

Doktori értekezés tézisei

Sipiczki Gizella

Budapest

2025



***Yarrowia* élesztőgombák biotechnológiai jelentőségű anyagcseretermékeinek vizsgálata**

DOI: 10.54598/006760

Sipiczki Gizella

Budapest

2025.

A doktori iskola

megnevezése: Élelmiszertudományi Doktori Iskola

tudományága: Élelmiszertudományok

vezetője: Simonné Dr. Sarkadi Livia egyetemi tanár, DSc

MATE, Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet
Élelmiszerkémiai és Táplálkozástudományi Tanszék
1118 Budapest, Somlói út 14-16.

Témavezető(k): Dr. Bujna Erika, egyetemi docens, PhD

MATE, Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet
Biomérnök és Erjedésipari Technológia Tanszék
1118 Budapest, Ménesi út 45.

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető(k) jóváhagyása

1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI

A *Yarrowia lipolytica* a *Yarrowia* nemzetség egyik legismertebb és legkutatottabb faja, legfőképpen azért, mert képes fontos anyagcseretermékek termelésére és azok nagy mennyiségben történő kiválasztására, ami indokoltá teszi az iparban való alkalmazását és tanulmányozását. Ezen élesztő nem patogén mikroba, amely szerepel a GRAS (általánosan biztonságosnak minősített) listán is, így élelmiszerekben való alkalmazása is biztonságos. Rendkívül erős lipolitikus és proteolitikus aktivitással, valamint pigmenttermelő-képességgel rendelkezik. Az élelmiszeripar mellett hasznosítják a tisztítószeriparban, az egészségügy területén, a gyógyszeriparban, valamint a bioüzemanyag gyártás számára is lehetőségeket rejt, továbbá a környezetvédelemben is kiemelt szerepet tölthet be.

A lipáz enzim a szerin-hidroláz enzimek csoportjába tartozik és a trigliceridek hidrolízisét katalizálja glicerinné és szabad zsírsavakká az olajos-vizes fázis határfelületén. Mindenütt jelen vannak a természetben, számos növény, állat és mikroorganizmus képes előállítani. A lipáz nemcsak biotechnológiai szerepe, de biológiai jelentősége miatt is ismert. A növények esetében a lipáz enzimek különösen a magok csírázásában, továbbá magának a gyümölcsnek az érési folyamatában is szerepet játszanak. Emberi és állati szervezetekben az emésztőrendszerben termelődnek, főként a nyálban, a gyomorban és a hasnyálmirigyben, illetve az emésztésben is kulcsfontosságú funkciót látnak el. Az iparban leginkább mikrobiális lipázokat használnak fel, mivel az adott mikroorganizmusok könnyen tenyészthetők és használhatók. Eleinte baktériumok és fonalas gombák által termelt lipázokat alkalmaztak, viszont a tudomány előrehaladtával a kutatások előterébe kerültek az élesztőgombák is. A gombáknál a lipáz gyakran extracelluláris formában van jelen, de sejtfolkötött vagy intracelluláris előfordulás is lehetséges. Az extracelluláris térbe juttatott enzim feladata, hogy a lipid szubsztrátot lebontsa olyan kisebb molekulákká, amelyeket a sejt már fel tud venni a környezetéből, ezáltal hasznosítani tudja azokat. Az intracelluláris lipázok pedig az extracelluláris lipáz enzimekkel szemben a sejtekben tartaléktápanyagként felhalmozott lipideket hidrolizálják. A sejtfalhoz kötött lipázok elengedhetetlenek a sejt felépítésben, és az egyes lipidek, így többek között a membránalkotó lipid vegyületek előállításában.

A hidrofób szubsztrátok a leghatékonyabb szénforrások közé tartoznak, amelyek serkentik a mikroorganizmusok lipolitikus enzimeinek termelését. Közülük kiemelt figyelmet kapnak a növényi olajok (olívaolaj, napraforgóolaj, kukoricaolaj, pálmaolaj, repceolaj, szójaolaj) és a tiszta zsírsavak (palmitinsav, olajsav). A természetes növényi olajok közül az olívaolaj hatékony indukátornak tekinthető a lipáz termelés szempontjából, magas olajsav- és linolsav tartalmának köszönhetően. A növényi olajokon túl az olajipari melléktermékek is természetes szubsztrátként használhatóak fel a *Yarrowia lipolytica* növekedéséhez és lipáz termeléséhez. A szubsztrát és az indukáló anyag minősége, valamint a felületaktív anyagok jelenléte fontos szerepet játszik az enzim szintézisében. Ez a jelenség nemcsak nemzetségenként, hanem fajonként és törzsenként is eltérő lehet.

A lipáz enzim mellett, a *Yarrowia* nemzetség pigmentek termelésére is alkalmazható, melyet színezőanyagként számos iparágban hasznosítanak. A biológiai pigmentek minden élő anyagban megtalálhatók, vonzó színeket biztosítanak, és alapvető szerepet játszanak az

organizmusok fejlődésében. A természetes pigmentek alkalmazása egyre elterjedtebb, hiszen a szintetikus színezékek összefüggésbe hozhatók olyan hatásokkal, mint gyermekeknél a hiperaktivitás megjelenése, allergiás reakciók, továbbá rákkeltő hatásúak is lehetnek, ezért sok mesterséges színezéket már betiltottak. Az említetteken túl ezen színezőanyagok prekursorai káros hatásokkal bírnak az üzemi dolgozókra, a folyamat során keletkező hulladék pedig a környezetre nézve is veszélyes. E szempontokat figyelembe véve a gyártók számára fokozottan javasolt a pigmentek természetes módon történő előállítása/termeltetése. A mikroorganizmusokkal fermentációs úton előállított pigmentek alkalmazásának előnyei közé tartozik, hogy felszaporításuk egyszerű, könnyű kinyerni, nem okoz problémát az idényszerűség sem, továbbá sok különböző színű pigmentet képesek előállítani, melyek nem okoznak allergiás reakciót, nem toxikusak, nem karcinogének, továbbá biológiailag lebonthatóak. Mindemellett az egészségünket is jótékonyan befolyásolják, hiszen antioxidáns hatással bírnak, illetve provitaminok is lehetnek.

Az aminosavak, valamint egyes nyomelemek jelenléte jótékony hatással van a melanin-szerű barna pigment termelésre. Ezen anyagok minőségi és mennyiségi optimalálása a fermentációs tápközegekben nagymértékben befolyásolja a folyamat hatékonyságát.

Mindezen ismeretek alapján kutatómunkám során elsősorban olyan *Yarrowia* fajok biotechnológiai alkalmazhatóságát – különös tekintettel a fermentációs úton történő lipáz és pigment termelésükre - terveztem feltárni, melyeket eddig kevésbé vizsgált a szaktudomány. Meggyőződésem, hogy a *Y. lipolytica* mellett a többi faj is hasznos lehet különféle ipari célú felhasználás tekintetében.

2. CÉLKITŰZÉS

Az iparban a lipáz enzim termelésére leginkább baktériumokat és penészgombákat, kisebb mértékben pedig élesztőgombákat használnak. Napjainkban azonban egyre több kutatás eredménye enged arra következtetni, hogy az élesztőgombák, köztük a *Yarrowia* nemzetség egyes törzsei, is jó lipáz és pigmenttermelők, sőt akár még eredményesebbek is lehetnek a megfelelő környezeti paraméterek, szubsztrátumok optimalálásával és alkalmazásával. A *Y. lipolytica* mellett a nemzetség más fajai esetén is az ipari célú felhasználás lehetősége állhat fenn, így kutatómunkám során célul tűztem ki eddig kevésbé jellemzett *Yarrowia* izolátumok által termelt lipáz enzim, valamint barna pigment fermentációjának optimalását. A fermentációs folyamatok optimalásán túl a lipáz enzimmél az ipari melléktermékek, mint természetes szubsztrátumok alkalmazását terveztem vizsgálni, hiszen egyre nagyobb hangsúly helyeződik a körforgásos gazdaság kialakítására. A termeltetett barna színanyag esetében pedig az esetleges későbbi ipari felhasználhatóság végett a pigment stabilitásának feltérképezése volt a célom.

