



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

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

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	1
1. BEVEZETÉS	4
2. CÉLKITŰZÉS.....	6
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	8
3.1. Élesztőgombák és ipari jelentőségük.....	8
3.2. <i>Yarrowia</i> nemzetség és egyes fajainak jellemzése	9
3.2.1. <i>Yarrowia lipolytica</i>	10
3.2.2. <i>Yarrowia divulgata</i>	12
3.2.3. <i>Yarrowia porcina</i>	12
3.2.4. <i>Yarrowia bubula</i>	13
3.2.5. <i>Yarrowia yakushimensis</i>	13
3.3. A lipáz enzim jellemzése	14
3.3.1. Szerkezete	14
3.3.2. Hatásmechanizmusa.....	14
3.3.3. Előfordulása	15
3.3.4. Optimális működési paraméterek.....	15
3.3.5. Szubsztrátspecifitás	16
3.3.6. Élesztő eredetű lipázok	17
3.4. Lipáz enzimtermelés fokozása.....	19
3.5. A lipáz enzim ipari felhasználása	20
3.5.1. Élelmiszeripar	21
3.5.2. Környezetvédelem.....	22
3.5.3. Egészségmegőrzés és gyógyszergyártás	23
3.5.4. Textilipar	23
3.5.5. Mosószer-gyártás	24
3.5.6. Kozmetikai ipar.....	24
3.5.7. Papíripár	24
3.5.8. Energiaipar	25
3.6. Biológiai pigmentek eredete	25
3.6.1. Mikrobiális pigmentek	26
3.7. Természetben előforduló pigmentek jellemzése.....	27
3.7.1. Karotinoidok	27
3.7.1.1 Karotin	27
3.7.1.2 Asztaxantin.....	28
3.7.1.3 Zeaxantin.....	28

3.7.1.4	Likopin.....	28
3.7.1.5	Torularhodin.....	29
3.7.2.	Sztafiloxantin	29
3.7.3.	Piocianin.....	29
3.7.4.	Riboflavin.....	29
3.7.5.	<i>Monascus</i> pigmentek.....	30
3.7.6.	Antrakínon	30
3.7.7.	Prodigiosin	30
3.7.8.	Cianobaktériumok által termelt pigmentek	30
3.7.9.	Melanin	31
3.7.9.1	Eumelanin	32
3.7.9.2	Feomelanin.....	33
3.7.9.3	Allomelanin.....	33
3.7.9.4	Piomelanin	34
3.8.	Mikrobiális pigment termelést befolyásoló tényezők	34
3.9.	Pigmentek általános felhasználása a különféle iparágakban.....	35
3.9.1.	Élelmiszeripar	36
3.9.2.	Gyógyszeripar	37
3.9.3.	Textilipar	38
3.9.4.	Kozmetikai ipar.....	39
4.	ANYAG ÉS MÓDSZER.....	40
4.1.	A kísérletekhez felhasznált <i>Yarrowia</i> törzsek.....	40
4.2.	Alkalmazott tápközegek	40
4.2.1.	Ferdeagar.....	40
4.2.2.	Pigment screeneléshez felhasznált tápagar	41
4.2.3.	Inokulum tápközeg.....	41
4.2.4.	A lipáz fermentációhoz használt tápközegek	41
4.2.5.	A pigment fermentációhoz használt tápközegek.....	43
4.3.	Enzimaktivitás méréshez felhasznált oldatok	44
4.4.	Alkalmazott módszerek	45
4.4.1.	pH mérés	45
4.4.2.	Sejtszám meghatározás	45
4.4.3.	Lipáz fermentáció.....	45
4.4.4.	Lipáz enzim aktivitásának mérése	46
4.4.5.	Kalibráció.....	47
4.4.6.	Sejtfeltárás.....	48
4.4.7.	Központi elrendezésű kísérlettervezés (CCD)	48
4.4.8.	Pigment fermentáció	49
4.4.9.	Pigment termelés meghatározása	49

5.	EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	50
5.1.	<i>Yarrowia</i> törzsek lipáz termelésének vizsgálata	50
5.1.1.	Lipáztermelő törzsek szelektálása	50
5.1.2.	Az olívaolaj és a Tween 80 hatása a <i>Yarrowia lipolytica</i> és a <i>Yarrowia divulgata</i> törzsek lipáz termelésére	51
5.1.3.	<i>Yarrowia yakushimensis</i> törzsek lipáz enzim termelésének vizsgálata.....	54
5.1.4.	Az olívaolaj és a Tween 80 koncentráció hatásának vizsgálata az extracelluláris lipáztermelésre	55
5.1.5.	Rázatási sebesség hatása a lipáz termelésre	60
5.1.6.	Inokulum mennyiség optimalálása.....	62
5.1.7.	Az extracelluláris lipáztermelés fokozásának vizsgálata Tween 80 és Triton X-100 alkalmazásával	65
5.1.8.	Lipáz aktivitás alakulása az optimalálási folyamat során	71
5.1.9.	A <i>Yarrowia</i> élesztőkből származó nyers lipázok részleges jellemzése.....	71
5.1.10.	Növényi olajok és olajpogácsák alkalmazhatóságának vizsgálata lipáz enzim termelésére	75
5.1.10.1	Növényi olajok vizsgálata.....	75
5.1.10.2	Növényi eredetű olajpogácsák vizsgálata	77
5.1.11.	Természetes szubsztrátumok koncentrációjának optimalálása az extracelluláris lipáz termelés szempontjából.....	79
5.2.	<i>Yarrowia</i> törzsek pigment termelésének vizsgálata.....	81
5.2.1.	<i>Yarrowia</i> törzsek screenelése pigment termelésre	82
5.2.2.	Tápközeg összetétel hatásának vizsgálata.....	83
5.2.3.	A kiindulási tápközeg puffer jellegének hatása a pigment termelésre	86
5.2.4.	Rázatási sebesség hatása a pigment termelésre.....	89
5.2.5.	Az inokulum kor hatásának vizsgálata.....	91
5.2.6.	Az inokulum mennyiség hatásának vizsgálata.....	92
5.2.7.	Mn ²⁺ -ion koncentráció hatása a pigment termelésre	94
5.2.8.	Pigment termelés alakulása az optimalálási folyamat során	97
5.2.9.	A pigmentek stabilitásának vizsgálatai	97
5.2.9.1	Forralási vizsgálat	98
5.2.9.2	Fagyasztási vizsgálat.....	98
5.2.9.3	Tárolási vizsgálat	99
6.	KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK	102
7.	ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	105
8.	ÖSSZEFOGLALÁS.....	107
9.	IRODALOMJEGYZÉK.....	118

1. BEVEZETÉS

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 – élelmiszeripari és egyéb ipari célú – citromsav termelésénél, 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 sejtfalkötött 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 sejtfelépítésben, és az egyes lipidek, így többek között a membránalkotó lipid vegyületek előállításában.

