán egy évtizede úgy gondolták, hogy egyetlen mikroorganizmus alkotja. A közelmúltban marker-szekvenálási vizsgálatok eredményei egyértelművé tették, hogy nemcsak egy képviselője van, 13 új tagot soroltak a csoporthoz. A *Yarrowia* nemzetség a tudomány mai állása szerint négy ivaros fajból áll: *Y. lipolytica*, *Y. deformans*, *Y. porcina* és *Y. parophonii*, valamint számos aszexuális fajból, köztük a *Y. alimentaria*, *Y. galli*, *Y. hispaniensis*, *Y. hollandica*, *Y. oslonensis*, *Y. phangngensis*, *Y. bubula*, *Y. divulgata*, *Y. keelungensis* és *Y. yakushimensis* (Scoh, 2020, Crous és munkatársai, 2017). Az 1. ábrán látható a nemzetség törzsfája.



1. ábra: A *Yarrowia* nemzetség törzsfája
(Forrás: Crous és munkatársai nyomán, 2017)

Számos törzs közülük korábban a *Candida* nemzetséghez tartozott. A *Yarrowia* nemzetség fajaira jellemző a többoldalú sarjadzás, valamint az álhifák és valódi hifák képződése. A tagok számának növekedése a *Yarrowia* fajok ismert élőhelyeinek kiszélesedését is eredményezte. Számos környezeti mintából kimutatták őket: olajszennyezett talajban, tengervízben, illetve termeszek és lárvák bélrendszerében is (Nicaud, 2012). A klád legrészletesebben tanulmányozott tagja a *Yarrowia lipolytica*, melynek ipari jelentősége nagy lipid-akkumulációs képességében rejlik. A csoport gyors bővüléséből adódóan több élesztőfaj még nem jól jellemzett a sejtnövekedés és a lipidfelhalmozás szempontjából, melyek az ipari felhasználásban a legrelevánsabb tényezők (Ciurko és munkatársai, 2023). A *Y. lipolytica* széleskörű biotechnológiai alkalmazása, felveti annak kérdését, hogy a csoport további tagjai is eredményesen bevonhatók-e ipari folyamatokba.

2.2.1 *Yarrowia lipolytica*

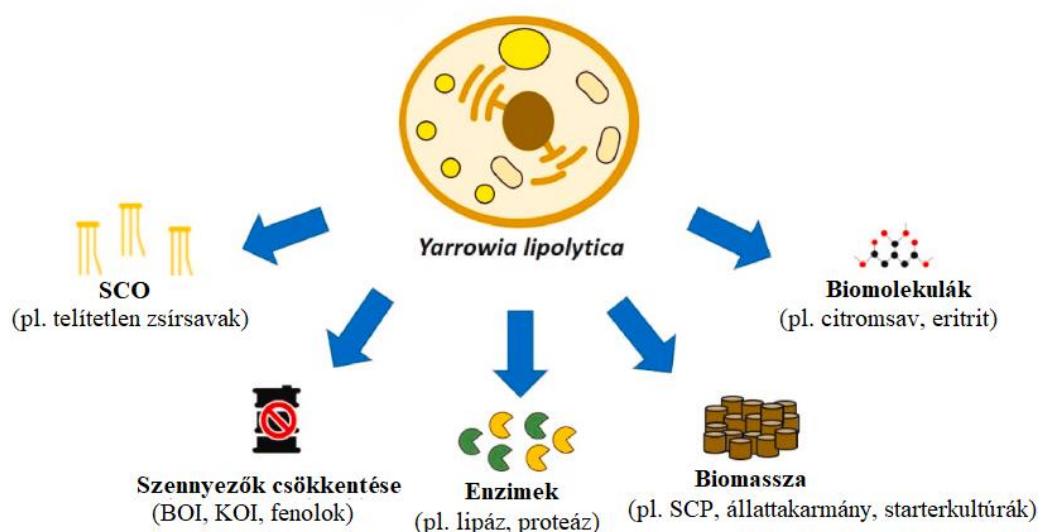
A *Y. lipolytica* teleomorf élesztő a *Yarrowia* nemzetség legrégebbi képviselője, sokáig úgy gondolták, egyedüli tagja a nemzetségnek. A fajt eredetileg a *Candida* nemzetségbe sorolták, mert ivaros úton történő szaporodása nem volt ismert. 1945-ben egy kukorica feldolgozó üzem rost nyeseadékot tartalmazó edényéből izolált kultúráról kiderült, hogy a mikroorganizmus megfelelő táptalajon történő inkubálása után aszkuszokat képez, melyek hifaelemekhez kapcsolódnak (Wolf és munkatársai, 1996). Wickerham és munkatársai (1970) felfedezése után a faj új neve *Endomycopsis lipolytica* lett, majd *Saccharomycopsis lipolytica*. Van der Walt és von Arx (1980) azt a megfigyelést tették, hogy a *S. lipolytica* *nom. inval.* egyedi, több szempontból is eltér a *Saccharomycopsis* többi fájától. Az aszkospóra alakja, mérete és felépítése egyedülálló volt a fajon belül, illetve koenzim Q-9 jelenlétét mutatták ki, míg a faj képviselői jellemzően a Q-6, Q-7, vagy Q-8 koenzim rendszert mutatták. Ezen különbségek végett Van der Walt és von Arx (1980) új nemzetséget vezetett be, melyet *Yarrowia* névre keresztelt, és megtették a *Y. lipolytica*-t típusfajának. A természetben gyakran izolálnak különböző *Y. lipolytica* törzseket, magas zsír-, vagy fehérjetartalmú élelmiszerekből. Ilyenek a fermentált tejtermékek, mint érlelt sajtok, de tejben, kefirben, és vajban is dokumentálták már a jelenlétét, illetve hőkezelt és nyers húsokban is észlelték. Környezeti mintákban is fellelhetők, főleg olaj szennyezés érintette területeken, és szennyvízből is kimutathatók (Groenewald és munkatársai, 2014).

A *Y. lipolytica* obligát aerob mikroorganizmus, növekedéséhez elengedhetetlen az oxigén jelenléte. A törzsek széles hőmérsékleti és pH tartományban tenyészthetők; szaporodásukat

megfigyelték 2 °C és 37 °C között, pH tűrési tartományuk pH 2,5 és 8 közé esik. Hőmérsékleti optimumuk 28-30 °C közé tehető, pH optimumuk 5,5 körüli, de ezt nagyban befolyásolhatja a felhasznált szubsztrátum (Jach és munkatársai, 2022).

***Yarrowia lipolytica* ipari alkalmazása**

A *Y. lipolytica* széleskörű ipari felhasználásának egyik oka a mikroorganizmus magas lipid-akkumulációs képessége. Száraz sejtömegének 40%-áig képes intracelluláris lipid felhalmozásra. Modell élesztőként szolgál a dimorfizmus, fehérje szekréció és peroxiszóma biogenezis tanulmányozása során (Beopoulos és munkatársai, 2011; Beopoulos és munkatársai, 2009). Hatékonyan bontják a hidrofób szubsztrátokat, például az n-alkánokat, zsírokat, zsírsavakat és olajokat. Szénforrásként ritkán használnak fel cukrokat, de képesek számos hexózt metabolizálni, mint glükózt, fruktózt, és mannózt (Fickers és munkatársai, 2005; Flores és munkatársai, 2000). Rodrigues és Pais (1997) kutatásai során megállapították, hogy a *Y. lipolytica* képes az ecetsav, tejsav, propionsav, almasav, borostyánkősav, citromsav és olajsav felhasználására, mint kizárólagos szén- és energiaforrás. A felhasznált szubsztrátum függvényében számos termék előállítására alkalmas, melyek csoportosítását a 2. ábra szemlélteti.



2. ábra: *Yarrowia lipolytica* által termelt agrár- és élelmiszeripari termékek, illetve hasznosításuk
(Forrás: Gottardi és munkatársai, 2021)

A *Y. lipolytica* egyik legelterjedtebb biotechnológiai alkalmazása az SCP (single cell protien), a mikrobiális biomassa előállítása. Ezen mikroorganizmus által termelt SCP fehérjetartalma magas, és gazdag esszenciális aminosavakban is, így környezetbarát fehérjeforrásként szolgál állati takarmányok számára (Patsios és munkatársai, 2020). A *Y. lipolytica* agráripari alkalmazása mellett, az élelmiszeripari felhasználása is számottevő. Képes eritrit szintézisére, melyet ízfokozó és édesítő hatása miatt élelmiszer-adalékként használnak. Előállítható velük citromsav, mely ízesítőszerként, savanyítószerként, antioxidánsként és tartósítószerként is alkalmazható. A citromsav, és a SCO előállításához szükséges paraméterek megegyeznek, így egyes törzsek képesek szimultán szintetizálni mindkét terméket (Grembecka, 2015; Fickers és munkatársai, 2020).

Olajos élesztőként a *Y. lipolytica* képes mikrobiális lipid vagyis SCO felhalmozására. Az SCO (single cell oil) zsírsavösszetételétől függően számos ipar számára hasznos vegyület. Felhasználható biodízel gyártásra, gyógyszerek alapanyagaként, vagy emberi és állati fogyasztásra szánt esszenciális zsírsavak forrásaként (Spalvins és Bumberga, 2019). A *Y. lipolytica*-t nemcsak értékes termékek előállítására használják, nem kívánt komponensek felszámolására is alkalmazható. Az agrár- és élelmiszeripari tevékenységek, magas szennyvízhozammal járnak, a keletkezett szennyvíz tisztításra szorul, mielőtt a szennyvízcsatornába kerülhet, ám ez költséges folyamat. A *Y. lipolytica* bevonható növényi olajok, állati zsírok vagy tejtermékek által szennyezett víz, tisztására. A szennyező komponensek szubsztrátként való felhasználásával 40-80% kémiai oxigénigény csökkenést is sikerült elérni (Wu és munkatársai 2009; Tarón és munkatársai, 2020).

2.2.2 *Yarrowia yakushimensis*

Benno (2004) kutatása során azonosított élesztők közé tartozott a (*Y.*) *Candida yakushimensis*. Nevét a Japánban található Yakushima-szigetről kapta, itt izolálták a fajt először, a *Hodotermopsis sjoestedti* természetű bélrendszeréből. A fajt később érvénytelenítették, mivel az eredeti publikációban csak a faj nevét közölték, megfelelő angol vagy latin leírás nélkül. Groenewald és Smith (2013) kutatásuk keretein belül megállapították, hogy a *Candida yakushimensis* nom. inval. szintén a *Yarrowia* kládba tartozik. Ők azonosították először a *Y. yakushimensis* aszexuális formáját. Az 1. táblázat bemutatja, hogy a *Y. yakushimensis*

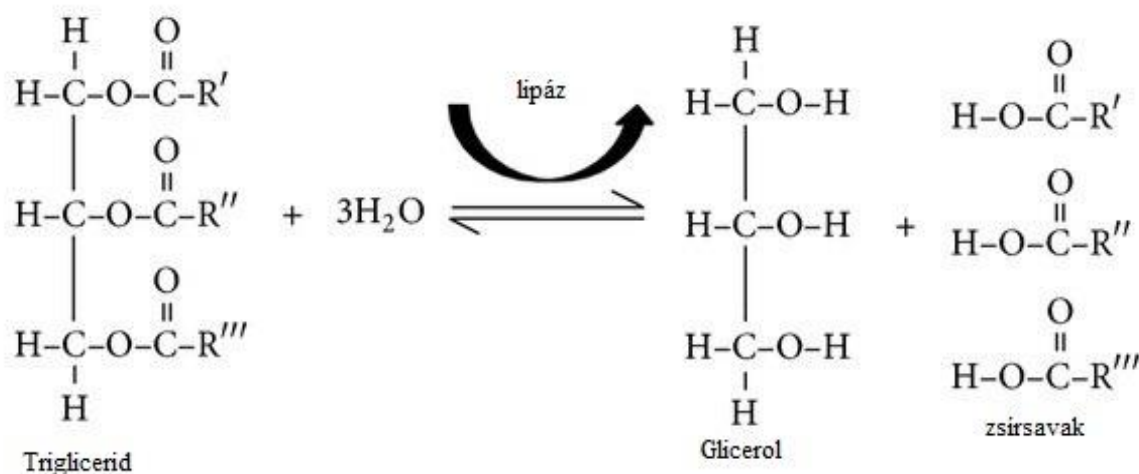
rokonfajaitól egyértelműen megkülönböztethető, a D-mannit asszimilációja és a növekedési hőmérséklet vizsgálata alapján.