Kísérleteim során a következő részfeladatokat terveztem végrehajtani:

- *Yarrowia* törzsek szaporodásának és lipáz aktivitásának vizsgálata
- A lipáz enzim jelenlétének vizsgálata az extracelluláris, illetve az intracelluláris frakcióban.
- A lipáz termelés fokozására irányuló kísérletek:
 - Különböző növényi olajok többek között az olívaolaj, valamint pelleték, mint természetes szubsztrátumok alkalmazása

- Tween 80 és Triton X-100 felületaktív anyagok befolyásoló hatásának vizsgálata
- A fermentáció környezeti paramétereinek optimalizálása (hőmérséklet, pH optimum, inokulum mennyisége, valamint a levegőztetés mértéke)
- *Yarrowia* törzsek screenelése pigment termelésre
- A pigment termelés fokozására irányuló kísérletek:
 - A fermentációt befolyásoló környezeti paraméterek feltérképezése (hőmérséklet, pH optimum, inokulum mennyisége és kora, továbbá a levegőztetés mértéke)
 - A pigment termelés fokozását befolyásoló komponensek és koncentrációjának vizsgálata a legjobb pigment termelő törzs esetében
- A pigmentek stabilitásának felderítése különböző hőmérsékleti- és fényviszonyok között, forralás során, szobahőmérsékleten, illetve hűtött tárolás esetén, továbbá fénynek kitett és sötét körülmények között.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. A kísérletekhez felhasznált *Yarrowia* törzsek

A kutatási munkám során 12 db *Yarrowia* nemzetséghez tartozó törzset, izolátumot alkalmaztam: *Y. bubula* 441/4, *Y. divulgata* NCAIM Y.02062, *Y. divulgata* 5257, *Y. divulgata* 445/4, *Y. lipolytica* 854/4, *Y. lipolytica* 1/4, *Y. lipolytica* 6/3, *Y. porcina* NCAIM Y.02102, *Y. porcina* 859/4, *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02049, *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02050, *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052.

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

3.2. Alkalmazott tápközegek

A tápközegeket minden esetben autoklávbán steriliztem 121 °C-on, 15 percen keresztül.

Ferdeagar

A kísérleteim során (YEPD) ferdeagart alkalmaztam a *Yarrowia* élesztők átoltására és fenntartására, mely 5g/l élesztőkivonatot, 10g/l peptont, 20g/l glükózt és 25g/l agart tartalmazott.

Pigment screeneléshez felhasznált tápagar

A pigment termelés screeneléséhez tirozin tartalmú tápagart alkalmaztam mellyel lemezőntést végeztem. A tápagar 5g/l élesztőkivonatot, 5g/l peptont, 4,504 g/l tejsavat, 1,819g/l tirozint, 0,106g/l $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -t és 25g/l agart tartalmazott.

Inokulum tápközeg

Az inokulum tápközeg 20 g/l glükózt, 20 g/l peptont és 10 g/l élesztőkivonatot tartalmazott.

A lipáz fermentációhoz használt tápközegek

Alap fermentációs tápközeg

A lipáz termelésre irányuló fermentációhoz YEPD tápközeget használtam fel 20 g/l glükóz, 6,4 g/l pepton és 10 g/l élesztőkivonat összetétel szerint.

Természetes szubsztrátum, valamint Tween 80 tartalmú YEPD tápleves

Az optimalizációs kísérletek során 1% -nyi különböző természetes szubsztrátummal (növényi olajok és olajpogácsák), és 0,5 g/l Tween 80-nal kiegészített YEPD tápközegeket alkalmaztam. Az alkalmazott növényi olajok (olívaolaj, mint kontroll, dióolaj, szőlőmagolaj, napraforgóolaj, repceolaj, szezámolaj, kukoricaolaj kókuszolaj, használt sütőolaj) kereskedelmi forgalomban kaphatóak. A pelleteket (tökmag, aranylenmag, napraforgómag, mogyoró, kendermag) a Gabona és Iparinövény Technológia Tanszék biztosította.

A pigment fermentációhoz használt tápközegek

Alap fermentációs tápközeg

A pigment fermentációkhoz 4 g/l KH_2PO_4 , 2,5g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ és 0,106g/l $\text{MnSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ összetevőkből készített alap tápközeg került alkalmazásra.

Kiegészítést tartalmazó fermentációs tápközegek

A fermentációs alap tápközeget első esetben 0,27g/l tirozinnal, második esetben a tirozin mellett 1g/l mennyiségű glicinnel, L-glutaminnal és L-aszparaginnal egészítettem ki. Harmadik esetben pedig az előbb felsorolt komponensek mellett még 5,46 g/l tejsav kiegészítést is alkalmaztam a pigment termelés fokozása érdekében.

3.3. Alkalmazott módszerek

pH mérés

Mettler Toledo SevenMulti™ féle pH mérő készülék segítségével határoztam meg a minták pH értékeit. A pH mérő kalibrálását, pH=4 és pH=9 kalibráló oldatokkal végeztem.

Sejtszám meghatározás

Bürker-kamrás módszerrel végeztem az élesztő sejtszám meghatározását, melyhez Olympos mikroszkópot használtam. A tízszeresen hígított mintákból 20 µl-t pipettáztam a Bürker-kamrába, majd mikroszkóp segítségével 10 db azonos nagyságú négyzetben számoltam meg az élesztő sejteket. Ezt követően a kapott eredményeket átlagoltam és sejt/ml-ben adtam meg a sejtszámot a hígítás figyelembevételével.

Lipáz fermentáció

A lipáz fermentáció elindításának első lépéseként a ferdeagaron fejlődött telepekből oltókaccsal, steril körülmények között az inokulum tápközegbe oltottam a mikrobákat, melyben az élesztők 24 óráig növekedtek 130 rpm-en és 28°C-on. A screeneléses kísérleteim folyamán, illetve az optimális környezeti paraméterek meghatározásánál a fermentációkat 5 v/v%-nyi 24 órás inokulum tenyészetekkel indítottam. Az inokulum mennyiségének optimalizálása során 10^6 sejt/ml, $5 \cdot 10^6$ sejt/ml és 10^7 sejt/ml sejtkoncentrációkat használtam. A további optimalizálási kísérleteknél minden törzsnél a számára optimális beállítást alkalmaztam. Rázott lombikos fermentációt alkalmaztam 150 ml térfogatban a kísérletek elvégzéséhez, 130 rpm rázatos sebesség mellett (kivétel a levegőztetés hatásának vizsgálatok, amikor 100, 160 rpm-t is vizsgáltam), 28 °C-on. A fermentáció ideje 5 és 13 nap között tartott kísérlettől függően, meghatározott időközönként történt a mintavétel.

Lipáz enzim aktivitásának mérése

Az extracelluláris lipáz aktivitás méréséhez a fermentáció során vett 1-1 ml mintát Eppendorf centrifuga csőbe helyeztem és centrifugáltam 10000 fordulat/perc fordulatszámmal 10 percen keresztül. Ezt követően elválasztottam a sejteket, majd a felülúszót használtam fel az enzimaktivitás méréséhez. Szükség szerint a minták hígításra kerültek. Minden esetben kettő párhuzamos aktivitás mérést hajtottam végre. A lipáz aktivitást a 25mM-os para-nitrofenil-laurát mesterséges szubsztrátumból az enzimoldat által felszabaduló p-nitrofenol mennyiségének meghatározásával állapítottam meg spektrometriásan. Az enzimaktivitás meghatározásához összemértem 100 µl szubsztrátot és 725 µl Sörensen puffert (pH 5-8). Néhány percig előinkubáltam 37°C-on, majd 25 µl megfelelően hígított mintát pipettáztam a kémcsövekbe, ezzel indítva a 10 percig tartó reakciót. Miután letelt a reakcióidő, 250 µl 0,1 N

Na₂CO₃ oldattal állítottam le a folyamatot és centrifugálást követően 405 nm-en mértem a minták abszorbanciáját. A felszabadult p-nitrofenol mennyiségét kalibráció segítségével határoztam meg, és ez alapján számoltam az enzim aktivitását.

