

SZAKDOLGOZAT

Perez Eliza, Szakdolgozat

**Perez Eliza
2023**

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet

Biomérnök és Erjedéssipari Technológia Tanszék



***Yarrowia* törzsek lipáz termelésének vizsgálata és
fokozása felületaktív anyagokkal**

**Perez Eliza
Budapest
2023**

**Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet**

Szak neve: BSc Biomérnöki

Modul neve: Alkalmazott biotechnológia

Modul szerinti tanszék: Biomérnök és Erjedésipari Technológia Tanszék

Szakedolgozat készítés helye: Biomérnök és Erjedésipari Technológia Tanszék

Hallgató: Perez Eliza

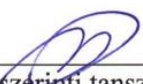
A szakedolgozat címe: ***Yarrowia* törzsek lipáz termelésének vizsgálata és fokozása
felületaktív anyagokkal**

Konzulens: Dr. Bujna Erika, egyetemi docens
Sipiczki Gizella, PhD hallgató

Beadás dátuma: 2023. május 3.


szakedolgozat készítés helyének vezetője
Dr. Nguyen Duc Quang


konzulensek
Dr. Bujna Erika, Sipiczki Gizella


modul szerinti tanszék vezetője
Dr. Nguyen Duc Quang

Tartalomjegyzék

1. BEVEZETÉS.....	1
2. A MUNKA CÉLJA	3
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	4
3.1. LIPÁZ ENZIM.....	4
3.2. MIKROBIÁLIS LIPÁZOK	7
3.2.1. Bakteriális lipázok	8
3.2.2. Gomba lipázok.....	10
3.3. LIPÁZ TERMELÉS FOKOZÁSA ÉS TENYÉSZTÉSI PARAMÉTEREK OPTIMÁLÁSA	12
3.4. LIPÁZ ENZIM IPARI FELHASZNÁLÁSA	13
3.4.1. Élelmiszeripar	14
3.4.2. Mosószertipar és textilipar	15
3.4.3. Parfüm- és kozmetikai ipar.....	15
3.4.4. Orvosi és gyógyászati alkalmazások	16
3.4.5. Papíripar és cellulóz gyártás.....	16
3.4.6. Bioremediáció és környezeti folyamatok.....	17
3.4.7. Energiaipar	17
3.5. YARROWIA FAJOK BESOROLÁSA	18
3.5.1. Yarrowia lipolytica.....	18
3.5.2. Yarrowia yakushimensis	20
3.5.3. Yarrowia divulgata	21
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	22
4.1. A FELHASZNÁLT YARROWIA NEMZETSÉGHEZ TARTOZÓ TÖRZSEK	22
4.2. ANYAGOK.....	22
4.2.1. Alkalmazott tápközegek.....	22
4.2.2. Enzimaktivitás méréshez használt oldatok.....	23
Sörensen puffer:	23
Szubsztrátum:	23
Leállító reagens:	24
4.2.3. Felhasznált eszközök	24
4.3. MÓDSZEREK	24
4.3.1. pH mérés	24
4.3.2. Optikai denzitás mérése	24
4.3.3. Extracelluláris lipázaktivitás mérése	24
4.3.4. Fermentáció	25
4.3.5. Bürker-kamrás sejtszámlálás	26
4.3.6. Központi elrendezésű kísérlettervezés (CCD)	26
5. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	28
5.1. YARROWIA YAKUSHIMENSIS TÖRZSEK SZKRINELÉSE LIPÁZ ENZIM TERMELÉSRE	28
5.2. INOKULUM MENNYISÉGÉNEK OPTIMÁLÁSA	30
5.3. TWEEN 80 ÉS TRITON X-100 HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA AZ ENZIMTERMELÉSRE.....	42
6. ÖSSZEFOGLALÁS	47
7. IRODALMI HIVATKOZÁSOK.....	49

1. BEVEZETÉS

Az emberek már az ősi civilizációktól kezdve hasznosították különböző célokra az enzimeket. Ma már közel 4000 enzim ismert, és ezek közül csaknem 200 enzimet használnak kereskedelmi forgalomban. A lipázok, mint a biokatalizátorok egyik legfontosabb csoportja vesznek részt különböző biotechnológiai alkalmazásokban ([Choudhury és Bhunia, 2015](#)). A lipáz enzimek a trigliceridek szabad zsírsavakká és glicerinné történő hidrolízisét katalizálják. Mindenütt jelen vannak a természetben, számos növény, állat és mikroorganizmus képes előállítani. A baktériumok a lipázok esetében leírt biodiverzitás 45%-át, a gombák a 21%-át, az állatok a 18%-át, a növények a 11%-át, végül az algák a 3%-át teszik ki ([Treichel és munkatársai, 2010](#); [Pérez és munkatársai, 2019](#)). A lipáz nemcsak biotechnológiai szerepe, de biológiai jelentősége miatt ugyancsak ismert. Növényekben leginkább a magok csírázásánál és a gyümölcsök érésénél van szerepük ([Eastmond, 2006](#)), míg az állatoknál, valamint az embernél az emésztésben van kulcsfontosságú funkciója (nyál-, gyomor-, hasnyálmirigy lipáz) ([Casas-Godoy és munkatársai, 2018](#)). A lipázok általában nem igényelnek kofaktorokat, széles pH-tartományban működnek, magas hőmérsékleten stabilak, és nagyfokú specificitást, valamint a regio-, kemo- és enantioszelektivitás tulajdonságokat mutatnak, ami nagymértékben alkalmazhatóvá teszi őket az ipari folyamatokban ([Pérez és munkatársai, 2019](#)).

A mikrobiális lipázok szerepe egyre jelentősebb, piaci felhasználásának értékét már 2018-ban is 425,0 millió dollárra becsülték, ami az előrejelzések szerint 2023-ra az 590,2 millió dollárt is elérheti ([Chandra és munkatársai, 2020](#)). A mikrobiális lipázok a globális lipáz piac mintegy 90 %-át teszik ki ([Raveendran és munkatársai, 2018](#)), ugyanis alacsony az előállítási költségük, nagy stabilitás jellemzi őket és nagyobb mennyiségben állnak rendelkezésre, mint a növények, illetve állatok által termelt lipázok ([Chandra és munkatársai, 2020](#)).

A mikrobiális eredetű lipáz a szerves kémiában és a biotechnológiában a legszélesebb körben használt enzimescsoport, emellett számos iparág alkalmazza köztük az élelmiszeripar, gyógyszeripar, kozmetikai ipar, textilipar és finomvegyipar ([Joshi és Kuila, 2018](#); [Seitz, 1974](#); [Chandra és munkatársai, 2020](#)).

A *Yarrowia lipolytica* a *Yarrowia* nemzetség egyik legismertebb és kutatótobb faja, melyet előszeretettel alkalmaznak különböző iparágakban.

Világszerte ismertté vált például a párizsi *Y. lipolytica* W29-es törzsének sikertörténete, melyet szennyvízből izoláltak, majd a figyelem középpontjába került robusztus növekedése és különböző enzimek, – többek között a proteázok, a lipáz és az RNáz –, valamint heterológ fehérje előállításának nagy kapacitása miatt. A W29 a legelterjedtebb törzs az élesztőgyűjteményekben világszerte, és egyfajta referenciává vált az új *Y. lipolytica* izolátumok vagy alternatív *Yarrowia* fajok teljesítményének összehasonlítására a növekedés vagy a különböző vegyületek előállítása tekintetében.

Ez a sikertörténet is bizonyítja, hogy a *Yarrowia lipolytica* mellett szintén igen fontos szerepe lehet a *Yarrowia* nemzetség egyéb fajainak. A szakdolgozatomban alkalmazott izolátumok szintén helytállhatnak és potenciális biokatalizátorként szolgálhatnak majd akár az iparban is. Kutatómunkám lipáz enzim termelésük feltérképezésére, fokozására és optimalizálására irányult.

2. A MUNKA CÉLJA

Napjainkban egyre inkább a mikroorganizmusok által termelt enzimek felhasználását részesítik előnyben a különböző iparágak.

Széleskörű alkalmazásuk miatt egyre több kutatás születik arról, hogy az élesztőgombák, köztük a *Yarrowia* nemzetség egyik leginkább kutatott faja a *Yarrowia lipolytica* által termelt lipáz enzimet többhelyen felhasználja a biotechnológia.

Azonban a *Yarrowia* nemzetség többi tagja is alkalmas lehet ipari felhasználásra, ugyanis erős proteolitikus és lipolitikus aktivitással rendelkeznek.

Munkám során célul tűztem ki a biotechnológiai fejlesztésekben potenciálisan felhasználható *Yarrowia* (*Y. lipolytica*, *Y. divulgata*, *Y. yakushimensis*) törzsek extracelluláris lipáztermelésének nyomon követését. Kísérleteimnél a következő részfeladatokat terveztem megvalósítani:

- *Yarrowia* élesztőgombatörzsek szkrínelése glükóz-pepton-élesztőkivonat, valamint olívaolaj kiegészítést tartalmazó tápközegben.
- A beoltott inokulum mennyiségének optimalizálása.
- A lipáz termelés fokozása Tween 80 hozzáadásával.
- Tween 80 és Triton X-100 optimális koncentrációjának meghatározása központi elrendezésű statisztikai modell (CCD) alkalmazásával az enzim termelés fokozására

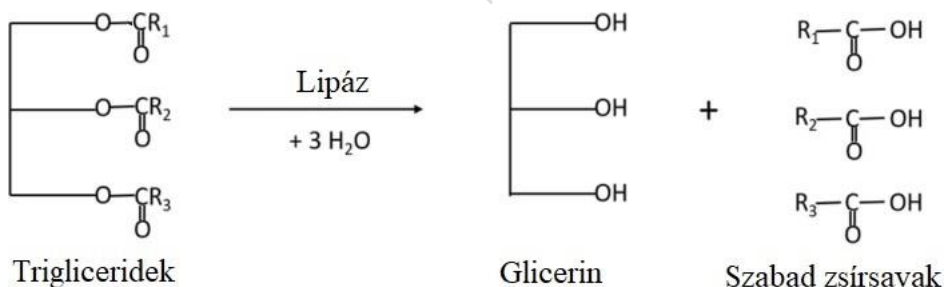
Kísérlet helye:

A kísérleteimet a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet, Biomérnök és Erjedéssipari Technológia Tanszék Fermentációs Laboratóriumában végeztem el.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. Lipáz enzim

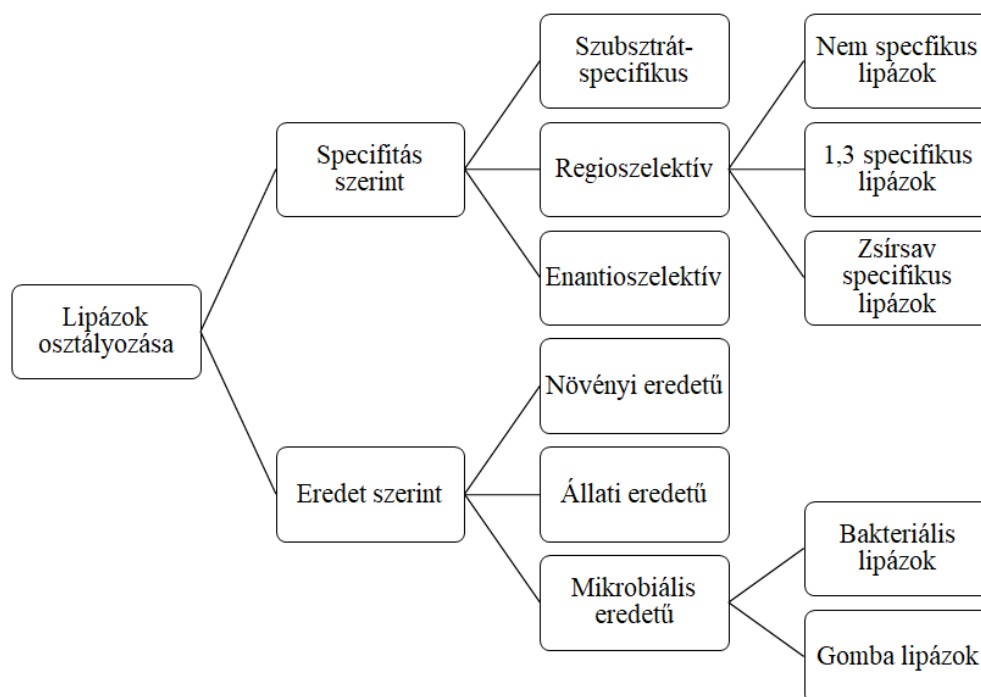
A lipáz enzimet a hidrolázok osztályába soroljuk. A lipáz enzimek (EC 3.1.1.3, triglicerid lipáz) a szubsztrát molekulákat, a triglicerideket glicerinre és szabad zsírsavakra hidrolizálják (1. ábra) ([Stefanovitsné Bányai, 2019](#); Internet 1). A lipáz enzimek olaj-víz határfelületen működnek, így nemcsak a vízben oldódó észterek hasítására, de a vízben nem oldódó észterek hidrolízisére is képesek ([Lotti és Alberghina, 2007](#)). Továbbá a lipázok nem igényelnek kofaktorokat, szubsztrátok széles skáláján aktívak és különböző mátrixokon egyaránt könnyen rögzíthetők ([Casas-Godoy és munkatársai, 2018](#); [Melani és munkatársai, 2020](#)). Az enzimek, így a lipázok is a reakció katalizálásakor legalább 10^6 - 10^9 -szeresére növelik a megfelelő nem katalizált reakció sebességét ([Choudhury és Bhunia, 2015](#)). A lipázok széles pH- és hőmérséklettartományban aktívak, általában semleges pH-optimummal rendelkeznek, de a pH- és hőmérsékleti optimuma attól függ, hogy milyen forrásból származnak, illetve azok élőhelyétől. A lipázok a pH 4 és 11 közötti széles tartományban stabilak, a hőmérsékleti optimum pedig 10 és 96 °C között van ([Patil és munkatársai, 2011](#)).



1. ábra: A lipáz-katalizált hidrolízis folyamatábrája ([Stefanovitsné Bányai, 2019](#) nyomán)

Osztályozás

A lipázokat osztályozhatjuk aszerint, hogy milyen forrásból származnak, illetve a specifitásuk szerint (2. ábra). Az eredet szerint megkülönböztethetünk növényi, állai és mikrobiális lipázokat. A lipázok ipari alkalmazásainak ábrázolásában fontos kritérium a specifitás, amely alapján három nagy csoportba sorolhatók: szubsztrátspecifikus, regioszelektív és enantioszelektív ([Sarmah és munkatársai, 2018](#)).



2. ábra: Lipázok osztályozása ([Sarmah és munkatársai, 2018](#) nyomán)

Az enantioszelektív lipázok képesek megkülönböztetni az enantiomereket a racém keverékben. A regioszelektivitás a triglicerid molekulában lévő elsődleges és másodlagos észtercsoportok megkülönböztetésének képessége, ami fontos a strukturált lipidek előállítása során. A lipázok ezen tulajdonsága óriási jelentőségű a vegyipar és a gyógyszeripar számára. A regioszelektív lipázok tovább csoportosíthatók szelektív funkcionalitásuk alapján ([Sarmah és munkatársai, 2018](#); [Chandler, 2001](#)).

A nem specifikus lipázok osztályába tartozó lipázok nagyon robusztusak és több szubsztráton is képesek hatni. Például a *Candida antarctica* nem specifikus lipázának alkalmazása során a repceolaj kaprilsavval történő acidolízisével nagy tisztaságú strukturált lipideket képes előállítani ([Sarmah és munkatársai, 2018](#)).

Az 1,3-specifikus lipázok a C₁ és C₃ pozíciókban katalizálják a triglicerid hidrolízisét, ami zsírsavakat, 2-monoglicerideket és 1,3 vagy 2,3 diglicerideket eredményez. Az utóbbi két vegyület instabilitása miatt acil-vándorlás következik be, ami 1,3-diglicerid és 1- vagy 3-monoglicerid képződéséhez vezet. A diglicerid képződése sokkal gyorsabb, mint a monogliceridé a trigliceridből. A *Pichia pastoris*-ban expresszált *Rhizopus oryzae* 1,3-specifikus immobilizált lipáza biodízel előállítására használható ([Sarmah és munkatársai, 2018](#)).

A zsírsavspecifikus lipázok a C-9 kettős kötéssel rendelkező hosszú láncú zsírsavakat tartalmazó észtereket hidrolizálják ([Sarmah és munkatársai, 2018](#)). Egy a zsírsav-specifikus

lipázokról szóló tanulmány során a Song és munkatársai (2008) által vizsgált lipázok közül az S₃ *Penicillium citrinum* (PCL), MJ₁ *Aspergillus niger* (ANL), MJ₂ *Aspergillus oryzae* (AOL), YM *Bacillus coagulans* (BCL), S₉ *Geotrichum candidum* (GCL) és S₁₁ *Candida lipolytica* (CLL) lipázai mutatták a legerősebb specificitást a rövid láncú észterekre, a többi lipáz pedig a közép- vagy hosszú láncú és elágazó észterekre jelzett erős szelektivitást.

Szubsztrát és reakciótípus

A lipáz természetes szubsztrátjai a hosszú szénláncú zsírsavakból álló trigliceridek. A lipáz-reakciónak a szubsztrát és a vizes fázis közötti határfelületen történő lejátszódása az enzimreakció reverzibilis jellegének köszönhető. Ez felelős mind a reaktánsok, mind a termékek hidrolíziséért és szintéziséért, amely az enzim vízaktivitásának irányítása alatt áll. Az enzim specifikus vagy nem specifikus módon hat a szubsztrátra és ennek eredményeképpen vagy a trigliceridek teljes hidrolízise történik szabad zsírsavakká és glicerinné, vagy a trigliceridek mellett még monogliceridek, digliceridek, zsírsavak és glicerol is keletkeznek. A reakció minden esetben egy kétfázisú rendszer reakciójának határfelületén megy végbe. Ez a kétfázisú rendszer a hidrofób szubsztrátot tartalmazó, vízben nem elegyedő szerves fázis jelenlétéből adódik. Bizonyos kísérleti körülmények között például, ha a rendszerben nincs víz, a lipázok képesek megfordítani az észterezéshez vezető reakciót (Ghosh és munkatársai, 1996; Casas-Godoy és munkatársai, 2018).

A lipázok termodinamikailag kedvező körülmények között (azaz alacsony vízaktivitás mellett) a szintézisreakciók széles skáláját is katalizálják, amelyek két fő reakciótípusba, az észterezésbe és az átészterezésbe sorolhatók. Az észterezés az a reakció, amikor egy zsírsav az enzim hatására kovalens kötással kapcsolódik egy alkoholhoz és egy vízmolekula felszabadulása mellett észter keletkezik. A tioészterezés és az amidálás hasonló reakciók, de szubsztrátként tiol vagy amin szerepel (Casas-Godoy és munkatársai, 2018). Az átészterezés csoportjai közé tartozik az alkoholízis, az acidolízis, az aminolízis és az molekulák közötti észterezési reakciók (Gosh és munkatársai, 1996). Ezek a szintézisreakciók általában alacsony vízaktivitású közegben játszódnak le, ahol a termodinamikai aktivitás a molekula oldószerben való hozzáférhetőségének mértékegysége. A lipázok további aktivitásokat is képesek kifejteni, mint például a foszfolipáz, a lizofoszfolipáz, a koleszterinészteráz, a kutináz vagy az amidáz aktivitást (Casas-Godoy és munkatársai, 2018).

Lipáz enzim előfordulása és biológiai szerepe

A lipáz enzimek a legtöbb élő szervezetben, az állatokban, a növényekben, az élesztőgombákban, a penészgombákban és a baktériumokban egyaránt jelen vannak

([Borrelli és Trono, 2015](#)). Az eukariótákban a lipázok a lipidanyagcsere különböző szakaszaiban vesznek részt, ideértve a zsírok emésztését, felszívódását, helyreállítását és a lipoprotein anyagcserét ([Sharma és munkatársai, 2001](#)). A növényi lipázok a növények különböző részeiből származnak, beleértve a magokat, leveleket, gyümölcsöket ([Sarmah és munkatársai, 2018](#)), de a növények raktározó szöveteiben is megtalálhatók ([Sharma és munkatársai, 2001](#)). A növényi lipázok többsége a magokból származik, ahol nagyobb lipázaktivitás figyelhető meg, mint bármely más növényi forrásban. A magok nagy koncentrációban tartalmazzak triglicerideket és így a növények növekedéséhez energiaforrásként szolgálnak. A lipáz a triglicerideket glicerinre és szabad zsírsavakra bontja, majd ezek belépnek a glükoneogenezisbe, ahol oldható cukrokká alakulnak, amelyek a csírázást követően az embrió növekedését teszik lehetővé. Ipari szempontból a növényi lipázok nagyon vonzóak tűnnek alacsony költségük, specifikus alkalmazásuk, könnyű hozzáférhetőségük miatt, ám a hagyományos tisztítási módszerekkel kis mennyiségben nyerhetők ki, instabilak és aktivitásuk jelentősen lecsökken ([Quettier és Eastmond, 2009](#); [Sarmah és munkatársai, 2018](#)).