1. táblázat: *Yarrowia yakushimensis* és egyéb *Yarrowia* törzsek növekedésének összehasonlítása, D-mannit szubsztráton, és 30 °C-os hőmérsékleten
(Forrás: Groenewald és Smith, 2013)

Név	D-mannit	Szaporodás 30 °C-on
<i>Y. yakushimensis</i>	+	-
<i>Y. alimentaria</i>	-	-
<i>Y. deformans</i>	+	+
<i>Y. galli</i>	+/- késleltetett szaporodás	+
<i>Y. hispaniensis</i>	+	+
<i>Y. hollandica</i>	gyenge szaporodás	+
<i>Y. lipolytica</i>	+	+
<i>Y. oslonensis</i>	-	+
<i>Y. phangngensis</i>	+	+

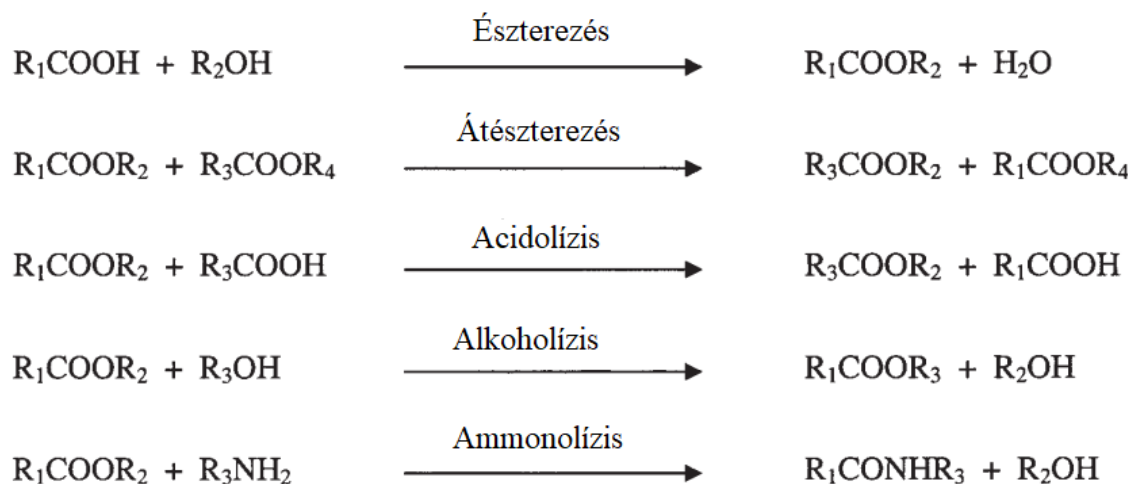
2.3 Lipáz enzim

Az enzim felfedezése a francia kutató Claude Bernard nevéhez fűződik, aki 1856-ban hasnyálmirigy váladékkal inkubált zsírokat, olajokat és vajat. Az inkubációs idő leteltével az elegyben zsírsav és glicerin jelent meg. Ő jegyezte le először, zsírok és olajok lebomlását egy akkor még ismeretlen anyag által (Singh és Mukhopadhyay, 2012). Napjainkban tudjuk, hogy a lipáz enzim (triacylglycerol-hidroláz; EC 3.1.1.3) a triglicerideket szabad zsírsavakra és glicerinnre bontja, a reakciót a 3. ábra mutatja be.



3. ábra: Lipáz katalizálta hidrolízis
(Forrás: Yew és munkatársai, 2016 nyomán)

A karboxil-kötések hidrolizálása mellett, a lipáz enzim felhasználható észterezési reakciók katalizálására is, melyeknek menetét a 4. ábra szemlélteti.



4. ábra: Lipáz által katalizált reakciók
(Forrás: Houde és munkatársai, 2004 nyomán)

A lipáz enzim állatok, növények, penész- és élesztőgombák, valamint baktériumok enzimmészletében is fellelhető a természetben (Singh és Mukhopadhyay, 2012). Az emlősökből származó lipázokat 3 csoportba sorolják: emésztőrendszerbe kiválasztott lipázok, szöveti lipázok, és a tejből izolálható lipázok. Számos szövetben és szervben azonosították: szívben, agyban, izomban, artériákban, vesében, májban, lépben és zsírszövetben (Wooley és munkatársai, 1994). A növényvilág egyik legjelentősebb lipáz termelője a *Ricinus communis*,

melynek lipolitikus aktivitását 1890-ben jegyezték le (Gandhi, 1997). Az első bakteriális lipázt 1901-ben azonosították *B. prodigiosus* és *B. fluorescens* vizsgálata során.

A mikrobiális lipázokra jellemző a katalitikus aktivitásuk sokfélesége, ami széleskörű ipari felhasználásra ad lehetőséget. A mikrobiális forrásból előállított enzim az állattartási előírások szigorodásával és az etikai fenntartások erősödésével kézenfekvő megoldást nyújtott az ipar növekvő igényére. Az ilyen módon előállított enzim esetén nem kell számolni a szezonális ingadozással, biztosított a rendszeres ellátás. Gyakran különböző génmanipulációs technikákat alkalmaznak, a termelő mikroorganizmusok növekedési rátájának és termékhozamának optimalizálására, ezzel még gazdaságosabbá téve a technológiát. Az így termelt lipáz enzimet, por formájában értékesítik, kihívást nem igénylő szállítása és könnyű felhasználhatósága miatt ez a kivitelezés a fogyasztók által is jobban preferált (Liu és Kokare, 2017; Poeta és munkatársai, 2018).

A következő táblázatokban különböző gombák (2. táblázat) és baktériumok (3. táblázat) által termelt lipázokat, és felhasználási területeiket foglaltam össze.

Mint azt a 2. és 3. táblázatok is szemléltetik, a mikrobiális lipázok alkalmazási területei szerte ágazóak: az élelmiszeriparon keresztül, a szépségiparon át, a könnyű ipar különböző szektoraiban, de még bioremedációs technológiákba is bevonható. Az élelmiszeriparban előszeretettel alkalmazzák tejtermékek minőségének javítására. A tejben található zsírsavakat bontja, ezzel rövidíti a lánchosszt. A reakció csökkenti a sajtok érési idejét, és elősegíti a jellegzetes ízjegyek kifejeződését (Law, 1999). Számos szépségipari termék összetevői között megtalálható, például különböző naptejekben és fürdőolajokban is, de a parfümipar számára egy felettebb fontos illatanyag-komponenst, a rózsaoxidot is mikrobiális úton állítják elő (Fiume és munkatársai, 2016).

2. táblázat: Penészgombák, élesztőgombák által termelt lipázok felhasználási területei
(Forrás: Chandra és munkatársai, 2020 nyomán)

Gombák	Alkalmazásuk
<i>Aspergillus flavus</i>	Polimerek, biodízel szintézise
<i>Aspergillus niger</i>	Gyorsabb sajttérlelés
<i>Aspergillus oryzae</i>	Telített zsírsavak szintézise, gyorsabb sajttérlelés
<i>Bacillus thermocatenulatus</i>	Orvosi ipar
<i>Candida antarctica</i>	Farmeranyagok kikészítése, szurokszabályozás a papír és cellulóz iparban
<i>Candida lipolytica</i>	Sajt érlelés, zsírsavtermelés
<i>Candida parapsilosis</i>	Élelmiszer adalékanyag
<i>Candida rugosa</i>	Élelmiszeripar, tápszerekben zsírpótló, aktív iszapkezelés, aerob hulladékkezelés
<i>Candida tropicalis</i>	Olaj szénhidrogének lebontása
<i>Fusarium solani</i> NFCCL 4084	Biodízel előállítás
<i>Geotrichum candidum</i>	Királis intermedierek előállítása, mely gyógyszeriparban többet között az Alzheimer-kór kezeléséhez elengedhetetlen
<i>Penicillium abeanum</i>	Tonhalolaj dúsítása
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Élelmiszeripari hulladékkezelés
<i>Penicillium roquefortii</i>	Kéksajt jellegzetes ízjegyinek előállítása
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> HFE733	KOI csökkentése szerves anyagok bontásával
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	Lúgos lipázok termelése, mosópor gyártás
<i>Pseudomonas plantarii</i>	Anionos mosószer
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Biodízel előállítás
<i>Rhizomucor miehei</i>	Biokatalizátor testápolási termékekben (naptej, fürdőolaj), kakaóvajpótlók
<i>Rhizopus arrhizus</i>	Ízfokozó észterek előállítása
<i>Rhizopus nodosus</i>	Bőrfeldolgozás, szőrtelenítés és zsírtalanítás
<i>Trichoderma lanuginosus</i>	Mosószer előállítás
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Nagyon hatékonyan bontja a hidrofób szubsztrátokat, és az olcsó szénforrásokat, mint n-alkánok

3. táblázat: Baktériumok által termelt lipázok felhasználási területei
(Forrás: Chandra és munkatársai, 2020 nyomán)

Baktériumok	Felhasználásuk
<i>Achromobacter sp. HEGN 014</i> <i>Virgibacillus pantothenicus HEGN 114</i>	Olajjal szennyezett víz kezelése
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	Detergensek
<i>Bacillus cereus</i>	Szennyvízkezelés
<i>Bacillus subtilis</i>	Sütőipar, kenyérgéztés
<i>Bacillus thermocatenulatus</i>	Orvosi ipar
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	Fokozott stabilitás metanolban
<i>Marinobacter lipolyticus</i>	Szerves oldószer toleráns lipáz
<i>Pseudomonas aeruginosa HFE733</i>	KOI csökkentése szerves anyagok bontásával
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	Lúgos lipázok termelése, mosópor gyártás
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Rovarölőszerek
<i>Pseudomonas mendocina</i>	Mosó- és mosogatószer ipar
<i>Pseudomonas plantarii</i>	Anionos mosószer
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Biodízel előállítás
<i>Staphylococcus pasteurii</i>	Olaj lebontás
<i>Staphylococcus warneri</i>	Ízesterek előállítása

2.4 Mikrobiális lipáz enzim tisztítása

A lipáz enzim termelődhet intra- és extracellulárisan, illetve kötődhet a sejtfalhoz is. Általánosságban, az extracelluláris lipáz enzim termelő mikroorganizmusokat alkalmazzák ipari folyamatokban. Az extracelluláris lipázt a fermentációt követően, ki kell nyerni a folyékony mátrixból. A biomasszát és az oldhatatlan részecskéket szűréssel vagy centrifugálással, elválasztják. A felülúszót ezután rendszerint kicsapják, majd többszörösen tisztítják, különböző bioszeparációs technológiákkal. Az enzimentisztítási folyamatok jelentős részének első lépéseként a fehérjét kicsapják az oldatból. Erre a célra legelterjedtebben alkalmazhatók a szerves oldószerek, valamint az ammónium-szulfát. A kromatográfiás tisztítást megelőző kicsapás nagyobb termékhozamot biztosít (Saxena és munkatársai, 2003).