Sejtfeltárás

Az intracelluláris lipáz aktivitás méréséhez sejtfeltárási módszert alkalmaztam, melyhez a fermentáció során vett 25 ml mintát centrifugáltam 10000 rpm fordulatszámon, 4 °C hőmérsékleten, 10 percen át. Ezt követően a felülúszót leöntöttem, majd a kiülepedett sejteket átmostam. E folyamathoz 5 ml McIlvaine puffert (pH=6,5) használtam, homogenizálást követően újra lecentrifugáltam 10000 rpm fordulatszámon, 10 percig, 4°C-on. Még egyszer elvégeztem ezt a műveletet, a felülúszót minden esetben kiöntöttem. Ezt követően 2 ml McIlvaine pufferben visszaszuszpendáltam a sejteket majd az így kapott szuszpenziót használtam fel a sejtfeltáráshoz. A kísérleteim során a French Press nagy nyomású homogenizátort alkalmaztam 800 psi nyomás mellett. Ezzel a módszerrel egyszeres, illetőleg kétszeres sejtfeltárást végeztem, amely után az intracelluláris enzimaktivitást határoztam meg, az extracelluláris lipáz aktivitás mérésével megegyező eljárást alkalmazva.

Központi elrendezésű kísérlettervezés (CCD)

A központi elrendezésű statisztikai modellt alkalmaztam a felhasznált *Yarrowia* törzsek lipáz enzim termelésének optimalizálásához. Az első esetben a két vizsgált faktor az olívaolaj (x_1) és a Tween 80 (x_2), míg a második esetben a Tween 80 (x_1), illetve a Triton X-100 (x_2) volt, függő változónak, vagyis az optimalizálandó paraméternek pedig az enzimaktivitást (Y) választottam. Mindkét faktor esetén megegyezett a munkapont 0,05% és a léptéktényező, 0,025%. Az optimális enzimtermelés megállapításához a következő másodfokú polinomiális egyenletet alkalmaztam (ahol b_{0-5} : a regressziós együtthatók):

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

Pigment fermentáció

A pigment fermentáció elindításának első lépéseként a ferde agaron fejlődött telepekből oltókaccsal, steril körülmények között az inokulum tápközegbe oltottam a mikrobákat. Ezt követően az élesztők 24 óráig növekedtek 130 rpm-en és 28°C-on. Az inokulum tenyészetből 5 v/v%-nyi mennyiséget oltottam át (kivétel az inokulum mennyiségének optimalizálása során, amikor 10⁶ sejt/ml, 5*10⁶ sejt/ml és 10⁷ sejt/ml koncentrációkat alkalmaztam) a fermentációs tápközegbe, s a fermentleveket 130 rpm-en (kivétel a levegőztetés hatásának vizsgálatakor, amikor 100, 160 rpm-t is vizsgáltam) és 28°C-on inkubáltam legalább 6 napon keresztül. A pigment termelés alakulását meghatározott időnkénti mintavételezéssel követtem.

Pigment termelés meghatározása

A mérések során *Unicam Helios Alfa* spektrofotométert használtam. A mintavételezést követően a pigment termelés meghatározására a mintákat 400 nm-es hullámhosszon mértem meg. A mérés előtt a fermentációs tápközegből kivett Eppendorf-csőben 10000 rpm-en 10 percig centrifugáltam, majd az abszorbanciákat a felülúszót használva 400 nm-en határoztam meg.

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELESLÉSÜK

4.1. *Yarrowia* törzsek lipáz termelésének vizsgálata

A lipáz enzim ipari célú felhasználása az elmúlt évtizedekben érezhetően növekedett, felhasználják az élelmiszeriparban, a gyógyszeriparban, a papírban, a kozmetikai iparban és az energia iparban egyaránt. Az iparban leginkább mikrobiális eredetű lipázokat alkalmaznak. A baktériumok és fonalas gombák által termelt lipázok mellett a tudomány előrehaladtával a kutatások előterébe kerültek az élesztőgombák is. Ezen okok miatt a PhD kutatásom első részében különféle *Yarrowia* élesztők lipáz aktivitását vizsgáltam.

4.1.1. Lipáztermelő törzsek szelektálása

Kutatómunkám első lépéseként a lipáz termelő *Yarrowia* törzsek rangsorolását végeztem el YEPD táplevesben. A *Y. porcina* NCAIM Y.02102, *Y. bubula* 441/4 és *Y. lipolytica* 6/3 törzsek esetében nem volt kimutatható lipáz aktivitás az 5 napos fermentáció során az alkalmazott tápközegben. A *Y. divulgata* 5257 törzs a fermentáció első napján érte el a maximális aktivitását, azonban a legnagyobb enzimaktivitásokat a 2. napon a *Y. lipolytica* 1/4, *Y. lipolytica* 854/4 és *Y. divulgata* NCAIM Y.02062 törzsek esetében figyelhetjük meg. A lipáz aktivitás meredeken csökkent 48-72 óra között a *Y. lipolytica* törzsek mindegyikénél. A legjobb értéket a *Y. divulgata* NCAIM Y.02062 adta a 48. órában, 40,56 mU maximális aktivitással. A többi törzstől eltérően a lipáz aktivitást a fermentáció 72. órájában is kimutattam ennél a törzsnél. A két *Y. divulgata* törzs, valamint az *Y. lipolytica* 1/4 és *Y. lipolytica* 854/4 érte el a legnagyobb aktivitást a fermentáció során, ezért ezeket a törzseket választottam ki további vizsgálatokra.

4.1.2. Az olívaolaj és a Tween 80 hatása a *Y. lipolytica* és a *Y. divulgata* törzsek lipáz termelésére

A legjobb törzsek kiválasztását követően optimalizációs feladatokat végeztem el a lipáz enzim aktivitásának növelése érdekében. Az alaptápközegbe 1% olívaolajjal, mint induktorként egészítettem ki, a fermentációs folyamat 148 órán át folyt, és az extracelluláris lipáz aktivitást naponta nyomon követtem. A Tween 80 *Yarrowia* élesztők lipáz termelésére gyakorolt hatását 1% olívaolajat tartalmazó tápközegben vizsgáltam. A Tween 80-at 0,05% koncentrációban alkalmaztam és mind az extracelluláris, mind az intracelluláris aktivitást naponta mértem a fermentációs folyamat során, 6 napon keresztül. Általában a Tween 80 jelenlétében az összes vizsgált *Yarrowia* törzs nagyobb lipáz aktivitást produkált mind az intracelluláris, mind az extracelluláris frakciókban. A *Y. lipolytica* 854/4 törzs által termelt extracelluláris lipáz aktivitás maximuma olívaolajat tartalmazó tápközegben Tween 80 kiegészítéssel a 72. órában (474 U/l) volt, anélkül a 48. órában 25 U/l volt megfigyelhető. Ennek a törzsnél a maximális intracelluláris aktivitása a Tween 80 nélküli tápközegben 467 U/l, míg a Tween 80-t is tartalmazó táptalajban csak 122 U/l volt. A *Y. lipolytica* 1/4 törzs esetében a csak olívaolajat tartalmazó tápközegben az extracelluláris lipáz aktivitás a 48. órában érte el a csúcst, 131 U/l-t, a Tween 80 kiegészítést is tartalmazó tápközegben mért maximális extracelluláris lipáz aktivitás 221 U/l volt a 72. órában. Az érték szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a *Y. lipolytica* 854/4 törzs által termelt érték. Az intracelluláris lipáz esetében a Tween 80 kiegészítés pozitív

hatást fejtett ki, az aktivitás 126 U/l-ről Tween 80 mellett 273 U/l-re nőtt. A *Y. divulgata* NCAIM Y.02062 törzs esetében a maximális extracelluláris lipáz aktivitást mindkét tápközegben 72 óra elteltével mértem, s az enzimaktivitás a Tween 80-at tartalmazó tápközegben (147 U/l) körülbelül kétszeres volt, mint anélkül (81 U/l). Az intracelluláris lipáz aktivitás 117 U/l volt a csak olívaolajat, továbbá 80 U/l az olívaolajat és Tween 80-t is tartalmazó tápközegben. A *Y. divulgata* 5257 törzs esetében a maximális extracelluláris lipáz aktivitást 72 órás fermentációt követően mutattam ki, a maximális extracelluláris enzimaktivitás (20 U/l és 13 U/l) nagyon alacsony volt mind a Tween 80-nal kiegészített, mind az anélküli tápközegben. Az intracelluláris aktivitás esetében a legnagyobb értékek 22 U/l és 8 U/l voltak a Tween 80 kiegészítést tartalmazó, illetve az anélküli tápközegben.