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 mikroorganizmusok alkalmazásának előnyei közé tartozik, hogy

felszaporításuk egyszerű, könnyű kinyerni, nem okoz problémát az idényszerűség sem, továbbá sok különböző színű pigmentet képesek előállítani.

A *Yarrowia* élesztőgombákkal összefüggő kutatások az elmúlt években azok sokoldalú felhasználását támasztották alá. Dolgozatomban elsősorban olyan *Yarrowia* fajok biotechnológiai alkalmazhatóságát – különös tekintettel lipáz és pigment termelő képességükre - terveztem feltárni, melyeket eddig kevésbé vizsgált a szaktudomány. Meggyőződésem, hogy a *Y. lipolytica* mellett a többi faj is hasznos lehet a különféle ipari célú felhasználás, illetve tevékenységek számára.

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 optimalizálásával és alkalmazásával. A *Y. lipolytica* mellett a nemzetség más fajai esetén is az ipari célú felhasználás lehetősége állhat fenn.

A munkám során célul tűztem ki az élesztőgombák által termelt lipáz enzim, valamint barna pigment fermentációjának optimalizálását, melynek megvalósítására a *Yarrowia* nemzetséget választottam.

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 hozzáadásának vizsgálata
 - A fermentációt befolyásoló környezeti paraméterek 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 koncentrációjának vizsgálata a legjobb pigment termelő törzs esetében
- A pigmentek stabilitásának felderítése különböző hőmérsékleti- és fényviszonyok között:
 - forralás során
 - szobahőmérsékleten, illetve hűtött tárolás esetén,
 - fénynek kitett és sötét körülmények között.

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. Élesztőgombák és ipari jelentőségük

Az élesztőgombák eukarióta, egysejtű, heterotróf élőlények, melyek lehetnek obligát aerob szervezetek, mint a *Yarrowia lipolytica*, vagy fakultatív anaerobok, mint a *Candida albicans* vagy a *Saccharomyces cerevisiae* (Deák *et al.*, 2006). Bimbózás vagy hasadás útján szaporodnak és spórákat képeznek, amelyek nincsenek bezárva termőtestbe. Először szexualitásuk (Ascomycotina vagy Basidiomycotina) vagy az életciklus szexuális fázisának hiánya (Deuteromycotina) alapján osztályozzák őket. Az alsóbb taxonómiai alosztályokat (családok, alcsaládok, nemzetségek, fajok és törzsek) morfológiai, fiziológiai és genetikai jellemzőik határozzák meg, beleértve az ivaros szaporodást is (Azhar *et al.*, 2017). Az élesztőfajok diverzitását bizonyos „nichékben” a különböző szénforrások hasznosítási képessége határozza meg, melyek az élőhelyekre igen specifikusak. Az élesztők megtalálhatóak szárazföldi, vízi és légi környezetben is. A különféle növények az élesztőközösségek kedvelt élőhelyei. Igen jól alkalmazkodnak olyan szélsőséges környezetekhez, mint például a savas kémhatású közeg, az alacsony hőmérséklet vagy vízaktivitás (nagy cukor- vagy sókoncentráció). A *Y. lipolytica*-t ugyanis izolálták már extrém sós környezetből, például a Holt-tengerből, az Utahban található Nagy-Sóstóból, valamint a Dominikai Köztársaságban lévő Enriquillo-tóból (Butinar *et al.*, 2005; Azhar *et al.*, 2017). A felfedezett élesztőgombák száma évről évre nő. 2005-ig több mint 2500 élesztőfajt publikáltak. Feltételezhető, hogy az élesztőfajoknak mindössze 1%-a ismert, ami azt jelenti, hogy a Földön élő élesztőfajok összlétszáma elérheti a 150 000-et (Barriga *et al.*, 2011). A *Yarrowia* csoporton belül új felfedezés eredményeként a *Yarrowia divulgata*-t 2013-ban (Nagy *et al.*, 2013), a *Yarrowia porcina*-t és a *Yarrowia bubula*-t 2014-ben írták le (Nagy *et al.*, 2014), a *Yarrowia parophoni*-t 2017-ben (Gouliamova *et al.*, 2017), továbbá a *Yarrowia brassicae*-t 2018-ban (Liu *et al.*, 2018). Az előbbieket elsősorban különböző húsmintákból, míg az utóbbi kettőt hagyományos kínai savanyú káposztából, illetve rovarból izolálták.