Kromatográfia

A lipáz enzim tisztítására számos enzimmtisztítási módszer áll rendelkezésünkre. Egyetlen tisztítási lépéssel nem tudunk kellő tisztaságú lipáz enzimet előállítani, ezért több egymást követő tisztítási lépés szükséges. Jelenleg 3 fő kromatográfiás elválasztáson alapuló módszert alkalmaznak mikrobiális eredetű lipáz enzim tisztítására: ioncserés kromatográfia, hidrofób kölcsönhatás kromatográfia, és gélkromatográfia, vagyis géliszűrés (Saxena és munkatársai, 2003).

Ioncserés kromatográfia

Az ioncserés kromatográfia a molekulák felületi töltés különbségén alapszik. Ioncserés kromatográfia esetén két típust különböztetünk meg: kationcserélő, és anioncserélő. A leggyakrabban használt töltetek anioncserélő esetén dietil-aminoetil csoport (DEAE), kationcserélő esetén pedig, karboximetil (Tan és munkatársai, 2015). A kationcserélő kromatográfiában a negatív töltésű oszlop pozitív töltésű molekulákat köt magához, míg az anioncserélő oszlop pozitív töltésű ligandumai a negatív töltésű molekulákat kötik. A szeparálni kívánt komponens, egészen addig kötődik az oszlophoz amíg a puffer ion-erőssége nem semlegesíti felületi töltését, ezután leválik az oszlopról. Az eluciót pH és ionerősség változtatásával is elérhetjük. Ez az egyik leggyakrabban használt kromatográfiás módszer gyógyszeripari fehérjék és peptidek tisztítására (Grönberg, 2023). Massadeh és munkatársai 2012-es tanulmányukban *Bacillus stearothermophilus* által termelt lipáz enzim tisztítását végezték. A kutatócsoport 40%-os telítettségű ammónium-szulfátos kicsapást követően, DEAE-cellulóz ioncserélő kromatográfiát alkalmazott. A két tisztítási lépéssel 2,49%-os kitermelést értek el. Yu és munkatársai (2007) YILip2 gén által kódolt extracelluláris lipáz enzim tisztításának lehetőségeit vizsgálták, az általuk alkalmazott fehérjetisztítás első lépése során 100 ml fermentlevet ultraszűrőn vezettek át, majd Q Sepharose FF ioncserés oszlopkromatográfiát alkalmaztak, 72%-os kitermelést eredményezve.

Hidrofób kölcsönhatás kromatográfia

A hidrofób kölcsönhatású kromatográfia (HIC) olyan elválasztási technika, amelyben az oldott anyagokat semleges vagy enyhén hidrofób állófázisra adszorbeálják. Általában az oldott anyagok HIC állófázisokra adszorbeálódnak olyan eluensekben, amelyek sókat, például ammónium-szulfátot nagy koncentrációban tartalmaznak állnak, amelyek elősegítik az oldott

anyagok hidrofób felületeken történő adszorpcióját (Roettger, 1989). Az oldott anyagok a mobilfázisban lévő sókoncentráció csökkentésével deszorbeálódnak, és a felület hidrofobicitásának növekvő sorrendjében eluálódnak. Előszeretettel alkalmazzák lipáz enzim tisztítása során, hiszen az enzim aktív helyét körülvevő felület hidrofób tulajdonságú. Általánosságban elterjedt hidrofób abszorbensek butil, metil, oktil és a fenil funkciók csoportokat tartalmaznak (Yagmurov és munkatársai, 2017). Sharon és munkatársai (1998) kutatásukban *Pseudomonas aeruginosa* eredetű lipáz enzimtisztítását végezték. A kicsapást ammónium-szulfáttal végezték, a lépés 74%-os kitermelést eredményezett. A kisózott fehérjét ezután hidroxyapatit oszlopra vitték fel, ezzel 11-es tisztítási tényezőt értek el.

Gélszűrés

Gélszűrés esetén az elválasztás alapja nem kémiai kölcsönhatások, hanem fizikai tulajdonság, a méret. Az oszlop töltete egy finom szemcsés porózus, hidrofil gél, a mozgófázissal kitölti a gél pórusait. A nagyobb molekulák gyorsan átmosódnak az oszlopon, míg a kisebbek átjárják a pórusokat, lassan érnek az oszlop aljára. A visszatartás, azaz a retenció mértéke az oldott anyagmolekula méretétől függ a pórus méretéhez viszonyítva (Bélanger, 1997).

Az enzimtisztítás választott technológiája függ a kiválasztani kívánt anyag fizikai és kémiai tulajdonságaitól. Tan és munkatársai (2015) tanulmányukban *Y. lipolytica* esetén *YLip2* enzim tisztításához Q-Sepharose FF ioncserés kromatográfiát, majd butil-Sepharose FF hidrofób-kölcsönhatás kromatográfiát javasol. A technikák alkalmazása végett 26,5-es tisztulási faktort állapítottak meg valamint 23 % fehérje visszanyerést értek el.

3. Anyagok és módszerek

3.1 Anyagok

3.1.1 Felhasznált mikroorganizmusok

Kísérletem során két a *Yarrowia* nemzetségbe tartozó törzset vizsgáltam:

- *Yarrowia lipolytica* 854/4 törzs, darált sertéshúsból izolálva
- *Yarrowia yakushimensis* NCAIM Y.02052, *Hodotermopsis sjostedti* természetes bélrendszerből izolálva

A törzsek a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményéből (NCAIM) kerültek beszerzésre.

3.1.2 Alkalmazott tápközegek

Minden alkalmazott tápközeget autoklávban steriliztem, 121 °C-n 15 percig.

Élesztőkivonat-pepton-glükóz ferdeagar

A *Yarrowia* törzsek fenntartásához és felszaporítására YEPD ferdeagart alkalmaztam, melynek összetételét a 4. táblázat tartalmazza.

4. táblázat: YEPD ferdeagar

Komponens	Mennyiség
Glükóz	20 g
Pepton	10 g
Élesztőkivonat	5 g
Agar	25 g
Desztillált víz	1000 ml

Inokulum tápközeg

Az inokulum tápközeg összeállításához szükséges anyagokat az 5. táblázat mutatja be.

5. táblázat: Inokulum tápközeg

Komponens	Mennyiség
Glükóz	20 g
Pepton	20 g
Élesztőkivonat	10 g
Desztillált víz	1000 ml

Fermentációhoz felhasznált tápközeg

A lipáz fermentációhoz mind a fermentoros, mind a rázatott lombikos eljárás esetén YEPD táplevest alkalmaztam, melyhez kiegészítésként 1%-os koncentrációban olíva olajat és 0,5 g/l mennyiségben Tween 80 felületaktív anyagot adtam. A fermentációs tápközeg összetevőit a 6. táblázatban szemléltetem.

6. táblázat: Fermentációs tápleves

Komponens	Mennyiség
Glükóz	20 g
Pepton	6,4 g
Élesztőkivonat	10 g
Olívaolaj	10 ml
Tween 80	0,5 g
Desztillált víz	1000 ml

3.1.3 Enzimaktivitás méréshez használt oldatok

Sörensen puffer (pH = 7,2)

Az enzimaktivitás méréshez 7,2-es pH-jú puffert használtam. Elkészítéséhez m/15 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (11,876 g/l) és m/15 KH_2PO_4 (9,078 g/l) oldatokat mértem össze. 100 ml pH 7,2 pufferhez dinátrium-hidrogén-foszfát oldatból 72,6 ml és kálium-dihidrogén-foszfát oldatból 27,4 ml szükséges. Az összemérés után a pH-t ellenőriztem.

Szubsztrátum

25 mM-os para-nitrofenil-laurát szubsztrátumot alkalmaztam, melyet 96 %-os etanolban oldottam fel. A mérések során mindig frissen készítettem el a szubsztrátumot, figyelembe véve, hogy a szubsztrátum szobahőmérsékleten bomlékony.

Leállító reagens

Leállító reagensként 0,1 N-os Na_2CO_3 oldat szolgált. 500 ml reagens elkészítéséhez desztillált vízbe 2,65 g nátrium-karbonátot oldottam fel.

3.1.4 Kicsapás során felhasznált anyagok

McIlvaine puffer (pH = 6,5)

A puffert pH=6,5 értéken készítettem el 0,2 M dinátrium-hidrogén-foszfát (25,192 g/l) és 0,1 M citromsav (21,008g/l) oldatok megfelelő arányú összemérésével. 100 ml pufferhez dinátrium-hidrogén-foszfát oldatból 69,25 ml-t mértem, majd kiegészítettem a citromsavval.

Szerves oldószerek

A szerves oldószerek kicsapási hatékonyságának vizsgálata során öt különböző vegyületet használtam fel: etanolt, metanolt, acetont, n-propil alkoholt, n-butil alkoholt.

Ammónium-szulfát oldat

Munkám során ammónium-szulfáttal történő kisózást is végeztem, ehhez öt különböző koncentrációban mértem hozzá az ammónium-szulfátot a fermentléhez, ezt a 7. táblázatban foglaltam össze.

7. táblázat: Alkalmazott ammónium-szulfát koncentrációk

Telítettség	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
60%	361 g/l
70%	436 g/l
80%	516 g/l
90%	603 g/l
100%	697 g/l

3.2 Felhasznált eszközök

- Fermentor
- Rázógép
- Steril lamináris fülke
- Elektromos pH mérő
- Spektrofotométer
- Centrifuga
- Eppendorf centrifuga
- Vízfürdő
- Egyéb laboratóriumi eszközök: analitikai mérleg, pipetta, Erlenmeyer lombik, főzőpohár, vortex keverő, mágnes keverő, mérőhenger, Eppendorf cső, centrifuga cső, kémcső, küvetta stb.

3.3 Módszerek

3.3.1 Enzim fermentáció

A ferdeagaron frissen felszaporodott tenyészeteket az 5. táblázatban bemutatott inokulum tápközegekbe oltottam. A fermentációkat 24 órás inokulum tápközegből indítottam, melyeket 27 °C-n inkubáltam, 160 rpm rázatási sebesség mellett. Az optimális sejtkoncentráció meghatározásához Perez (2023) munkáját vettem alapul. Eredményei szerint a *Yarrowia* törzsek lipáz fermentációjához optimális kezdeti sejtkoncentráció $5 \cdot 10^6$ sejt/ml, ez alapján oltottam be a fermentációs tápközegeket. Kísérletem során Biostat B laboratóriumi fermentorban, és rázatott lombikban párhuzamosan futtattam a fermentációkat. A fermentor térfogata két liter, ám a megfelelő levegőztetés érdekében a fermentort 80%-ig töltöttem, 1600 millilitert használtam a 6. táblázatban bemutatott fermentációs táplevesből. A rázatott lombikos eljáráshoz 150 ml fermentációs táplevest alkalmaztam. A fermentációkat 160 rpm-es fordulatszámmal vezettem, 27 °C-on, 168 óráig.

3.3.2 Optikai denzitás mérése

Az optikai denzitás (OD) mérése képet ad a sejtek szaporodásáról. Optikai denzitás méréseire Helios α spektrofotométert használtam, a mintákat 600 nm-es hullámhosszú fénnel világítottam meg. Mérés előtt a készüléket desztillált vízzel nulláztam. Amennyiben a mért minta OD értéke meghaladta a 0,7-et, hígítást alkalmaztam.

3.3.3 pH mérés

A pH értékek megállapítására Mettler-Toledo típusú elektromos pH mérőt használtam, mely kombinált üvegelektróddal van felszerelve. Mérés előtt az eszközt pH 2 és pH 9 értékek között kalibráltam, kalibráló oldatokkal.