4.1.3. *Yarrowia yakushimensis* törzsek lipáz enzim termelésének vizsgálata

1% olívaolaj tartalmú YEPD tápközegben vizsgáltam további, eddig kevésbé ismert törzs - a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02049, NCAIM Y.02050 és NCAIM Y.02052 – extracelluláris lipáz termelő képességét 2 hetes fermentáció során. A törzsek lipáz aktivitását áttekintve kitűnik, hogy a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02050 törzs lipáz enzimaktivitása még az 1 U/l-t sem érte el. Már a 3. naptól kezdődően jól kivehető, hogy a Y.02049 és a Y.02052 törzsek aktivitása kezd elkülönülni a Y.02050 törzsétől, s a 8 naptól kezdve ugrásszerűen nőtt enzimtermelésük. A fermentáció időtartama alatti maximális értéket a 13. napon érték el, a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052 98 U/l, a Y.02049 85 U/l lipáz aktivitással. A kísérlet eredményeit a *Y. lipolytica* 1/4, a *Y. lipolytica* 854/4, a *Y. divulgata* 5257 és a *Y. divulgata* NCAIM Y.02062 törzsekével összevetve látszik, hogy nagyságrendileg hasonló aktivitás értékeket mértem az 1%-os olívaolaj tartalmú tápközegben. Miután az olívaolaj induktív jellege bebizonyosodott a *Y. yakushimensis* törzsek esetében is, a Tween 80 hatását is vizsgáltam 1 hetes fermentáció során. A YEPD tápközeghez 1% olívaolajat és 0,05% Tween 80-at adtam és mind az extracelluláris, mind az intracelluláris aktivitást nyomon követtem a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02049 és a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052 törzsek esetében. Konklúzióként levonható, hogy *Y. lipolytica* 1/4, a *Y. lipolytica* 854/4, a *Y. divulgata* 5257 és a *Y. divulgata* NCAIM Y.02062 törzsekhez hasonlóan a *Y. yakushimensis* élesztőknél is a Tween 80 felületaktív anyag alkalmazása olívaolaj mellett fokozta az extracelluláris aktivitást. A *Y. lipolytica* és a *Y. divulgata* törzsekhez hasonlóan ezen élesztőknél is az intracelluláris lipáz aktivitás nagysága elmaradt az extracelluláris aktivitáséhoz képest.

4.1.4. Az olívaolaj és a Tween 80 koncentráció hatásának vizsgálata az extracelluláris lipáz termelésre

Az olívaolaj és a Tween 80 koncentrációjának optimalizálása a kiválasztott *Yarrowia* törzsek extracelluláris lipáz termelésének maximalizálása érdekében a válaszfelületi módszerek közül, központi elrendezésű statisztikai modell alkalmazásával történt. Meghatároztam a modell egyenleteket, s a vizsgált törzsek esetén a maximális enzim termeléshez szükséges olívaolaj és Tween 80 koncentrációt. A legnagyobb aktivitás értékeket a *Y. lipolytica* 854/4 esetében mértem, s az is megállapítható, hogy az egyes beállítások során kapott enzimaktivitás értékek között jelentős különbség van. A másik három vizsgált törzs (*Y. lipolytica* 1/4, *Y.*

divulgata 5257, *Y. divulgata* NCAIM Y.02062) eredményei között nincs nagy mértékű eltérés, sem az egyes beállítások során mért aktivitás értékek, sem pedig a törzsek maximum értékei tekintetében. Általánosságban megállapítható, hogy az általam vizsgált tartományban az olívaolaj, valamint a Tween 80 koncentrációjának növelésével az enzimaktivitás fokozható. Az eredmények alapján a független változók (olívaolaj és Tween 80) optimális koncentrációját az alábbiak szerint határoztam meg a vizsgált koncentráció tartományban:

- *Y. lipolytica* 854/4 törzs: 1,6 % olívaolaj, 0,065 % Tween 80
- *Y. lipolytica* 1/4 törzs: 1,4 % olívaolaj, 0,09 % Tween 80
- *Y. divulgata* NCAIM Y.02062 törzs: 1,6 % olívaolaj, 0,09 % Tween 80
- *Y. divulgata* 5257 törzs: 1,6 % olívaolaj, 0,06 % Tween 80

4.1.5. Rázatási sebesség hatása a lipáz termelésre

Kevés szakirodalmi adat áll rendelkezésre a levegőztetés hatásának kérdésével kapcsolatban lipáz szekréció szempontjából *Yarrowia* élesztők esetében, így kutatómunkám során ezt is tanulmányoztam. Az eredményeimből megállapítható, hogy a leghatékonyabb rázatási sebesség a *Y. lipolytica* 1/4, a *Y. lipolytica* 854/4, a *Y. divulgata* 5257, és a *Y. divulgata* NCAIM Y.02062 törzsek esetében a 130 rpm volt, ezen beállítás során sokkal hatékonyabbnak bizonyult a lipáz termelés, ugyanis mind a négy élesztő legalább 2-3x annyi enzimet termelt a többi beállításhoz (100 és 160 rpm) képest. A legjobb termelő törzs a *Y. lipolytica* 854/4 élesztő 628,83 U/l maximum értékkel. Kutatómunkám folytatásában 130 rpm fordulatszám alkalmazása mellett végeztem el a kísérleteimet.

4.1.6. Inokulum mennyiség optimalizálása

Az inokulum mennyiségének optimalizálása is nagyon fontos tényező a fermentációs folyamatok során. Vizsgáltam az inokulum kiindulási sejtszámának a hatását a lipáz termelésre a *Y. lipolytica* 854/4, a *Y. divulgata* 5257, a *Y. divulgata* NCAIM Y.02062 és a három *Y. yakushimensis* törzs esetében három különböző sejtkoncentráció 10^6 , $5 \cdot 10^6$ és 10^7 TKE/ml alkalmazása mellett. A 10^6 TKE/ml sejtkoncentrációjú inokulummal beoltott fermentációs tápközeg egyik vizsgált törzs esetében sem bizonyult a leghatékonyabbnak. Az összes törzs esetében elmondható, hogy az $5 \cdot 10^6$ és 10^7 TKE/ml inokulum koncentráció számottevően nem befolyásolta az enzimtermelést. Ennek ellenére a továbbiakban minden törzs esetében a számára ideális, vagyis a *Y. lipolytica* 854/4, a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02050, a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052 és a *Y. divulgata* NCAIM Y.02062 törzseknél az $5 \cdot 10^6$ TKE/ml koncentrációjú, a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02049 és a *Y. divulgata* 5257 élesztőknél pedig a 10^7 TKE/ml mennyiségű 24 órás inokulumot alkalmaztam a fermentációs tápközeg beoltásához.

4.1.7. Az extracelluláris lipáz termelés fokozásának vizsgálata Tween 80 és Triton X-100 alkalmazásával

Az enzim termelés, illetve kiválasztás fokozása érdekében az alkalmazott Tween 80 mellett, a Triton X-100 hatását is vizsgáltam központi elrendezésű statisztikai modell (CCD)

alkalmazásával 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) esetében olívaolaj kiegészítést tartalmazó YEPD táplevesben. A statisztikai eredményekből megállapítható, hogy mind a Tween 80, mind a Triton X-100 szignifikáns hatással bír az enzimtermelésre, s míg előbbi felületaktív anyagból nagyobb koncentráció alkalmazása (0,05-0,09%) addig az utóbbiból kisebb mennyiség (0,01-0,02%) a hatékonyabb.