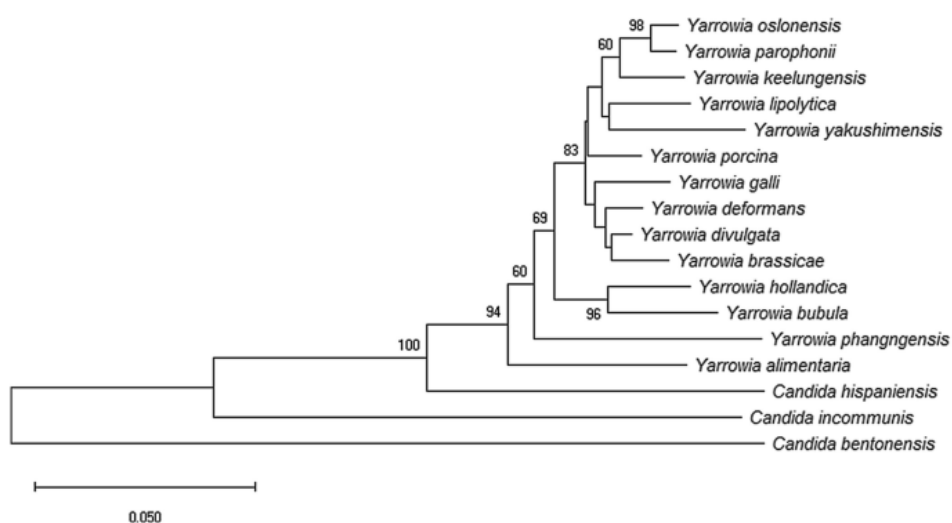
Az élesztőgombák meglehetősen fontos szerepet játszanak az iparban, elsősorban az élelmiszeriparban. Az élesztőgombák az erjesztett termékek széles skálájának előállításáért felelősek, kezdve a különféle szubsztrátumok felhasználásával készített alkoholos italoktól, az erjesztett tejtermékeken át, a gabonaalapú kelesztett termékeken keresztül egészen az ízesítőig (Rai és Jeyaram, 2017). Egy részük alkoholos erjesztést végez, amit az élelmiszeriparban előszeretettel használnak. Ennek során a glikolízis útján képződött piroszölősav acetaldehiddé dekarboxileződik, majd etil-alkohollá redukálódik. Az erjedés folyamán létrejött úgynevezett

másodlagos termékek a glicerín, diacetil és az etil-acetát az erjesztett italok aromájának kialakításában bírnak jelentőséggel. Aerob módon sokféle vegyületet tudnak hasznosítani, mint az összetett szénhidrátokat, valamint a szerves savakat, esetleg alkoholokat, továbbá egyes fajok, mint például a *Y. lipolytica* még a szénhidrogéneket is képesek asszimilálni (Deák *et al.*, 2006).

Azonban meg kell említeni, hogy számos előnyük mellett hátrányaik is vannak. A káros vagy éppen hasznos jellegük törzs-, valamint élelmiszer függő, ahogy remek példa erre a *Saccharomyces cerevisiae*, melyet a szesziparban előszeretettel alkalmaznak a sörök, valamint a borok erjesztésére, tehát ebben az esetben igen hasznosnak tekinthető, ellenben a gyümölcsleveknel romlást okozó fajként tartják számon. A húsok és tejtermékek esetében a *Y. lipolytica* gyakran okoz érzékszervi elváltozást vagy romlást, míg a sörök és borok esetében mindez a *Candida vini*-nek róható fel.

3.2. *Yarrowia* nemzetség és egyes fajainak jellemzése

A *Yarrowia* nemzetség a Saccharomycetes osztályban, a Saccharomycetales rendben és a Dipodascaceae családban helyezkedik el (Gouliamova *et al.*, 2017), valamint a *Wickerhamiella* testvércsoportja (Kurtzman *et al.*, 2011). A *Y. lipolytica*-t tekintették a *Yarrowia* nemzetség egyetlen fájának több mint 50 éven át, és csak mintegy 25 éve (amikor a szekvenálás rutintechnikává vált a rendszertani vizsgálatokban) sikerült más fajokat is azonosítani (Heard és Fleet; 1999; Madzak, 2021). A *Yarrowia* csoport jelenleg ismert fajai az 1. ábrán láthatóak.



1. ábra: A *Yarrowia* csoport tagjai közötti filogenetikai kapcsolatok a spacer régiók és a nagy alegység rRNS gén D1/D2 doménjének összekapcsolt szekvenciái alapján (Péter *et al.*, 2019).

A nemzetség tagjai között megkülönböztetnek ivaros és ivartalan fajokat egyaránt. Liu és munkatársai 2018-as tanulmánya alapján az ivaros fajokhoz tartozik a *Y. parophonji*, *Y. porcina*, *Y. deformans* és a *Y. lipolytica*, s az ivartalanokhoz pedig a *Y. alimentaria*, *Y. galli*, *Y. bubula*, *Y. yakushimensis*, valamint a nemzetség további tagjai.

Tagjai közül a leggyakrabban vizsgált faj a *Y. lipolytica*, melyet anyagcsere termékei miatt sokoldalúan felhasználnak különféle iparágakban, különösképpen az élelmiszeriparban. A molekuláris biológiai vizsgálatoknak köszönhetően bebizonyosodott, hogy a *Y. lipolytica*-nak vélt törzsek egy jelentős része valójában más fajhoz tartozik. Feltételezhetően a *Y. lipolytica* eddig még nem, vagy kevésbé vizsgált közel rokon fajainak tagjai az ipar számára szintén kiemelkedő jelentőségűek lehetnek.

3.2.1. *Yarrowia lipolytica*

Van der Walt és von Arx 1980-ban javasolta a *Yarrowia* általános elnevezést egy új nemzetség elismeréseként, amelyet David Yarrow azonosított 1972-ben. A „*lipolytica*” fajnév pedig ennek az élesztőnek a lipidek hidrolízisére való képességéből származik (Nicaud, 2012). A *Y. lipolytica* teleomorf faj, tehát képes az ivaros szaporodásra, anamorf változata a *Candida lipolytica*. A *Y. lipolytica* törzsek szénforrásként valójában kevés cukrot (főként glükózt) használnak fel, de nagyon hatékonyan bontják a hidrofób szubsztrátokat, tehát ezen élesztő törzseit általában hidrofób szubsztrátumot tartalmazó környezetből izolálják, például sajtból vagy kolbászból. Úgynevezett „olajos élesztőnek” tekintik, mivel képes nagy mennyiségű lipid felhalmozására. Figyelembe véve, hogy szigorúan aerob mikrobáról van szó, ezért többnyire a felszíni mikroflórában azonosították (Groenewald *et al.*, 2014). Figyelemreméltó proteolitikus és lipolitikus aktivitással rendelkezik (Spencer *et al.*, 2002; Gonçalves *et al.*, 2014). A *Y. lipolytica* nem patogén mikroba, amely szerepel a GRAS listán is, így az élelmiszerekben való felhasználása is biztonságos (Coelho *et al.*, 2010). Spencer és munkatársai (2002) szerint, ezen mikroba maximális szaporodási hőmérséklete 32-34 °C, optimális növekedési hőmérséklete pedig 20-28°C között van. Bár az optimális pH tartomány törzsenként eltérő lehet, azonban a legtöbb törzsnek széles a pH tűrése (pH 3,5-8,0), míg vannak, amelyek elviselik az ennél savasabb (pH 2), illetve lúgosabb (pH 9,7) kémhatású közeget is (Madzak, 2021).