3.3.4 Extracelluláris lipázaktivitás meghatározása

A fermentlevekből 1-1 ml mintát mértem Eppendorf csövekbe, majd 10 percen át 4 °C-on 10.000 rpm-en centrifugáltam. A minta ekkor két frakcióra vált, az Eppendorf cső oldalára kiült szilárd fázis tartalmazza a sejteket, az extracelluláris enzim pedig a folyadék fázisú felülúszóban található. A felülúszót leöntöttem és a mintákat szükség szerint hígítottam, majd két párhuzamos aktivitás mérést végeztem. Az enzimaktivitás méréshez szükséges elegyek mennyisége a 8. táblázatban látható. A megfelelően hígított enzimoldat kivételével minden komponenst összemértem, majd 37 °C-os vízfürdőbe helyeztem. Az előmelegítést követően belemértem az enzimoldatot, ezzel párhuzamosan elindítottam egy stopperórát. 10 perces reakcióidő leteltével 250 µl Na₂CO₃ oldat hozzáadásával leállítottam az enzimreakciót.

8. táblázat: A lipáz aktivitás mérés reakcióelegyei

	Desztillált víz (µl)	Szubsztrátum (µl)	Enzimoldat (µl)	Puffer (µl)
Műszervak	125	—	—	725
Szubsztrátumvak	25	100	—	725
Enzimvak	100	—	25	725
Minta	—	100	25	725

A reakcióelegyeket Eppendorf-csövekbe öntöttem és a fent megadott paraméterek szerint újra centrifugáltam. Az újbóli centrifugálás a minta zavarosságát hivatott csökkenteni. A reakció során a para-nitrofenil-laurát szubsztrát enzimatis bontása során felszabadult p-nitrofenol abszorpciós maximuma 450 nm. Az enzimaktivitás meghatározásához ezen a hullámhosszon mértem a minták abszorbanciáját, a készüléket műszervakra nulláztam.

A lipáz aktivitás meghatározásához a következő egyenletet használtam:

$$\text{Lipáz aktivitás (U/ml)} = \frac{\text{Minta}_{Abs} - \text{Enzimvak}_{Abs} - \text{Szubsztrátumvak}_{Abs}}{\text{meredekség} * \text{reakció idő}} * \text{hígítás}$$

Egy egységnyi (U) lipáz az az enzimmennyiség, mely a para-nitrofenil-laurát szubsztrátumból 1 μmol p-nitrofenolt szabadít fel egy perc alatt a vizsgált reakció körülményei között.

A kalibrációs egyenes meredeksége: $y = 11,561x$

3.3.5 Szerves oldószeres kicsapás

A szerves oldószerrel történő kicsapás során hat különböző alkohol hatékonyságát vizsgáltam. A fermentlevet 10 percen át 4 °C-on 10.000 rpm-en centrifugáltam. A minta ekkor két frakcióra vált, az extracelluláris enzimet a felülúszóból nyertem ki. 10 ml felülúszóhoz az egyes kísérleti beállításoknak megfelelő szerves oldószert mértem (1:1 – 1:6 fermentlé:szerves oldószer arányig), majd 10 percre a hűtőszekrénybe helyeztem. A 10 percet követően a kicsapott fehérjét centrifugálással gyűjtöttem össze a korábbival megegyező paraméterek szerint. Ezt követően óvatosan leöntöttem a felülúszót, ügyelve, hogy a csapadék el ne váljon a centrifuga falától. A csapadékot ezután 2 ml McIlvaine (pH= 6,5) pufferben oldottam vissza. Az enzimaktivitást ezután a 3.3.4 fejezetben leírtak szerint mértem.

3.3.6 Ammónium szulfátos kicsapás

A fermentációt követően a fermentlevet 10 percen át 4 °C-on 10.000 rpm-en centrifugáltam. A felülúszó 10 ml-es mennyiségéhez hozzámértem, a 7. táblázatban leírt ammónium-szulfát mennyiségeket, majd egy éjszakára a hűtőszekrénybe helyeztem őket. Másnap a kicsapódott fehérjéket centrifugálással elválasztottam (10 perc, 4 °C, 10.000 rpm). A felülúszót elöntöttem, a csapadékot 2 ml McIlvaine pufferben oldottam vissza, majd meghatároztam az enzimaktivitást.

3.3.7 Anyagmérleg

Az anyagmérleg az enzimmtisztítási folyamatok hatékonyságáról ad átfogó képet, elengedhetetlen eleme a különböző tisztítási folyamatok összehasonlításának. Az anyagmérleg elkészítéséhez a következő számításokat végeztem el:

$$\text{Összaktivitás (U)} = \text{térfogat (ml)} * \text{aktivitás } \left(\frac{\text{U}}{\text{ml}}\right)$$

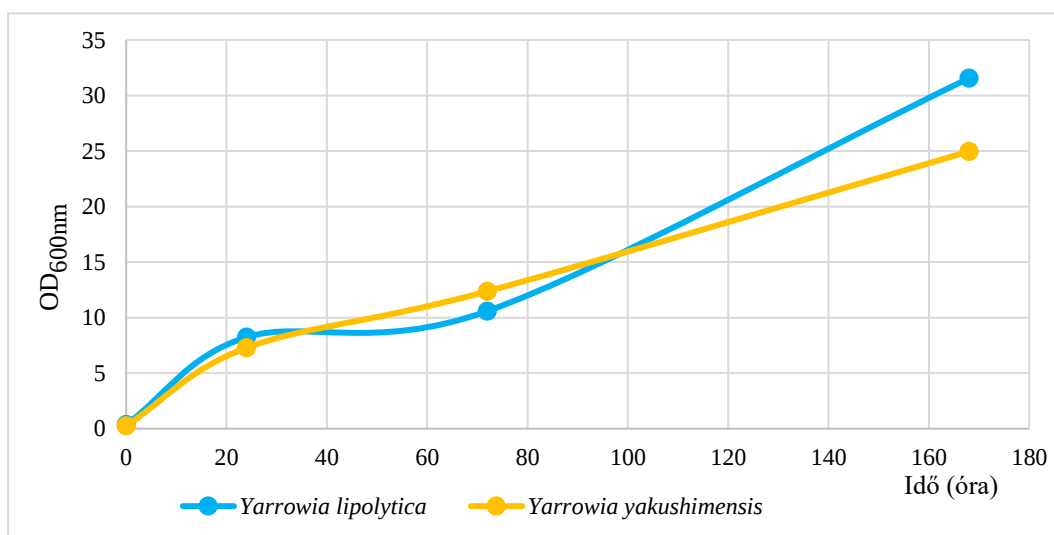
$$\text{Kitermelés (\%)} = \frac{\text{összaktivitás az adott lépésnél}}{\text{kiindulási összaktivitás}}$$

4. Eredmények és értékelésük

A *Y. lipolytica* és a *Y. yakushimensis* törzsek extracelluláris lipáz enzimének tisztításához, a legkedvezőbb fermentációs eljárást alkalmaztam Sipiczki és munkatársai (2024) által optimált tápközegekben és körülmények között az enzim előállításához. A folyamat során léptéknövelést is megvalósítottam, így laboratóriumi fermentort is alkalmaztam, és ezt hasonlítottam össze a rázatott lombikos fermentációval. Mindkét beállítás esetén olívaolaj s Tween 80 tartalmú YEPD tápleves volt a fermentációs közeg, illetve a fermentáció környezeti paraméterei is megegyeztek. A fermentációt 168. óráig futtattam, majd a meghatároztam az extracelluláris enzimaktivitást.

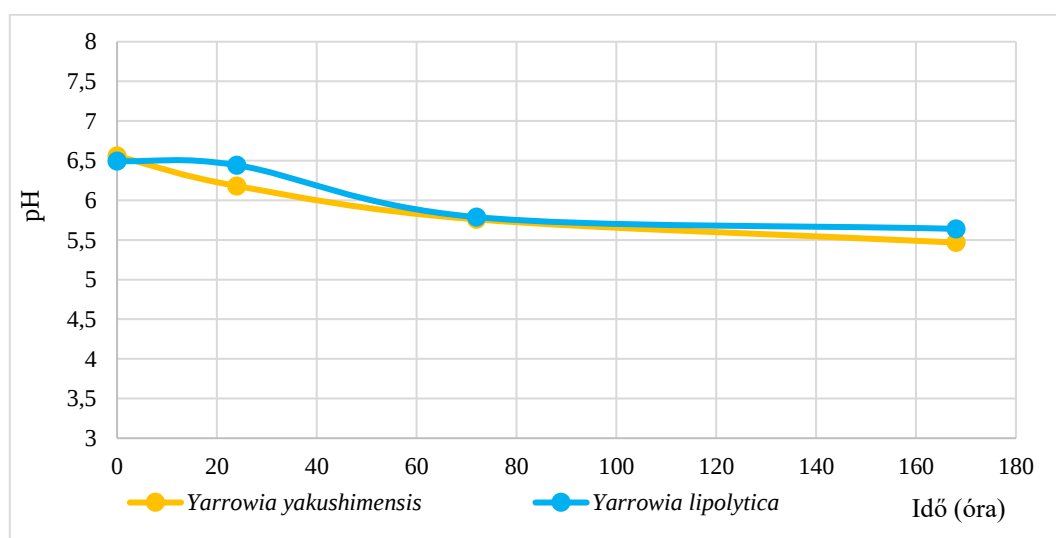
4.1 Rázott lombikos fermentáció

A rázott lombikos fermentáció során a tápleves térfogata 150 cm³ volt, a fermentáció 27 °C-on zajlott, 160 RPM-es rázatási sebességgel 168 óráig. A fermentációs tápleves beoltását követően megmértem a kezdeti OD és pH értékeket, majd mindkét törzs esetében vizsgáltam ezen jellemzők változását a fermentáció során, illetve a lipáz enzimaktivitás alakulását. A fermentáció nyomon követése érdekében mintavételezés történt a 24., 72., és 168. órában. Az optikai denzitás változását a fermentáció során, az 5. ábra mutatja be.



5. ábra: *Yarrowia lipolytica* és *Yarrowia yakushimensis* törzsek szaporodásának alakulása optikai denzitás alapján olívaolajjal és Tween 80-nal dúsított YEPD tápközegekben
(Forrás: saját munka)

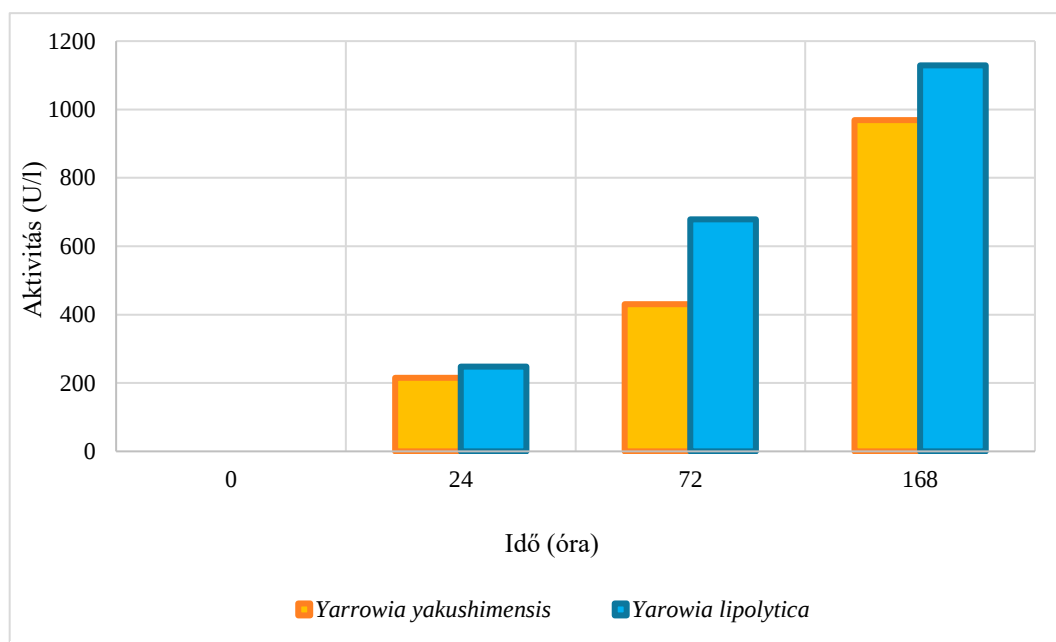
A beoltást követően mért OD értékek különbsége elhanyagolható volt a két törzs között. 24. és 72. óra között a *Y. yakushimensis* szaporodási sebessége nagyobb volt, mint a *Y. lipolytica*-nál tapasztalt, ugyanebben az időintervallumban. A *Y. yakushimensis* törzsről elmondható, hogy a fermentáció során végig egyenletes volt a szaporodási sebessége. A fermentáció végén, a 168.óránban mértem a legnagyobb OD értékeket, ami a *Y. lipolytica* esetén 31,59, a *Y. yakushimensis* esetén 24,96. A *Y. lipolytica* szaporodásának kedvezőbbek voltak a fermentációs körülmények. A szaporodás nyomon követése mellett a pH alakulását is megfigyeltem. A 6. ábrán láthatók a fermentáció során mért pH értékek.