Ezen eredmények ismeretében a független változók (Tween 80 és Triton X-100) optimális koncentrációja az alábbiak szerint határozható meg:

- *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02049, NCAIM Y.02052, valamint *Y. divulgata* NCAIM Y.02062 törzsek: 0,09 % Tween 80, 0,01 % Triton X-100
- *Y. lipolytica* 854/4 törzs: 0,09% Tween 80, 0,03 % Triton X-100
- *Y. divulgata* 5257 törzs: 0,05 % Tween 80, 0,05 % Triton X-100

Az optimalásokat követően mind az öt *Yarrowia* törzs esetében nagyságrendekkel nagyobb aktivitást sikerült elérni a kezdeti aktivitáshoz képest. A legnagyobb mértékű, 101-szeres lipáz aktivitás növekedést a *Y. lipolytica* 854/4 törzsnél mutattam ki az optimalizációs kísérletek követően, a kezdeti értékhez képest. A *Y. divulgata* 5257 törzsnél 58-szoros, a *Y. divulgata* NCAIM Y.02062 55-szörös, a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02049 élesztőnél 28-szoros, a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052 esetében pedig 25-szörös aktivitás növekedést detektáltam. A két *Y. divulgata* törzs esetében az olívaolaj, a Tween 80 és a Triton X-100 alkalmazása mellett mértem a legnagyobb lipáz aktivitást, a másik három élesztő esetében viszont a csak az olívaolaj és Tween 80 kiegészítést tartalmazó tápközeg adta a legnagyobb enzimaktivitás értéket.

4.1.8. A *Yarrowia* élesztőkből származó nyers lipázok részleges jellemzése

Meghatároztam a *Y. lipolytica* 1/4, *Y. lipolytica* 854/4, *Y. divulgata* 5257, *Y. divulgata* NCAIM Y.02062 *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02049, *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052 törzs eredetű extracelluláris és intracelluláris nyers lipáz enzimek pH- és hőmérséklet-optimumát. A hőmérséklet optimum mérése 30°C-tól-45°C-ig terjedő hőmérséklet tartományban történt, s a legnagyobb aktivitás érték 37°C-on volt mindkét frakciónál. A pH optimalizálást különböző pH-jú (pH 5 - pH 8) Sörensen pufferek segítségével végeztem el az optimálisnak talált 37°C-on. Az eredmények alapján a pH 7,2 Sörensen puffer a legkedvezőbb a lipáz aktivitás szempontjából mind az extracelluláris, mind az intracelluláris frakció esetén.

4.1.9. Növényi olajok és olajpogácsák alkalmazhatóságának vizsgálata lipáz enzim termelésére

Növényi olajok vizsgálata

Az optimalizációs vizsgálatokat követően lipáz enzim termelésre alkalmazható növényi olajokat (olívaolaj (kontrollként), kókuszolaj, dióolaj, szőlőmagolaj, szezámmagolaj, napraforgóolaj, kukoricaolaj, használt sütőolaj és a repceolaj), mint természetes

szubsztrátumokat hasonlítottam össze 1%-os koncentrációban. A vizsgálatot a két legjobb enzintermelő törzssel (*Y. lipolytica* 854/4, *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052) végeztem el. Elmondható, hogy mind a két vizsgált élesztőnél, az összes felhasznált szubsztrátumon történt lipáz enzim termelés, azonban az egyes olajok esetében eltérő mértékben. Mind a két törzsnél a legjobb induktornak az olívaolaj és a napraforgóolaj bizonyult, illetve, míg az olívaolaj szubsztrátumnál a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052, addig a napraforgóolajnál a *Y. lipolytica* 854/4 élesztő esetén mértem nagyobb lipáz aktivitást. Kiemelendő, hogy a használt sütőolaj, mint enzimermentációhoz potenciálisan hasznosítható hulladék alkalmazásában is van potenciál, ugyanis számos olajhoz képest (szőlőmag, kukorica, repce) hatékonyabbnak bizonyult a használata mind a két törzsnél.

Növényi eredetű olajpogácsák vizsgálata

A körforgásos gazdaság térhódítása és kiemelkedő fontossága révén a következő kísérletemben ipari melléktermék (olajpogácsa) enzimermentáláshoz kapcsolódó hasznosítási lehetőségét vizsgáltam. 5 féle pellet – tökmag, aranylenmag, napraforgómag, mogoró és kendermag felhasználásával is elvégeztem a kísérletet. Mind a *Y. lipolytica* 854/4 mind a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052 törzs esetében a legjobb induktornak az aranylenmag pellet bizonyult, -279,8 U/l és 428,68 U/l-, azonban míg előbbi esetében a lipáz aktivitás már a 24. órában elérte a maximális értéket, addig az utóbbinál csak a 72. órában. Megemlítendő, hogy a *Y. lipolytica* 854/4 törzs esetében az aranylenmag pellet mellett a tökmag pellet is hatékonynak bizonyult az elért aktivitás értéke 267,45 U/l volt, mely alig marad el a törzs maximum értékétől.

4.1.10. Természetes szubsztrátumok koncentrációjának optimalálása az extracelluláris lipáz termelés szempontjából

Az előző kísérletek eredményei szerint a legjobbnak talált olajok (olíva, napraforgó) és pellet (aranylenmag), valamint a használt sütőolaj koncentráció növelés hatásának vizsgálatát (0,5%, 1% és 2%) is elvégeztem lipáz termelésre mind a *Y. lipolytica* 854/4, mind a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052 törzsekkel. Az eredményekből általánosan megállapítható, hogy az adott szubsztrátumot minél nagyobb koncentrációban alkalmazzuk, annál nagyobb aktivitást sikerül elérni. Az olívaolaj bizonyult mind a két törzs esetében a legjobb induktoroknak, akár 1%, akár 2 % koncentrációban alkalmazva, illetve ezen kívül még a 2 %-os napraforgóolaj mutatkozott hatékonyak. A használt sütőolaj ugyan közel sem a leghatékonyabb induktor, azonban a koncentrációjának növelésével már ígéretes mértékű aktivitás növekedés volt megfigyelhető. A legkevésbé hatékony szubsztrátumnak az aranylenmag pellet tekinthető, hiszen minden koncentrációnál e emellett mértem a legalacsonyabb lipáz aktivitási értékeket.

4.2. *Yarrowia* törzsek pigment termelésének vizsgálata

Kutatómunkám során a különféle *Yarrowia* élesztők lipáz aktivitása mellett az egyes törzsek barna színű pigment termelését is vizsgáltam. A pigmenteket, mint színezőanyagokat számos iparágban hasznosítják, többek között felhasználják az élelmiszeriparban, a gyógyszeriparban, a festékiparban, a kozmetikai iparban és a textil iparban egyaránt. Azonban

nem lehet eléggé hangsúlyozni, hogy a szintetikus színezékeknek kedvezőtlen egészségügyi hatásai lehetnek, valamint gyártásuk a környezetre is káros hatással bírhat, ezen okok miatt a mesterséges pigmentek piaca leáldozóban van. Ezzel szemben a természetes eredetű mikrobiális pigmentek egyre szélesebb körben népszerűek. Ezen indokok miatt választottam ki a barna színű, melanin-szerű pigmentet a kutatómunkám folytatásához.

4.2.1. *Yarrowia* törzsek screenelése pigment termelésre

Hét különböző *Yarrowia* törzs -*Y. porcina* 859/4, *Y. divulgata* NCAIM Y.02062, *Y. lipolytica* 1/4 *Y. divulgata* 445/4; *Y. lipolytica* 6/3, *Y. lipolytica* 854/4, *Y. divulgata* 5257- screenelését végeztem el tirozin tartalmú tápagaron, agardiffúziós módszert alkalmazva. Az inkubáció egy héten keresztül tartott. A törzsek pigment termelő képességére az agaron kinőtt telepek körül látható barna elszíneződés utalt. A zóna nagyságának mértéke alapján került sor a törzsek rangsorolására. Elmondható, hogy valamennyi törzs termelt pigmentet, viszont különböző mértékben. A legkevesbé jó termelőnek a *Y. divulgata* 445/4 és a *Y. porcina* 859/4, a leghatékonyabbnak pedig a *Y. lipolytica* 6/3 bizonyult. Az eredmények alapján kutatómunkám folytatásához a *Y. lipolytica* 6/3 mellett a *Y. lipolytica* 854/4 élesztőt, illetve a még kevésbé kutatott *Y. divulgata* NCAIM Y.02062 és a *Y. divulgata* 5257 törzseket választottam ki.