Számos anyagcsereterméket termel extracellulárisan, például lipázt, proteázt (López-Trujillo *et al.*, 2023), lipideket (Park és Ledesma-Amaro, 2023), eritritet, mannitot (Tomaszewska *et al.*, 2012), citromsavat (Cavallo *et al.*, 2017) és pigmentet (Carreira *et al.*, 2001 a), melyek felhasználhatók különböző iparágakban. Az anyagcseretermékek kiválasztása és a mikroba növekedése erősen függ az oxigénellátottságtól (Groenewald *et al.*, 2014).

Néhány, a nyilvános élesztőgyűjteményekben lévő, biotechnológiai szempontból hasznos és figyelemre méltó *Y. lipolytica* törzset mutat be az 1. táblázat.

1. táblázat: Biotechnológiai jelentőségű 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 citromsav termelés, szekvenált törzs	<i>in situ</i> talajbioremediáció, citromsav termelés
ACA-DC 50109/ Görögország	nagyon magas lipidtartalom és termelékenység, robusztus növekedés nyers glicerinen, egyidejűleg magas lipid- és citromsav hozam	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 citromsav hozam	citromsav és poliol termelés
ATCC 20362/USA	robusztus 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 citromsav termelés, 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

3.2.2. *Yarrowia divulgata*

Nagy és munkatársai (2013) munkájuk során 5 új *Yarrowia divulgata* f.a., sp. nov. törzset izoláltak, állati eredetű mintákból. Az egyik új törzset egy Dániában lévő szalonnafeldolgozó üzeméből izolálták, két törzset az USA-ban csirkemájából, valamint egyet egyet csirkemellből, illetve darált marhahúsból nyertek ki Magyarországon. E törzsek fenotípusos tulajdonságaikat tekintve megkülönböztethetetlenek a *Y. lipolytica* és a *Y. deformans* fajoktól. A D1 / D2, illetve az ITS régió szekvenciáinak összehasonlítása azt mutatta, hogy a *Yarrowia* nemzetségbe tartoznak, viszont a *Y. lipolytica* és a *Y. deformans* fajokkal szemben mutatott fenotípusos egyezés ellenére az izolált törzsek új fajt alkotnak. Rakicka és munkatársai (2016) a *Yarrowia* nemzetség tizenkét fajt vizsgálták különböző tápközegekben eritrit és mannit előállítására tiszta glicerinnél, glükózból vagy fruktózból. Megállapították, hogy a *Y. divulgata* is ígéretesnek bizonyult, mint cukoralkohol-termelő törzs. A sejtek alakja gömbölyű, gömbölyded vagy ellipszoid. Gömbölyű vagy gömbölyded alak esetén 2,5-6 µm átmérőjűek, az ellipszoid sejtek 2,5-6,5 x 3,5-10 µm méretűek. A sejtek egyesével, párokban, rövid láncokban vagy kis csoportokat alkotva fordulnak elő. Három napon át 25 °C-on inkubált 5%-os malátakivonat tartalmú táplevesben komplett vagy inkomplett felkúszó hártát és üledéket képez, míg az agarra szélesztett tenyészet állaga vajszerű, felszíne a majdnem simától a gyűrtig változhat, lapos vagy enyhén kiemelkedő, krémszínű, matt. A telep szegélye finoman lebenyezett, esetleg fonalas. Mindez megállapítható a *Yarrowia porcina* és a *Yarrowia bubula* esetében is. Hét napon át inkubálva 25 °C-on kukoricaliszt agaron valódi- és álhifát is képez. Aszkospórát nem képez. Erjesztésre nem képes. (Nagy et al., 2013).

3.2.3. *Yarrowia porcina*

2014-ben került leírásra a *Y. porcina*, melyet trópusi folyó üledékéből, illetve sertéshúsminiókból izoláltak (Nagy et al., 2014). A vizsgálat során a D1 / D2 és az ITS régiót analizálták, s eredményeképpen a két újonnan felfedezett fajt a *Yarrowia* nemzetségben helyezték el. Az első új fajt reprezentáló hét törzs közül néhány képes ivarosán szaporodni, így ez a *Yarrowia* csoport harmadik ismert teleomorf faja, melyet *Yarrowia porcina* sp. nov. névvel jelöltek. Ez az új élesztő faj a fenotípusos tulajdonságai szerint megkülönböztethetetlen a *Y. lipolytica*-tól, valamint néhány más fajtól a nemzetségen belül. Jelentős variabilitást figyeltek meg a hét törzs D1 / D2 és az ITS régiók között. A D1 / D2, valamint az ITS régió 0-3 szubsztitúciója támasztotta alá a hét törzsnek a külön fajba való sorolását. Aszexuális szaporodása multilaterális sarjadzással megy végbe. A sejtek ellipszoidok, méretük 1,0-5,0 x 2,5-14,0 µm, egyesével, párokban, rövid láncokban vagy kis csoportokat alkotva fordulnak elő.

Rövid álhifát és valódi hifát képez. A három napos 25 °C-on inkubált 5%-os malátakivonat agarra szélesztett tenyészet állaga vajszerű, krémszínű, felszíne a simától vagy enyhén érdestől a gyúrtig és fonalasig változhat, lapos vagy enyhén kiemelkedő, matt vagy enyhén fénylő. A telep szegélye ép vagy fonalas, esetleg enyhén lebenyes (Nagy *et al.*, 2014).