A lipázok az állatoknál és az embernél egyaránt az emésztésben töltenek be fontos szerepet (nyál-, gyomor-, hasnyálmirigy lipáz). Az állati eredetű lipázok nagy részét a szarvasmarha, a juh, és a sertés hasnyálmirigyéből nyerik. Azonban az állati hasnyálmirigyből kinyert lipázok csak ritkán elég tiszták ahhoz, hogy azok az élelmiszeripar számára felhasználhatók legyenek. A sertés hasnyálmirigyéből kivont lipáz például nyomokban tripszinnel szennyezett, ez pedig keserű ízt eredményez, ehhez hasonlóan további szennyeződések még az állati vírusok és hormonok is ([Casas-Godoy és munkatársai, 2018](#)). Az állati lipázokat azonban inkább a klinikai diagnosztikában használják, mintsem a kereskedelmi termelésben. ([Sarmah és munkatársai, 2018](#)).

A növényekből vagy állatokból származó lipázokkal ellenben a mikrobiális lipázok értékesebbek, mivel sokféle katalitikus aktivitásuk van, genetikailag könnyen manipulálhatóak, illetve egyszerű beszerezhetőség, valamint könnyű, költséghatékony és következetes előállítás jellemzi őket. Ezen tulajdonságai miatt a legtöbb iparban használt lipázt mikrobiális forrásokból nyerik ([Deive és munkatársai, 2009](#); [Borrelli és Trono, 2015](#); [Raveendran és munkatársai, 2018](#); [Chandra és munkatársai, 2020](#)).

3.2. Mikrobiális lipázok

Mikrobiális lipázok mind a penészgomba-, az élesztőgomba- és a baktérium eredetű lipázok is ([Sarmah és munkatársai, 2018](#)). A mikroorganizmusoknál a lipáz gyakran extracelluláris

(sejten kívüli), de intracelluláris (sejten belüli) vagy akár sejtfalhoz kötött formában is előfordul ([Deive és munkatársai, 2009](#); [Treichel és munkatársai, 2010](#)).

Napjainkban egyre inkább a mikroorganizmusok által termelt enzimek felhasználását részesítik előnyben a különböző iparágak, jó stabilitásuk, egyszerű előállításuk és alacsony gyártási költségeik miatt ([Joshi és Kuila, 2018](#)). A mikrobiális lipázok enzimatisma tulajdonságaik és szubsztrát specifikusságuk tekintetében is igen változatosak, ami széleskörű alkalmazási lehetőséget teremt ([Ray, 2012](#)). A megnövekedett kereslet kielégítése céljából, rekombináns DNS-technológia és a fehérjemérnökség alkalmazásával egy adott mikroorganizmus nagy mennyiségben tenyészthető ([Liu és munkatársai, 2013](#)). Nemrégiben megállapították, hogy a mikrobiális lipázok mezőgazdasági és tejipari melléktermékek fermentációjával szintén előállíthatók, hozzájárulva a környezetvédelemhez ([Sarmah és munkatársai, 2018](#)).

A GRAS (általánosan biztonságosnak minősített) státusszal rendelkező élesztőforrásokból származó lipázokat is széles körben használják számos iparágban, beleértve az élelmiszerfeldolgozást is ([Casas-Godoy és munkatársai, 2018](#)).

3.2.1. Bakteriális lipázok

A bakteriális lipázok általában glikoproteinek, de néhány extracelluláris bakteriális lipáz lipoprotein ([Ghosh és munkatársai, 1996](#)). A bakteriális lipázok mellett, hogy hőstabilak és nem szubsztrátspecifikusak, nagy mennyiségben rendelkezésre állnak ([Sarmah és munkatársai, 2018](#)). A következő nemzetségeket jól hasznosították lipázok előállítására: *Achromobacter spp.*, *Alcaligenes spp.*, *Arthrobacter spp.*, *Pseudomonas spp.* és *Chromobacterium spp.* ([Godtfredsen, S. E., 1990](#)). Ghosh és munkatársai (1996) a *Staphylococcus spp.* és a *Pseudomonas spp.* baktérium nemzetségeket kifejezetten a kereskedelmi hasznosítás céljából vizsgálták. A *Staphylococcus*-ok közül a *S. aureus* és a *S. hyicus* is fontos lipáztermelő faj. A *Staphylococcus aureus* és *S. hyicus*-eredetű lipázokat általában a kétértékű ionok, például a Ca^{2+} stimulálják, viszont a kelátképző EDTA inhibitorként hat. Ezen enzimek pH-optimuma 7,5 és 9,0 között változik. A *Staphylococcus* lipázok lipoprotein természetűek. A *Pseudomonas* három fontos fajtát, - *P. fragi*, a *P. fluorescens* és a *P. aeruginosa*- is ipari szinten alkalmazzák. A lipázt gátolta a Zn^{2+} , Fe^{2+} , Al^{3+} , míg a *Staphylococcus* eredetű lipázhoz hasonlóan a Ca^{2+} fokozta a hosszú láncú zsírsavészterek hidrolízisét.

A bakteriális lipázok optimális hőmérséklete 15-70 °C, pH-ja 5,0-10,8 körül van, de ezek az értékek magától a baktérium típusától és növekedési körülményeitől is erősen függenek. A felületi hidrofób jelleg, az enzimaktivitás, a szerves oldószerekben és magas hőmérsékleten való stabilitás és a proteolitikus enzimekkel szembeni rezisztencia a bakteriális lipázok azon tulajdonságai, amelyeket mérnöki beavatkozással már javítottak ([Javed és munkatársai, 2018](#)). Sánchez-Porro és munkatársai (2003) Dél-Spanyolországban különböző nagy sókoncentrációjú környezetből izoláltak baktériumokat. Ezek a baktériumok optimálisan 5-15%-os sótartalmú közegben, de a legtöbb esetben 20-25%-os sótartalmú közegben képesek növekedni. Összesen 122 mérsékelt halofil baktériumot izoláltak (*Salinivibrio*, *Halomonas*, *Chromohalobacter*, *Bacillus-Salibacillus*, *Salinicoccus* és *Marinococcus*), amelyek különböző hidrolázok, amilázok, DNázok, proteázok, pullulanázok, valamint lipázok termelésére is képesek. A vizsgálatukból az derül ki, hogy az eddig leírt fajokhoz tartozó törzsek csak nagyon alacsony hidroláz aktivitást mutattak, ám az általuk azonosított környezeti izolátumok igen sok hidrolázt termeltek.

Ugyan a bakteriális lipázok többnyire nem szubsztrát-specifikusak, vannak kivételek, amelyeknek 1,3-regioszelektivitásuk van. ([Gupta és munkatársai, 2004](#)). Néhány bakteriális lipáz hőmérséklet-, pH-optimumát és stabilitását, szubsztrát-specifitását, illetve aktivátorait és inhibitorait foglalja össze az 1. táblázat.

1. táblázat: Bakteriális lipázok tulajdonságai ([Gupta és munkatársai, 2004](#) nyomán)

Baktériumok	Hőmérséklet-, pH-optimum	Hő-, pH-stabilitás	Szubsztrát-specifitás	Aktivátorok, inhibitorok
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> LP009	50 °C; pH 7,0	45 °C alatt; pH 4,0-8,0	-	Triton X-100, Tween 80 és Tween 20 aktivátorok; EDTA inhibitor
<i>Bacillus</i> sp.	60-65 °C; pH 5,6-6,2	60 °C-on 12 órán át; pH 5,0-11,5	1,3-regio-szelektivitás	Cu ²⁺ , Hg ²⁺ , Zn ²⁺ inhibitorok
<i>Pseudomonas</i> sp. (PSL)	45-60 °C; pH 7,0-9,0	40 °C-on 4 óráig pH 6,0-12,0; 25-50 °C-on 30 percig	-	Ca ²⁺ , Bi ³⁺ aktivátorok; Fe ²⁺ , Fe ³⁺ , Al ³⁺ , Zn ²⁺ , Mn ²⁺ inhibitorok
<i>Pseudomonas luteola</i>	55 °C; -	t _{1/2} =116 perc 65 °C-on; pH 12,3-nál t _{1/2} =84 perc	telített és telítetlen zsírsavak	Sn, Zn inhibitorok

3.2.2. Gomba lipázok

A különböző katalitikus tulajdonságokkal rendelkező lipázok új forrásai iránti ipari igény motiválja az új törzsek izolálását és szelekcióját ([Sharma és munkatársai, 2001](#)). Számos kutató hasznosította a gombákat, mint értékes lipáz forrásokat a következő tulajdonságaik miatt: hőstabilitás, pH-stabilitás, szubsztrátspecifitás és szerves oldószerekben való aktivitás ([Chandra és munkatársai, 2020](#)). Az élesztők és a penészek által termelt lipázok optimális pH-ját és hőmérsékletét, illetve pH stabilitását mutatja a 2. táblázat. A hőmérséklet lipáz termelésre gyakorolt hatása elsősorban a szervezet növekedésével függ össze. A különböző gombák lipáz-hozamát a termelőközeg pH-ja egyaránt befolyásolja ([Meghwanshi és Vashishtha, 2018](#)). A gomba eredetű lipázokat előnyben részesítik a bakteriális lipázokkal szemben, egyrészt azért, mert a gombák enzimeit extracellulárisan szekretálódnak, és egyszerűen tisztíthatók, ami jelentősen csökkenti a költségeket, másrészt pedig a mai technológia kedvez a szakaszos fermentációnak és az alacsony költségű extrakciós módszereknek ([Ghosh és munkatársai, 1996](#); [Sharma és munkatársai, 2016](#); [Chandra és munkatársai, 2020](#)).

2. táblázat: Gomba lipázok különböző biokémiai tulajdonságai ([Vakhlu és Kour, 2006](#); [Song és munkatársai, 2008](#) nyomán).

Mikroorganizmus		Hőmérséklet optimum (°C)	pH optimum	Hő-stabilitás (60 °C)	pH stabilitás
Élesztőgombák	<i>Kurtzmanomyces</i> sp. I-11	75	1,9-7,2	-	7,1 alatt
	<i>Trichosporonasteroides</i>	50	5,0	-	3,0-10,0
	Y-11 <i>Trichosporon capitatum</i>	40	8,0	t _{1/2} = 120 perc	8,0-10,5
	S ₉ <i>Geotrichum candidum</i>	35	8,5	t _{1/2} = 100 perc	8,5-9,0
	S ₁₁ <i>Candida lipolytica</i> / <i>Yarrowia lipolytica</i>	30 37	8,0 8,2	t _{1/2} = 80 perc	8,0-9,0 4,5-8,0
Fonalgombák	M ₂ <i>Mucor racemosus</i>	50	8,0	t _{1/2} = 15 perc	7,0-8,5
	J ₈₋₂ <i>Rhizopus oryzae</i>	30	6,0	t _{1/2} = 35 perc	5,5-6,8
	MJ ₁ <i>Aspergillus niger</i>	35	7,0	t _{1/2} = 45 perc	7,0-8,0
	S ₃ <i>Penicillium citrinum</i>	50	9,0	t _{1/2} = 100 perc	5,0-6,5

Fonalgombák

Kereskedelmi szempontból a legfontosabb lipáztermelő fonalgombafajok a *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizomucor*, *Fusarium* és *Alternaria* nemzetséghez tartoznak ([Treichel és munkatársai, 2010](#); [Chandra és munkatársai, 2020](#)). Az ipari szintű termelés szempontjából a fonalgombák az extracelluláris lipázok kiváló forrásai ([Sharma és munkatársai, 2016](#)). A mezofil gombák, amelyek növekedési optimuma 25 és 37 °C között van, savas pH tartományban termelnek lipázt, ilyen a *Mucor heimalis* és a *Fusarium oxysporum* is ([Meghwanshi és Vashishtha, 2018](#)). A különböző hőmérsékletek (20-90 °C) az *A. niger* lipáz aktivitására és stabilitására gyakorolt hatását vizsgálták Sharma és munkatársai ([2016](#)), s megállapították, hogy az enzim 40 °C-on volt a legaktívabb, majd 60 °C után drasztikusan csökkenni kezdett, végül 90 °C-on az enzimaktivitása teljesen megszűnt. Az *A. niger* MYA 135 lipáza a pH 2,0-10,0 -tartományban volt aktív, ha előtte 1 órán át 37 °C-on előinkubálták, de az optimális aktivitást pH 6,5-nél érte el. Különböző vízzel elegyedő oldószerek, köztük a metanol, etanol, acetone, butanol és hexán, az *A. niger* lipáz stabilitására gyakorolt hatását vizsgálták, s megállapították, hogy az enzim minden szerves oldószerben stabilnak bizonyult. A legnagyobb aktivitást acetoneban mutatta, amikor előtte 1 órán át 37 °C-on előinkubálták.

Élesztőgombák

Az élesztő lipázok nagyon fontos lipázforrást jelentenek, mivel egyedi tulajdonságaik, valamint könnyű tenyésztetőségük miatt számos iparágban, például a gyógyszeriparban, a vegyiparban, a biodízeliparban stb. keresettek. Az élesztők körében a *Candida antarctica*, *Candida rugosa*, *Candida utilis* és *Saccharomyces* fajok a lipázok elsődleges termelői, amelyek közül a *C. rugosa* eredetűek a legfontosabb biokatalizátorok a különböző típusú reakciók katalizálásában. A lipáz másik fontos élesztőforrása a *Candida lipolytica*/ *Yarrowia lipolytica*, amely a bio felületaktív anyagok előállításában is részt vesz ([Sarmah és munkatársai, 2018](#)). Az élesztőgombák további lipáztermelő fajtái a következők: *Candida tropicalis*, *Candida cylindracea*, *Candida parapsilopsis*, *Candida deformans*, *Yarrowia lipolytica*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula pilimornae*, *Pichia bispora*, *Pichia mexicana*, *Pichia xylosa*, *Saccharomycopsis crataegensis* és *Trichosporon asteroides* ([Vakhlu és Kour, 2006](#)). Az élesztőgombákról általában ismert, hogy alacsonyabb, 5,5-6,2 pH-értékek mellett termelnek lipázt, a *C. rugosa* optimálisan az 5,5-6,2 pH-tartományban állít elő lipázt. Továbbá a pH befolyásolja a gombakultúra által szekretált lipáz típusát, a *G. candidum* a közeg pH-értékének változtatásakor különböző specificitású lipázt termelt, az egyiket 6,0-

os, a másikat 7,5-ös pH-értéknél. A mezofil élesztőgombák, mint a *Candida cylindracea*, *Geotrichum candidum* és *Candida rugosa* is 25 és 37 °C között növekednek optimálisan ([Meghwanshi és Vashishtha, 2018](#)).

3.3. Lipáz termelés fokozása és tenyésztési paraméterek optimalálása

A legtöbb mikrobiális lipáz extracelluláris, a sejtmembránon keresztül ürül a táptalajba. A termelt lipáz mennyisége számos környezeti tényezőtől függ, köztük a hőmérséklettől, a pH-tól, a nitrogén-, szén- és lipidforrásoktól, a keveréstől és az oldott oxigén koncentrációjától. Ahhoz, hogy a lipáz termelést növelni lehessen elsősorban a környezeti paramétereket kell optimalizálni. Különböző táptalaj-összetételeket dolgoztak ki különböző organizmusok számára. A lipáz termelést általában a lipidek serkentik, és bizonyos induktorok szintén nagy hatással vannak a lipáz termelés stimulálására. Az induktorok közé tartoznak a trigliceridek, a szabad zsírsavak, a hidrolizálható észterek, az epesók és a glicerín is ([Ghosh és munkatársai, 1996](#); [Treichel és munkatársai, 2010](#)). A lipáz enzim előállításának mértéke nemcsak a környezeti paraméterek optimalizálásán keresztül a termelés fokozásával érhető el, de az enzim tisztításával egyaránt lehetséges ([Javed és munkatársai, 2018](#)).

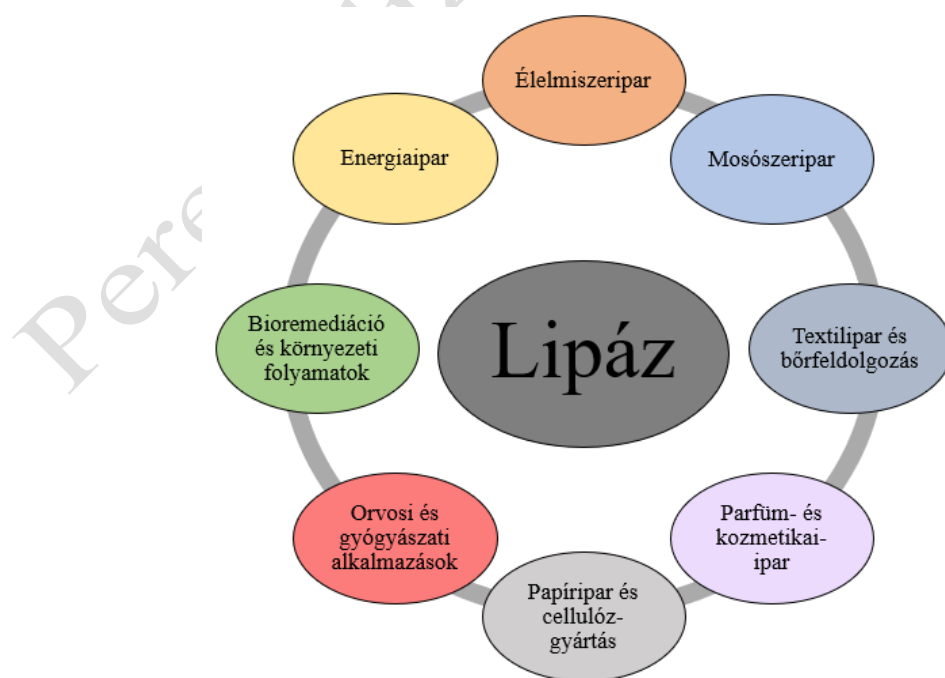
Számos szakirodalmi munka bizonyította, hogy az olívaolaj és a Tween 80 fokozzák a lipázaktivitást ([Corzo és Revah, 1999](#); [Ghosh és munkatársai, 1996](#); [Fickers és munkatársai, 2004](#); [Fickers és munkatársai, 2005](#); [Kapturowska és munkatársai, 2012](#)). Ghosh és munkatársai ([1996](#)) kimutatták, hogy a glükóz, mint szénforrás a *P. fragi* lipáz termeléséhez elengedhetetlen, míg a *P. aeruginosa* nem igényli. Továbbá megfigyelték, hogy a glükózzal kiegészített táptalajok az általuk vizsgált összes gomba esetében maximális lipáz-hozamot eredményeztek.

A *Y. lipolytica* élesztőgomba lipáz termelésének fokozására több megközelítés is született ([Corzo és Revah, 1999](#); [Fickers és munkatársai, 2004](#); [Amaral és munkatársai, 2006](#)). Köztük Corzo és Revah ([1999](#)) azt tapasztalta, hogy a tápközeg olíva- vagy kukoricaolaj tartalma látványosan fokozta a *Y. lipolytica* 681 lipázaktivitását, illetve megállapították, hogy a karbamid volt a legjobb nitrogénforrás az enzimtermeléshez, valamint az alacsony szintű levegőztetés növelte a lipolitikus aktivitást és a micéliumképződést a tápközegben. Emellett Tween 80 hozzáadásával növelni tudták az extracelluláris lipáz aktivitást a biomassa koncentrációjának változása nélkül. Az olajsav azonban erősen gátolta a lipázt. Fickers és munkatársai ([2004](#)) azt vizsgálták, hogy módosítja-e a tápközeg szén- és nitrogénforrás összetétele a *Y. lipolytica* élesztő lipáz termelését. Megállapították, hogy a *Y. lipolytica* mutáns által termelt extracelluláris lipáz előállításához a tripton N1 volt a legjobb

nitrogén- és szénforrás, valamint, hogy a termelt lipáz szintje akkor volt a legnagyobb, amikor a legkisebb koncentrációban volt jelen az olajsav. A *Y. lipolytica* CBS6303 vad típusú törzs esetében az extracelluláris lipáz termelését a hosszú láncú zsírsav jelenléte serkenti, míg glükóztartalmú táptalajon az extracelluláris lipáz aktivitás viszonylag alacsony szinten és csak a tápközegben lévő ilyen szubsztrát kimerítése után mutatható ki. Amaral és munkatársai (2006) perfluorodekalint, egy perfluor-szénhidrogént (PFC) oxigénvektorként használták a táptalajban, hogy a *Y. lipolytica* számára az oxigén elérhetőségének növelésével fokozzák a lipáz termelődését. Ennek eredményeképpen a lipáz termelés a 23-szorosára nőtt 20% (v/v) PFC hozzáadásával 250 rpm fordulatszámra.

3.4. Lipáz enzim ipari felhasználása

A lipáz enzim széles körben alkalmazható számos iparágban, pl. a tejiparban, az élelmiszer- és italgyártásban, az állati takarmányozásban, a tisztításban, a bioüzemanyag-, a gyógyszer-, a textil, kozmetikai, parfüm- és aromaiparban, a finomvegyyszerek előállításában, az agrokémiai termékek, a bioszenzorok és a bioremediáció területén (Chandra és munkatársai, 2020). A lipázok sokoldalú felhasználásuknak köszönhetően nagymértékben hozzájárulhatnak a biotechnológiai ipar bővüléséhez, mivel a reakciók széles skáláját katalizálják, amelyek elsősorban a nyersanyagok biológiai feldolgozásában vagy a szerves vegyianyagok szintézisében játszanak szerepet (Sarmah és munkatársai, 2018). A lipáz néhány ipari alkalmazását az alábbiakban mutatom be (3. ábra).