4.2.2. Tápközeg összetétel hatásának vizsgálata

A továbbiakban a négy kiválasztott törzzsel végeztem tápközeg optimalizációs kísérletet szubmerz fermentációk során. A fermentációs alap tápközeget a pigment termelés fokozása érdekében tirozin, glicin, L-glutamin, L-aszparagin és tejsav komponensekkel egészítettem ki és 5% inokulum tenyésztettel oltottam be. A tápközeg egyike csak tirozin kiegészítést, egy másik az összes komponenst, míg a harmadik a tejsav kivételével a további felsorolt komponenseket tartalmazta. Az egyes mintavételek során nyomon követtem a pH változását és az abszorbancia értékeket 400 nm-en a pigment termelés követésére. Az inkubáció időtartama legalább egy hét volt. Az alkalmazott törzsek közül a *Y. lipolytica* 6/3 volt a legeredményesebb a pigment termelés szempontjából az aminosav kiegészítést tartalmazó tápközegben. A két *Y. divulgata* törzset összehasonlítva a *Y. divulgata* 5257 bizonyult jobb pigment termelőnek. A tejsav indukáló hatásáról megoszlanak a szakirodalmi adatok, a kísérletemben ezen adalékanyag használata során több pigment szintetizálódott az alaptápközeghez képest a legtöbb törzs esetében, azonban ennél nagyobb volt a pigment termelés a csak aminosav kiegészítést tartalmazó tápközegben minden törzsnél. A kísérlet eredményeiből az is látszik, hogy a semleges pH tartomány kedvez a pigment szintézisnek.

4.2.3. A kiindulási tápközeg puffer jellegének hatása a pigment termelésre

Annak ismeretében, hogy a pH befolyásolja a pigment termelést, jelen kísérlet sorozatom folyamán különféle pufferek, valamint adalékanyagok hatását vizsgáltam a fermentáció során. A kívánt kémhatás elérését McIlvaine és Sörensen pufferek alkalmazásával biztosítottam, továbbá desztillált vízzel készített aminosav kiegészítést tartalmazó fermentációs tápközeghez NaOH-t adva állítottam be a semleges kémhatást, s az így kapott eredményeket hasonlítottam össze pigment termelés szempontjából, kontrollként vízzel készített tápközeget

alkalmazva. Ismételt vizsgáltam a tejsav hatását a pigment szintézisre a pufferekhez adagolva, majd a pH-t semlegesre állítva. A mért abszorbancia eredmények alapján rögzíthető, hogy a *Y. lipolytica* 6/3 esetén mért maximális abszorbancia értéke közel háromszorosa volt a másik három törzsnél mérteknek. A *Y. lipolytica* 6/3, *Y. divulgata* NCAIM Y.02062 és a *Y. divulgata* 5257 törzsek esetében a leghatékonyabbnak a NaOH-t tartalmazó tápközeg, a *Y. lipolytica* 854/4 élesztőnél pedig a McIlvaine pufferrel készített tejsav kiegészítést nem tartalmazó tápközeg bizonyult. Azonban az eredményeim alapján nincs nagyságrendi eltérés a különböző módokon készített fermentációs tápközégek között, így a kutatómunkám folytatásához gazdasági szempontok alapján a kontrollként alkalmazott tápközeget választottam.

4.2.4. Rázatási sebesség hatása a pigment termelésre

A *Y. lipolytica* egy obligát aerob élesztő, mely esetében az optimalizált rázatási sebesség alkalmazása pozitívan befolyásolhatja az anyagcserefolyamatokat, s ezáltal a pigment termelést is. Mindezek ismeretében három különböző rázatási sebesség – 100 rpm, 130 rpm és 160 rpm – hatását vizsgáltam a színanyagtermelésre. A kísérlet eredményei alapján megállapítható, hogy bár a különböző törzsek esetében különböző fordulatszámok bizonyultak a legjobbnak, a levegőztetés mértéke nagyságrendileg nem befolyásolta a pigment szintézisét, így a további kísérleteim során 130 rpm rázatási sebességet alkalmaztam.

4.2.5. Az inokulum kor hatásának vizsgálata

Tanulmányoztam, hogyan befolyásolja a fermentációs tápközegben a pigment termelést az élesztőknek az inokulum tápközegben való felszaporítási ideje. Az inokulum tenyésztési időintervallumokat 16, 24 és 48 órában határoztam meg. Az eredményekből egyértelmű, hogy a legnagyobb abszorbancia értékeket minden élesztőnél a 48 órás inokulum használata mellett mértem, azonban a 24 és a 48 órás inokulummal beoltott fermentációs tápközégek 400 nm-en mért maximális abszorbancia értékei között nem volt számottevő különbség a vizsgált törzseknél. Gazdasági és technológiai szempontokat mérlegelve, a 24 órás inokulum tenyésztési időtartamot választottam ki munkám folytatásához.

4.2.6. Az inokulum mennyiség hatásának vizsgálata

Az inokulum kiindulási sejtszámának a pigment termelésre gyakorolt hatását is vizsgáltam 10^6 , $5 \cdot 10^6$ és 10^7 sejt/ml sejtkoncentráció alkalmazásával. Az eredményekből látható, hogy a kiindulási sejtkoncentráció nagymértékben befolyásolja a színanyagtermelés hatékonyságát. Amíg a *Y. lipolytica* 6/3 törzsnél a legkedvezőbb pigment termelés az $5 \cdot 10^6$ TKE/ml, addig a *Y. lipolytica* 854/4 és a *Y. divulgata* 5257 törzseknél a 10^6 TKE/ml sejtkoncentrációjú inokulummal beoltott fermentációs tápközeg esetében következett be. A *Y. divulgata* NCAIM Y.02062 törzs esetében a 10^7 TKE/ml-es sejtkoncentráció alkalmazása volt az optimális. A további kísérleteimben minden törzsnél a számára ideális mennyiségű inokulumot alkalmaztam a fermentációs tápközeg beoltásához.

4.2.7. Mn^{2+} ion koncentráció hatása a pigment termelésre

Az egyes nyomelemek hatást gyakorolnak a színanyag szintézisre. Ezen tudományos tényre alapoztam a következő kísérleti tervem, melyben a Mn^{2+} hatását vizsgáltam különböző koncentrációban alkalmazva (0; 0,1; 0,2 és 0,5 g/l). Az eredményekből megállapítható, hogy a mangán jelenléte a pigment termelést pozitívan befolyásolja, ugyanis a hiányában a színanyag képződés később indult be és minden törzs esetében alacsonyabb abszorbancia értéket is mértem 400 nm hullámhosszon. Bár abszorbancia növekedés mangán nélkül is megvalósult, - ami a sejtek tirozin fogyasztása miatt lehet -0,5 g/l mangánt tartalmazó tápközeg esetében mértem a legnagyobb abszorbancia értékeket, minden élesztőnél. A legjobb pigment termelőnek továbbra is a *Y. lipolytica* 6/3 bizonyult. A *Y. lipolytica* 6/3 törzsnél a 0,5 g/l koncentráció alkalmazása mellett szinte ötször nagyobb abszorbancia értéket kaptam (8,76) a fermentáció utolsó napján, mint mangán hiányában (1,78), s a másik három törzsnél is legalább hatszoros volt a két érték között a különbség.

A négy alkalmazott *Yarrowia* élesztőnél az optimálási folyamatot követően nagyobb abszorbancia értékeket kaptam a kezdetihez képest, mely a pigment termelés fokozódására utal. A legnagyobb mértékű, 7,1-szeres növekedést a *Y. lipolytica* 6/3 törzsnél tapasztaltam. A *Y. lipolytica* 854/4 és a *Y. divulgata* 5257 élesztőknél szinte ugyanakkora mértékű emelkedést értem el (2,6x), a legkisebb mértékben a *Y. divulgata* NCAIM Y.02062 törzs esetében nőtt az abszorbancia.