3.2.4. *Yarrowia bubula*

A *Y. bubula* leírása szintén 2014-ben történt meg, melyet marhahúsmintákból izoláltak. Mindez a *Y. porcina* azonosításával egy időben zajlott és a vizsgálat során szintén a D1 / D2 és az ITS régiót analizálták. Ahogyan a fentiekben említettem, a tizenkét törzsből hét törzs egy azon fajhoz tartozott, míg a másik öt törzs esetében nem figyeltek meg aszkospóra képződést, tehát nem képesek ivaros szaporodásra. Ennek ellenére az utóbbiakat is a *Yarrowia* nemzetségbe, illetve egy azon fajba sorolták. Ennek az új fajnak a *Yarrowia bubula* f.a., sp. nov. nevet adták. A törzsek hasonló makro- és mikromorfológiával, fiziológiai jellemzőkkel rendelkeznek. Nem képesek 30 °C-on szaporodni. Aszexuális szaporodása multilaterális sarjadzással megy végbe. A sejtek ellipszoidok, méretük 2,0-6,0 x 2,5-14,5 µm, egyesével, párokban, rövid láncokban vagy kis csoportokat alkotva fordulnak elő. Rövid álhifát és valódi hifát képez (Nagy *et al.*, 2014).

3.2.5. *Yarrowia yakushimensis*

Groenewald és Smith 2013-ban publikálta a *Y. yakushimensis* tudományos leírását *Yarrowia yakushimensis* f.a. (forma asexualis), comb. nov. néven egy másik *Yarrowia* nemzetségbe tartozó fajjal együtt, a *Y. lipolytica* élesztő tanulmányozása során. A „*yakushimensis*” elnevezés az izolátumok eredetére, a Japánban lévő Yakushima szigetre utal. Ezen élesztő anamorf, vagyis ivartalan alakja *C. lipolytica*-ként volt besorolva a *Candida* nemzetségbe. A *Candida* (Y.) *deformans*-t először a *C. (Y.) lipolytica* különféle változatának tekintették, ezt követően szinonimaként használták a két elnevezést. Az rRNS-génszekvenciák tanulmányozására irányuló vizsgálatok azonban azt mutatták, hogy a *C. (Y.) deformans* egy külön faj. A Dél-Afrikából származó *C. (Y.) deformans* törzsekkel és a CBS élesztőgyűjteményben jelen lévő törzsekkel együtt történő kutatás során a *Yarrowia* nemzetség új teleomorf fajt fedezték fel, melyet *Yarrowia deformans*-ként azonosítottak. A kutatás során *Candida yakushimensis* nom. inval, törzseket is tanulmányoztak, hasonlóképpen, mint a *C. (Y.) deformans*-t. A kísérletek folyamán megállapított eredmények alapján nevezték át *Yarrowia yakushimensis*-re. A *Yarrowia* nemzetség tagjaitól az különbözteti meg, hogy 30 °C-on nem tud növekedni. Ezen élesztőgomba 25 °C-on élesztő-malátakivonat tápvelésben a harmadik napon finom pelliciumot és üledéket képez. Többoldali bimbózással történik az ivartalan

szaporodása. A sejtek előfordulhatnak párokban, csoportokban vagy esetleg önállóan. Alakjuk változó, a tojásdadtól egészen a megnyúlt formáig lehet megfigyelni, illetve pszeudohifák keletkezhetnek (Groenewald és Smith, 2013).

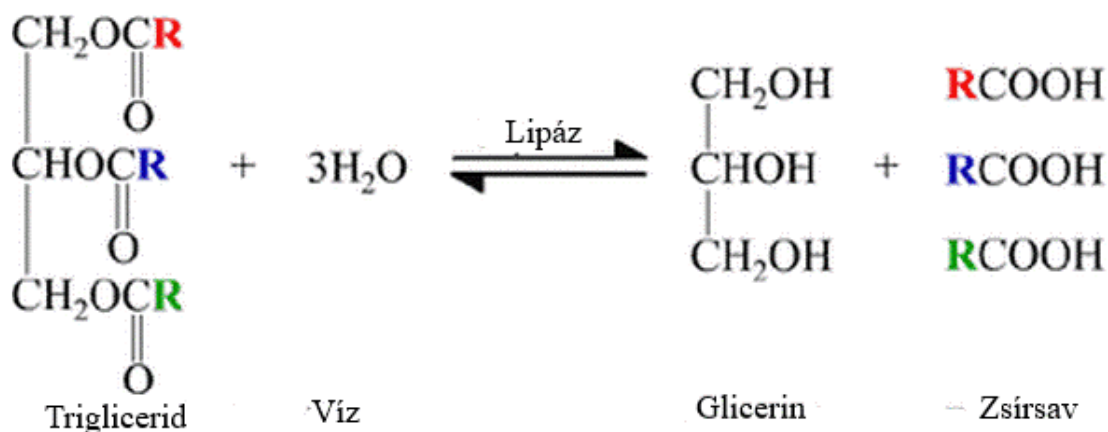
3.3. A lipáz enzim jellemzése

3.3.1. Szerkezete

A lipáz (triacylglycerin-hidroláz; EC 3.1.1.3) enzim a szerin-hidroláz enzimek csoportjába tartozik. A lipázok szerkezeti jellemzői alapján az $\alpha\beta$ -hidrolázok redős családjába tartoznak és konzervált katalitikus triáddal rendelkeznek, amely szerin, hisztidin és aszparaginsav/glutaminsav aminosavakból tevődik össze. Az enzim egy, kettő vagy több hurokkal vagy hélixszel rendelkező fedőket tartalmazhat. A kis hurok/hélix fedők a mono- és diacylglycerin-lipázban fedezhetők fel (Nascimento *et al.*, 2022).