6. ábra: pH alakulása *Yarrowia lipolytica* és *Yarrowia yakushimensis* törzsek fermentációja során alapján olívaolajjal és Tween 80-nal dúsított YEPD tápközegben (Forrás: saját munka)

A beoltást követően a két törzs pH-ja közel megegyezett, *Y. lipolytica* esetén a kezdeti pH 6,49, *Y. yakushimensis*-nél pH 6,55. A *Y. lipolytica* esetén a 24. órában a pH változás elhanyagolható. A *Y. yakushimensis* esetén a tápközeg pH-ja nagyobb mértékben változott, pH 6,55-ről 6,18-ra esett ebben az időintervallumban. A 72. órára a két törzs pH-ja közelített egymáshoz, ahogy a szaporodás mértéke is megegyezett. A 168. órában elhanyagolható eltérést dokumentáltam. A fermentáció végén a törzsek pH-ja 5,4 és 5,6 közé esett, a *Y. yakushimensis* pH-ja alacsonyabb volt, mint a *Y. lipolytica* esetében tapasztalt.

A fermentáció során a törzsek esetében vizsgáltam az enzimaktivitást, a 24., 72. és 168. órában. Az enzimaktivitás értékek alakulását a 7. ábra ábrázolja.



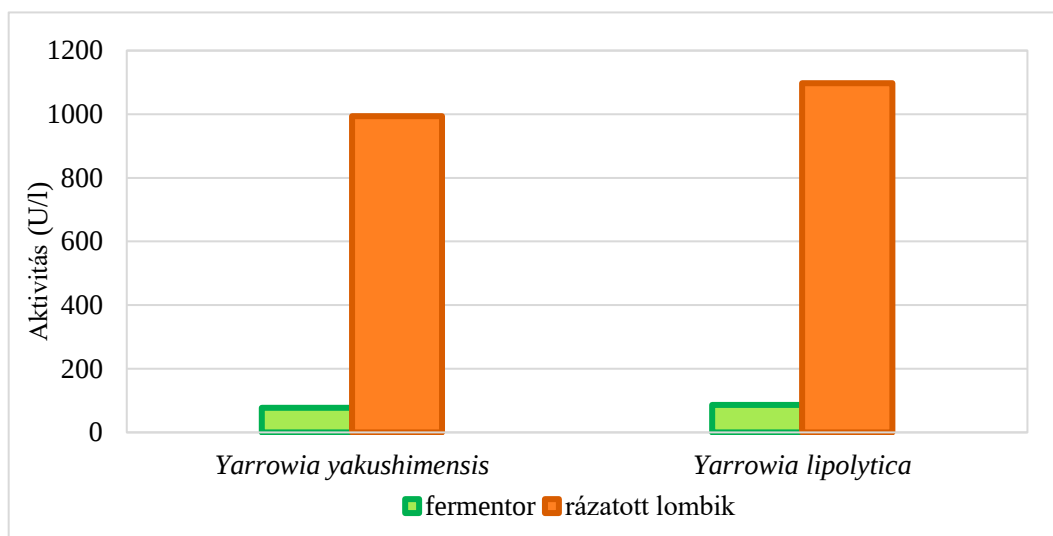
7. ábra: *Yarrowia lipolytica* és *Yarrowia yakushimensis* törzsek extracelluláris lipáz aktivitása a fermentáció során
(Forrás: saját munka)

A 24. órában mért lipáz enzimaktivitás a két törzs esetében kis különbséget mutatott, ez a különbség jóval jelentősebb lett a 72. órában. Míg a 24. órában a *Y. lipolytica* esetén 248,19 U/l volt, addig a *Y. yakushimensis* esetén 214,75 U/l. Ezek az értékek a 72. órára a *Y. lipolytica* esetén 678,83 U/l, *Y. yakushimensis*-nél pedig 430,88 U/l-re emelkedtek. A fermentáció végén a 168. órában mértem a legnagyobb enzimaktivitást mindkét törzs esetén. A *Y. lipolytica* nagyobb extracelluláris lipáz aktivitást mutatott, ami 1129,22 U/l volt, a *Y. yakushimensis* aktivitása ehhez képest 16,5%-kal volt kevesebb, 969,2 U/l. Mindkét törzsről elmondható, hogy a fermentációt követően a fermentáléban nagy extracelluláris lipáz aktivitás volt megfigyelhető. Corzo és Revah (1999) kutatásai során megállapították, hogy a *Y. lipolytica* 681 lipáztermelését szignifikánsan ($p < 0,05$) fokozta az olívaolaj, ha mind szén-, mind induktorforrásként használták. A Tween 80 felületaktív anyag szintén növeli az extracelluláris lipáz aktivitását, *Y. lipolytica* esetén (Sipiczki és munkatársai, 2024).

4.2 Léptéknövelés

A kutatásom során léptéknövelést is megvalósítottam, így laboratóriumi fermentort is alkalmaztam, és ezt hasonlítottam össze a rázatott lombikos fermentációval. Mindkét beállítás esetén olívaolajjal és Tween 80-nal dúsított YEPD tápkeverék volt a fermentációs közeg, illetve a

fermentáció környezeti paraméterei is megegyeztek. Mindkét esetben 27 °C-os fokra állítottam a hőmérsékletet, és 160 rpm-es volt a rázatási sebesség. A fermentációt 168. óráig futtattam, majd meghatároztam az extracelluláris enzimaktivitást. A lipáz enzimaktivitás alakulását fermentorban, illetve lombikban történő termeltetés után, a 8. ábra ábrázolja *Y. lipolytica* és *Y. yakushimensis* esetében.



8. ábra: *Yarrowia lipolytica* és *Yarrowia yakushimensis* aktivitásának összehasonlítása, fermentorban és rázatott lombikban 7 napos fermentáció során (Forrás: saját munka)

A *Y. yakushimensis* esetén a fermentorban 76,84 U/l lipáz enzimaktivitású, míg a rázatott lombikos eljárásnál 993,4 U/l aktivitású lipáz enzimet tartalmazó fermentlevet sikerült előállítani. A *Y. lipolytica* a fermentorban 86,48 U/l aktivitással rendelkezett, a rázatott lombikos minta ugyanennél a törzsnél 1097,6 U/l aktivitást mutatott. Alapjában véve a *Y. lipolytica* bizonyult a jobb termelőnek, bár a különbség egyik eljárásnál sem jelentős, körülbelül 10%-kal termelt több lipázt a *Y. lipolytica*, mint a *Y. yakushimensis*. Mindkét törzsnél a rázatott lombikos eljárás eredményezett nagyobb, több mint tízszeres extracelluláris lipáz aktivitást. Eredményeim egybevágnak Deive és munkatársai (2010) által tett megállapításokkal. A kutatócsoport *Y. lipolytica* extracelluláris lipáz termelését az általam is alkalmazott térfogatban, 2 dm³-es fermentorban történő fermentáció esetén vizsgálta. Megállapították, hogy 200 rpm keverési sebességű kultúrák esetén, a bioreaktor kevertetése nem volt optimális. A vizes közeg és az alkalmazott olajok nem keveredtek megfelelően, két fázis volt megfigyelhető a bioreaktor

tetején, ami meglehetősen gyenge termeléssel párosult. A csoport által végzett kísérletben, a fermentlében 48 - 36 U/l aktivitás volt megfigyelhető 25 mM-os para-nitrofenil-laurát szubsztrátumon. Mivel felméréseim alapján a rázatott lombikos eljárás eredményezett nagyobb extracelluláris aktivitást, ezzel a beállítással dolgoztam tovább.

4.3 Szerves oldószeres kicsapás

A *Yarrowia* széleskörű ipari felhasználása miatt, elengedhetetlen, hogy az élesztő által termelt enzimeket magas tisztasági fokon tudjuk előállítani és forgalmazni. Munkám során az enzimtisztítás első lépésének szerves oldószerrel történő kicsapást választottam. A szerves oldószeres kicsapás során mutatott hatékonyságukat öt különböző alkohol esetén vizsgáltam; etalon, metanol, aceton, propil-alkohol és butil-alkohol. Először felmértem, hogy a felhasznált törzsek lipáz enzime esetén melyik alkohol a leghatásosabb az enzim kinyeréséhez, ehhez 1:3 arányban mértem szerves oldószerrel a centrifugált fermentléhez. Az eredményeimet az alábbiakban mutatom be a két különböző faj esetén.

4.3.1. Lipáz aktivitás alakulása *Yarrowia yakushimensis* esetén

A szerves oldószerrel megvalósított kicsapás után mért enzimaktivitásokat, illetve kitermelést *Y. yakushimensis* esetén a 9. táblázat tartalmazza.

9. táblázat: Különböző szerves oldószeres hatékonysága *Yarrowia yakushimensis* eredetű lipáz enzim esetén
(Forrás: saját munka)

Minta	Térfogat ml	Enzimaktivitás U/ml	Össz. aktivitás U	Kitermelés %
Kiindulási fermentlé	10	0,9670	9,6704	100,00%
Etanolos kicsapás után	2	0,0984	0,1968	2,03%
Metanolos kicsapás után	2	0,1505	0,3010	3,11%
Propanolos kicsapás után	2	0,1838	0,3676	3,80%
Butanolos kicsapás után	2	0,1881	0,3763	3,89%
Acetonos kicsapás után	2	0,2132	0,4264	4,41%

A kiindulási fermentlé enzimaktivitása 0,967 U/ml volt. Az 1:3 arányú szerves oldószeres kicsapás után a kitermelés 2,03% és 4,41% közé esett. A kitermelés alacsony értéke mutatja, hogy a kicsapás nem volt túl hatékony. A propanolos és butanolos kicsapás után közel azonos enzimaktivitást tapasztaltam. A legnagyobb kitermelést az acetonos kezelés után tapasztaltam, az acetonnal történő kicsapást tovább vizsgáltam a fermentléhez képest nagyobb és kisebb 1:1 és 1:6 közötti arányban is.