3. ábra: A lipáz potenciális alkalmazási területei

3.4.1. Élelmiszeripar

A lipázokat katalizátorként használják az élelmiszeriparban azért, hogy a zsírok és olajok szelektív hidrolízisével zsírsavakat szabadítsanak fel az élelmiszeripari termékekben. A zsírok és olajok módosítása a lipáz egyik legfontosabb alkalmazási területe az élelmiszerfeldolgozó iparban ([Sarmah és munkatársai, 2018](#)). A kereskedelmi lipázokat elsősorban a tejiparban alkalmazzák a sajtok, tejszín és más tejtermékek ízének kialakítása, javítása érdekében. A jellegzetes íz a tej hidrolízise során a szabad zsírból keletkező zsírsavak eredménye. Emellett ezek a zsírbontó enzimek hozzájárulnak a sajt érlelésének felgyorsításához is. A lipázokat a vajban és a margarinban ízfokozóként is alkalmazzák, valamint különböző sütőipari termékek eltarthatósági idejének meghosszabbítására ([Raveendran és munkatársai, 2018](#); [Sarmah és munkatársai, 2018](#); [Sindhu és munkatársai, 2021](#)). Használják emulgeálószerként a pékáruk és a tészták állagának és szerkezetének javítására, továbbá adalékanyagként az állati takarmányozásban ([Casas-Godoy és munkatársai, 2018](#)). Ezen túlmenően alkalmazzák őket a komplex bioanyagok módosítására és lebontására, hús- és haltermékek zsírtalanítására. A foszfolipázokat az iparban a tojássárgája kezelésénél használják majonéz és más emulgeálószer előállításához, a lecitin módosításához, valamint a növényi olajok finomításánál az olajbontási lépésben ([Sarmah és munkatársai, 2018](#)). Alkoholos italokban, például borban, az aroma módosítható lipázzal. A lipázokkal egyaránt találkozhatunk a gyümölcsök, zöldségek fermentálásánál, illetve a tej-, hús- és sütőiparban is. Az olyan zöldségek, mint a káposzta, uborka, kelbimbó stb. tejsavbaktériumokkal erjeszthetők. Egy tanulmány vizsgálatai azt mutatták, hogy a szabad zsírsavak (FFA) mennyisége jelentősen megnőtt a fermentált káposztában és kelbimbóban ([Seitz, 1974](#)). Egy későbbi vizsgálatban pedig azt találták, hogy az uborka tejsavas erjesztése során valamennyi lipidfrakcióban jelentős változások következtek be, köztük az FFA közel négyszerére növekedett a savanyúságképződés során. Ezeket az eredményeket a tejsavbaktériumok által a 22 napos fermentációs időszak alatt képződött lipázok által végzett zsírhidrolízissel magyarázták. ([Seitz, 1974](#)).

A lipázokat bioszenzorként is alkalmazzák a trigliceridek mennyiségi meghatározására. A trigliceridből felszabaduló glicerinnel mennyiségi meghatározása által a lipidtartalom közvetett mérésére alkalmazható. A lipázokat glükóz-oxidázzal kombinálva pH/oxigén elektródákra lehet immobilizálni, ezek lipid-bioszenzorként működnek, s triglicerid- és vérkoleszterin-meghatározásokban használhatók ([Ray, 2012](#); [Raveendran és munkatársai, 2018](#); [Sarmah és munkatársai, 2018](#)).

3.4.2. Mosószeripar és textilipar

A textilipar szintén használ lipázokat az enzimatis mosáshoz és a farmerek kezeléséhez. A proteázok mint mosószeradalékok nagy kereskedelmi sikere után az enzimipar komoly erőfeszítéseket tett a lipázok, mosószer enzimeként való alkalmazásának bevezetésére ([Choudhury és Bhunia, 2015](#)). Adalékanyagként történő alkalmazásuk a mosó- és tisztítószerekben napjainkban gyorsan növekszik, mivel magas hőmérsékleten és lúgos pH-n aktívak és stabilak, valamint a mosószer-proteázokkal és más felületaktív anyagokkal szemben toleránsak. A lipázok a mosó- és tisztítószer összetételében kulcsfontosságú funkcionális vegyületet alkotnak, és az összes előállított lipáz mintegy 32%-át a mosó- és tisztítószeriparban használják ([Sarmah és munkatársai, 2018](#)).

Lipázokat adnak a háztartási mosogatógépek tisztítószeréhez is, ahol feladatuk a zsírmaradványok eltávolítása és az eldugult lefolyók tisztítása ([Ray, 2012](#); [Casas-Godoy és munkatársai, 2018](#)). A lipázokat proteázokkal és amilázokkal kombinálva használják a tisztítószer hatékonyságának javítására. A lipáz adszorbeálódik a szövet felületén, majd stabil szövet-lipáz komplexet alkot, amely víz hozzáadásával katalizálja a kémiai kötések lebontását. A mosószeriparban leggyakrabban használt lipáz előállító mikroorganizmusok közé tartozik a *Staphylococcus arlettae*, a *Burkholderia cepacia*, a *P. fluorescens* és a *Candida* fajok. Várhatóan a lipázok a következő néhány évben sokoldalúságukból és a mosószer és kozmetikumok piacán való folyamatos térnyerésükből fognak profitálni ([Ray, 2012](#)).

3.4.3. Parfüm- és kozmetikai ipar

A lipázokat széles körben alkalmazzák a kozmetikai és parfümiparban számos felületaktív anyag, aromavegyület, illatanyagok előállítására, továbbá a testápolókban lágyítószerként használják őket ([Sarmah és munkatársai, 2018](#); [Casas-Godoy és munkatársai, 2018](#)). A viasz, fahéjsav, ellagsav, ferulasav észtereit lipáz-katalizált észteresítéssel szintetizálják, amelyek aroma/illatanyag vegyületekként, gyógyszerek előanyagaként, valamint kozmetikai és fényvédő szerek adalékanyagaként használhatók. A lipázok elsődleges összetevői a külsőleg alkalmazott krémeknek vagy a szájon át beadott gyógyszereknek, amelyek a zsír eltávolításával segítik a fogysítást. A szépségiparban *P. fluorescens* és a *Pseudomonas cepacia* lipázokat használnak a mentol-észterek előállítására, amelyek a szájöblítőkben mentolos ízt, a borotvakrémekben borsmenta illatot kölcsönöznek ([Sarmah és munkatársai, 2018](#)). A parfüm- és kozmetikai ipar a *Y. lipolytica* lipázait is felhasználja. A lavandulil-acetát felbontását a megfelelő (R)- és (S)-lavandulolra a *Y. lipolytica* NCIM 3639-ből izolált

extracelluláris lipázok felhasználásával végezték. Megfigyelték, hogy a *Y. lipolytica* NCIM 3639-ből származó extracelluláris és sejthez kötött lipázok eltérő viselkedést mutatnak: az extracelluláris lipáz sokkal gyorsabban hidrolizálja az (S)-lavandulil-acetátot, mint a megfelelő (R)-enantiomer. Ezzel szemben a sejthez kötött lipáz sokkal gyorsabban hidrolizálja az (R)-lavandulil-acetátot, mint a megfelelő (S) enantiomer. A lavandulol az illóolajok alkotórésze, és fontos adalékanyag a parfüm- és kozmetikai iparban ([Brígida és munkatársai, 2014](#)).

3.4.4. Orvosi és gyógyászati alkalmazások

A lipázokat gyakran használják az orvostudományban diagnosztikai eszközként, mivel ezen enzimek vérben mért szintje egyes betegségek és fertőzések markereként szolgál. A vérben lévő magas enzimszint összefüggésbe hozható az akut hasnyálmirigy-gyulladás és a hasnyálmirigy elváltozás kialakulásával. Az orvosi ágazatban a lipázokat a szérum triglicerid (TAG) szintjének meghatározására is használják – a TAG-ek szabad zsírsavakká és glicerinné történő átalakításával – ([Casas-Godoy és munkatársai, 2018](#); [Pérez és munkatársai, 2019](#)). A lipázok alkalmazása fontos a gyógyszeriparban az átészterezés és a hidrolízis folyamatok megvalósítására. Ezek az enzimek, a zsírok emulgeálására való képességük miatt, felhasználhatók emésztési zavarok esetén, így más enzimekkel, mint például a proteázokkal együtt segíthetik az emésztést. A lipázok további felhasználási területei lehetnek a daganatos és a gyulladásos betegségek, valamint az elhízás és a cukorbetegség kezelése. A bőrfertőzések kezelésére krém készítményekben is alkalmazható a lipáz más enzimekkel, például kollagenázokkal együtt. A lipázok segítenek fenntartani a bőr szerkezetét és megvédik azt a környezet okozta károsodásoktól ([Pérez és munkatársai, 2019](#)).

3.4.5. Papíripar és cellulóz gyártás

A fa a papír- és cellulózipar fő forrása, viszont a fában lévő gyanta jelenléte komoly problémákat okoz a papír- és cellulózgyártásban. A gyanta hidrofób komponensekből, főként trigliceridekből és viaszokból áll. A lipázokat az 1990-es évek eleje óta rutinszerűen alkalmazzák a nagyüzemi papírgyártás során, hogy az előállított cellulózból eltávolítsák a gyantát. Az alkalmazott lipáz *C. rugosa* eredetű ([Choudhury és Bhunia, 2015](#); [Chandra és munkatársai, 2020](#)). A hulladékpapír festéktelenítésénél szintén jelentős szerepet tölt be a lipáz enzim, ugyanis növelheti a cellulóz pépesítési sebességét, intenzitását és fehérségét, csökkentheti a vegyszerhasználatot, a szennyvíz szennyezettségi szintjét,

meghosszabbíthatja a berendezések élettartamát, mindezek által energia és idő takarítható meg a használatával, valamint csökkentheti az összetett költséget is. A *Pseudomonas sp.* KWI-56 lipáz használata például feljavította a papír fehérségét és csökkentette a tartós tintafoltokat ([Chandra és munkatársai, 2020](#)).

3.4.6. Bioremediáció és környezeti folyamatok

A lipázokat széles körben használják olajban gazdag maradékvizek kezelésére, szerves törmelékek lebontására és számos egyéb ipari szennyvíz kezelésében ([Casas-Godoy és munkatársai, 2018](#)). A lipáz termelő baktériumok tenyésztése és a szennyvízbe való bejuttatása segítségül szolgál az ipari szennyvizek, az élelmiszerhulladék, a tejipari hulladék, a gyapjából származó zsír, a trágya és az olajsajtoló üzemek szennyvizének kezelésében. A szennyvíztisztító telepeken a zsírok enzimátikus kezelésével akár 90%-ban hidrolizálható a főként triglicerideket tartalmazó iszap. Az aktív iszapos eljárás során a lipázok alkalmazásával a levegőztetett tartályok felületéről folyamatosan eltávolított vékony zsírrétegek révén, lehetővé válik az oxigénszállítás, és a biomassza fenntartása. Ezért a mikroorganizmusok szerepe a szennyvízhulladék kezelésében nem vitatható, emellett a hatékonyság a lipáz termelő baktériumok immobilizálásával és géntechnológiai módszerekkel tovább javítható ([Sarmah és munkatársai, 2018](#)).

3.4.7. Energiaipar

A kenőanyagok, a biodízel és a biokerozin környezetbarát megoldást jelentettek az üzemanyagválságra, mivel olyan megújuló, biológiailag lebomló és nem mérgező üzemanyagok, amelyek növényi olajok és állati zsírok enzimátikus átészterezésével könnyen előállíthatók ([Aarthy és munkatársai, 2014](#); [Casas-Godoy és munkatársai, 2018](#)). A biodízelt, az alternatív üzemanyagok ígéretes formáját világszerte különböző olajok/zsírok alkohollal történő átészterezésével állítják elő. Az enzimátikus átészterezésnek számos előnye van a kémiai átészterezéssel szemben, mint például a melléktermék glicerin könnyű visszanyerése tisztított formában, a minimális hulladéktermelés, a kisebb energiafelhasználás stb. A szakirodalomban számos tanulmányt közöltek a lipáz-katalizált biodízelszintézisről különböző étkezési és nem étkezési olajok felhasználásával, ilyen *B. cepacia* lipáza is, amely a ricinusolaj – ami egy nem étkezési olaj – átészterezését katalizálja ([Sarmah és munkatársai, 2018](#)). Az élesztők közül, a *C. antarctica*, a *C. rugosa*, a *Cryptococcus sp.*, a *Trichosporon asahii* és a *Y. lipolytica* lipázai ismertek az ilyen reakciók katalizálására ([Aarthy és munkatársai, 2014](#)). A *Geotrichum sp.* lipázát a hulladék étolajból,

a *P. fluorescens* lipázát pedig a hulladék napraforgóolajból történő biodízelgyártáshoz használták ([Sarmah és munkatársai, 2018](#)).

3.5. *Yarrowia* fajok besorolása

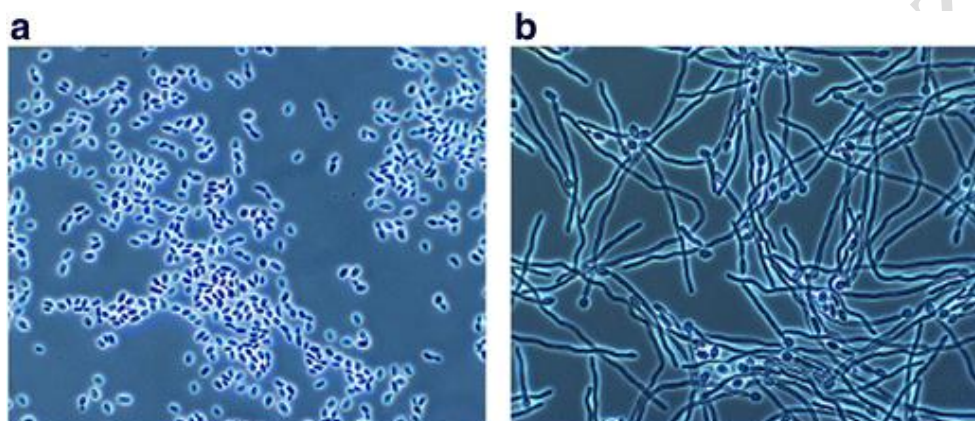
A *Y. lipolytica* filogenetikai története meglehetősen kaotikus, mivel eleinte csak az anamorf (vagyis az aszexuális állapot) volt ismert, ezért a fajt a *Candida* nemzetségbe sorolták. A teleomorfot (vagyis az ivaros állapotot) csak az 1960-as évek végén fedezték fel, (amikor megfigyelték az askospórák képződését) akkor a fajt *Endomycopsis lipolytica* néven az *Endomycopsis* nemzetségben belül írták le. Ezt viszont taxonómiai problémák miatt az 1970-es években *Saccharomycopsis*-ra változtatták és a faj *Saccharomycopsis lipolytica* néven vált ismertté. Azonban, a *S. lipolytica* jelentősen különbözött a nemzetség többi fajától, különösen az askospórák morfológiai jellemzői és a Q-9 koenzim termelésére való képessége tekintetében, így végül létrehoztak egy új *Yarrowia* nemzetséget, ami alapján *Yarrowia lipolytica* névre módosították. Több mint 50 éven át a *Y. lipolytica*-t tekintették a *Yarrowia* nemzetség egyetlen fajának, és csak két évtizede (amikor a szekvenálás rutintechnikává vált a rendszertani vizsgálatokban) sikerült más fajokat is azonosítani ([Heard és Fleet, 1999](#); [Madzak, 2021](#)).

A nagy alegység (LSU) rRNS-gén D1/D2 domének és a belső átírt spacer régiók (ITS1 és ITS2) szekvenciáinak összehasonlítása rávilágított a korábbi *Yarrowia* izolátumok közötti bizonyos heterogenitásra, és azt is kimutatta, hogy néhány, korábban az aszexuális *Candida* nemzetséghez tartozó élesztőgombát újra a *Yarrowia* kládba kellett sorolni. Négy *Candida* faj (*C. alimentaria*, *C. deformans*, *C. galli* és *C. phangngensis*) mitokondriális DNS-ének szekvenálása szintén megerősítette a *Yarrowia* kládba való tartozásukat. A *Y. lipolytica* mellett 12 további *Yarrowia*-faj szerepel az NCBI Taxonomy Browser weboldalán (Internet 2; [Nagy és munkatársai, 2013](#); [Madzak, 2021](#)).

3.5.1. *Yarrowia lipolytica*

A legújabb rendszertani besorolás a *Candida lipolytica*-t *Yarrowia lipolytica* néven írja le. A "*Yarrowia*" nemzetségnév David Yarrow-ra, a hollandiai Delft Microbiology Laboratory kutatójára utal, aki ezt a nemzetséget azonosította. A "*lipolytica*" fajnév a lipolitikus szóhoz kapcsolódik, amely a lipidek hidrolizálásának képességét jelenti ([Heard és Fleet, 1999](#); [Nicaud, 2012](#); [Zieniuk és munkatársai, 2018](#)). A *Y. lipolytica* egy obligát aerob élesztőgomba, amely természeténél fogva hidrofób szubsztrátokat tartalmazó környezetben, olajos hulladékokban és élelmiszerekben (tej- és baromfitermékekben) fordul elő. A *Y.*

lipolytica nem minősül patogénnek, és általában biztonságos státuszú élesztőnek tekintik. A szénforrások rendkívül széles skáláját képes asszimilálni, beleértve mind a hidrophil (glükóz, glicerín, fruktóz, szerves savak és alkoholok), mind a hidrofób (zsírsavak, alkánok és triglicerid) szubsztátokat ([Fickers és munkatársai, 2004](#); [Timoumi és munkatársai, 2018](#)). A környezeti körülményektől függően (stressz hatására) két különböző morfológiai változatban, egysejtű élesztő vagy a fonalas gombákra jellemző hifák formájában képes növekedni (4. ábra). A dimorfikus váltás során több alak- és mérettartományú forma van jelen. A *Y. lipolytica*-t ezen tulajdonsága miatt modellszervezetként is használták az élesztők dimorfizmusának vizsgálatához ([Timoumi és munkatársai, 2018](#)).



4. ábra: *Y. lipolytica* (W29 törzs) morfológiája oxigéndús táptalajon (a), illetve oxigénlimitáció mellett élesztőszerű formában növesztett micéliummal (b) ([Timoumi és munkatársai, 2018](#) nyomán).

Néhány, a nyilvános élesztőgyűjteményekben lévő figyelemre méltó, biotechnológiai szempontból hasznos *Y. lipolytica* törzseket mutat be a 3. táblázat.

3. táblázat: Biotechnológiailag jelentős vad típusú vagy genetikailag módosított *Y. lipolytica* törzsek ([Madzak, 2021](#) nyomán)

Törzs neve/ Eredete	Figyelemre méltó tulajdonságok	Felhasználási területek
A-101/autómosó szennyvíz, Lengyelország (nem nyilvánosan hozzáférhető)	erőteljes növekedés olajon, magas citromsavtermelés, szekvenált törzs	<i>in situ</i> talajbioremediáció, citromsavtermelés
ACA-DC 50109/ Görögország	nagyon magas lipidtartalom és termelékenység, robusztus növekedés nyers glicerinen, egyidejűleg magas lipid- és citromsavhozam	szerves savak (főleg citromsav) előállítása, mérnöki metabolikus gazdaszervezet a továbbfejlesztett GM-törzsek tervezésére
ACA-DC 5033/savas kovász, Görögország	robusztus növekedés nyers glicerinen, egyidejűleg nagy lipid- és citromsavhozam	citromsav és poliol termelés

Törzs neve/ Eredete	Figyelemre méltó tulajdonságok	Felhasználási területek
ATCC 20362/USA	robosztus növekedés, magas lipidtartalom és termelékenység	a kőolaj nyersolaj lebontása, mérnöki metabolikus gazdaszervezet a Dupont GM PUFA-termelő platformhoz
ATCC 48436/talaj, Japán	lipáz-aktivátorokat termel	lipáz enzimtermelés
H222/talaj, Németország	jobb fruktóz-asszimiláció, nagy citromsavtermelés, szekvenált törzs	szerves savtermelés, mérnöki metabolikus gazdaszervezet továbbfejlesztett GM törzsek tervezése
NCIM 3589/tengervíz, India	biofilmképzés, emulgeálószer-termelés	arany nanorészecskék előállítása
W29/szennyvíz, Franciaország	magas szintű fehérje szekréció, szekvenált törzs	szerves savak előállítása
Po1f/W29-es törzs GM változata	képes szacharózon növekedni, szekvenált törzs	heterológ fehérje előállítása, mérnöki metabolikus gazdaszervezetnek szánt GM-törzsek tervezése többféle alkalmazáshoz

3.5.2. *Yarrowia yakushimensis*

A *Y. yakushimensis* tudományos leírását [Groenewald és Smith 2013](#)-ban publikálta *Yarrowia yakushimensis* f.a. (forma asexualis), comb. nov. néven. A „*yakushimensis*” elnevezés az izolátumok eredetére, a Japánban lévő Yakushima szigetre utal. A *Yarrowia yakushimensis* megnevezésnek a latin szinonimája a *Candida yakushimensis*. Suzuki ([2004](#)) Japánban két *C. yakushimensis* törzset is izolált természetesek (*Hodotermopsis sjoestedti*) bélrendszeréből. A *Candida yakushimensis* a *Yarrowia* filogenetikai kládba tartozó faj, amelyet a *Yarrowia* új fajaként írtak le. Groenewald és Smith ([2013](#)) tanulmánya során a *Y. yakushimensis*-t a D-mannit asszimilációja és a 30°C-on való növekedésének hiánya alapján különböztették meg a *Yarrowia*-klád többi fajától (4. táblázat). A *Y. yakushimensis* tudományos besorolása a következő: Élesztőgomba, *Ascomycota*, *Saccharomycotina*, *Saccharomycetina*, *Saccharomycetidae*, *Saccharomycetales*, *Dipodascaceae*, *Yarrowia* ([Groenewald és Smith, 2013](#); Internet 3).