3.3.2. Hatásmechanizmusa

Ezek az enzimek különböző zsírok, illetve olajok hidrolízisét katalizálják glicerinné és szabad zsírsavakká az olajos-vizes fázis határfelületén. Ezt a folyamatot szemlélteti a 2. ábra. Az észter kötések bontják, valamint hasítják a vízben nem oldódó zsírsav-észtereket is, ellentétben az észterázokkal. Működésükhöz nincs szükségük kofaktorokra (Divakar és Manohar, 2007; Lotti és Alberghina, 2007). A lipázok specifikus kinetikai tulajdonságai a katalitikus hely konformációival hozhatók összefüggésbe. Két konformációból, egy nyitott, aktív és egy zárt, inaktív konformációból állhat. A nyitott, aktív konformációban a szubsztrát hozzá tud férni a katalitikus helyhez, ennek köszönhetően termékképződés zajlik le. További tulajdonságai közé sorolhatjuk, hogy változó reakciósebességgel hatnak a különböző szubsztrátumokra (Nascimento *et al.*, 2022).



2.ábra: Trigliceridek hidrolízise (Internet 1)

3.3.3. Előfordulása

A lipázok a különböző élőlények számára nélkülözhetetlenek, ugyanis rendkívül fontos szerepük van a lipid- és lipoprotein metabolizmusokban (Sharma *et al.*, 2001), így állatokban, növényekben és mikroorganizmusokban egyaránt megtalálhatók. A növények esetében a lipáz enzimek különösen a magok csírázásában, illetve magának a gyümölcsnek az érési folyamatában játszanak közre (Eastmond, 2006).

Emberi és állati szervezetek esetén az emésztőrendszerben termelődnek, főként a nyálban, a gyomorban és a hasnyálmirigyben. A lipázok a táplálékban lévő trigliceridek lebontását végzik (Casas-Godoy *et al.*, 2012). Az eukariótákban a lipázok a lipidanyagcsere különböző szakaszaiban vesznek részt, ideértve a zsírok emésztését, felszívódását, helyreállítását és a lipoprotein anyagcserét (Sharma *et al.*, 2001).

A mikrobiális lipázok, a növényekből vagy állatokból származó lipázokkal szemben értékesebbek, mivel sokféle katalitikus aktivitásuk van, és genetikailag könnyebben manipulálhatóak (Joshi és Kuila, 2018). Erre való tekintettel 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 kereskedelmi forgalomban kapható lipáz enzimek 88%-a mikrobiális eredetű, 8%-a állati és mindössze 4%-a növényi eredetű (Martínez-Martínez *et al.*, 2017).

A mikrobiális lipázok enzimatisma tulajdonságaik és szubsztrát specifitásuk tekintetében is igen változatosak, ami széleskörű alkalmazási lehetőséget teremt (Ray, 2012). A gomba, illetve a baktérium eredetű a lipáz enzimek gyakran extracelluláris formában vannak jelen, de előfordulhatnak sejtfalhoz kötötten, valamint intracellulárisan. Kiváló példa erre a *Thermus thermophilus*, ugyanis ez a baktérium mind a három formában képes az enzimet szintetizálni (Deive *et al.*, 2009). Az extracellulárisan termelődő enzimek nagy előnye, hogy a kinyerésükhöz nincs szükség a sejtek feltárására, ezáltal gyorsítva és egyszerűsítve a hozzáférhetőségüket. A közelmúltban állapították meg, hogy a mikrobiális lipázok mezőgazdasági és tejipari melléktermékek fermentációjával is előállíthatók, hozzájárulva a környezetvédelmi célok teljesüléséhez (Sarmah *et al.*, 2018).

3.3.4. Optimális működési paraméterek

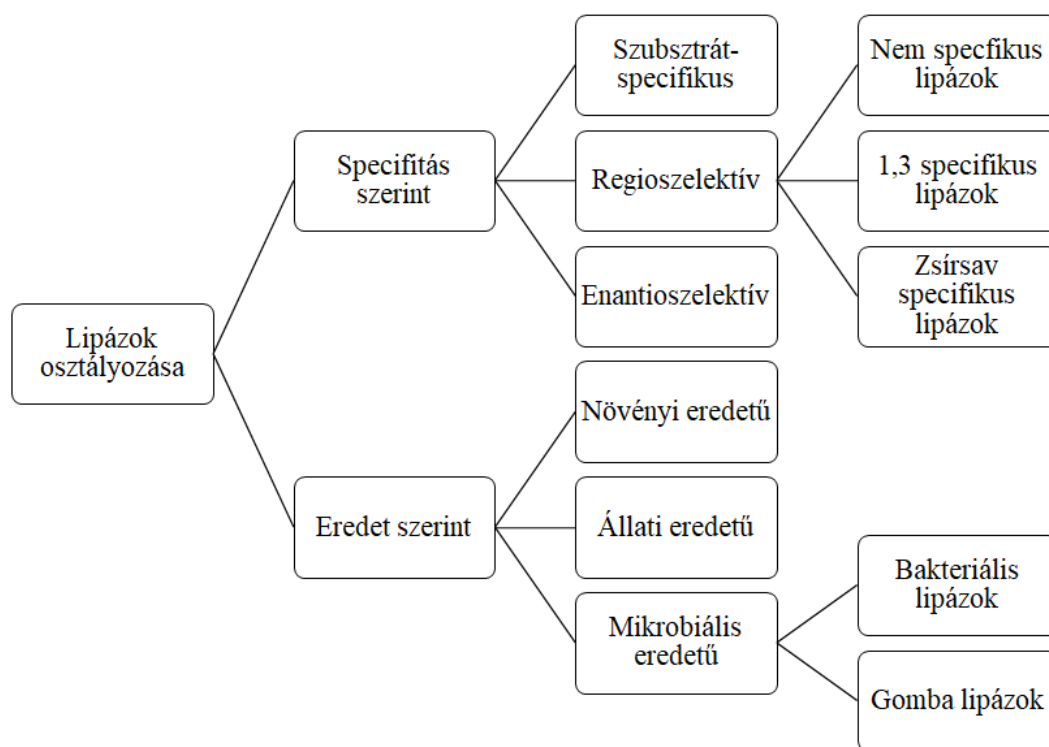
A lipázok széles pH- és hőmérséklettartományban aktívak. Általában semleges pH-optimummal rendelkeznek, de a pH- és hőmérsékleti optima attól is függ, hogy milyen

forrásból származnak, továbbá azok élőhelyétől. A lipázok hőmérsékleti optimuma 10 és 96 °C között van, továbbá pH 4 és 11 közötti széles tartományban stabilak (Patil *et al.*, 2011).