10. táblázat: Aceton hatékonysága *Yarrowia yakushimensis* eredetű lipáz enzim esetén, 1:1-1:6 arányban
(Forrás: saját munka)

Minta	Térfogat ml	Enzimaktivitás U/ml	Össz. aktivitás U	Kitermelés %
Kiindulási fermentlé	10	0,5445	5,4450	100,00%
1:1	2	0,1135	0,2271	4,17%
1:2	2	0,1259	0,2517	4,62%
1:3	2	0,1083	0,2167	3,98%
1:4	2	0,1367	0,2733	5,02%
1:5	2	0,2091	0,4182	7,68%
1:6	2	0,2534	0,5069	9,31%

A *Y. yakushimensis* acetonnal történő kicsapása során a kezdeti aktivitás 0,54 U/ml. Bár az 1:2 arányban vizsgált minta aktivitása nagyobb volt, mint az 1:3-nál tapasztalt, ettől eltekintve elmondható, hogy az aceton mennyiségének növelése jobb kitermelést eredményezett. A leghatásosabb beállítás az 1:6 arányú volt, itt a kitermelés 9,31%-os volt.

4.3.2. Lipáz aktivitás alakulása *Yarrowia lipolytica* esetén

Y. lipolytica esetén a fent leírtakhoz hasonlóan jártam el. A *Y. lipolytica* eredetű lipáz enzim szerves oldószerekkel történő kicsapása utáni aktivitását és a kitermelését a 11. táblázat szemlélteti.

11. táblázat: Különböző szerves oldószerek hatékonysága *Yarrowia lipolytica* eredetű lipáz enzim esetén
(Forrás: saját munka)

Minta	Térfogat ml	Enzim aktivitás U/ml	Össz. aktivitás U	Kitermelés %
Kiindulási fermentlé	10	0,8607	8,6065	100,00%
Etanolos kicsapás után	2	0,0774	0,1547	1,80%
Metanolos kicsapás után	2	0,0770	0,1540	1,79%
Propanolos kicsapás után	2	0,0281	0,0562	0,65%
Butanolos kicsapás után	2	0,0718	0,1436	1,67%
Acetonos kicsapás után	2	0,0404	0,0809	0,94%

A kezdeti enzim aktivitás *Y. lipolytica*-nál 0,806 U/ml. Kísérletem során nagyon alacsony kitermelést mutatott a törzs minden alkalmazott alkohol esetén. Az etanol és a metanollal történő kicsapás hasonló kitermeléssel járt, az etanollal kezelt minta kitermelése 0,01%-kal magasabb, mint a metanolnál tapasztalható. Bár az eltérés igazán csekély, eredményeim alapján az etanollal végeztem további kísérletet. Etanol esetén különböző koncentrációban is megvizsgáltam a kicsapás effektivitását, eredményeim a 12. táblázatban láthatók.

12. táblázat Etanol hatékonysága *Yarrowia lipolytica* eredetű lipáz enzim esetén, 1:1-1:6 arányban
(Forrás: saját munka)

Minta	Térfogat ml	Enzim aktivitás U/ml	Össz. aktivitás U	Kitermelés %
Kiindulási fermentlé	10	0,1105	1,1054	100,00%
1:1	2	0,0033	0,0066	0,59%
1:2	2	0,0074	0,0148	1,34%
1:3	2	0,0080	0,0160	1,45%
1:4	2	0,0088	0,0176	1,60%
1:5	2	0,0102	0,0205	1,85%
1:6	2	0,0194	0,0388	3,51%

Y. lipolytica etanollal való kicsapás során a fermentlé:szerves oldószer arányának növelése és a kicsapás hatékonysága között arányosság figyelhető meg, a koncentráció növelésével magasabb kitermelést értem el. Optimális beállításnak az 1:6 arány bizonyult. A kitermelés *Yarrowia lipolytica* esetén sem lett megfelelő, etanolos kicsapás maximális kitermelése csupán 3,51%.

4.4 Ammónium-szulfátos kicsapás

A kisózás az egyik leggyakrabban alkalmazott eljárás enzimtisztítás során. Kísérletem keretein belül különböző telítettségű ammónium-szulfát oldatokat használok fel és vizsgálom kicsapási hatékonyságukat.

4.4.1. Lipáz aktivitás alakulása *Yarrowia yakushimensis* esetén

A *Y. yakushimensis*-szel végzett kisózási lépés eredményeit a 13. táblázat tartalmazza.

13. táblázat: *Yarrowia yakushimensis* eredetű lipáz enzim kicsapása különböző telítettségű ammónium-szulfát oldatokkal
(Forrás: saját munka)

Minta	Térfogat ml	Enzim aktivitás U/ml	Össz. aktivitás U	Kitermelés %
Kiindulási fermentlé	10	0,2709	2,7091	100,00%
60%	2	0,0982	0,1963	7,25%
70%	2	0,1053	0,2106	7,77%
80%	2	0,4022	0,8044	29,69%
90%	2	0,4193	0,8387	30,96%
100%	2	0,2164	0,4328	15,98%

A 70% és a 80%-os telítettségű oldatokkal való kicsapáshoz tartozó kitermelési százalékok nagy mértékben eltérnek, csupán 10%-os ammónium-szulfát koncentráció növelés négyszeres kitermelést eredményezett. A kitermelés a 90%-os beállításnál volt a legnagyobb, 30,96%. Eredményeim alapján a *Y. yakushimensis* esetén ammónium-szulfátos kicsapás során az optimális telítettség 90%.

4.4.2. Lipáz aktivitás alakulása *Yarrowia lipolytica* esetén

Kísérletemben a *Y. lipolytica* lipáz enzim kisózásának hatékonyságát vizsgáltam ammónium-szulfát alkalmazásával. A kisózás során kapott eredményeimet a 14. táblázat mutatja be.

14. táblázat: *Yarrowia lipolytica* eredetű lipáz enzim kicsapása különböző telítettségű ammónium-szulfát oldatokkal
(Forrás: saját munka)

Minta	Térfogat ml	Enzim aktivitás U/ml	Össz. aktivitás U	Kitermelés %
Kiindulási fermentlé	10	0,1100	1,1003	100,00%
60%	2	0,0759	0,1518	13,80%
70%	2	0,1185	0,2370	21,54%
80%	2	0,3249	0,6498	59,06%
90%	2	0,4126	0,8252	75,00%
100%	2	0,4577	0,9155	83,21%

Y. lipolytica esetén az ammónium-szulfát oldat telítettségének növelése a kitermelésre is pozitívan hatott. A *Y. lipolytica* esetén a kitermelés széles skálán mozgott értéke 13,80%-tól 83,21%-ig terjedt. 100%-os telítettség esetén mértem a legjobb eredményeket. Iftikhar és munkatársai (2011) *Rhizopus oligosporus* var. extracelluláris lipáz enzim tisztítása során 80% telítettségű ammónium-szulfát oldatot alkalmazva 77,01% kitermelést és 2,34-es tisztulási faktort állapítottak meg. Brígida és munkatársai (2023) *Y. lipolytica* extracelluláris enzimmtisztás során 75%-os szaturációjú ammónium-szulfát oldattal 60%-os kitermelést jegyeztek le.

5. Következtetések és javaslatok

- 2 dm³-es fermentorban 160 rpm-es kevertetési sebességgel mind a *Yarrowia lipolytica* 854/4 mind a *Yarrowia yakushimensis* NCAIM Y.02052 extracelluláris lipáz aktivitása elmaradt a rázott lombikos fermentációhoz képest, batch fermentáció során.
 - **Javaslat:** Deive és munkatársai (2010) 600 U/l-es extracelluláris lipáz aktivitást érték el, nagyobb 400-700 rpm-es keverési sebességgel, illetve lejegyezték, hogy a folytonos fermentáció is emeli a termelt lipáz mennyiséget.
- Kutatási eredményeim alapján megállapítható, hogy a *Yarrowia lipolytica* 854/4 és a *Yarrowia yakushimensis* NCAIM Y.02052 törzsek szaporodása között olívaolajat és Tween 80-at tartalmazó tápközegben eltérés van. A *Yarrowia lipolytica* 854/4 azonos fermentációs körülmények mellett magasabb OD értéket ért el a fermentáció végén, tehát eredményesebben szaporodott.
- A lipáz aktivitás értékeket tekintve látható, hogy a két vizsgált törzs közül a *Y. lipolytica* volt a hatékonyabb enzintermelő olívaolajjal és Tween 80-nal dúsított YEPD tápvelésben. Ugyanis a vizsgálatom során 2 dm³-es fermentorban 160 rpm-es kevertetési sebességgel 7 napon át tartó fermentáció során a *Y. lipolytica* 854/4 élesztő 86,48 U/l extracelluláris lipáz aktivitással rendelkezett, addig a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052 törzs 76,84 U/l aktivitást mutatott. Az azonos paraméterek között elvégzett rázatott lombikos fermentáció esetén a *Y. lipolytica* 854/4-nél 1097,6 U/l, a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052 törzsnél pedig 993,4 U/l aktivitás értéket detektáltunk.
- Kutatásom során alkalmazott szerves oldószerek esetében a kicsapás alacsony kitermelést eredményezett mind a *Y. lipolytica* 854/4, mind a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052 törzsek esetén. A lipáz enzim szerves oldószerekkel történő kicsapásával maximálisan 1,80-3,50%-os kitermelést értem el, így megállapítható, hogy nem hatékony a módszer.
- Kísérletem eredményei alapján kijelenthető, hogy az ammónium-szulfáttal történő kisózás hatékony kezdeti lépésnek bizonyult az enzim tisztítási eljárás során. Ugyanakkor az adott törzs tulajdonságai befolyásolják, hogy melyik telítettségi beállítás

az optimális. A *Y. lipolytica* 854/4 esetén a 100%-os ammónium-szulfát telítettség mellett 83,21%-os kitermelést értem el, míg a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052 esetén a 90%-os szaturáció volt a legkedvezőbb itt a kitermelés 30,96%.

6. Összefoglalás

A mikrobiális eredetű lipáz enzimeket egyre szélesebb körben alkalmazzák a különböző iparágakban, ennek oka többek között a kiemelkedő hő- és pH-stabilitásuk, valamint a szubsztrátspecifitásuk, továbbá igen előnyös, hogy a természetben nagy mennyiségben megtalálhatók. Az elmúlt évtizedekben a *Yarrowia* nemzetség leginkább kutatott faját a *Y. lipolytica*-t számos iparág felhasználta a citromsav, a lipáz, illetve más anyagcseretermékei végett.

A kutatásom során a *Y. lipolytica* 854/4 és a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052 törzsek lipáz termelést vizsgáltam. Első lépésként rázatott lombikos enzimfermentációt hajtottam végre. A két törzs esetén megegyeztek a fermentációs körülmények. A 7 napos fermentáció során monitoroztam a tápveles pH értékének változását, illetve megmértem az optikai denzitást, valamint követtem a lipáz aktivitás alakulását a 0., 24, 72., és 168. órában. A két törzs pH-ja a fermentáció végén 5,4-5,6 közé esett, számottevő különbség nélkül, azonban az OD értékek szerint, a *Y. lipolytica* 854/4 nagyobb sejtszaporulatot produkált. A rázott lombikos módszerrel megvalósított enzimfermentáció során az általam használt környezeti paraméterek mellett a *Y. lipolytica* hatékonyabb volt, ugyanis e törzsnél nagyobb enzimaktivitási értékeket detektáltam.

Munkám során vizsgáltam, hogy a rázatott lombikos fermentáció léptéknövelése milyen hatékonysággal valósítható meg. Az alkalmazott 2 literes mechanikus kevertetésű fermentorban a fermentációs tápközeg, a hőmérséklet és a kevertetési sebesség megegyezett a rázatott lombikos fermentációnál használt beállításokkal. Mind a kettő *Yarrowia* törzs extracelluláris lipáz aktivitása elmaradt a rázott lombikos fermentáció értékeihez képest, a batch fermentáció során. Megállapítottam, hogy ilyen módon nem valósítható meg eredményesen a léptéknövelés. Alapjában véve a *Y. lipolytica* bizonyult a jobb termelőnek a fermentációk során, bár a különbség egyik eljárásnál sem jelentős, körülbelül 10%-kal termelt több lipázt mint a *Y. yakushimensis*.