4. táblázat: Növekedési jellemzők, amelyek megkülönböztetik a *Y. yakushimensis*-t a többi *Yarrowia* kládba sorolt fajtól (([Groenewald és Smith, 2013](#) nyomán)

Törzs	Növekedés	
	D-mannit	30 °C
<i>Y. yakushimensis</i>	+	–
<i>C. alimentaria</i>	–	–
<i>Y. deformans</i>	+	+
<i>C. galli</i>	+/-	+
<i>C. hispaniensis</i>	+	+
<i>C. hollandica</i>	gyenge	+
<i>Y. lipolytica</i>	+	+
<i>C. oslonensis</i>	–	+
<i>C. phangngensis</i>	+	+

3.5.3. *Yarrowia divulgata*

Nagy és munkatársai ([2013](#)) *Yarrowia divulgata* f.a., sp. nov. törzseket izoláltak, amelyek különböző állati eredetű forrásokból származtak. Az egyik új törzset egy dániai szalonnafeldolgozó üzemből izolálták, két törzset az USA-ban csirkemájából, kettőt pedig hazánkban csirkemellből, illetve darált marhahúsból nyertek ki. Rakicka és munkatársai ([2016](#)) a *Yarrowia* nemzetség tizenkét fajtát vizsgálták eritrit és mannit előállítására tiszta glicerinnél, glükóznál vagy fruktóznál négy különböző táptalajon. Megállapították, hogy a *Y. divulgata* is ígéretesnek bizonyult, mint cukoralkohol- termelő törzs.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. A felhasznált *Yarrowia* nemzetséghez tartozó törzsek

Az alábbi törzseket használtam fel a kísérleti munkám során:

- *Yarrowia lipolytica* 854/4 törzs húsból izolált
- *Yarrowia yakushimensis* NCAIM Y.02049 törzs rovarból izolált
- *Yarrowia yakushimensis* NCAIM Y.02050 törzs rovarból izolált
- *Yarrowia yakushimensis* NCAIM Y.02052 törzs rovarból izolált
- *Yarrowia divulgata* NCAIM Y.02062 törzs csirkemellből izolált
- *Yarrowia divulgata* 5257 törzs darált sertéshúsból izolált

A törzsek a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményéből (NCAIM) kerültek beszerzésre, különböző húsokból, illetve rovarból származnak ([Nagy, 2015](#)).

4.2. Anyagok

4.2.1. Alkalmazott tápközegek

YEPD ferdeagar (Élesztőkivonat-pepton-glükóz agar)

A kísérleteimnél a *Yarrowia* élesztők fenntartására és felszaporítására YEPD ferdeagart alkalmaztam az alábbi 5. táblázat szerint.

5. táblázat: YEPD ferdeagar összetétele

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

A tápközeget 121 °C-on autoklávban steriliztem, 15 percen át.

Inokulum tápközeg

Inokulum tápközeg összetételét a 6. táblázat tartalmazza.

6. táblázat: Inokulum tápközeg

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

A tápközeget 121 °C-n autoklávban steriliztem, 15 percen át.

Fermentációs tápközeg

A lipáz fermentációhoz olívaolaj tartalmú YEPD táplevest használtam (7. táblázat). A kísérleti beállításoknak megfelelően Tween 80, kiegészítést alkalmaztam 0,5g/l mennyiségben. A lipáz enzim termelésének optimalizálására irányuló kísérleteimhez olívaolaj, Tween 80 és Triton X-100 tartalmú YEPD táplevest használtam. Ezen kísérleteimhez a 8. táblázat alapján mértem be a Tween 80 és Triton X-100 megfelelő mennyiségeit. A tápközeget 121 °C-n autoklávban steriliztem, 15 percen át.

7. táblázat: Fermentációs tápközeg

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

8. táblázat: Triton X-100 és Tween 80 mennyiségei

Beállítás	Triton X-100 koncentráció	Tween 80 koncentráció	Triton X-100 (%)	Tween 80 (%)
1	-1,41	0	0,01475	0,05
2	-1	1	0,025	0,075
3	0	1,41	0,05	0,08525
4	1	1	0,075	0,075
5	1,41	0	0,08525	0,05
6	1	-1	0,075	0,025
7	0	-1,41	0,05	0,01475
8	-1	-1	0,025	0,025
9	0	0	0,05	0,05
10	0	0	0,05	0,05

4.2.2. Enzimaktivitás méréshez használt oldatok

Sörensen puffer:

A 7,2-es pH-jú puffert 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) megfelelő arányú összemérésével készítettem el úgy, hogy bemértem 5,93 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -t és kiegészítettem 500 ml desztillált vízzel, majd 2,27 g KH_2PO_4 -t mértem be, ezt 250 ml desztillált vízzel egészítettem ki. 100 ml pufferhez dinátrium-hidrogén-foszfát oldatból 72,6 ml-t, kálium-dihidrogén-foszfát oldatból 27,4 ml-t mértem be.

Szubsztrátum:

25mM-os para-nitrofenil-laurát szubsztrátum oldatot alkalmaztam, 96%-os etanolban feloldva. Emellett ügyeltem arra, hogy a méréseim során mindig frissen készítsem el a szubsztrátumot.

Leállító reagens:

Leállító reagensként 0,1 N-os Na_2CO_3 oldatot használtam, amelyhez 500 ml desztillált vízben 2,65g nátrium-karbonátot oldottam fel.

4.2.3. Felhasznált eszközök

- Vízfürdő
- Rázógép
- Eppendorf centrifuga
- Spektrofotométer
- Elektromos pH mérő
- Steril lamináris fülke
- Mikroszkóp
- Bürker-kamra
- Egyéb laboratóriumi eszközök, pl.: Eppendorf csövek, centrifuga csövek, kémcsövek, Pasteur- és automata pipetták, főzőpoharak, 500 ml-es Erlenmeyer-lombikok, mérőhengerek, analitikai mérleg stb.

4.3. Módszerek

4.3.1. pH mérés

A mintáim pH értékének meghatározásához Mettler-Toledo elektromos pH mérőt alkalmaztam, melyet mérés előtt mindig kalibráltam. A pH mérő kalibrálásához, pH=2 és pH=9 kalibráló oldatokat használtam.

4.3.2. Optikai denzitás mérése

Az optikai denzitás (OD) mérést a szaporodás nyomon követése céljából végeztem. A mintáim abszorbanciáját 600 nm-re állított spektrofotométerrel mértem meg. Hígítást alkalmaztam, ha az OD érték 0,7- nél nagyobb értéket mutatott.

4.3.3. Extracelluláris lipázaktivitás mérése

Az extracelluláris lipázaktivitás méréséhez a fermentléből 1-1 ml mintát Eppendorf centrifuga csőbe helyeztem és 14000 rpm fordulatszámmal 10 percen keresztül centrifugáltam. Ezáltal két frakciót kaptam, a centrifugacső aljára leülepedett sejteket és a felülúszót. Az extracelluláris lipázaktivitás meghatározásához a megfelelően hígított

felülúszót használtam fel. Mindig két párhuzamos mérést végeztem. Az enzimaktivitás mérésének elvégzéséhez a 9. táblázat alapján állítottam össze a reakcióelegyeket. A reakció indítása előtt a reakcióelegyeket pár percig 37°C-on előinkubáltam. A reakció indításakor bemértem a mintákat (25 µl) a kémcsövekbe. A reakcióidő 10 perc volt, ezután a kémcsövekbe 250 µl Na₂CO₃ oldatot pipetázva állítottam le a reakciót. A spektrometriás mérést megelőzően a reakcióelegyeket Eppendorf csövekbe öntöttem, ezt követően 10 percig, 14000 fordulat/perc fordulatszámmal centrifugáltam, majd spektrofotométer segítségével 405 nm-en megmértem a minták abszorbanciáját.

9. táblázat: Enzimaktivitás mérés reakcióelegyei

	Desztillát víz (µl)	Szubsztrátum (µl)	Enzimoldat (µl)	Puffer (µl)
Műszer vak	125	-	-	725
Szubsztrátum vak	25	100	-	725
Enzim vak	100	-	25	725
Minta	-	100	25	725

A lipáz extracelluláris enzimaktivitását az alábbi egyenlet alapján határoztam meg:

$$\text{Lipáz enzimaktivitás} = \frac{(A_{\text{minta}} - A_{\text{enzimvak}} - A_{\text{szubsztrátumvak}})}{11,561 * \text{reakció idő}} * \text{hígítás (U/ml)}$$

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

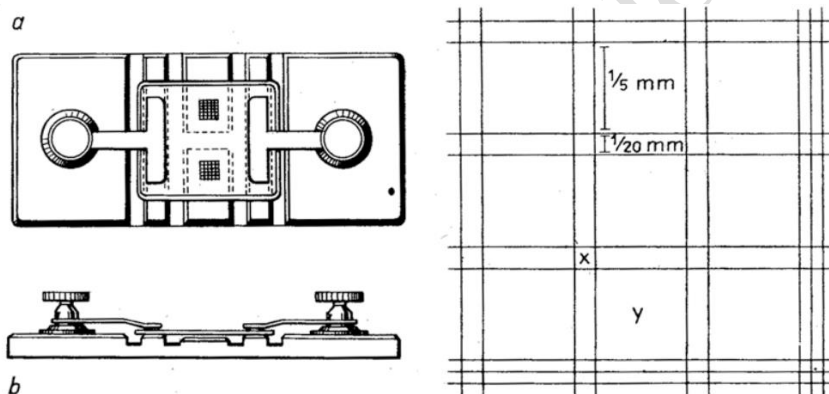
4.3.4. Fermentáció

A szkríneléses kísérleteim során a fermentációkat 5 v/v%-nyi 24 órás inokulum tenyészetekkel indítottam. Az inokulum mennyiségének optimalálása során 10⁶ sejt/ml, 5*10⁶ sejt/ml és 10⁷ sejt/ml sejtkoncentrációkat használtam. A CCD-s vizsgálatokhoz a második kísérlethez használt koncentrációk közül minden törzsnél az optimálisat alkalmaztam. A kísérleteket megelőzően átoltottam a törzseket, mely során a felhasználni kívánt mikrobákat tartalmazó ferdeagarról 1-1 nagy kacsnyi *Yarrowia* törzset vittem fel a frissen készített YEPD ferdeagar felületére. A törzsek két nap alatt felszaporodtak. Az inokulum tápközegeket két napos ferdeagarról oltottam be. A kísérletek elvégzéséhez rázott lombikos fermentációt alkalmaztam 150 ml térfogatban, 160 rpm rázatási sebesség mellett, 28 °C-on.

A szkríneléses vizsgálatomnál 312 órán át, a többi kísérletemnél pedig 168 órán át tartott a fermentáció és 24 óránként történt a mintavétel.

4.3.5. Bürker-kamrás sejtszámlálás

A felhasznált *Yarrowia* törzsek törzssoldatainak spektrofotométer segítségével megmértem az optikai denzitását, szükség szerint hígítást alkalmazva. Majd ezekből a sejtszuszpenziókból 20-20 μl -nyi mintát vettem, a mikroszkópot pedig 40x-es nagyításra állítottam. A sejtszámláláshoz Bürker-kamrát használtam (5. ábra), mely során 10 db nagy négyzetben megszámoltam a sejteket, ezután a kapott értékeket összeadtam, majd átlagoltam és az így kapott értéket beszoroztam $2,25 \cdot 10^5$ értékkel, illetve, ha volt hígítás, akkor azzal is szoroztam. Ezzel megkaptam az 1 ml mintában lévő sejtmennyiséget sejt/ml-koncentrációban.



5. ábra: Bürker-kamra felül- (a) és oldanézetben (b), illetve a Bürker-kamra beosztásai (Internet 4.)

4.3.6. Központi elrendezésű kísérlettervezés (CCD)

A felhasznált *Yarrowia* törzsek lipáz enzim termelésének optimalizálásához a központi elrendezésű statisztikai modellt használtam. Ez alapján a két vizsgált faktorom, a Tween 80 (x_1), illetve a Triton X-100 (x_2) volt. Mivel két faktorom volt, így az α értéke a 1,414 volt. A függő változónak, vagyis az optimalizálandó paraméternek pedig az enzimaktivitást (Y) választottam. A munkapont és a léptéktényező mindkét faktor esetén megegyezett, 0,05% és 0,025%. A fermentációs tápközegeben alkalmazott Tween 80 és Triton X-100 koncentrációinak a *Yarrowia* törzsek enzimtermelésére gyakorolt hatását vizsgáltam, illetve azt, hogy mely koncentrációk mellett lesz maximális az enzimtermelés. Az optimális enzimtermelés megállapításához a következő másodfokú polinomiális egyenletet alkalmaztam (ahol b_{0-5} : a regressziós együtthatók):

$$Y = b_0 + b_1 * x_1 + b_2 * x_1^2 + b_3 * x_2 + b_4 * x_2^2 + b_5 * x_1 x_2$$

A módszer elve:

A Box-Wilson-féle központi elrendezésű kísérletterv, egy beágyazott faktoriális vagy tört faktoriális tervet tartalmaz, amelynek középpontjai központi pontok, amelyeket a görbület becslését lehetővé tevő "csillagpontok" csoportjával egészítenek ki. A CCD mindig kétszer annyi csillagpontot tartalmaz, mint ahány faktor van a tervben. Az α érték a központi elrendezésű kísérletterv faktoriális részében a kísérleti futtatások számától függ. A faktorkok számának függvényében az α néhány tipikus értékét szemlélteti a 10. táblázat.

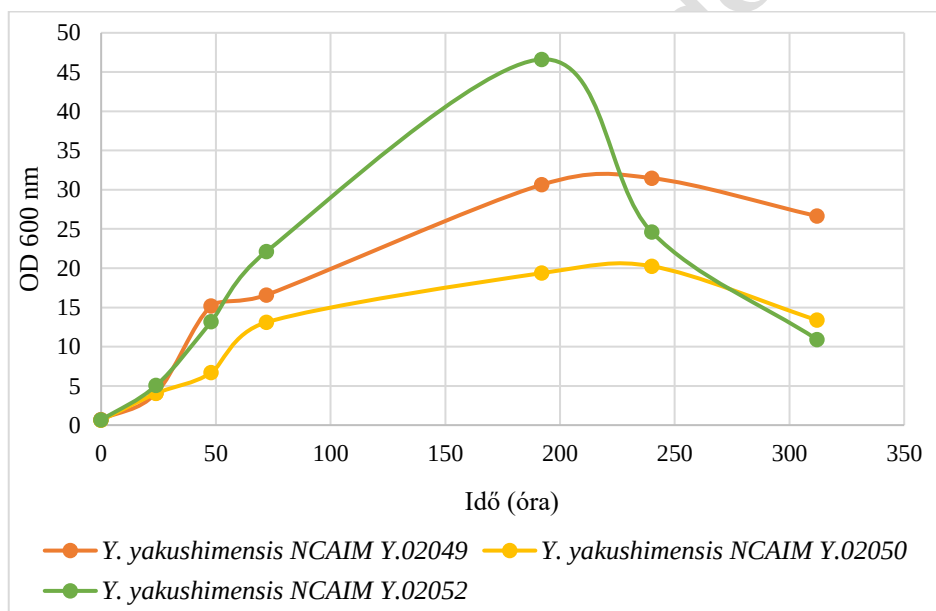
10. táblázat: Az α értékei a faktorkok számától függően a faktoriális tervrészben (Internet 5).

Faktorkok száma	Faktoriális rész	Az α skálázott értékei
2	2^2	$2^{2/4} = 1,414$
3	2^3	$2^{3/4} = 1,682$
4	2^4	$2^{4/4} = 2,000$

5. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

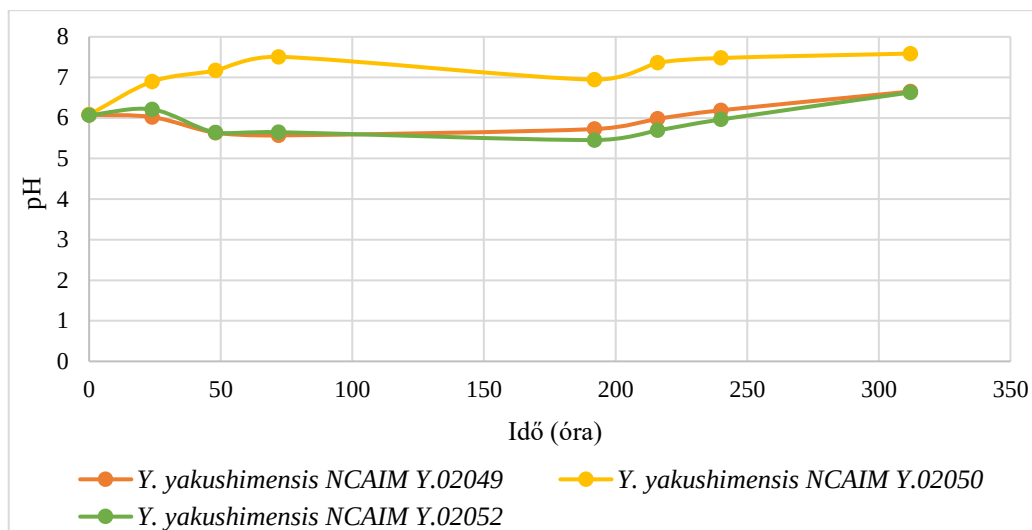
5.1. *Yarrowia yakushimensis* törzsek szkrínélése lipáz enzim termelésre

Három *Yarrowia yakushimensis* törzs szkrínélésével kezdtem meg kutatásaimat, melynek célja volt, hogy végigkövessem lipáz enzim termelésük alakulását. Emellett feladatul tűztem ki még, hogy kiválasszam a legjobban termelő törzseket a további vizsgálatokhoz. A szkrínéléshez a Biomérnök és Erjedéssipari Technológia Tanszéken rendelkezésre álló *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02049, *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02050 és *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052 törzseket választottam. Az első kísérletem folyamán tehát ezen törzsek szaporodását, extracelluláris lipáz aktivitását, illetve pH-jának változását követtem a 2 hetes fermentáció során glükóz-pepton-élesztőkivonat, valamint olívaolaj kiegészítést is tartalmazó tápközegeben.



6. ábra: *Y. yakushimensis* törzsek szaporodásának alakulása az optikai denzitás alapján glükóz-pepton-élesztőkivonat és olívaolaj kiegészítést tartalmazó tápközegeben

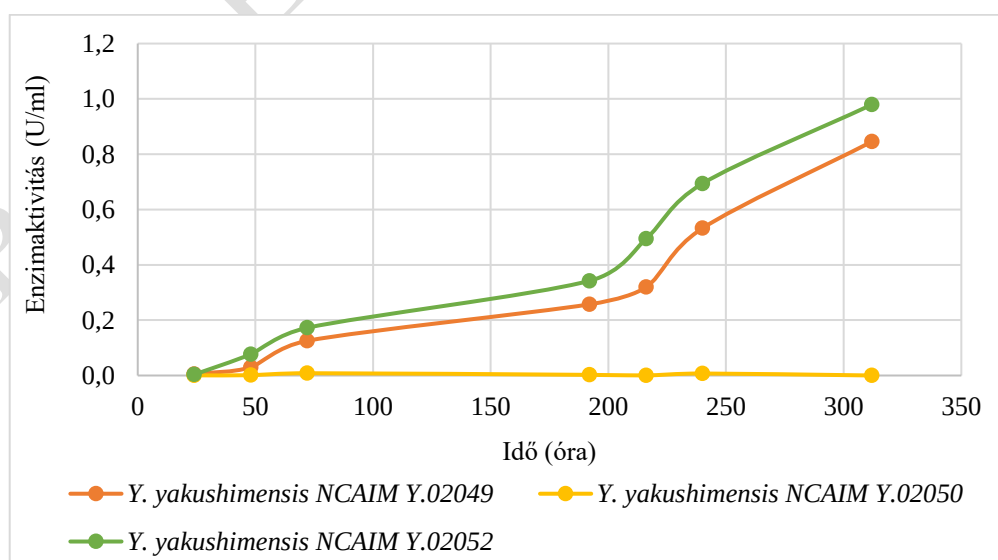
A 6. ábra a *Y. yakushimensis* törzsek szaporodásának alakulását mutatja be a fermentáció során. Mindhárom *Y. yakushimensis* törzsnél egészen a 192. óráig emelkedtek az optikai denzitás értékek, utalva a törzsek szaporodására. A 24. óráig nem volt szembetűnő különbség a vizsgált törzsek szaporodása között, ám a 48. órától a 192. óráig a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02049 és Y.02050 törzséhez képest a Y.02052 törzs jobban szaporodott. Az OD érték csökkenése a Y.02052 törzsnél már a 192. órától, míg a másik kettő esetén a 240. órától figyelhető meg.