3.3.5. Szubsztrátspecifitás

A lipázokat osztályozhatjuk eredetük mellett specifitásuk szerint is (3. ábra). Ez utóbbi alapján három nagy csoportba, a szubsztrátspecifikusba, a regioszelektívbe és az enantioszelektívbe lehet sorolni őket (Sarmah *et al.*, 2018), melyek az ipari alkalmazás szempontjából fontos jellemzők. Az enantioszelektív lipázok képesek megkülönböztetni az enantiomereket a racém keverékben. A regioszelektivitás a triglicerid molekulában lévő elsődleges és másodlagos észtercsoportok megkülönböztetésének képessége, ami fontos jellemző a strukturált lipidek előállítása során. A lipázok ezen tulajdonsága kiemelt jelentőséggel bír a gyógyszeripar és a vegyipar számára. A regioszelektív lipázok tovább csoportosíthatók szelektív funkcionalitásuk alapján (Sarmah *et al.*, 2018; Chandler, 2001).

A szubsztrátspecifikus lipázok hatékonyan alkalmazhatóak olyan reakciókban, ahol szelektíven hatnak egy specifikus szubsztrátumra, elősegítve a kívánt termékszintézist. Ezt igazolja a biodízel gyártásban és a nagy tisztaságú diacil-glicerinek előállítása során történő lipáz használat is. Általánosságban elmondható, hogy a szubsztrátspecifikus lipázok által átalakítható anyagok közé tartoznak a zsírsavak és az alkohol. A nem specifikus lipázok osztályába tartozó lipázok nagyon robusztusak és több szubsztráton is képesek hatni, ezt bizonyítják a *Mucor (M.) meihei* lipázok is, melyek a kozmetikai ipartól a biodízel gyártásig a reakciók széles skáláját katalizálják. 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. A zsírsavspecifikus lipázok a C-9 kettős kötéssel rendelkező hosszú láncú zsírsavakat tartalmazó észtereket hidrolizálják (Sarmah *et al.*, 2018). Egy, a zsírsav-specifikus lipázokról szóló tanulmányban Song és munkatársai (2008) által vizsgált lipázok közül az S3 *Penicillium citrinum*, MJ1 *Aspergillus niger*, MJ2 *Aspergillus oryzae*, YM *Bacillus coughing*, S9 *Geotrichum candidum* és S11 *Candida lipolytica* lipázai mutatták a legerősebb specifitást a rövid láncú észterekre, míg a többi lipáz pedig a közép- vagy hosszú láncú és elágazó észterekre jelzett erős szelektivitást.



3. ábra: Lipáz enzimek osztályozása (Sarmah *et al.*, 2018 nyomán)

3.3.6. Élesztő eredetű lipázok

A GRAS státusszal rendelkező élesztőforrásokból származó lipázokat is széles körben használják, ideértve az élelmiszeripari alkalmazást is (Casas-Godoy *et al.*, 2018). Nagyon fontos lipázforrást jelentenek az élesztőből származó lipázok, mivel hivatkozott kedvező tulajdonságaik miatt számos iparágban, például a vegyiparban, a gyógyszeriparban, a biodízeliparban stb. keresettek. Az élesztők körében a lipázok elsődleges termelői a *Candida antarctica*, a *Candida rugosa*, a *Candida utilis* és a *Saccharomyces* fajok, amelyek közül a *C. rugosa* eredetűek a legfontosabb biokatalizátorok a különböző típusú reakciók katalizálásában. A lipáz másik fontos termelő organizmusa a *Candida lipolytica*/ *Yarrowia lipolytica*, amely a bio felületaktív anyagok előállításában is részt vesz (Sarmah *et al.*, 2018). Az élesztőgombákról általában ismert, hogy alacsonyabb, pH 5,5-6,2 kémhatású közegben termelnek lipázt, ez jellemző a *C. rugosa* fajra is. Kiemelendő, hogy a pH befolyásolja az élesztő által kiválasztott lipáz típusát, a *Geotrichum candidum* a közeg pH-értékének változtatásakor különböző specifitású lipázt termelt, az egyiket 6,0-os, a másikat 7,5-ös pH-értéknél. A mezofil élesztőgombák, mint a *C. cylindracea*, a *G. candidum* és a *C. rugosa* is 25-40°C hőmérsékleten növekednek (Meghwanshi és Vashishtha, 2018). A 2. táblázatban látható néhány élesztőgomba által termelt lipáz pH és hőmérséklet optimuma.

2.táblázat: Néhány élesztőgomba eredetű lipáz enzim pH, valamint hőmérséklet optimuma (Vakhlu és Kour, 2006; Kiran *et al.*, 2016)

Élesztőgomba	pH optimum	Hőmérséklet optimum
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4,0-10,0	55°C
<i>Candida rugosa</i> DMS 2031	7,8	35 - 40°C
<i>Trichosporonasteroides</i>	5,0	50°C
<i>Yarrowia lipolytica</i>	8,2	37°C
<i>Geotrichum candidum</i>	5,6 – 7,0	40°C
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	6,0	37°C

Az élesztők elsősorban extracelluláris lipázt termelnek (3. táblázat), melynek eredményeképpen a kinyerésük, illetve a feldolgozásuk egyszerűbb, emiatt az ipar előnyben részesíti az enzimforrásként történő alkalmazásukat (Ülker és Karaoglu, 2012; Patel *et al.*, 2017).