4.2.8. A pigmentek stabilitásának vizsgálatai

Az optimálási vizsgálatokat követően tanulmányoztam az élelmiszeripari alkalmazásnál szokásos környezeti körülmények, a forralás (30 perc), a fagyasztás, illetve különböző fény- és hőmérsékleti viszonyok melletti 5 hónapos tárolásnak a *Yarrowia* törzsek által termelt pigment stabilitására gyakorolt hatását, az esetleges későbbi ipari felhasználás céljából. A vizsgálatok során megállapítottam, hogy a minták abszorbancia értékei szinte változatlanok maradtak, bomlás nem volt tapasztalható, a színanyag stabil maradt a különböző környezeti körülmények között.

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

5.1. Lipáz enzim termelés

A *Yarrowia* törzsek YEPD táplevesben történő szelektálása során megállapítottam, hogy nagy különbség volt az egyes törzsek esetében lipáz enzim aktivitás szempontjából. A széleskörűen alkalmazott *Yarrowia lipolytica* mellett, a *Y. divulgata* és *Y. yakushimensis* vizsgált törzsei esetén tapasztaltam lipáz aktivitást, míg a rendelkezésre álló *Y. porcina* és *Y. bubula* törzsei nem termeltek lipáz enzimet az 5 napos fermentáció során indukáló komponens jelenléte nélkül. Mind extracelluláris, mind intracelluláris lipáz aktivitást detektáltam, azonban az extracelluláris frakcióban számottevően nagyobb aktivitás értékeket határoztam meg minden törzs esetében.

Az enzim termelés fokozására irányuló optimálási vizsgálatok (olívaolaj és Tween 80 hatása; rázatási sebesség hatása; inokulum mennyiség hatása; Triton X-100 és Tween 80 különböző koncentrációinak hatása) eredményeként nagyságrendekkel nagyobb aktivitást sikerült elérni: *Y. lipolytica* 854/4 esetében 101x, a *Y. divulgata* 5257-nél 58x a *Y. divulgata* NCAIM Y.02062 törzsnél 55x, a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02049 élesztőnél 28x és a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052 esetében 25x nagyobb értékeket mértem a kiindulási lipáz aktivitásokhoz képest.

Meghatároztam 6 kiválasztott *Yarrowia* törzs (*Y. lipolytica* 1/4, *Y. lipolytica* 854/4, *Y. divulgata* NCAIM Y.02062, *Y. divulgata* 5257, *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02049, *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052) eredetű extracelluláris és intracelluláris nyers lipáz enzimek pH- és hőmérséklet-optimumát. Mind az intracelluláris, mind az extracelluláris frakciók esetén is pH 7,2 az optimális kémhatás, s a két szélső pH-érték esetén (pH 5 és pH 8) szignifikánsan alacsonyabb enzimaktivitást határoztam meg. A hőmérséklet optimumot tekintve elmondható, hogy 25 °C és 37 °C között a lipáz aktivitás azonos növekvő tendenciát mutatott, 37°C-on érte el a maximumot, ezt követően drasztikusan visszaesett.

Növényi olajokat - olívaolajat (kontrollként), kókuszolajat, dióolajat, szőlőmagolajat, szezámmagolajat, napraforgóolajat, kukoricaolajat, használt sütőolajat és a repceolajat -, 1% koncentrációban 0,05% Tween 80-t tartalmazó YEPD tápközegben alkalmazva megfelelő szubsztrátumnak bizonyultak a *Y. lipolytica* 854/4, és a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052 törzsek esetében extracelluláris lipáz enzim termeltetésre. Az eredményeim alapján mind a két *Yarrowia* törzsnél az olívaolaj alkalmazása bizonyult a leghatékonyabbnak, a napraforgó olaj mellett. Kiemelném a használt sütőolajat is, mely számos növényi olajnál (szőlőmag, kukorica, repce) jobbnak bizonyult, mindkét *Yarrowia* élesztő esetében. A növényi olajok, mellett vizsgált 5 féle pellet (tökmag, aranylenmag, napraforgómag, mogyoró és kendermag) természetes szubsztrátumként való alkalmazhatóságának vizsgálata során megállapítottam, hogy a legnagyobb lipáz aktivitás az aranylenmag pelletnél, majd a tökmag pelletnél volt kimutatható.

A természetes szubsztrátumok (olívaolaj, a napraforgóolaj, használt sütőolaj, aranylenmag pellet) 0,5 %, 1 %, és 2 %-os koncentrációban történő alkalmazása során mindkét élesztőnél a 2% koncentráció volt a leghatékonyabb. Mind a *Y. lipolytica* 854/4 mind a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052 élesztőtörzs esetében a legjobb induktornak az olívaolaj mondható, A legkevésbé hatékony szubsztrátumnak az aranylenmag pellet minősíthető, hiszen minden

koncentrációnál e szubsztrátum esetében mértem a legalacsonyabb lipáz aktivitási értékeket, mely az alacsonyabb olajsavtartalmára vezethető vissza.

A kutatómunka folytatásaként érdemes lenne a használt sütőolaj szubsztrátumként való alkalmazhatóságát tovább vizsgálni a koncentráció növeléssel. Bár a használt olajat tartalmazó tápközegek esetében detektált maximum enzimaktivitás jóval elmarad a két legjobbnak bizonyult növényi olaj (olíva, napraforgó) esetében mért maximumoktól, mind a *Y. lipolytica* 854/4, mind a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052 törzseknél, szubsztrátumként való nagyobb mennyiségű alkalmazhatósága gazdaságos lenne alacsony beszerzési költsége végett, emellett a hulladékhasznosításhoz is hozzájárul. Szintén megfontolandó az aranylenmag pellet esetében is koncentráció növelése vagy szilárd szubsztrátumú fermentáció alkalmazása. Így mind a körforgásos gazdaságba való beillesztése, mind környezetvédelmi szempontból is előnyös lenne az olajpogácsa lipáz fermentációban való használata.

5.2. Barna pigment termelés

A *Yarrowia* törzsek rangsorolását pigment termelés szempontjából is elvégeztem tirozin tartalmú tápagon agardiffúziós módszerrel. Az egyes törzsek között látható különbségek voltak a termelt pigment mennyiségét illetően. A leghatékonyabb termelő törzs a *Y. lipolytica* 6/3, emellett a *Y. lipolytica* 854/4 élesztőt, illetve a még kevésbé kutatott *Y. divulgata* NCAIM Y.02062 és a *Y. divulgata* 5257 törzseket választottam ki további kísérleteimhez.

A pigment termelés fokozása érdekében a fermentáció körülményeinek optimalizálását is elvégeztem (tápközeg szelektálás, pH hatása, rázatási sebesség hatása, inokulum mennyiségének, valamint korának a hatása, Mn^{2+} -ion koncentráció hatása), melynek eredményeképpen a *Y. lipolytica* 6/3 esetében 7,1x a *Y. lipolytica* 854/4 törzsnél 2,6x a *Y. divulgata* 5257-nél 2,62x és a *Y. divulgata* NCAIM Y.02062 élesztőnél pedig 1,63x mértékű abszorbancia növekedést sikerült elérni a kezdetihez képest 400 nm-es hullámhosszon. A pigment termelés fokozásában a mangán koncentráció növelésének a hatása a legjelentősebb.

A pigment fermentáció optimalizálását követően a megtermelt színanyag stabilitását ikülönböző körülmények között vizsgálva megállapítottam, hogy a 30 perces forralás hatására a minták színe nem halványodott. Szobahőmérsékleten sötétben, fényben, és 4°C-on történő tárolás, illetve a -18°C-os fagyasztás, sem befolyásolta a megtermelt pigment színét, stabil maradt mindegyik törzs esetében az 5 hónapos vizsgálat alatt

Az esetleges ipari alkalmazás előtt mindenképpen ajánlatos volna vizsgálni a termelt melanin-szerű barna pigment stabilitását savas körülmények között is, ugyanis számos élelmiszer esetében a kémhatás a semlegesnél alacsonyabb (akár tartósítás végett).

Javasolnám továbbá a pigment típusának meghatározását HPLC technika alkalmazásával.