7. ábra: *Y. yakushimensis* törzsek pH-jának alakulása glükóz-pepton-élesztőkivonat és olívaolaj kiegészítést tartalmazó tápközegben

A tenyésztések pH értékeit nézve a fermentáció során, amelyeket a 7. ábra mutat be, a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02049 és a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052 törzsének gyakorlatilag megegyezett a pH-ja a teljes kísérlet alatt. Azonban a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02050 törzs fermentációja során a kiindulási pH érték megemelkedett és a kísérlet teljes ideje alatt magasabb pH-t mértem a másik két törzshöz képest.

A törzsek lipáz aktivitását tekintve (8. ábra) jól látszik, hogy a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02050 törzs jóval kevesebb lipázt termelt, hiszen enzimaktivitása még a 0,1 U/ml-t sem éri el. Már a 72. óránál látszik, hogy a Y.02049 és a Y.02052 törzs aktivitása kezd elkülönülni a Y.02050 törzsetől.



8. ábra: *Y. yakushimensis* törzsek lipáz aktivitásának alakulása glükóz-pepton-élesztőkivonat és olívaolaj kiegészítést tartalmazó tápközegben

A 192. órától kezdve ugrásszerűen nőtt a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02049 és Y.02052 törzsek enzimettermelése. Ezek közül a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052-es törzs a 312. órára eredményezte a legmagasabb lipáz enzimaktivitást (**0,98 U/ml**) és mutatta a nagyobb értékeket végig a fermentáció során. A Y.02049-es törzs szintén a 312. órára érte a legjobb enzimaktivitást, amely 0,85 U/ml volt.

Összefüggést tapasztaltam a lipáz enzim aktivitása, illetve a pH alakulása terén, mivel a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02049 és a Y.02052 törzs esetében egyaránt magas volt a lipáz termelés, illetve ezen törzsek esetén a pH többnyire csökkent, s pH=5,5-6,6 között mozgott a fermentáció során. A *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02050 törzsnél azonban a pH 7-7,5 értékek között volt és feltételezhetően ez lehetett az oka annak, hogy alig történt enzimettermelés a kísérlet során. Ez azonban annak is betudható, hogy a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02050 törzs nem szaporodott fel olyan erősen, mint a másik kettő, ezért végül mindhárom törzset tovább vittem a következő kísérletemhez. A szakirodalomban is hasonló eredményekről számoltak be, miszerint a gombák általában alacsonyabb, pH 5,5-6,2 - értékek mellett termelnek lipázt ([Meghwanshi és Vashishtha, 2018](#)). Corzo és Revah ([1999](#)) a *Y. lipolytica* 681 lipáz termelésének fokozására tett kísérleteik során megállapították, hogy a tápközeg olívaolaj tartalma szignifikánsan ($P < 0,05$) fokozta a vizsgált mikroba lipáz aktivitását, s a maximális enzim-hozamot 37°C-on, pH 6 mellett kapták. A lipáz aktivitás szignifikánsan ($P < 0,05$) csökkent pH 8 felett.

5.2. Inokulum mennyiségének optimalizálása

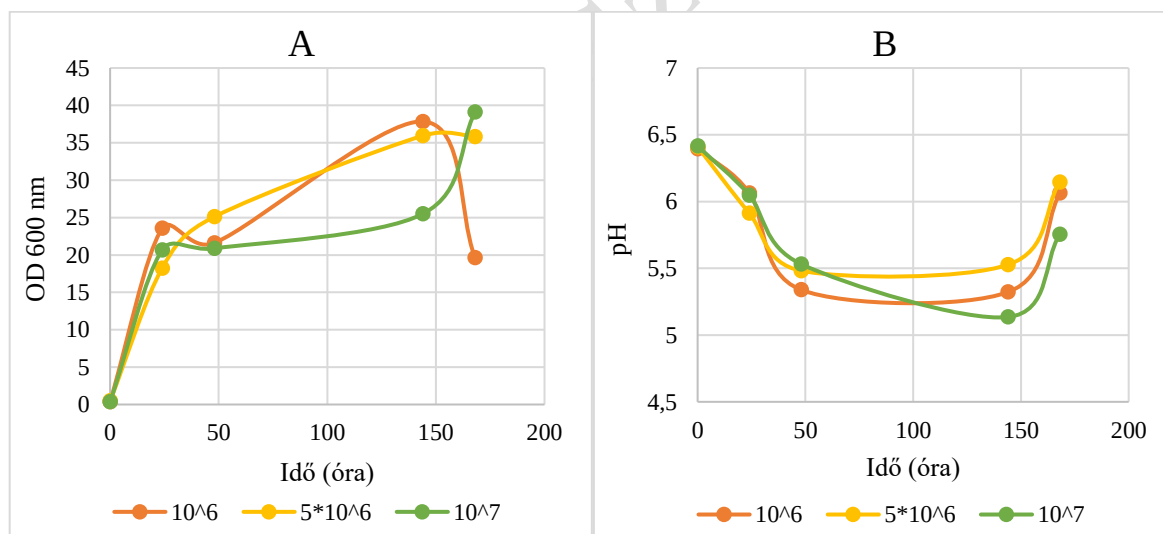
A következő kísérletem során az inokulum mennyiségének optimalizálást tűztem ki célul. Három különböző sejtkoncentráció (10^6 sejt/ml, $5 \cdot 10^6$ sejt/ml és 10^7 sejt/ml) hatását vizsgáltam az enzimettermelésre. Ezen kísérletemhez Sipiczki és munkatársai ([2019](#)) munkája alapján legjobbnak talált, *Yarrowia divulgata* fajba tartozó törzseket, emellett egy *Yarrowia lipolytica* törzset is bevontam, így a lipáz fermentációhoz az alábbi törzseket alkalmaztam: *Y. divulgata* NCAIM Y.02062, *Y. divulgata* 5257, *Y. lipolytica* 854/4, *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02049, *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02050 és *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052. A fermentáció 7 napon keresztül zajlott és a fermentáció kezdeti időpontjában, a 24. órában, a 48. órában, a 72. órában, a 144. órában és a 168. órában vettem mintát. A lipáz fermentációhoz olívaolaj tartalmú YEPD táplevest használtam, amelyhez a kísérleti beállításoknak megfelelően Tween 80 kiegészítést alkalmaztam 0,5g/l mennyiségben.

Minden minta esetében, az összes mintavételi időpontban megmértem az OD értéket, ezáltal tudtam monitorozni az egyes törzsek szaporodását, valamint nyomon követtem az adott törzsek pH változását is.

***Y. lipolytica* törzs**

A *Y. lipolytica* 854/4 törzs szaporodásának alakulását a 9. (A) ábra mutatja be. A 24. óráig mindhárom beállítás esetén exponenciális növekedés látható. Az $5 \cdot 10^6$ sejt/ml beállításnál a növekedés a 144. óráig tapasztalható, majd ezután a stacioner szaporodási fázisba lép. A legkisebb sejtkoncentrációjú (10^6 sejt/ml) beállításnál az OD értéke a 144. órában maximális, majd a 168. órára hirtelen lecsökken. A legnagyobb sejtkoncentrációjú (10^7 sejt/ml) beállításnál 24. órától a 48. óráig stagnálás látható, majd az OD értéke lassan emelkedni kezd, s a 144. órától kezdve ugrásszerűen megnő.

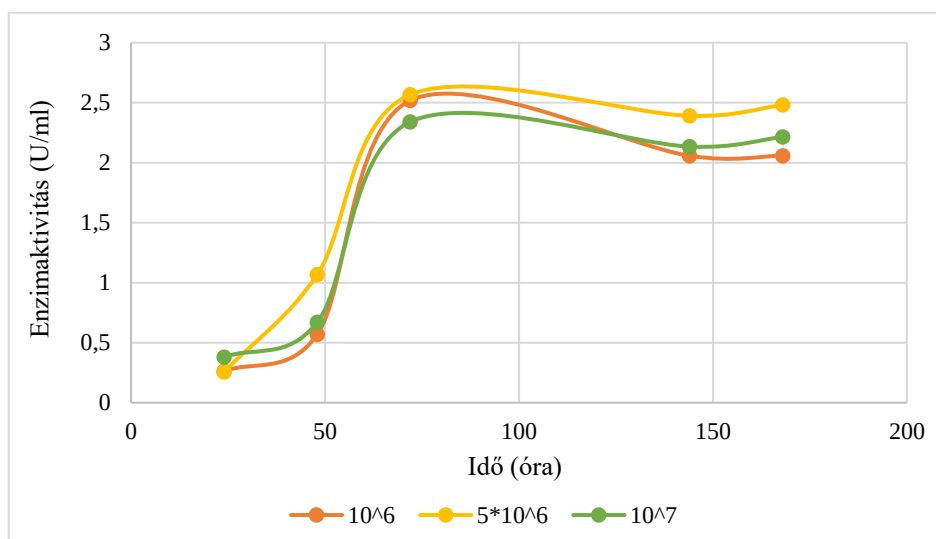
A 10^7 sejt/ml sejtkoncentrációval indított tápközeg pH-ja egészen a 144. óráig csökkent, majd ezután kezdett el nőni (9. (B) ábra). Ezzel szemben az $5 \cdot 10^6$ sejt/ml-es és a 10^6 sejt/ml-es beállításoknál a pH a 48. óráig csökkent, a 144. óráig alig változott és csak ezután kezdett el emelkedni.



9. ábra: *Y. lipolytica* 854/4-es törzs szaporodásának alakulása az optikai denzitás alapján (A) és pH-jának változása Tween 80 kiegészítést tartalmazó tápközegben (B)

A *Y. lipolytica* 854/4 törzsének fermentáció alatti enzimtermelését a 10. ábra mutatja be. Ennél a törzsnél a három különböző inokulum koncentráció aktivitásra gyakorolt hatása között nem tapasztalható számottevő különbség. Jól látható, hogy a három görbe lefutása igen hasonló. Ez a törzs az $5 \cdot 10^6$ sejt/ml-es beállítás mellett produkálta a legjobb lipázaktivitást, bár ezesetben a másik két beállítás mellett sem maradt el az enzim termelése (a 10^6 sejt/ml-esnél 2,52 U/ml, a 10^7 sejt/ml-esnél 2,34 U/ml). Az $5 \cdot 10^6$ sejt/ml-es beállítás

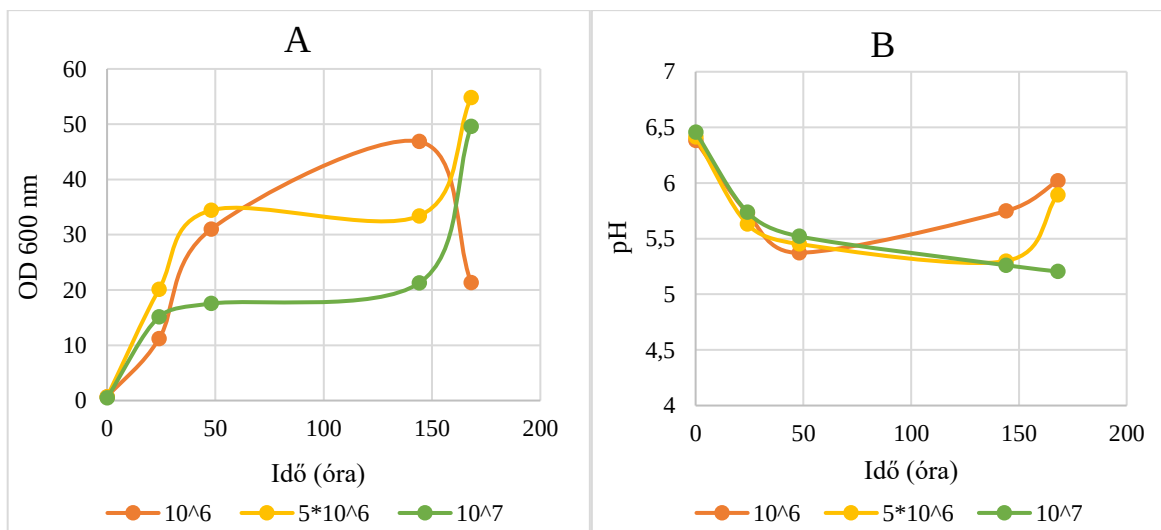
esetén a 72. órában érte el a maximumot (2,57 U/ml). Ezt az értéket később a 168. órában kishíján megismételte. Ennél a törzsnél az $5 \cdot 10^6$ sejt/ml-es beállításhoz alkalmazott sejtkoncentráció adta az optimális inokulum mennyiséget.



10. ábra: *Y. lipolytica* 854/4 törzs enzimaktivitása különböző beállítások mellett

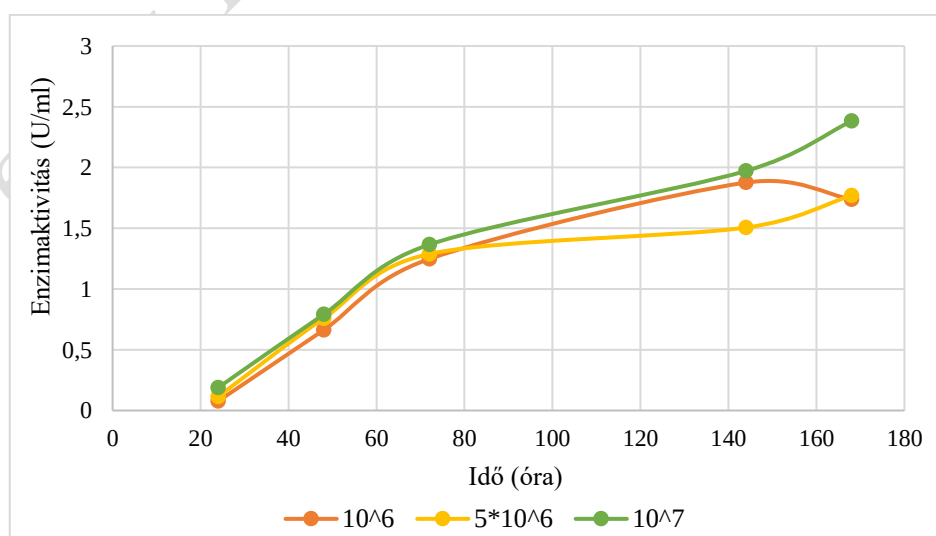
***Yarrowia yakushimensis* törzsek**

A *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02049 törzsnél a három alkalmazott beállításnál a szaporodás intenzitása eltérő volt (11. (A) ábra). Az $5 \cdot 10^6$ sejt/ml-es és a 10^7 sejt/ml-es beállításról egyaránt elmondható, hogy a mérés alatt kétszer is intenzívvé vált a szaporodásuk. Az első csúcst a 48. órában, a másodikat a 168. órában érték el, a legkisebb sejtkoncentrációjú (10^6 sejt/ml) beállítás esetén pedig először a 48. órában, majd a 144. órában érte el. A 10^6 sejt/ml-es beállításnál ezután az OD érték nagyon lecsökkent. A pH változást tekintve az látszik, hogy a kiindulástól a 24. óráig mindhárom koncentráció esetében egyszerre csökkent le a pH érték, majd innentől kezdve látható különbség a beállítások között (11.(B) ábra). A 10^7 sejt/ml-esnél az egész mérés alatt pH csökkenés látható, viszont a $5 \cdot 10^6$ sejt/ml-esnél a csökkenés csak a 144. óráig tart, majd a mérés végére ugrásszerűen megnő. A 10^6 sejt/ml-es beállítás esetén a 48. óráig látható csökkenés, de itt már ezután emelkedni kezd a pH.

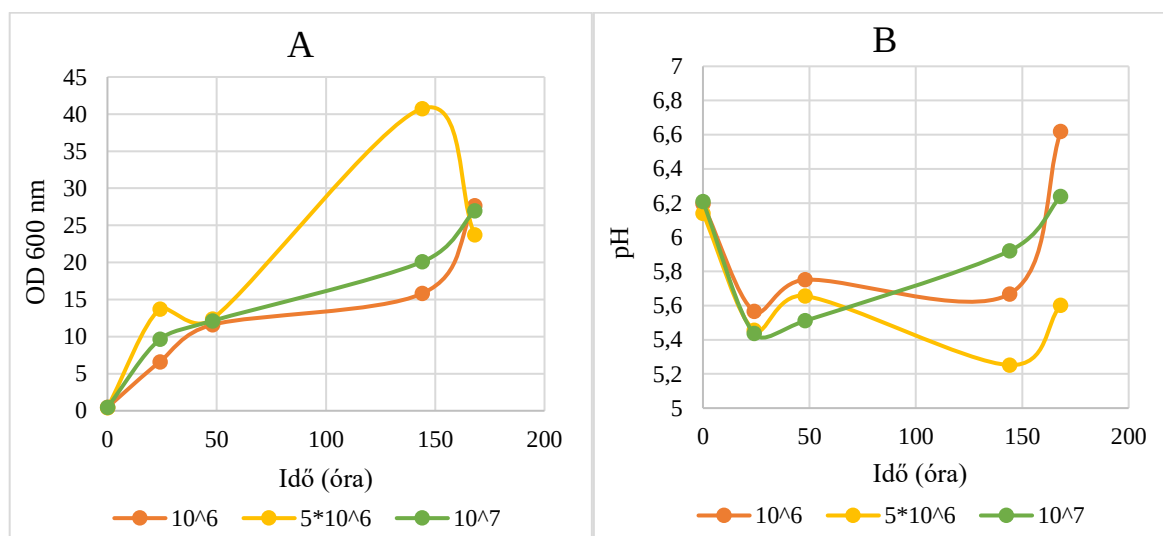


11. ábra: A *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02049-es törzs szaporodásának alakulása az OD alapján (A) és pH-jának változása Tween 80 kiegészítést tartalmazó tápközegben (B)

A *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02049 törzsének fermentáció alatti enzimtermelését mutatja be a 12. ábra. A három beállítás enzimaktivitása a 72. óráig gyakorlatilag együtt mozgott, ezután az 5*10⁶ sejt/ml-es beállítás esetén az enzimaktivitás állandósult, de a másik két beállításnál egészen a 144. óráig egyként emelkedett. Az első naptól a harmadik napig volt a legintenzívebb az enzimaktivitás, ezt egy lassabban gyorsuló enzim termelési fázis követte, majd a 144. órától a 10⁶ sejt/ml-es beállítás enzimaktivitása csökkenni kezdett, míg a másik kettőé nőtt. Az 5*10⁶ sejt/ml-es beállítás bizonyult a legkevésbé kedvezőnek, mivel itt a lipázaktivitás csupán 1,77 U/ml, a legkisebb sejtkoncentrációjú (10⁶ sejt/ml) beállításnál pedig 1,87 U/ml volt az aktivitás. A 10⁷ sejt/ml-es beállítás mellett elért aktivitás mondható a legjobbnak (2,38 U/ml), amit a 168. órában ért el.

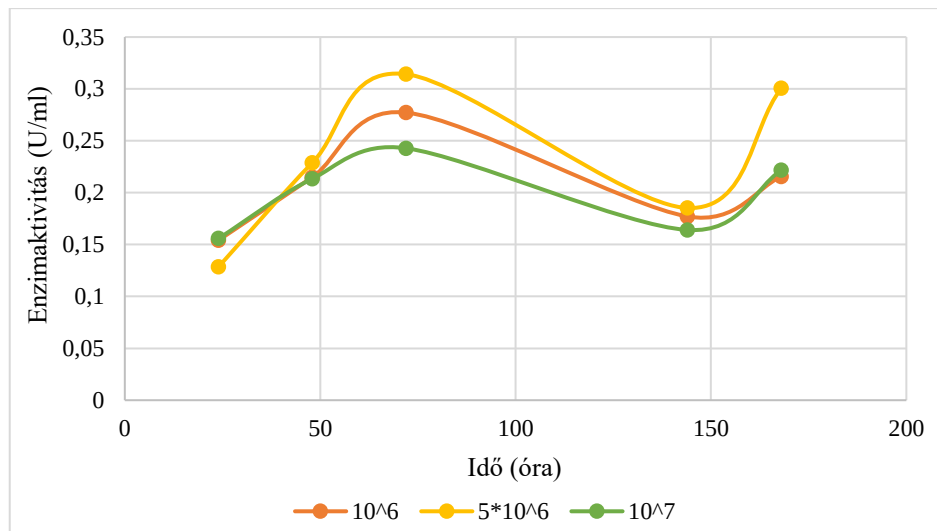


12. ábra: *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02049 törzs enzimaktivitásának alakulása különböző beállítások mellett



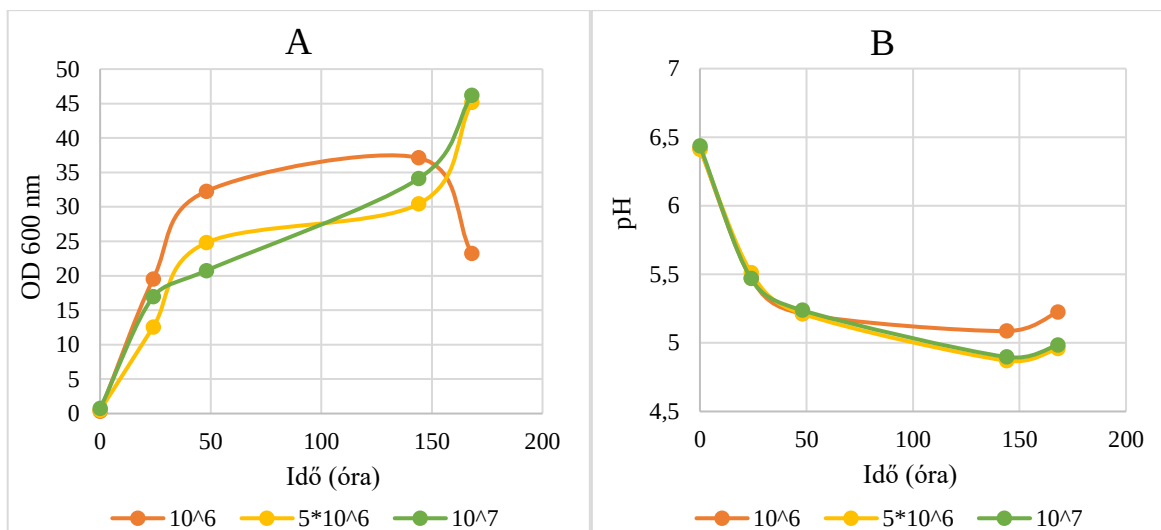
13. ábra: *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02050 törzs szaporodásának alakulása az OD alapján (A) és pH-jának változása Tween 80 kiegészítést tartalmazó tápközegben (B)

A 13. (B) ábrán látszik, hogy a Y.02050 törzsnél a pH a 24. órára az összes beállítás során hirtelen lecsökken. A beállítások a 48. órától kezdenek elkülönülni egymástól, mert innentől kezdve a pH-juk eltérő intenzitást mutat. A 48. órára a pH kissé megnő, majd a 10⁷ sejt/ml-esnél ez a növekedés a mérés végéig eltart. A másik két beállítás esetén a 48. óra után a pH lecsökken, ezt követően azonban a 144. órától ugrásszerűen megnőtt. A szaporodásukat tekintve a 24. óráig exponenciális volt a növekedés mindhárom beállítás esetében (13.(A) ábra). Ezután az 5*10⁶ sejt/ml-esnél csökkenés figyelhető meg, míg a másik kettőnél egészen a 48. óráig növekedés látható. A 10⁶ sejt/ml-esnél és a 10⁷ sejt/ml-esnél is végig növekedés tapasztalható. Az 5*10⁶ sejt/ml-es beállításnál a 48. órától a 144. óráig egy exponenciális szaporodási szakasz látható, ezután viszont az OD értéke lecsökken.