Mivel a rázatott lombikos fermentáció során mértem a nagyobb lipázaktivitást, az így előállított fermentlevekkel kezdtem meg az enzim tisztítására irányuló kísérleteimet. Az enzimmtisztítás első lépéseként szerves oldószerrel történő kicsapás hatékonyságát vizsgáltam öt különböző alkohol esetén melyek a következők voltak: etalon, metanol, aceton, propil-alkohol és butil-alkohol. Először felmértem, hogy a felhasznált törzsek lipáz enzime esetén melyik alkohol a leghatásosabb az enzim kinyeréséhez, majd további optimalást végeztem a fermentlé:szerves

oldószer arány mennyiségének változtatásával. Az eredményeket nézve míg a *Y. yakushimensis* esetén az acetón bizonyult a leghatékonyabbnak addig a *Y. lipolytica* élesztőnél etanol és metanol volt a legideálisabb, a két oldószer használata hasonló kitermelést eredményezett. A lipáz enzim szerves oldószerrel történő kicsapásával maximálisan 1,80-3,50%-os kitermelést értem el, így megállapítható, hogy nem hatékony a módszer.

Kutatómunkám utolsó lépéseként az ammónium-szulfátos kicsapás hatékonyságát vizsgáltam a két *Yarrowia* élesztő által termelt extracelluláris lipáz enzimre. 5 különböző telítettségű ammónium-szulfát oldattal végeztem a kisózást. Ez az eljárás mindkét törzs esetén kedvezőbb volt. A *Y. yakushimensis* élesztőnél a 90%-os telítettségű oldat mutatta a legnagyobb kitermelést, 30,96%-ot. A *Y. lipolytica* 100%-os telítettségű ammónium-szulfát oldattal való kicsapása után 83,21%-os kitermelést értem el, ami egybe vág Brígida és munkatársai által 2023-ban elvégzett kísérlettel. A *Y. lipolytica* által termelt lipáz enzim tisztítása során a 100%-os telítettségű ammónium-szulfát oldattal történő kisózás megfelelő kezdeti lépés lehet.

Az általam elvégzett kísérletek eredményei hozzájárulhatnak a környezetbarát biotechnológiai folyamatok megvalósításához, az enzimtermelés költséghatékonyságának növeléséhez, valamint kiindulási pontot adhatnak, az enzimtisztítás első lépéséhez.

7. Hivatkozások

Bélanger J. M. R., Bisonette M. C., Paré J. J. R., 1997, Chromatography: Principles and Applications Principles, In: *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry* 18, pp. 1-35, Elsevier

Benno Y., 2004, Microbe division (RIKEN BRC JCM). In: Annual report of the Riken Biological Research Center, RIKEN (in Japanese with English translation), Wako, pp 905–914

Beopoulos A., Chardot T., Nicaud J-M., 2009, *Yarrowia lipolytica*: A model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation, In: *Biochimie*, 91(6), 692-696. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2009.02.004>

Beopoulos A., Nicaud J-M., Gaillardin C., 2011, An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes, In: *Applied microbiology and biotechnology*, 90, 1193-1206.

Brígida A. I. S., Buarque F. S., Nogueira V. L. R., Melo V. M. M., Guisán J. M., Ribeiro, B. D., Goncalves L. R. B., Coelho M. A. Z., 2023, Partial purification of crude lipase extract from *Yarrowia lipolytica*: precipitation, aqueous two-phase systems (ATPS), and immobilization methods, In: *Cleaner Chemical Engineering*, 6, 100105, ISSN 2772-7823, <https://doi.org/10.1016/j.clce.2023.100105>.

Buzzini P., Lachance M. A., Yurkov, A., 2017, *Yeasts in Natural Ecosystems: Diversity* (pp. 331-365)

Caetano C. F., Gaspar C., Martinez-de-Oliveira J., Palmeira-de-Oliveira A., Rolo, J., 2023, The role of yeasts in human health: A review, In: *Life*, 13(4), 924

Cavalieri D., McGovern P. E., Hartl D. L., Mortimer R., Polsinelli M., 2003, Evidence for *S. cerevisiae* fermentation in ancient wine, In *Journal of Molecular Evolution*, 57, S226-S232

Chandra P., Enespa, Singh R., Arora P.K., 2020, Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. *Microb Cell Fact*, 19, Chapter 169, <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01428-8>

Ciurko D., Neuvéglise C., Szwechłowicz M., Lazar, Z., Janek T., 2023, Comparative Analysis of the Alkaline Proteolytic Enzymes of *Yarrowia* Clade Species and Their Putative Applications, *Int. J. Mol. Sci.* 24, 6514, <https://doi.org/10.3390/ijms24076514>

Corzo G., Revah S., 1999, Production and characteristics of the lipase from *Yarrowia lipolytica* 681, *Bioresource Technology*, 70, 2, 173-180, [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00024-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00024-3).

Crous P. W., Wingfield M. J., Burgess T. I., Carnegie A.J., Hardy G. E. S., Smith D., Summerell B. A., Cano-Lira J. F., Guarro J., Houbraken J., Lombard L., Martín M. P., Sandoval-Denis M., Alexandrova A. V., Barnes C. W., Baseia I. G., Bezerra J. D. P., Guarnaccia V., May T. W., Hernández-Restrepo M., Stchigel A. M., Miller A. N., Ordoñez M. E., Abreu V. P., Accioly T., Agnello C., Agustin Colmán A., Albuquerque C. C., Alfredo D. S., Alvarado P., Araújo-

Magalhães G. R., Arauzo S., Atkinson T., Barili A., Barreto R. W., Bezerra J. L., Cabral T. S., Camello Rodríguez F., Cruz R. H. S. F., Daniëls P. P., da Silva B. D. B., de Almeida D. A. C., de Carvalho Júnior A. A., Decock C. A., Delgat L., Denman S., Dimitrov R. A., Edwards J., Fedosova A. G., Ferreira R. J., Firmino A. L., Flores J. A., García D., Gené J., Giraldo A., Góis J. S., Gomes A. A. M., Gonçalves C. M., Gouliamova D. E., Groenewald M., Guáorguiev B. V., Guevara-Suarez M., Gusmão L. F. P., Hosaka K., Hubka V., Huhndorf S. M., Jadan M., Jurjević Ž., Kraak B., Kučera V., Kumar T. K. A., Kušan I., Lacerda S. R., Lamlertthong S., Lisboa W. S., Loizides M., Luangsa-ard J. J., Lysková P., Mac Cormack W. P., Macedo D. M., Machado A. R., Malysheva E. F., Marinho P., Matočec N., Mijer M., Mešić A., Mongkolsamrit S., Moreira K. A., Morozova O. V., Nair K. U., Nakamura N., Noisripoom W., Olariaga I., Oliveira R. J. V., Paiva L. M., Pawar P., Pereira O. L., Peterson S. W., Prieto M., Rodríguez-Andrade E., Rojo De Blas C., Roy M., Santos E. S., Sharma R., Silva G. A., Souza-Motta C. M., Takeuchi-Kaneko Y., Tanaka C., Thakur A., Smith M. T., Tkáčec Z., Valenzuela-Lopez N., van der Kleij P., Verbeke A., Viana M. G., Wang X. W., Groenewald J. Z., 2017, Fungal Planet description sheets: 628 Persoonia ,doi: 10.3767/persoonia.2017.39.11. Epub PMID: 29503478; PMCID: PMC5832955.

Deive F. J., Sanromán M. A., Longo M. A., 2010, A comprehensive study of lipase production by *Yarrowia lipolytica* CECT 1240 (ATCC 18942): from shake flask to continuous bioreactor, in *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, pp 258-266 <https://doi.org/10.1002/jctb.2301>

Dunoyer A. T., Cuello R. E. G., Salinas R. P., 2020, Biodegradation of dairy wastes using crude enzymatic extract of *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773, In: *Revista Ambiente & Água*, 15, e2448.

Fickers P., Benetti P.H., Waché Y., Marty A., Mauersberger S., Smit M.S., Nicaud J.M., 2005, Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. *FEMS Yeast Research*.;5:527-543. DOI: 10.1021/ja01314a001

Fickers P., Cheng H., Sze Ki Lin C., 2020, Sugar alcohols and organic acids synthesis in *Yarrowia lipolytica* : Where are We ?, In: *Microorganisms*, 8(4), 574.

Fiume M.M., Belsito D.V., Hill R.A., Klaassen C.D., Liebler D., Marks J.G. Jr, Heldreth B., 2013, Amended safety assessment of alkyl esters as used in cosmetics. Washington, DC: *Cosmetic Ingredient Review*; p. 1–82.

Flores C.L., Rodriguez C., Petit T., Gancedo C., 2000, Carbohydrate and energy yielding metabolism in non-conventional yeasts. *FEMS Microbiology Reviews*, 24:507-529.

Gandhi N.N., 1997, Applications of lipase. *J Amer Oil Chem Soc*, 74: 621-634. <https://doi.org/10.1007/s11746-997-0194-x>

Goffeau A., Barrell B.G., Bussey H., Davis R.W., Dujon B., Feldmann H., Galibert F., Hoheisel J.D., Jacq C., Johnston M., Louis E.J., Mewes H.W., Murakami Y., Philippsen P., Tettelin H., Oliver S.G., 1996, Life with 6000 genes, *Science* 274, (5287), 546-567. doi: 10.1126/science.274.5287.546. PMID: 8849441.

Gottardi D., Siroli L., Vannini L., Patrignani F., Lanciotti R., 2021, Recovery and valorization of agri-food wastes and by-products using the nonconventional yeast *Yarrowia lipolytica*, *Trends in Food Science & Technology*, Page 78, ISSN 0924-2244, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.06.025>.

Gouliamova D. E., Dimitrov R. A., Guéorguiev B. V., Smith M. T. Groenewald M., 2017, Fungal Planet description sheets: 628 *Persoonia*, doi: 10.3767/persoonia.2017.39.11. Epub PMID: 29503478; PMCID: PMC5832955.

Grembecka M., 2015, Sugar alcohols—their role in the modern world of sweeteners: A review, In: *European Food Research and Technology*, 241, 1-14.

Groenewald M., Boekhout T., Neuvéglise C., Galandin C., van Dijck P.W.M., Wyss M., 2014, *Yarrowia lipolytica*: Safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential, *Critical Reviews in Microbiology*, 40:3, 187206, DOI: [10.3109/1040841X.2013.770386](https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.770386)

Groenewald, M., Smith, M.T., 2013, The teleomorph state of *Candida deformans* Langeron & Guerra and description of *Yarrowia yakushimensis* comb. nov. *Antonie van Leeuwenhoek* **103**, 1023–1028 <https://doi.org/10.1007/s10482-013-9882-8>

Grönberg A., 2018, Ion exchange chromatography, in *Biopharmaceutical Processing*, pp. 379-399

Houde A., Kademi A., Leblanc D., 2004, Lipases and their industrial applications. *Appl Biochem Biotechnol* **118**, 155–170, <https://doi.org/10.1385/ABAB:118:1-3:155>

Jach M.E., Serefko A., Ziaja M., Kieliszek M., 2022, Yeast Protein as an Easily Accessible Food Source, In: *Metabolites*, 12(1), 63, <https://doi.org/10.3390/metabo12010063>

Kurtzman C.P., Fell J. W., Boekhout T., 2001, The Yeasts, a Taxonomic Study, 1, pp 27

Law B. A., 1999, Cheese ripening and cheese flavour technology, in *Technology cheesemaking*, p. 163–92.