6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Különböző indukáló szerek hatását megvizsgálva megállapítottam, hogy az olívaolaj bizonyult a legjobb induktornak a különböző *Yarrowia* törzsek intracelluláris és extracelluláris lipáz termelésében, valamint a Tween 80 és Triton X-100 felületaktív ágensek alkalmazása fokozza az extracelluláris lipáz aktivitást. Az olívaolaj és a Tween 80 koncentrációjának optimalizálása során azt tapasztaltam, hogy a *Y. lipolytica* 854/4 törzs esetében az 1,6 % olívaolaj, valamint 0,065 % Tween 80 koncentráció, a *Y. lipolytica* 1/4 törzsnél az 1,4 % olívaolaj és a 0,09 % Tween 80 koncentráció, a *Y. divulgata* NCAIM Y.02062 élesztőnél a 1,6 % olívaolaj, valamint a 0,09 % Tween 80 koncentráció, a *Y. divulgata* 5257 törzsnél az 1,6 % olívaolaj és a 0,06 % Tween 80 alkalmazásával YEPD táplevesben érhető el a legkedvezőbb lipáz aktivitás. Kísérletekkel igazoltam, hogy a különböző *Yarrowia* törzsek extracelluláris lipáz termelésében az optimált olívaolaj koncentráció csökkenthető a Tween 80 és Triton X-100 ágensek együttes alkalmazásával. Az 1% olívaolajat tartalmazó YEPD tápközegekben a *Y. lipolytica* 854/4 törzs esetében 0,09 % Tween 80 és 0,03 % Triton X-100, a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02049, NCAIM Y.02052 és a *Y. divulgata* NCAIM Y.02062 törzseknél 0,09 % Tween 80 és 0,01 % Triton X-100, míg a *Y. divulgata* 5257 törzsnél 0,05 % Tween 80 és 0,05 % Triton-X-100 koncentráció szignifikánsan fokozza a lipáz enzim aktivitást.

2. Megállapítottam a *Y. lipolytica* 1/4, a *Y. lipolytica* 854/4, a *Y. divulgata* 5257, a *Y. divulgata* NCAIM Y.02062, a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02049 és a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052 törzsek által termelt extracelluláris és intracelluláris nyers lipáz enzimek optimális környezeti paramétereit, amelyek a következők: pH optimum pH 7,2 (Sørensen puffer) és hőmérséklet optimum 37°C voltak.

3. Megvizsgáltam a használt sütőolaj (olcsó, környezetterhelő hulladék) alkalmazhatóságát a *Yarrowia* élesztő lipáz enzim előállítására és azt tapasztaltam, hogy a 0,5%-ban használt sütőolajat és 0,05% Tween 80-t tartalmazó YEPD tápközegben hasonló lipáz titer érhető el, mint 0,5% olívaolaj szubsztrátumot tartalmazó tápközegben a *Y. lipolytica* 854/4 és a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052 törzsekkel megvalósított 24 órás fermentáció esetén.

4. Optimalizáltam a tápközeg összetételeit a barna színű melanin-szerű pigment termelésének fokozására, és megállapítottam, hogy 0,27 g/l tirozin és 0,5 g/l Mn^{2+} -ion tartalmú, különböző aminosavakkal - glicin, L-glutamin, L-aszparagin - 1g/l koncentrációban kiegészített tápközegben, 24 órás $5 \cdot 10^6$ TKE/ml inokulum mennyiséggel indított, 130 rázatási sebességgel megvalósított fermentáció adta a legjobb eredményeket a *Y. lipolytica* 6/3 törzs esetén.

5. Megvizsgáltam a *Yarrowia* élesztő által termelt barna színű melanin-szerű pigment stabilitását és azt tapasztaltam, hogy a *Y. lipolytica* 6/3, *Y. lipolytica* 854/4, a *Y. divulgata* NCAIM Y.02062 és a *Y. divulgata* 5257 eredetű pigment nagy stabilitást mutatott különböző körülmények között. Stabil maradt legalább 30 percen keresztül történő forralás során, továbbá 5 hónapon keresztül szobahőmérsékleten (fényes világos helyen és sötétben), valamint 4°C -on és -18°C -on történő tárolás során.

7. PUBLIKÁCIÓK

7.1. Tudományos folyóiratban megjelent közlemények

- Sipiczki, G.**, Micevic, S. S., Kohari-Farkas, C., Nagy, E. S., Nguyen, Q. D., Gere, A., & Bujna, E. (2024). Effects of Olive Oil and Tween 80 on Production of Lipase by *Yarrowia* Yeast Strains. *Processes*, 12(6), 1206. DOI: 10.3390/pr12061206
- Végh, R., **Sipiczki, G.**, Csóka, M., Mednyánszky, Z., Bujna, E., & Takács, K. (2024). Chemical Characterization, In Vitro Analysis of Functional Properties, and Volatile Profiling of Sixteen Nutraceuticals Marketed as “Superfood”. *Applied Sciences*, 14(23), 11069. DOI: 10.3390/app142311069
- Végh, R., **Sipiczki, G.**, & Csóka, M. (2023). Investigating the antioxidant and color properties of bee pollens of various plant sources. *Chemistry & Biodiversity*, 20(7), e202300126. DOI: 10.1002/cbdv.202300126
- Sun, W., Nguyen, Q. D., **Sipiczki, G.**, Ziane, S. R., Hristovski, K., Friedrich, L., Visy, A., Hitka, G., Gere, A., & Bujna, E. (2022). Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* 299v strain with whey proteins by lyophilization and its application in production of probiotic apple juices. *Applied Sciences*, 13(1), 318 DOI: 10.3390/app13010318
- Vu, V., Farkas, C., Riyad, O., Bujna, E., Kilin, A., **Sipiczki, G.**, Sharma, M., Usmani, Z., Gupta, K. V., & Nguyen, Q. D. (2022). Enhancement of the enzymatic hydrolysis efficiency of wheat bran using the *Bacillus* strains and their consortium. *Bioresource Technology*, 343, 126092. DOI: 10.1016/j.biortech.2021.126092
- Sipiczki, G.**, Eszterbauer, E., Nagy, E. Sz.; Kiss, Zs., Bujna, E., (2022). *Yarrowia* törzsek pigment termelésének vizsgálata. Élelmiszer Tudomány Technológia, p.68

7.2. Konferencia posztterek

- Nagy, E. Sz., Bujna, E., **Sipiczki, G.**, Farkas, Cs., Belo, I., Lopes, M., Braga, A., Mesquita, D. P., Ferreira, P., Nguyen, D. Q. (2018) Optimization of lipase production by *Yarrowia divulgata*, 3rd International Conference on Food Science and Technology, pp. 136-137., <http://www.foodconf.hu/files/BOA2018.pdf>
- Nagy, E. Sz., Bujna, E., **Sipiczki, G.**, Farkas, Cs., Belo, I., Lopes, M., Braga, A., Mesquita, D. P., Ferreira, P., Nguyen, Q. D.. (2019) Enhancement of lipase production by *Yarrowia divulgata*, XX EuroFoodChem Conference, pp. 284., Book of Abstracts of the XX EuroFoodChem Congress
- Sipiczki, G.**, Eszterbauer, E., Szinger, D.; Bujna, E., (2020) Production of Pigment by *Yarrowia*, Magyar Mikrobiológiai Társaság (MMT) pp. 34., A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2020. évi Nagygyűlése és a XIV. Fermentációs Kollokvium: Absztraktfüzet
- Sipiczki, G.**, Bujna, E. (2020) A pH és a levegőztetés hatása a *Yarrowia* élesztők pigment termelésére, ITT -Ifjú Tehetségek Találkozója 2020, Konferenciakiadvány p. 335.
- Sipiczki, G.**, Kovács, O. L., Bujna, E. (2021) Production and stability of pigment by *Yarrowia*, 4th International Conference on Biosystems and Food Engineering, Book of abstract Paper E447.
- Sipiczki, G.**, Bujna, E. (2021) *Yarrowia* törzsek pigment termelésének optimalálása, ITT -Ifjú Tehetségek Találkozója 2021

- Sipiczki, G., Bujna, E. (2022)** Effect of aeration and manganese concentration on pigment production by *Yarrowia* yeast, 4th International Conference on Food Science and Technology, pp. 75., <http://www.foodconf.hu/files/BOA2022.pdf>
- Sipiczki, G., Bujna, E. (2023)** Effect of agitation speeds on lipase production by *Yarrowia* yeasts, 5th International Conference on Biosystems and Food Engineering, ISBN 978-615-01-8151-6