14. ábra: *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02050 törzs enzimaktivitásának alakulása különböző inokulum koncentráció mellett

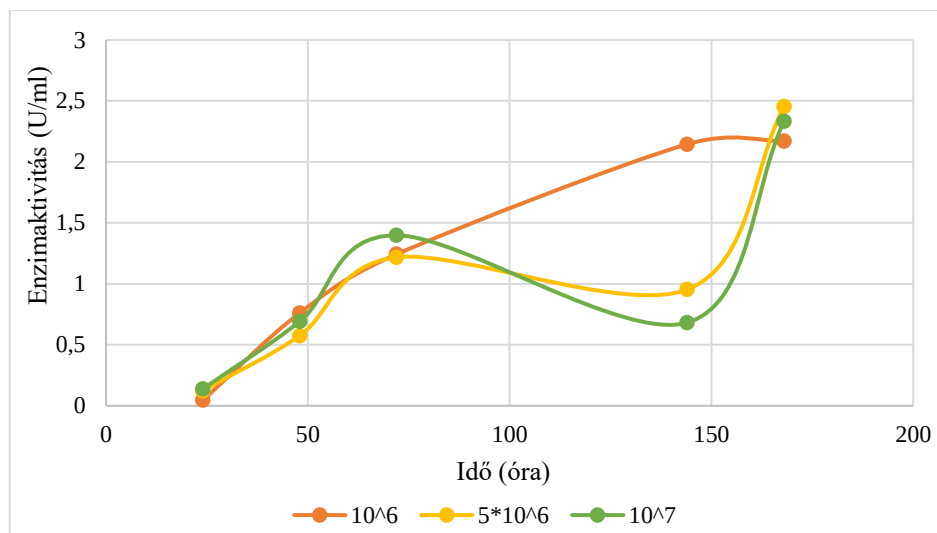
A *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02050 törzsnél a különböző beállítások enzimtermelése nagyon hasonló (14. ábra). A 48. óráig a 10^6 sejt/ml-es és a 10^7 sejt/ml-es sejtkoncentrációval indított fermentációk során az enzimtermelés gyakorlatilag megegyezik, majd ezután mindhárom beállításé elkülönül. Igen meglepő azonban, hogy a legkisebb sejtkoncentrációjú beállításnál a 48. órától a 144. óráig magasabb volt az enzimtermelés, mint a legnagyobb sejtkoncentrációjú beállítás esetén. A 168. órára már a 10^7 sejt/ml-es beállítás mellett is eléri a 10^6 sejt/ml-es beállításnál mutatott enzimaktivitást. A legkiemelkedőbb eredményt ennél a törzsnél az $5 \cdot 10^6$ sejt/ml-es beállítás eredményezte, amely a 48. órától kezdve végig több enzimet termelt, mint a másik kettő. Nagyságrendi különbségek nincsenek az aktivitás értékek között, illetve ahogy a korábbi kísérlet is mutatta, ennél a törzsnél elég szegényes az enzimtermelés, egyik beállítás során sem érte el még a 0,4 U/ml-t se. Mindhárom beállításnál a 72. órában volt aktivitási maximum, a 10^6 sejt/ml-esnél ez 0,27U/ml, az $5 \cdot 10^6$ sejt/ml-esnél ez 0,31 U/ml, végül a 10^7 sejt/ml-esnél ez 0,24 U/ml volt.



15. ábra: *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052 törzs szaporodásának alakulása az OD alapján (A) és pH-jának változása Tween 80 kiegészítést tartalmazó tápközegben (B)

A pH-értékeket tekintve ennél a törzsnél nem tapasztalható olyan szembetűnő különbség az alkalmazott beállítások között (15. (B) ábra). A pH az összes beállítás esetén csökken az idő előrehaladtával, majd csak a 144. óra után kezd el lassan növekedni, ami arra enged következtetni, hogy a fermentáció során biztosan történt szaporodás. A 10⁶ sejt/ml-es beállításnál a 48. órától a 144. óráig tartó szakaszon alig csökken a pH. A szaporodásukat nézve a 144. óráig a görbék lefutása igen hasonló, csak intenzitásukban van különbség (15.(A) ábra). Az 5*10⁶ sejt/ml-es és a 10⁷ sejt/ml-es beállításoknál a mérés egésze alatt nőtt az OD érték. A kezdeti és a 24. óra között, illetve a 144. óra és a 168. óra között exponenciális volt a növekedés. A 144. óránál a legkisebb sejtkoncentrációjú (10⁶ sejt/ml) beállítás OD értéke lecsökken.

A 16. ábrán látható, hogy a 10⁶ sejt/ml-es beállítás enzimtermelésének alakulása teljesen eltér az 5*10⁶ sejt/ml-es és 10⁷ sejt/ml-es beállításokétól, mivel gyakorlatilag a mérés egésze alatt folyamatosan nőtt az aktivitása. A másik kettő enzimtermelése között azonban alig látható különbség, a 72. óráig folyamatosan nő, majd a 144. óráig csökken az aktivitás, viszont a 168. órára ugrásszerűen megnő az enzimtermelésük. A *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052 törzs enzimaktivitás mérése során mindhárom koncentráció esetén a 168. órában vett mintánál kaptam a legjobb eredményt, a 10⁶ sejt/ml-esnél 2,17 U/ml, az 5*10⁶ sejt/ml-esnél 2,45 U/ml és a 10⁷ sejt/ml-esnél 2,33 U/ml volt az aktivitás. Ezen értékek között nincs számottevő különbség, de ennél a törzsnél az 5*10⁶ sejt/ml-es beállítást találtam a legmegfelelőbbnek.

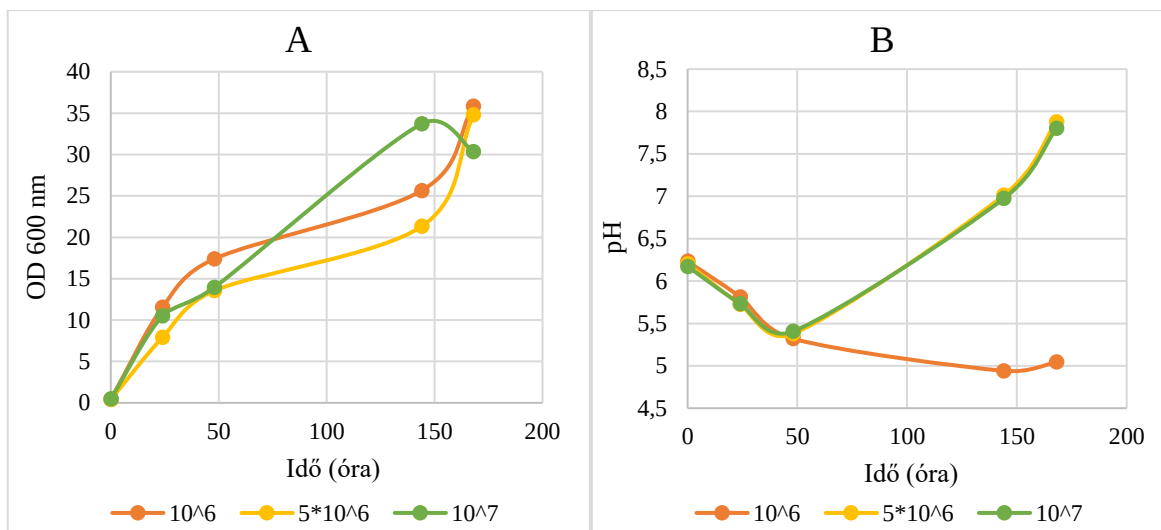


16. ábra: *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052 törzs enzimaktivitásának alakulása különböző beállítások mellett

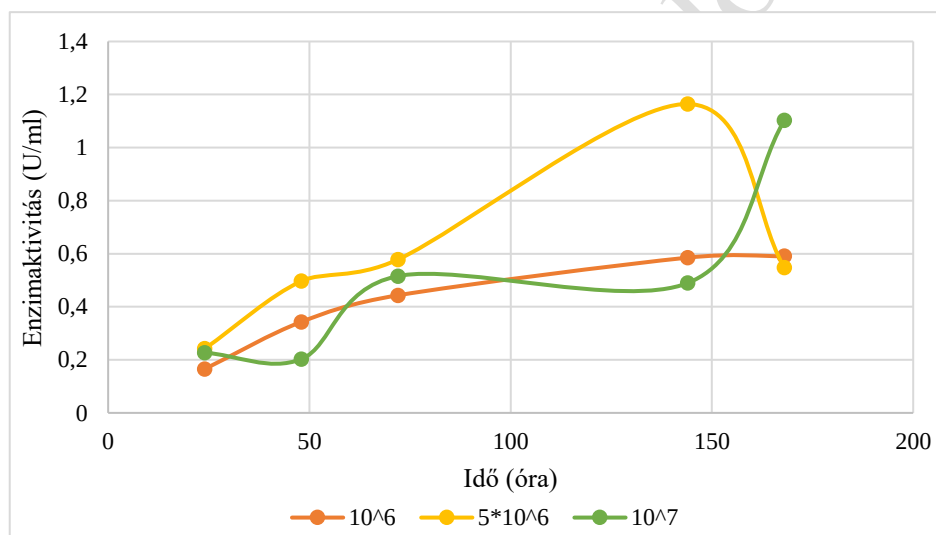
Érdekes különbség a *Y. yakushimensis* törzseknél, hogy míg a Y. 02049 és a Y.02052 -nél a pH csökkenésével nőtt az enzimaktivitás, úgy a Y.02050-nél többnyire csökkent. A *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02050 törzsnél tapasztalt alacsony pH-értékeket akár savtermelés is okozhatta, hiszen a *Y. lipolytica* törzseknél ismert, hogy nemcsak lipázt, de citromsavat is termelnek ([Madzak, 2021](#)).

***Yarrowia divulgata* törzsek**

A *Y. divulgata* NCAIM Y.02062 törzsnél a 17.(B) ábrán látható, hogy mindhárom beállítás pH-ja egyként csökkent egészen a 48. óráig, ekkor azonban az 5*10⁶ sejt/ml-es és a 10⁷ sejt/ml-es beállítások pH-ja hirtelen növekedésnek indult és a mérés végéig folyamatosan nőtt. A legkisebb sejtkoncentrációjú (10⁶ sejt/ml) beállításnál a pH egészen a 144. óráig folyamatosan csökken, majd a 168. óránál a pH csekély emelkedése látható. A szaporodásukat nézve a 144. óráig mindhárom beállításnál növekedés figyelhető meg (17.(A) ábra). A 10⁶ sejt/ml-es és az 5*10⁶ sejt/ml-es beállításnál a kezdeti és a 48. óra között, illetve a 144. és a 168. óra között a legintenzívebb az az OD érték növekedés, míg a 10⁷ sejt/ml-es koncentráció esetében a 144. óránál mért maximumot követően az OD értékek csökkentek.



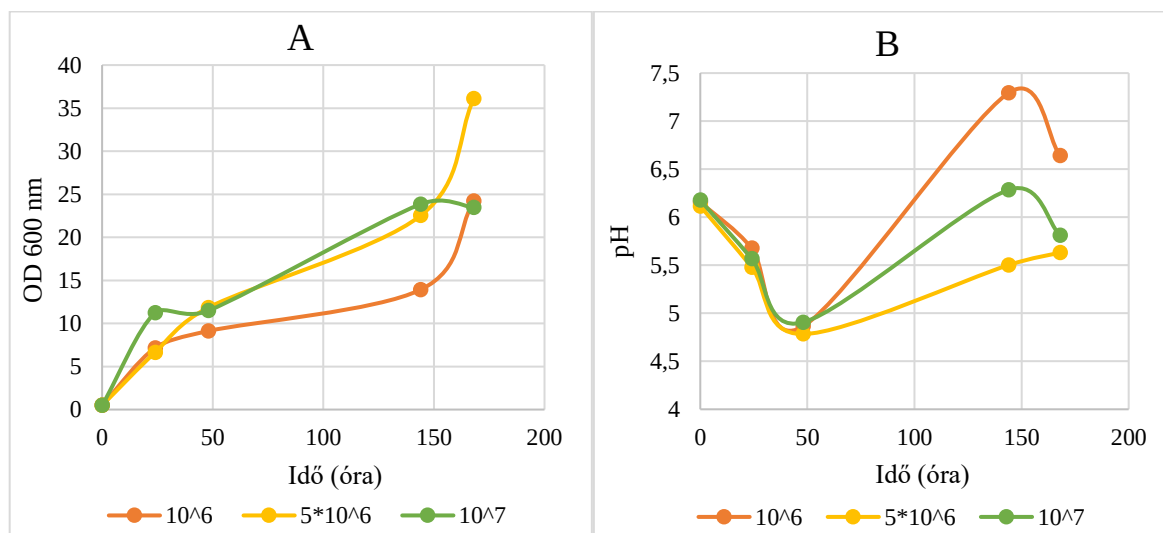
17. ábra: *Y. divulgata* NCAIM Y.02062 törzs szaporodásának alakulása az OD alapján (A) és pH-jának változása Tween 80 kiegészítést tartalmazó tápközegben (B)



18. ábra: *Y. divulgata* NCAIM Y.02062 törzs enzimaktivitásának alakulása különböző beállításonál

A *Y. divulgata* NCAIM Y.02062 törzs enzimaktivitásának alakulását a 18. ábra szemlélteti. A három beállítás enzimtermelése között eltérés volt tapasztalható. A 10⁶ sejt/ml-es beállítás esetén ugyan a 144. óráig folyamatosan nőtt az enzimaktivitás, de az egyszer sem bizonyult kiemelkedőnek. A 168. órára az enzimszintézist stagnálás jellemezte. A legnagyobb sejtkoncentrációjú (10⁷ sejt/ml) beállításonál a 48. órától, illetve a 144. órától indult be igazán a lipáztermelés. A 24. órától a 48. óráig, illetve a 72. órától a 144. óráig tartó szakaszon enyhén lecsökkent. A legkiemelkedőbb enzimaktivitási értéket (1,16 U/ml) a 144. órában az 5*10⁶ sejt/ml-es beállítás eredményezte, mely esetben a fermentáció végére, a 168. órára

történt drasztikusabb enzimaktivitás csökkenés. A további kísérletekhez, így az $5 \cdot 10^6$ sejt/ml-es beállítást választottam.

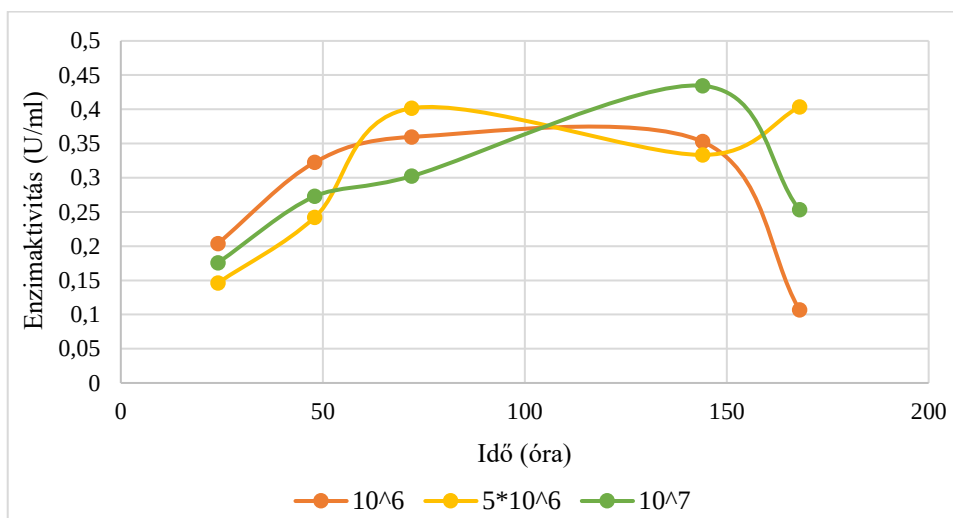


19. ábra: *Y. divulgata* 5257 törzs szaporodásának alakulása az OD alapján (A) és pH-jának változása Tween 80 kiegészítést tartalmazó tápközegben (B)

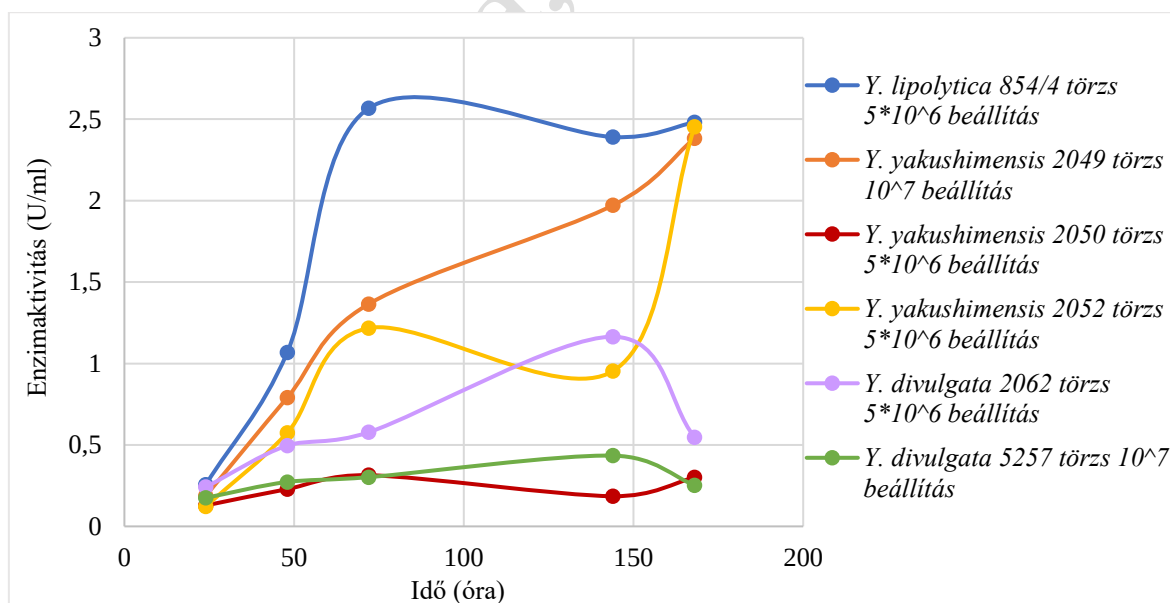
A *Y. divulgata* 5257 törzsnél a három beállítás pH-jának változása egészen a 48. óráig közel azonos volt (19. (B) ábra). A pH folyamatos csökkenése után, a 48. órától kezdve a különböző beállításoknál eltérő intenzitással nőtt a pH. A legintenzívebben a 10^6 sejt/ml-esnél, ezt követte a 10^7 sejt/ml-es, majd pedig az $5 \cdot 10^6$ sejt/ml-es beállítás pH-ja. A 144. óra után a 10^6 sejt/ml-es és a 10^7 sejt/ml-es beállítás pH-ja csökkenni kezdett. Az OD-értékeket tekintve a 10^6 sejt/ml-es és a 10^7 sejt/ml-es beállítás görbéinek lefutása a 144. óráig nagyon hasonló volt, annyi különbséggel, hogy a 10^7 sejt/ml-esnél a szaporodás intenzívebb volt (19.(A) ábra). Ezt követően pedig a 10^6 sejt/ml-es inokulum koncentrációval indított közegben az OD a 168. órára ugrásszerűen megnőtt, míg a 10^7 sejt/ml-es beállítás OD értéke a 144. óra után csökkenni kezdett. Az $5 \cdot 10^6$ sejt/ml-es és a 10^6 sejt/ml-es beállítások a 24. óráig egyként mozogtak. Az $5 \cdot 10^6$ sejt/ml-esnél a fermentáció során az optikai denzitás.