Legras J. L., Merdinoglu D., Cornuet J., Karst F., 2007, Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history, *Molecular Ecology*, 16: 2091-2102. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03266.x>

Liu X., Kokare C., 2017, Microbial enzymes of use in industry, in *Biotechnology of Microbial Enzymes*. Acad Press, p. 267–98.

Massadeh, M., Sabra, F., Dajani, R., Arafat, A., 2012, Purification of lipase enzyme produced by *Bacillus stearothermophilus* HU1., in *International conference on eco-systems and Biological Sciences* (pp. 34-37).

McGovern P. E., Zhang J., Tang J., Zhang Z., Hall G. R., Moreau R. A., Wang C., 2004, Fermented beverages of pre- and proto-historic China, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101.51: 17593-17598.

Nicaud, J. M., 2012, *Yarrowia lipolytica*. *Yeast*, 29: 409-418. <https://doi.org/10.1002/yea.2921>

Patsios S. I., Dedousi A., Sossidou E. N., Zdragas A., 2020, Sustainable animal feed protein through the cultivation of *Yarrowia lipolytica* on agro-industrial wastes and by-products. *Sustainability* **2020**, 12(4), 1398; <https://doi.org/10.3390/su12041398>

Perez E., 2023, *Yarrowia* törzsek lipáz termelésének vizsgálata, és fokozása felületaktív anyagokkal, Szakdolgozat, Budapest

- Péter G., Takashima M., Čadež N., 2017, Yeast Habitats: Different but Global. In: Buzzini, P., Lachance, MA., Yurkov, A. (eds) *Yeasts in Natural Ecosystems: Ecology*. Springer, Cham. Pages? https://doi.org/10.1007/978-3-319-61575-2_2
- Poeta P., Diaz A. A., Igrejas G., Silva V., Bezerra R., Nunes C. S., 2018, Selection, engineering, and expression of microbial enzymes. In: *Enzymes in Human and Animal Nutrition*. Acad Press, p. 1–29.
- Rodrigues G., Pais C., 1997, The influence of acetic and other weak carboxylic acids on growth and cellular death of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Food Technology and Biotechnology*.;38:27-32.
- Roettger B. F., Ladisch M. R., 1989, Hydrophobic interaction chromatography, *Biotechnology Advances*, 7, 1, 15-29, [https://doi.org/10.1016/0734-9750\(89\)90901-4](https://doi.org/10.1016/0734-9750(89)90901-4).
- Saxena R. K., Sheoran A., Giri B., Davidson W. S., 2003, Purification strategies for microbial lipases, *Journal of Microbiological Methods*, 52(1), 1-18
- Schoch C. L., Ciufo S., Domrachev M., Hotton C. L., Kannan S., Khovanskaya R., Leipe D., Mcveigh R., O'Neill K., Robbertse B., Sharma S., Soussov V., Sullivan J.P., Sun L., Turner S., Karsch-Mizrachi I., 2020, NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools, *Database*, 1–21 <https://doi.org/10.1093/database/baaa062>
- Segal-Kischinevsky C., Romero-Aguilar L., Alcaraz L. D., López-Ortiz G., Martínez-Castillo B., Torres-Ramírez N., Sandoval G., González J., 2022, Yeasts Inhabiting Extreme Environments and Their Biotechnological Applications. *Microorganisms*. 10(4):794.
- Sharon C., Furugoh S., Yamakido T. H., Ogawa I., Kato, Y., 1998, Purification and characterization of a lipase from *Pseudomonas aeruginosa* KKA-5 and its role in castor oil hydrolysis. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 20, (5), 304-307.
- Singh A. K., Mukhopadhyay M., 2012, Overview of Fungal Lipase: A Review, in *Appl Biochem Biotechnol* 166, 486–520 ,<https://doi.org/10.1007/s12010-011-9444-3>
- Sipiczki G., Micevic S.S., Kohari-Farkas C., Nagy E. S., Nguyen Q. D., Gere A., Bujna E., 2024, Effects of Olive Oil and Tween 80 on Production of Lipase by *Yarrowia* Yeast Strains. *Processes*,12(6):1206. <https://doi.org/10.3390/pr12061206>
- Spalvins K., Blumberga D., 2019, Single cell oil production from waste biomass: review of applicable agricultural by-products, In: *Environmental and Climate Technologies*, 23(2), 325-337, <https://doi.org/10.2478/rtuct-2019-0071>
- Straathof A. J. J., Adlercreutz P., 2000, *Applied Biocatalysis* (2nd ed.), chapter 1.3, page 3-4 CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781482298420>
- Tan C. H., Show P. L., Ooi C. W., Ng E. P., Lan J. C. W., Ling T. C., 2015, Novel lipase purification methods—a review of the latest developments. *Biotechnol J* 10(1):31–44
- Walker G.M., 1998, *Yeast Physiology and Biotechnology*. John Wiley & Sons: England, Page 53
- Walt J.P., von Arx J. A., 1980, The yeast genus *Yarrowia* gen. nov. *Antonie Van Leeuwenhoek* 46:517–21

Wickerham L. J., Kurtzman C. P., Herman A. I., 1970, Sexual reproduction in *Candida lipolytica*. Science 167, 1141.

Wolf K., Barth G., Gaillardin C., 1996, *Yarrowia lipolytica*. In: Nonconventional Yeasts in Biotechnology, 313-388, Springer, Berlin, Heidelberg, https://doi.org/10.1007/978-3-642-79856-6_10

Woolley P., 1994, Lipases: Their Structure, Biochemistry and Application. Cambridge: Cambridge University Press, 288

Wu L., Ge G., Wan J-B., 2009, Biodegradation of oil wastewater by free and immobilized *Yarrowia lipolytica* W29. [Journal of Environmental Sciences](#). 21, 2, 237-242

Yagmurov E. R., Kozlov G. V., Pushkarev M. A., 2017, Lipase purification: the review of conventional and novel methods, In: *Journal of Hygienic Engineering and Design*, 20, 60-69.

Yu M., Lange S., Richter S., Tan T., Schmid R. D., 2007, High-level expression of extracellular lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica* in *Pichia pastoris* and its purification and characterization. Protein Expression and Purification, 53(2), 255-263.

Ábrák jegyzéke

1. ábra: A <i>Yarrowia</i> nemzetség törzsfája	6
2. ábra: <i>Yarrowia lipolytica</i> által termelt agrár- és élelmiszeripari termékek, illetve hasznosításuk	8
3. ábra: Lipáz katalizálta hidrolízis	11
4. ábra: Lipáz által katalizált reakciók	11
5. ábra: <i>Yarrowia lipolytica</i> és <i>Yarrowia yakushimensis</i> törzsek szaporodásának alakulása optikai denzitás alapján olíva olajjal és Tween 80-nal dúsított YEPD tápközegben	23
6. ábra: <i>Yarrowia lipolytica</i> és <i>Yarrowia yakushimensis</i> törzsek pH-jának változása a fermentáció során	24
7. ábra: <i>Yarrowia lipolytica</i> és <i>Yarrowia yakushimensis</i> törzsek extracelluláris lipáz aktivitása a fermentáció során	25
8. ábra: <i>Yarrowia lipolytica</i> és <i>Yarrowia yakushimensis</i> aktivitásának összehasonlítása, fermentorban és rázatott lombikban 7 napos fermentáció során	26

Táblázatok jegyzéke

1. táblázat: <i>Yarrowia yakushimensis</i> és egyéb <i>Yarrowia</i> törzsek növekedésének összehasonlítása, D-mannit szubsztráton, és 30 °C-os hőmérsékleten	10
2. táblázat: Penészgombák, élesztőgombák által termelt lipázok felhasználási területei	13
3. táblázat: Baktériumok által termelt lipázok felhasználási területei	14
4. táblázat: YEPD ferdeagar	17
5. táblázat: Inokulum tápközeg	18
6. táblázat: Fermentációs tápleves	18
7. táblázat: Alkalmazott ammónium-szulfát koncentrációk	19
8. táblázat: A lipáz aktivitás mérés reakcióelegyei	21
9. táblázat: Különböző szerves oldószerek hatékonysága <i>Yarrowia yakushimensis</i> eredetű lipáz enzim esetén	27
10. táblázat: Aceton hatékonysága <i>Yarrowia yakushimensis</i> eredetű lipáz enzim esetén, 1:1-1:6 arányban	28
11. táblázat: Különböző szerves oldószerek hatékonysága <i>Yarrowia lipolytica</i> eredetű lipáz enzim esetén	29
12. táblázat: Etanol hatékonysága <i>Yarrowia lipolytica</i> eredetű lipáz enzim esetén, 1:1-1:6 arányban	30
13. táblázat: <i>Yarrowia yakushimensis</i> eredetű lipáz enzim kicsapása különböző telítettségű ammónium-szulfát oldatokkal	31
14. táblázat: <i>Yarrowia lipolytica</i> eredetű lipáz enzim kicsapása különböző telítettségű ammónium-szulfát oldatokkal	31

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom konzulenseimnek, Sipiczki Gizellának és Dr. Bujna Erikának, akik iránymutatásukkal és szakértelmükkel támogattak. Részletekre való oda figyelésük hatalmas segítséget jelentett labormunkám során. Hálás vagyok a folyamatos visszajelzésükért, és türelmükért, melyek segítettek átlendülni a kezdeti nehézségeken. Segítőkézségük példaértékű, személyes példán keresztül mutatták meg, milyen egy elhivatott szakember.

Mellőzhetetlen részei voltak munkámnak, nélkülük nem készülhetett volna el szakdolgozatom.

NYILATKOZAT

a szakdolgozat nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről

A hallgató neve: Sebők Dóra
A Hallgató Neptun kódja: A2WQAO
A dolgozat címe: *Yarrowia* törzsek lipáz termelésének léptéknövelése és részleges tisztítása
A megjelenés éve: 2024
A konzulens intézetének neve: Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet
A konzulens tanszékének a neve: Biomérnök és Erjedéssipari Technológia Tanszék

Kijelentem, hogy az általam benyújtott szakdolgozat egyéni, eredeti jellegű, saját szellemi alkotásom. Azon részeket, melyeket más szerzők munkájából vettem át, egyértelműen megjelöltem, és az irodalomjegyzékben szerepeltettem.

Ha a fenti nyilatkozattal valótlan állítottam, tudomásul veszem, hogy a záróvizsga-bizottság a záróvizsgából kizár és a záróvizsgát csak új dolgozat készítése után tehetek.

A leadott dolgozat, mely PDF dokumentum, szerkesztését nem, megtekintését és nyomtatását engedélyezem.

Tudomásul veszem, hogy az általam készített dolgozatra, mint szellemi alkotás felhasználására, hasznosítására a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem mindenkori szellemitulajdon-kezelési szabályzatában megfogalmazottak érvényesek.

Tudomásul veszem, hogy dolgozatom elektronikus változata feltöltésre kerül a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem MATER Hallgatói Dolgozatok repozitóriumába. Tudomásul veszem, hogy a megvédett és

- nem titkosított dolgozat a védést követően
- titkosításra engedélyezett dolgozat a benyújtásától számított 5 év eltelte után

nyilvánosan elérhető és kereshető lesz az Egyetem MATER Hallgatói Dolgozatok repozitóriumában.

Kelt: 2024 év 11 hó 12 nap

Sebők Dóra
Hallgató aláírása

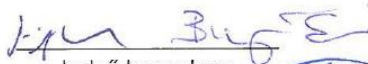
NYILATKOZAT

Sebők Dóra (Neptun azonosító: A2WQAO) konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a szakdolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A szakdolgozatot a záróvizsgán történő védeésre javaslom / nem javaslom¹.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem^{*2}

Kelt: Budapest, 2024. november 11.


belső konzulens



¹ A megfelelő aláhúzendő.

² A megfelelő aláhúzendő.