A három különböző beállításnál a 24. órától a 48. óráig ugyan eltérő intenzitással, de nagyon hasonlóan nőtt az enzimaktivitása. Az $5 \cdot 10^6$ sejt/ml-es beállítás kezdetben alacsonyabb enzimaktivitás értékeket vett fel, de a 72. órára ennek a beállításnak volt a legjobb az enzintermelése. A 72. órától viszont lecsökkent és még a 168. órára sem tudta felülmúlni a 10^7 sejt/ml-es beállítás mellett – a 144. órában – kapott enzim mennyiséget. A 168. órára mind a 10^6 sejt/ml-es, mind a 10^7 sejt/ml-es beállításnál csökkent az enzintermelés. A *Y. divulgata* 5257 törzs enzimaktivitás mérése során a 10^7 sejt/ml-es beállítás esetén a 144.

órán vett mintánál kaptam a legkiemelkedőbb eredményt, ami 0,43 U/ml volt. Ugyanez az érték sem sokkal nagyobb, mint a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02050 törzs által elért maximális mennyiség (0,31 U/ml), de mivel a *Y. divulgata* törzset az előzőekben még nem használtam, a jól teljesítő (1,16426 U/ml aktivitású) *Y. divulgata* NCAIM Y.02062 törzs mellett a *Y. divulgata* 5257 törzsét is tovább vittem a következő kísérletbe.



20. ábra: *Y. divulgata* 5257 törzs enzimaktivitásának alakulása különböző inokulum koncentráció mellett



21. ábra: A felhasznált törzsek lipázaktivásai, a legjobb beállítások mellett

A 21. ábrán a legjobb beállítás mellett kapott enzimaktivitásokat ábrázoltam, hogy az alkalmazott törzsek enzimettermelését jobban össze tudjam hasonlítani egymással. A

különböző *Yarrowia* törzsek közül kiemelkedő enzimaktivitással rendelkezett a *Y. lipolytica* 854/4-es törzse, emellett a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052- és a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02049-es törzse is. Ez utóbbi két törzs a 168. órára gyakorlatilag elérte a *Y. lipolytica* enzimaktivitását és mivel csak ebben az órában érték el a valódi maximumukat így lehetséges, hogy egy hosszabb ideig tartó fermentáció során akár felül is múlhatták volna azt. Ezekhez képest a lipáz enzimaktivitás nagyságrendekkel elmarad a *Y. divulgata* 5257-es törzs és a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02050-es törzs esetében. A *Y. divulgata* törzsek közül a *Y. divulgata* NCAIM Y.02062 törzs által termelt lipáz mennyisége (1,16426 U/ml) a 144. órában még felülmúlta a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052 törzsét (0,95 U/ml). Egy rövidebb ideig tartó fermentáció során a *Y. divulgata* NCAIM Y.02062 törzs is jó enzintermelőnek minősülne. Érdekes különbségként azt tapasztaltam, hogy a *Y. divulgata* törzsek a 144. órára érték el a legmagasabb enzintermelést, majd ezen maximum elérése után már csak csökkenő tendenciát mutattak. Ezzel ellentétben a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02050 és 2052 törzsek először a 72. órában értek el egy csúcsot, majd a 144. órára csökkent az enzintermelésük végül azonban a 168. órában érték el a valódi maximumukat.

A kutató munkám további részében már nem használtam a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02050-es törzset, mert nem bizonyosult jó lipáz termelőnek.

A legtöbb törzs esetén az $5 \cdot 10^6$ sejt/ml-es beállítás eredményezte a legmagasabb enzimaktivitási értékeket. A három legkiemelkedőbb törzsnél a *Y. lipolytica* 854/4 (2,56 U/ml) és a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052-nél (2,45329 U/ml) is az $5 \cdot 10^6$ sejt/ml-es volt a legoptimálisabb, a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02049-nél (2,38249 U/ml) viszont a 10^7 sejt/ml-es beállítás bizonyult a legmegfelelőbbnek. Azonban törzsenként nézve nem tapasztaltam szembevető eltérést a különböző sejtkoncentrációjú beállítások között, így véleményem szerint egyik törzs esetében sem befolyásolta jelentősen az enzintermelést.

Lipáz előállítása céljából számos kutató használt különféle mikroorganizmus alkalmazásával különböző mennyiségű beoltási inokulumot. Muralidhar és munkatársai (2001) a *Candida cylindracea* 10%-os (v/v) inokulumszintjét használta, hogy 47,25 U/ml maximális lipáz-hozamot érjen el olívaolaj, élesztőkivonat, malátakivonat, pepton és Tween-80 felhasználásával. Kamini és munkatársai (1998) tanulmányából az derül ki, hogy az *A. niger* lipáztermeléséhez az $1,07 \cdot 10^8$ spóra/g szubsztrátum beoltási inokulum koncentrációt látták optimálisnak, ám a koncentráció növelése nem eredményezett szignifikáns aktivitás emelkedést. Elibol és Özer (2000) immobilizált *Rhizopus arrhizus* fonalgombának

lipáztermelését kutatták. Továbbá az inokulumszint lipáz-hozamára gyakorolt hatásának megállapítása érdekében négy különböző spórakoncentrációval végeztek kísérletsorozatot, viszont azt tapasztalták, hogy a spórainokulum koncentrációja nem volt jelentős hatással a lipolitikus aktivitásra. Salihu és munkatársai (2011) szerint a nagy inokulumsűrűség befolyásolhatja az enzimtermelést a rendelkezésre álló tápanyagokért folytatott verseny miatt, illetve az alacsony sűrűség a sejtek számának csökkenése miatt az enzimszekréció mérséklődését is eredményezheti. A 10^8 sejt/ml koncentrációjú, 1,0 és 5,0% (v/v) közötti különböző inokulumszinteket tesztelték, hogy meghatározzák a lipáz maximális termeléséhez szükséges inokulum mennyiséget. A legnagyobb, 6,2 U/ml-es lipolitikus aktivitást 2%-os (v/v) inokulum mennyiségnél kapták. Pereira és munkatársai (2019) a *Y. lipolytica* optimális lipáz-hozamát 27.9 °C-on, 187 rpm rázatási sebesség és pH 5,0 mellett, 0,96 g/l inokulum koncentrációval érték el. Kísérleteik során az inokulum koncentráció az, ami a legnagyobb hatással volt az enzimaktivitásra. Azonban esetükben ez egy negatív hatás volt, ez viszont azt jelenti, hogy a nagy sejtkoncentrációjú beoltási inokulum mennyiség a lipáztermelés csökkenéséhez vezet. Érdekes a maximális lipázaktivitást alacsonyabb sejtkoncentrációval előállítani.

5.3. Tween 80 és Triton X-100 hatásának vizsgálata az enzimtermelésre

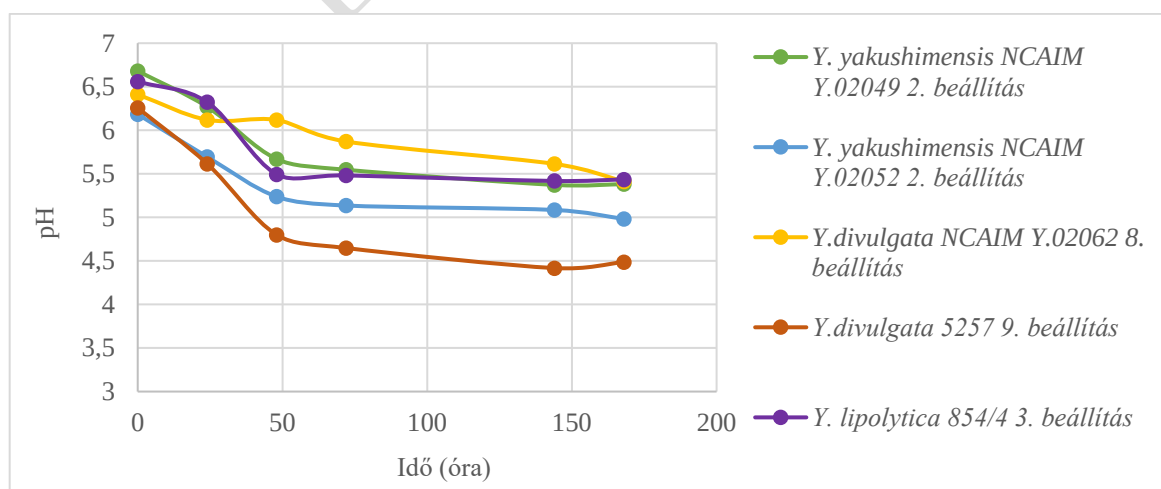
Ezen kísérletem során 5 *Yarrowia* törzs (*Y. lipolytica* 854/4, *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02049, *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052, *Y. divulgata* NCAIM Y.02062, *Y. divulgata* 5257) lipáz enzim termelésének optimalizálását végeztem el. Vizsgáltam a Tween 80, illetve a Triton X-100 indukáló hatását központi elrendezésű statisztikai modell (CCD) alkalmazásával. Azért ezt a modellt választottam, mert a módszert gyakran használják optimalizációs feladatokhoz, a hatékonyságának köszönhetően, figyelembe véve az alacsony mintaszámot (Nwabueze, 2010). Az egyes beállításokat a 8. táblázat szemlélteti.

Minden törzs esetében a számára optimálisnak bizonyult sejtkoncentrációt használtam a fermentációs tápközeg beoltásakor. Nyomon követtem az egy hetes fermentáció során az OD600 és a pH érték változását, valamint az aktivitás értékeket is. Utóbbi esetében a legmagasabb aktivitást eredményező napon a mintákat statisztikai módszerrel kielemeztem a szignifikáns hatás tanulmányozása végett (11. táblázat). A *Y. lipolytica* 854/4-nél és a két *Y. yakushimensis* törzs esetében a 168. óránál volt a legjobb az aktivitás, a két *Y. divulgata* törzsnél a 144. órát választottam, mert a legtöbb beállítás esetén a 144. órában mért aktivitás volt a legnagyobb.

11. táblázat: A felhasznált *Yarrowia* törzsek a legjobb enzimaktivitást elért napon kapott enzimaktivitás értékei

Minta	Felhasznált törzsek lipázaktivitásai (U/ml)				
	<i>Yarrowia lipolytica</i> 854/4	<i>Yarrowia divulgata</i> NCAIM Y.2062	<i>Yarrowia divulgata</i> 5257	<i>Yarrowia yakushimensis</i> NCAIM Y.02049	<i>Yarrowia yakushimensis</i> NCAIM Y.02052
1	2,30	1,36	1,04	1,69	1,47
2	2,42	1,30	1,11	2,10	1,54
3	2,55	1,28	0,99	2,08	1,40
4	1,75	1,28	1,15	1,93	1,40
5	1,95	1,35	1,04	1,95	1,12
6	1,61	1,29	1,01	1,75	1,19
7	2,49	1,32	0,94	1,80	1,29
8	2,29	1,40	1,44	1,14	1,34
9	2,26	1,39	1,48	1,22	1,11
10	2,25	1,39	1,44	1,22	1,27

A 11. táblázat mutatja be a felhasznált törzseknél a legmagasabb aktivitást elért napon kapott eredményeket. A *Y. yakushimensis* törzseknél a 2. beállítással (0,0375 g Triton X-100 és 0,1125 g Tween 80), a *Y. divulgata* 5257 törzsnél a 9. beállítással (0,075 g Triton X-100 és 0,075 g Tween 80), a *Y. divulgata* NCAIM Y.02062-nél a 8. beállítással (0,0375 g Triton X-100 és 0,0375 g Tween 80), végül a *Y. lipolytica* 854/4-nél pedig a 3. beállítással (0,075 g Triton X-100 és 0,127875 g Tween 80) kaptam a legkimagaslóbb aktivitás értékeket. Az enzimaktivitás alapján a felhasznált törzseknél a legjobb beállítás melletti pH alakulását a következő diagram szemlélteti (22. ábra).



22. ábra: Az alkalmazott törzsek pH értékeinek alakulása, a legjobb beállítások mellett

A *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02049 törzs görbájének lefutása nagyon hasonlít a *Y. lipolytica* 854/4 törzséhez, annyi különbséggel, hogy a Y.02049-nél a pH értékek a kezdeti és a 48. órában kissé magasabbak (22. ábra). A felhasznált törzsek közül négynél a 48. óráig csökkent a pH. A *Y. divulgata* NCAIM Y.02062-nél csak a 24. óráig csökkent, ezután a 48. óráig stagnált, majd ezt követően ismét csökkenésnek indult, ami egészen a mérés végéig eltartott. Ezen törzs míg a 24. óráig alacsonyabb, addig a 48. órától a 144. óráig magasabb pH értékeket mutatott, mint a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02049 és a *Y. lipolytica* 854/4 törzsek. Mind a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052, mind a *Y. divulgata* 5257 törzsek pH értékei a három másik törzshöz képest az egész fermentáció alatt alacsonyabbak voltak. A *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052 és a *Y. divulgata* 5257 törzsek pH-jának változása a 24. óráig megegyezett. A Y.02052 esetén a pH végig csökkent, bár a 72. órától a 144. óráig állandósulni látszik, ezután is csökkenés tapasztalható. A *Y. divulgata* 5257 törzsének pH értékei a legalacsonyabbak, a 48. órától a 144. óráig folyamatosan csökkent, majd a 168. órára enyhe növekedés figyelhető meg.

12. táblázat: A felhasznált törzsek p-értékei, a szignifikáns eredmények kiemelésével

Törzsek	p- érték				
	Triton X-100	Triton X-100 (Q)	Tween 80	Tween 80 (Q)	Triton X-100 + Tween 80
<i>Y. lipolytica</i> 854/4	0,070848	0,312607	0,670255	0,672201	0,980356
<i>Y. divulgata</i> NCAIM Y.2062	0,081994	0,160487	0,046319	0,010798	0,120832
<i>Y. divulgata</i> 5257	0,406064	0,074393	0,79117	0,043659	0,201494
<i>Y. yakushimensis</i> NCAIM Y.02049	0,172036	0,030343	0,033238	0,015733	0,084522
<i>Y. yakushimensis</i> NCAIM Y.02052	0,034278	0,207492	0,089567	0,107784	0,982305

A 12. táblázatból látszik, hogy a legjelentősebb szignifikáns hatást az enzimtermelésre a *Y. divulgata* NCAIM Y.02062 törzs ($p=0,010798$), illetve a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02049 törzs esetén ($p=0,015733$) a Tween 80 másodfokú koefficiense (Tween 80 (Q)) adta. Ezen törzsek esetén a lineáris Tween 80 is nagyban befolyásolta az enzimaktivitást, mivel p-értékei ($p=0,033238$; $p=0,046319$) ebben az esetben is szignifikánsak voltak 0,05-ös valószínűségi szinten. Továbbá a Tween 80 másodfokú koefficiense a *Y. divulgata* 5257 törzs enzimaktivitására is szignifikáns hatással volt ($p=0,043659$) ugyanezen a valószínűségi szinten. Míg a *Y. lipolytica* 854/4 és a *Y. divulgata* NCAIM Y.02062 törzsének enzimtermelését a Triton X-100, addig a *Y. divulgata* 5257 törzset a másodfokú Triton X-100 befolyásolta jelentősen ($p=0,070848$; $p=0,081994$; $p=0,074393$). A *Y. yakushimensis*

NCAIM Y.02049 törzs enzimaktivitására az előbb említetteken kívül még a Triton X-100 másodfokú koeficiense is szignifikáns hatással volt ($p=0,030343$). A *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052 törzsnél csak a Triton X-100-ra kapott p-érték lett szignifikáns. Tehát megállapítható, hogy a Triton X-100-nak van szignifikáns eredménye ($p=0,034278$), vagyis csak ez van szignifikáns hatással az enzimaktivitásra 0,05-ös valószínűségi szinten. A kölcsönhatási tag (Tween 80 + Triton X-100) komoly hatással volt a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02049 törzs lipáz-hozamára ($p=0,084522$). A lineáris Tween 80 erőteljesen fokozta a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052 törzs lipáz szintézisét ($p=0,089567$).

Jól látható különbségek voltak a kísérlet során az alkalmazott beállításoknál, ami minden általam felhasznált törzsnél megjelent. A 23. ábra szemlélteti, a fermentációs tápközegekben alkalmazott Tween 80 és Triton X-100 koncentrációinak a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02049-es törzs enzim-hozamára gyakorolt hatását. Szabad szemmel is látható, hogy a termelt enzim mennyiségeknek megfelelően miként térnek el színben a minták egymástól. A 4; 5; 6, illetve a 9-es és a 10-es minták színe kevésbé tejszerű, ezen esetekben a termelt enzim mennyisége is kevesebb volt a többi mintához képest.



23. ábra: *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02049 törzs izolátumai $5 \cdot 10^6$ -os koncentráció mellett a 168. órában

A statisztikai eredményekből az derül ki, hogy ugyan mindkét felületaktív anyagnak van hatása, jelentős befolyása azonban csak a Tween 80-nak volt a felhasznált törzseim extracelluláris lipáz aktivitására, ettől függetlenül a Triton X-100 is jó induktornak bizonyult a fermentációk során.

Több mikroorganizmus esetén is vizsgálták a felületaktív anyagok lipáztermelés javítására gyakorolt hatását, de eltérő eredmények születtek. Lin és munkatársai (1995) a *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F111 baktérium lipáz termelésének fokozására számos felületaktív anyagot, mint a tween 20, tween 60, tween 80 vizsgáltak, illetve többféle Triton polimert is teszteltek, köztük a Triton X-15, X-45, X-200 és X-305-t, de ezek nem javították az enzim-

hozamot. A Triton X-100 különböző koncentrációval is kísérleteztek, kis mennyiségű Triton X-100 hozzáadásával az aktivitás jelentősen nőtt, végül a baktérium a 2 g/l Triton X-100 tartalmú közegben termelte optimálisan a lipázt. Sukohidayat (2018) szintén megállapította, hogy a Triton X-100 koncentrációjának növelése a (*Leuconostoc mesenteroides*) bakteriális lipáz aktivitásának emelkedéséhez vezetett. A nem ionos felületaktív anyagok, mint a Triton X-100, indukálják a lipáz aktivitást, és ezért csökkentik az enzim denaturációját. Emellett a Triton X-100 az enzim-szubsztrát kölcsönhatás befolyásolásával is növelheti az enzimaktivitást, amelyben ennek a nem ionos felületaktív anyagnak a hozzáadása megakadályozta az adszorbeált enzim inaktiválódását. Azonban 50%-os (m/m) Triton X-100 koncentrációnál a lipáz aktivitás csökkenni kezdett, mivel a felületaktív anyagok magasabb koncentrációja negatívan befolyásolta a feloldott enzim mennyiségét és a katalitikus hatását.

Az élesztőgombáknál is indukáló hatást gyakorolt a Triton X-100 az enzim-hozamra. A *C. rugosa* 0,45 g/l Triton X-100 jelenléte ötszörösére növelte az enzimtermelést, a felületaktív anyagot nem tartalmazó mintákhoz képest ([Perna és munkatársai, 2017](#)).

A Tween 80 több mikroba esetén növelte az extracelluláris lipázaktivitást, ilyen a *Burkholderia glumae* ([Boekema és munkatársai, 2007](#)), a *Penicillium simplicissimum* ([Silva és munkatársai, 2014](#)) és a *Y. lipolytica* ([Carvalho és munkatársai, 2023](#)).

Corzo és Revah ([1999](#)) a *Y. lipolytica* 681 lipáz termelésének fokozását kutatták. Ennek eredményeképpen a Tween 80 0,5 és 2 g/l közötti koncentrációja növelte az extracelluláris lipázaktivitást a biomassza koncentrációjának változása nélkül.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A mikrobiális lipázoknak egyre nagyobb szerepük van az iparban, többek között hő- és pH-stabilitásuk, szubsztrátspecifitásuk és szelektivitásuk miatt, továbbá azért, mert 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 miatt. Napjainkban jó néhány folyóiratban beszámoltak ezen faj kozmetikai iparban, a mosószeriparban való felhasználásáról, illetve a hulladékolajok és a szennyvizek kezelésében betöltött szerepéről. Mindemellett gyógyászati és orvosi alkalmazásai egyaránt ismertek. Véleményem szerint azonban nemcsak a *Y. lipolytica*, hanem a *Yarrowia* nemzetség egyéb fajai is alkalmasak lehetnek az iparban, ugyanis erős proteolitikus és lipolitikus aktivitással rendelkeznek.

Kutatómunkám során 6 *Yarrowia* (*Y. divulgata* NCAIM Y.02062, *Y. divulgata* 5257, *Y. lipolytica* 854/4, *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02049, *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02050, *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052) törzset vizsgáltam extracelluláris lipáz termelésre és optimálásra. A szkrínelés során a *Yarrowia* törzsek extracelluláris enzimtermelésével, pH-juk és szaporodásuk alakulásának vizsgálatával foglalkoztam. Feladatul tűztem ki a beoltott inokulum mennyiségének optimálását, valamint a lipáz-hozam fokozását Tween 80 hozzáadásával. Továbbá a Tween 80 és a Triton X-100 felületaktív anyagok optimális koncentrációjának meghatározásával foglalkoztam a lipázaktivitás indukálása céljából.

A szkríneléses vizsgálatom során olívaolaj kiegészítést tartalmazó tápközeggel dolgoztam. Megállapítottam, hogy a három *Y. yakushimensis* törzs közül kettő (*Y. yakushimensis* NCAIM Y.02049, *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052) igen jó enzimtermelő, amelyek a 312. órára érték el a maximumukat.

A beoltási inokulum mennyiségek optimálásakor a tápközeghez az olívaolajon felül induktorként Tween 80-at is használtam. A *Y. lipolytica* 854/4 (2,56725 U/ml), törzse mellett igen kiemelkedő aktivitással rendelkezett még a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02049, *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052, illetve a *Y. divulgata* NCAIM Y.02062 aktivitása is viszonylag magas volt. A csak olívaolaj kiegészítést tartalmazó tápközeggel a Y.02049 aktivitása 0,84532 U/ml, a Y.02052 törzsé 0,97926 U/ml volt, míg a már Tween 80-at is tartalmazó kísérletnél e két törzs aktivitása jóval magasabb volt (Y.02049: 2,38249 U/ml; Y.02052: 2,45329 U/ml). Ezen eredmények egyértelművé tették, hogy a Tween 80 erőteljesen növelte az enzimtermelést.

Végül a központi elrendezésű statisztikai modell segítségével a Triton X-100 és a Tween 80 enzimtermelésre gyakorolt indukáló hatását vizsgáltam. A statisztikai kiértékelés alapján megállapítható, hogy ugyan mindkét felületaktív anyagnak volt hatása, jelentős befolyása csak a Tween 80-nak volt a felhasznált törzseim extracelluláris lipáz-hozamára. Ettől függetlenül a Triton X-100 is jó induktornak bizonyult a mérés során. Habár az itt elért aktivitás eredmények nem múlták felül az olívaolajat és Tween 80-at tartalmazó tápközegnél elért lipáz-hozamokat.

Összességében mivel a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02049 és a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052 enzim-hozama gyakorlatilag elérte a *Y. lipolytica* 854/4-t, így akár egy hosszabb ideig tartó fermentáció során még felül is múlhatják azt. Emiatt úgy gondolom, hogy a *Y. lipolytica* mellett a *Y. yakushimensis*-ek egyaránt ígéretesek lehetnek az ipar számára.

7. IRODALMI HIVATKOZÁSOK

Aarthy, M., Saravanan, P., Gowthaman, M. K., Rose, C., & Kamini, N. R. (2014). Enzymatic transesterification for production of biodiesel using yeast lipases: An overview. Chemical engineering research and design, 92(8), 1591-1601. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2014.04.008>

Amaral, P. F., Rocha-Leão, M. H. M., Marrucho, I. M., Coutinho, J. A., & Coelho, M. A. Z. (2006). Improving lipase production using a perfluorocarbon as oxygen carrier. Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology, 81(8), 1368-1374. <https://doi.org/10.1002/jctb.1478>

Benno, Y. (2004). Microbe division (RIKEN BRC JCM). Annual Report of the Riken Biological Research Center, 905-914.

Boekema, B. K., Beselin, A., Breuer, M., Hauer, B., Koster, M., Rosenau, F., Jaeger, K. E., & Tommassen, J. (2007). Hexadecane and Tween 80 stimulate lipase production in *Burkholderia glumae* by different mechanisms. Applied and environmental microbiology, 73(12), 3838–3844. <https://doi.org/10.1128/AEM.00097-07>

Borrelli, G. M., & Trono, D. (2015). Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications. International journal of molecular sciences, 16(9), 20774-20840. <https://doi.org/10.3390/ijms160920774>

Brígida, A. I., Amaral, P. F., Coelho, M. A., & Goncalves, L. R. (2014). Lipase from *Yarrowia lipolytica*: Production, characterization and application as an industrial biocatalyst. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 101, 148-158. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.11.016>

Carvalho, A. S. S., Sales, J. C. S., Nascimento, F. V. do, Ribeiro, B. D., Souza, C. E. C. de, Lemes, A. C., & Coelho, M. A. Z. (2023). Lipase Production by *Yarrowia lipolytica* in Solid-State Fermentation Using Amazon Fruit By-Products and Soybean Meal as Substrate. Catalysts, 13(2), 289. <https://doi.org/10.3390/catal13020289>

Casas-Godoy, L., Gasteazoro, F., Duquesne, S., Bordes, F., Marty, A., & Sandoval, G. (2018). Lipases: an overview. Lipases and Phospholipases, 3-38. DOI: [10.1007/978-1-4939-8672-9_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8672-9_1)

Chandler, I. C. (2001). Determining the regioselectivity of immobilized lipases in triacylglycerol acidolysis reactions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78(7), 737-742. <https://doi.org/10.1007/s11746-001-0335-7>

Chandra, P., Singh, R., & Arora, P. K. (2020). Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. *Microbial Cell Factories*, 19(1), 1-42. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01428-8>

Choudhury, P., & Bhunia, B. (2015). Industrial application of lipase: a review. *Biopharm J*, 1(2), 41-47.

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)

Deive, F. J., Carvalho, E., Pastrana, L., Rúa, M. L., Longo, M. A., & Sanroman, M. A. (2009). Strategies for improving extracellular lipolytic enzyme production by *Thermus thermophilus* HB27. *Bioresource Technology*, 100(14), 3630-3637. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.02.053>

Eastmond, P. J. (2006). SUGAR-DEPENDENT1 encodes a patatin domain triacylglycerol lipase that initiates storage oil breakdown in germinating *Arabidopsis* seeds. *The Plant Cell*, 18(3), 665-675. DOI: [10.1105/tpc.105.040543](https://doi.org/10.1105/tpc.105.040543)

Eko Sukohidayat, N. H., Zarei, M., Baharin, B. S., & Manap, M. Y. (2018). Purification and Characterization of Lipase Produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ATCC 8293 Using an Aqueous Two-Phase System (ATPS) Composed of Triton X-100 and Maltitol. *Molecules* (Basel, Switzerland), 23(7), 1800. <https://doi.org/10.3390/molecules23071800>

Elilbol, M., & Özer, D. (2000). Lipase production by immobilised *Rhizopus arrhizus*. *Process Biochemistry*, 36(3), 219-223. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00191-6](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00191-6)

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(6-7), 527-543. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.09.004>

- Fickers, P., Nicaud, J. M., Gaillardin, C., Destain, J., & Thonart, P. (2004). Carbon and nitrogen sources modulate lipase production in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Applied Microbiology*, 96(4), 742–749. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02190.x>
- Ghosh, P. K., Saxena, R. K., Gupta, R., Yadav, R. P., & Davidson, S. (1996). Microbial lipases: production and applications. *Science Progress* (1933-), 79(2), 119–157. <http://www.jstor.org/stable/43421608>
- Godtfredsen, S.E. (1990). Microbial Lipases. In: Fogarty, W.M., Kelly, C.T. (eds) *Microbial Enzymes and Biotechnology*. Springer, Dordrecht. 255-274. https://doi.org/10.1007/978-94-009-0765-2_7
- 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. DOI: [10.1007/s10482-013-9882-8](https://doi.org/10.1007/s10482-013-9882-8)
- Gupta, R., Gupta, N., & Rathi, P. (2004). Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64, 763-781. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1568-8>
- Heard, G.M. & Fleet, G.H. (1999). CANDIDA | *Yarrowia (Candida) lipolytica*, (ed) Robinson, R. K., *Encyclopedia of Food Microbiology*, Elsevier, 360-365. <https://doi.org/10.1006/rwfm.1999.0285>
- Javed S., Azeem F., Hussain S., Rasul I., Siddique M. H., Riaz M., Afzal M., Kouser A., Nadeem H. (2018): Bacterial lipases: A review on purification and characterization. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 132. 23-34. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2017.07.014>
- Joshi, R., & Kuila, A. (2018). Lipase and their different industrial applications: A review. *Brazilian Journal of Biological Sciences*, 5(10), 237-247. DOI: [10.21472/bobs.051004](https://doi.org/10.21472/bobs.051004)
- Kamini, N. R., Mala, J. G. S., & Puvanakrishnan, R. (1998). Lipase production from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using gingelly oil cake. *process Biochemistry*, 33(5), 505-511. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(98\)00005-3](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(98)00005-3)

- Kapturowska, A. U., Stolarzewicz, I. A., Krzyczkowska, J., & Białecka-Florjańczyk, E. (2012). Studies on the lipolytic activity of sonicated enzymes from *Yarrowia lipolytica*. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19(1), 186-191. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2011.06.015>
- Lin, S. F., Chiou, C. M., & Tsai, Y. C. (1995). Effect of Triton X-100 on alkaline lipase production by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111. *Biotechnology Letters*, 17, 959-962. <https://doi.org/10.1007/BF00127434>
- Liu, L., Yang, H., Shin, H. D., Chen, R. R., Li, J., Du, G., & Chen, J. (2013). How to achieve high-level expression of microbial enzymes: strategies and perspectives. *Bioengineered*, 4(4), 212-223. <https://doi.org/10.4161/bioe.24761>
- Lotti, M., Alberghina, L. (2007): Lipases: Molecular structure and function. In: Polaina, J., MacCabe A. P. (eds.): *Industrial enzymes. Structure, function and applications*. Springer, Dordrecht, pp. 263-281. https://doi.org/10.1007/1-4020-5377-0_16
- Madzak, C. (2021). *Yarrowia lipolytica* strains and their biotechnological applications: How natural biodiversity and metabolic engineering could contribute to cell factories improvement. *Journal of Fungi*, 7(7), 548. <https://doi.org/10.3390/jof7070548>
- Meghwanshi, G.K., Vashishtha, A. (2018). Biotechnology of Fungal Lipases. In: Gehlot, P., Singh, J. (eds) *Fungi and their Role in Sustainable Development: Current Perspectives*. Springer, Singapore, 383-411. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0393-7_22
- Melani, N. B., Tambourgi, E. B., & Silveira, E. (2020). Lipases: from production to applications. *Separation & Purification Reviews*, 49(2), 143-158. <https://doi.org/10.1080/15422119.2018.1564328>
- Muralidhar, R. V., Chirumamila, R. R., Marchant, R., & Nigam, P. (2001). A response surface approach for the comparison of lipase production by *Candida cylindracea* using two different carbon sources. *Biochemical Engineering Journal*, 9(1), 17-23. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(01\)00117-6](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(01)00117-6)
- Nagy, E., Niss, M., Dlauchy, D., Arneborg, N., Nielsen, D. S., & Peter, G. (2013). *Yarrowia divulgata* fa, sp. nov., a yeast species from animal-related and marine sources. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(Pt_12), 4818-4823. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.057208-0>

Nagy E. Sz (2015): Élelmiszerromlást okozó *Yarrowia* csoport biodiverzitása különböző élelmiszerekben. Doktori disszertáció. Budapest

Nagy, Sz. E., Bujna, E., Sipiczki, G., Farkas, Cs., Belo, I., Lopes, M., Braga, A., Ferreira, P., Nguyen, D. Q., Enhancement of lipase production by *Yarrowia divulgata*, In: M., Beatriz; P.P., Oliveira; Joana, S. Amaral; Manuel, A. Coimbra Book of Abstracts of the XXEuroFoodChem Congress (2019) p. 284

Nicaud J. M. (2012). *Yarrowia lipolytica*. Yeast (Chichester, England), 29(10), 409–418. <https://doi.org/10.1002/yea.2921>

Nwabueze, T.U. (2010). Basic steps in adapting response surface methodology as mathematical modelling for bioprocess optimisation in the food systems. Int J Food Sci Technol 45:1768–1776 DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02256.x>

Patil, K. J., Chopda, M. Z., & Mahajan, R. T. (2011). Lipase biodiversity. Indian Journal of Science and Technology, 4(8), 971-982. DOI: [10.17485/ijst/2011/v4i8.30](https://doi.org/10.17485/ijst/2011/v4i8.30)

Pereira, A. D. S., Fontes-Sant'Ana, G. C., & Amaral, P. F. (2019). Mango agro-industrial wastes for lipase production from *Yarrowia lipolytica* and the potential of the fermented solid as a biocatalyst. Food and Bioproducts Processing, 115, 68-77. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.02.002>

Pérez, M.M., Gonçalves, E.C.S., Vici, A.C., Salgado, J.C.S., de Moraes Polizeli, M.d.L.T. (2019). Fungal Lipases: Versatile Tools for White Biotechnology. In: Yadav, A., Mishra, S., Singh, S., Gupta, A. (eds) Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi. Volume 1: Diversity and Enzymes Perspectives, 361-404. Fungal Biology. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-10480-1_11

Perna, R. F., Tiosso, P. C., Sgobi, L. M., Vieira, A. M. S., Vieira, M. F., Tardioli, P. W., Soares, C. M. F., & Zanin, G. M. (2017). Effects of Triton X-100 and PEG on the Catalytic Properties and Thermal Stability of Lipase from *Candida rugosa* Free and Immobilized on Glyoxyl-Agarose. The Open Biochemistry Journal, 11, 66–76. <https://doi.org/10.2174/1874091X01711010066>

Quettier, A. L., & Eastmond, P. J. (2009). Storage oil hydrolysis during early seedling growth. Plant Physiology and Biochemistry, 47(6), 485-490. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2008.12.005>

- Rakicka, M., Kieroń, A., Hapeta, P., Neuvéglise, C., & Lazar, Z. (2016). Sweet and sour potential of yeast from the *Yarrowia* clade. *Biomass and Bioenergy*, 92, 48-54. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.06.004>
- Raveendran, S., Parameswaran, B., Ummalyma, S. B., Abraham, A., Mathew, A. K., Madhavan, A., Rebello, S. & Pandey, A. (2018). Applications of microbial enzymes in food industry. *Food Technology and Biotechnology*, 56(1), 16. DOI: [10.17113/ftb.56.01.18.5491](https://doi.org/10.17113/ftb.56.01.18.5491)
- Ray, A. (2012). Application of lipase in industry. *Asian Journal of Pharmacy and Technology*, 2(2), 33-37.
- Salihu, A., Alam, M. Z., AbdulKarim, M. I., & Salleh, H. M. (2011). Optimization of lipase production by *Candida cylindracea* in palm oil mill effluent based medium using statistical experimental design. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 69(1-2), 66-73. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.12.012>
- Sánchez-Porro, C., Martin, S., Mellado, E., & Ventosa, A. (2003). Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. *Journal of Applied Microbiology*, 94(2), 295-300. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01834.x>
- Sarmah, N., Revathi, D., Sheelu, G., Yamuna Rani, K., Sridhar, S., Mehtab, V., & Sumana, C. (2018). Recent advances on sources and industrial applications of lipases. *Biotechnology Progress*, 34(1), 5-28. <https://doi.org/10.1002/btpr.2581>
- Seitz, E. W. (1974). Industrial application of microbial lipases: a review. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 51(2), 12-16. <https://doi.org/10.1007/bf02545206>
- Sharma, A. K., Sharma, V., & Saxena, J. (2016). A review paper on properties of fungal lipases. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 5(12), 123-130. <http://dx.doi.org/10.20546/ijcmas.2016.512.014>
- Sharma, R., Chisti, Y., & Banerjee, U. C. (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, 19(8), 627-662. [https://doi.org/10.1016/s0734-9750\(01\)00086-6](https://doi.org/10.1016/s0734-9750(01)00086-6)
- Silva, J. N., Godoy, M. G., Gutarra, M. L., & Freire, D. M. (2014). Impact of extraction parameters on the recovery of lipolytic activity from fermented babassu cake. *PloS one*, 9(8), e103176. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103176>

Sindhu, R., Shiburaj, S., Sabu, A., Fernandes, P., Singhal, R., Mathew, G. M., Nair, I.C., Jayachandran, K., Vidya, J., Porto de Souza Vandenberghe, L., Deniz, I., Madhavan, A., Binod, Sukumaran, R. K., Kumar, S. S., Anusree, M., Nagavekar, N., Soumya, M., Jayakumar, A., Radhakrishnan, E. K., Karp, S. G., Giovana, M., Pagnoncelli, M. G. B., Vinicius de Melo Pereira, N., Soccol, C. R., Dogan, S. & Pandey, A. (2021). 3.12-Enzyme technology in food processing: recent developments and future prospects. Innovative Food Processing Technologies, Elsevier, 191-215. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815781-7.00016-0>

Song, X., Qi, X., Hao, B., & Qu, Y. (2008). Studies of substrate specificities of lipases from different sources. European Journal of Lipid Science and Technology, 110(12), 1095-1101. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200800073>

Stefanovitsné Bányai (szerk.) (2019): Biokémiai alapismeretek. Szent István Egyetem, Élelmiszertudományi Kar, Alkalmazott Kémia Tanszék

Timoumi, A., Guillouet, S. E., Molina-Jouve, C., Fillaudeau, L., & Gorret, N. (2018). Impacts of environmental conditions on product formation and morphology of *Yarrowia lipolytica*. Applied Microbiology and Biotechnology, 102(9), 3831–3848. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8870-3>

Treichel, H., de Oliveira, D., Mazutti, M. A., Di Luccio, M., & Oliveira, J. V. (2010). A review on microbial lipases production. Food and Bioprocess Technology, 3, 182-196. DOI:[10.1007/s11947-009-0202-2](https://doi.org/10.1007/s11947-009-0202-2)

Vakhlu, J. & Kour, A. (2006) Yeast Lipases: Enzyme Purification, Biochemical Properties and Gene Cloning. Electronic Journal of Biotechnology, 9, 69-85. <http://dx.doi.org/10.2225/vol9-issue1-fulltext-9>

Zieniuk, B., & Fabiszewska, A. (2018). *Yarrowia lipolytica*: a beneficial yeast in biotechnology as a rare opportunistic fungal pathogen: a minireview. WorldJ of Microbiology & Biotechnology, 35(1), 10. <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2583-8>

Internetes hivatkozások:

Internet 1:

<https://iubmb.qmul.ac.uk/enzyme/EC3/1/1/3.html>

Internet 2:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>

Internet 3:

<https://www.shroomers.app/eng/mushroom/yarrowia-yakushimensis>

Internet 4: Bürker-kamra felépítése

<https://labtutorials.files.wordpress.com/2013/08/burker2.jpg>

Internet 5: CCD: NIST/SEMATECH e-Handbook of Statistical Methods

DOI: <https://doi.org/10.18434/M32189>

<https://www.itl.nist.gov/div898/handbook/pri/section3/pri3361.htm>

Perez Eliza, Szakdolgozat

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőimnek, Dr. Bujna Erikának és Sipiczki Gizellának, hogy mind a kutatómunkám, mind a dolgozatom elkészítése alatt végig rengeteg segítséget és útmutatást adtak, emellett kedvességükre és jótanácsaikra is mindig számíthattam.

Köszönet illeti még a Fermentációs Laboratóriumban dolgozókat a laborban nyújtott készséges segítségükért.

Köszönöm páromnak és barátaimnak, hogy szeretetükkel támogattak.

Végül, de nem utolsó sorban, hálásan köszönöm szerető családomnak, hogy tanulmányaim, illetve az élet minden terén mindvégig mellettem álltak és bíztattak engem.

Szerzői nyilatkozat

Alulírott **Perez Eliza** Biomérnöki szakos, nappali tagozatos hallgató kijelentem, hogy a **Yarrowia törzsek lipáz termelésének vizsgálata és fokozása felületaktív anyagokkal** című szakdolgozat a saját munkám eredménye. Azon részeket, melyeket más szerzők munkájából vettem át, egyértelműen megjelöltem, s az irodalomjegyzékben szerepeltettem. Ha a fenti nyilatkozattal valótlan állítottam, tudomásul veszem, hogy a Záróvizsga-bizottság a záróvizsgából kizár és záróvizsgát csak új dolgozat készítése után tehetek.

Budapest, 2023. május 3.



a hallgató aláírása

NYILATKOZAT

a szakdolgozat nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről

A hallgató neve: Perez Eliza
A Hallgató Neptun kódja: TDMO9U
A dolgozat címe: Yarrowia törzsek lipáz termelésének vizsgálata és fokozása felületaktív anyagokkal
A megjelenés éve: 2023
A konzulens tanszék 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, s az irodalomjegyzékben szerepeltettem.

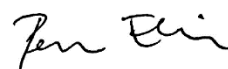
Ha a fenti nyilatkozattal valótlan állítottam, tudomásul veszem, hogy a Záróvizsga-bizottság a záróvizsgából kizár és a záróvizsgát csak új dolgozat készítése után tehetek.

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 könyvtári repozitori rendszerébe.

Kelt: Budapest, 2023. május 3.



Hallgató aláírása

KONZULTÁCIÓS NYILATKOZAT

Perez Eliza (Neptun azonosítója: TDMO9U) 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 javaslom.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem

Kelt: Budapest, 2023. május 3.


Belső konzulens

Perez Eliza, Szakdo