3.táblázat: Néhány élesztőgomba faj által termelt lipáz enzim típusának a bemutatása (Vakhlu és Kour, 2006 nyomán)

Élesztőgomba	Lipáz enzim típusa
<i>Yarrowia lipolytica</i>	extracelluláris, sejtfalhoz kötött
<i>Candida antarctica</i>	extracelluláris
<i>Yarrowia deformans</i> CBS 2071	extracelluláris
<i>Candida rugosa</i> /Cylindracea ATCC 14380 DMS 2031 L 1754	extracelluláris extracelluláris extracelluláris
<i>Candida parapsilosis</i> CBS 604	sejtfalhoz kötött
<i>Trichosporoncutaneum</i>	extracelluláris
<i>Geotrichum</i> sp. FO401B	extracelluláris

Annak ellenére, hogy az extracelluláris enzim termelés bizonyítottan jellemző az élesztőgombákra, kutatások folynak az intracelluláris, illetve sejtfalhoz kötött enzim termelés feltérképezésével kapcsolatban is. Nunes és munkatársai (2014) szerint az intracelluláris és a sejtfalhoz kötött lipázok alkalmazása az ipari folyamatok esetében olyan előnyökkel járhat, mint a tisztítási költségek csökkentése, megkönnyítve ezzel az enzim használatát.

3.4. Lipáz enzimtermelés fokozása

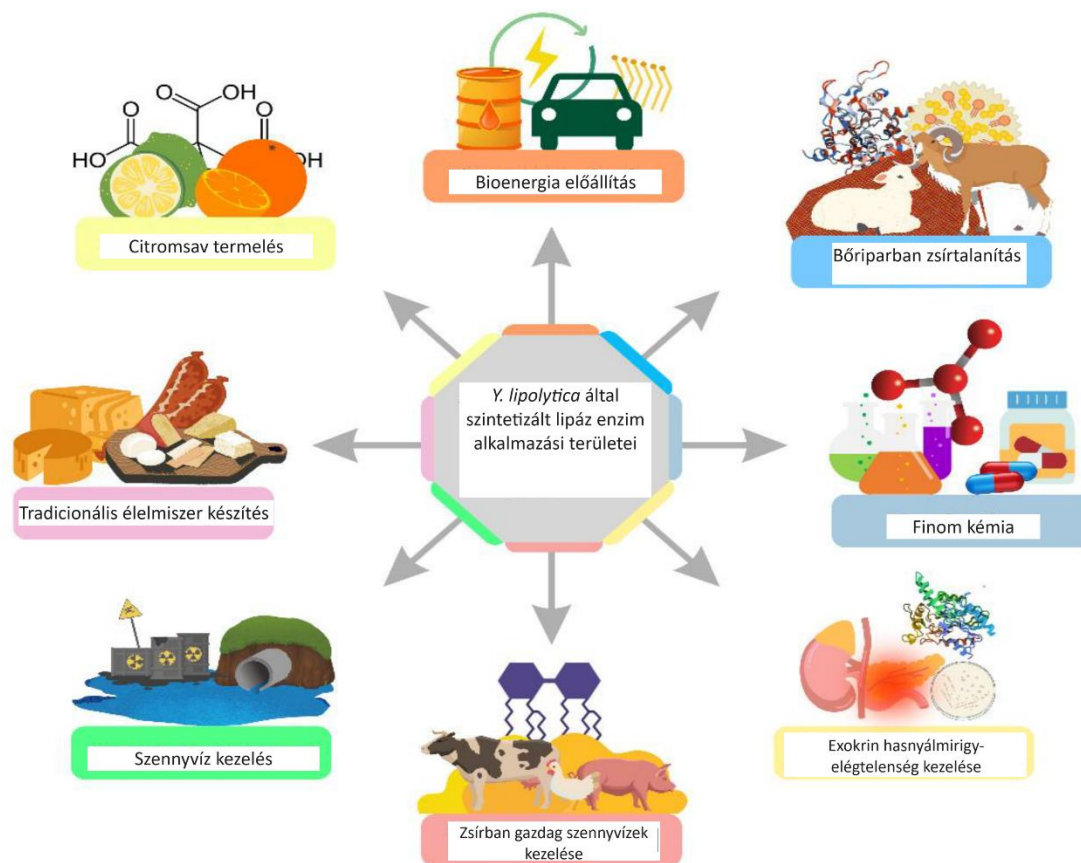
A termelt lipáz mennyisége számos környezeti tényezőtől függ, ezek közé tartozik a hőmérséklet, a pH, a nitrogén-, szén- és lipidforrás, a kevertetés, illetve az oldott oxigén koncentrációja. A lipáz termelés fokozásának lehetőségei közé tartozik a fermentációs technológia optimalizálása, melyhez elsősorban a környezeti paraméterek optimalizálását szükséges elvégezni. A lipáz termelés fokozására bizonyos induktorok jelentős hatással bírnak, többek közt a lipidek, a trigliceridek, a szabad zsírsavak, a hidrolizálható észterek, az epesók és a glicerín is (Ghosh *et al.*, 1996; Treichel *et al.*, 2010). Számos kutató végzett kísérletet arra vonatkozóan, hogy a Tween 80, a Triton X-100, a különböző növényi olajok, valamint az olajpogácsák is, mint természetes szubsztrátumok is alkalmazhatók a lipáz termelőképeség fokozására (Domínguez *et al.*, 2003; Darvishi *et al.*, 2009; Salihu *et al.*, 2012). Az olajok fő összetevője a zsírsav, mely egy hosszú alifás szénhidrogénláncból áll, és az egyik végén karboxilcsoport található. Előfordulnak köztük esszenciális zsírsavak is, ezek közül legfontosabbak a linolsav és linolénsav (Zhou *et al.*, 2020). Számos kutatást végeztek a növényi olajokban található olajsav hatásának vizsgálatával is a mikrobiális lipáz termelésre. 1993-ban Obradors és munkatársai a *C. rugosa* élesztő lipáz termelésének fokozását mutatták ki e komponens hatására. Később Fickers és munkatársai (2004) különböző szén- és nitrogénforrások, köztük az olajsav esetében is vizsgálták a *Y. lipolytica* élesztőgomba lipáz termelését, s nagyobb olajsav koncentráció mellett megnövekedett lipáz termelést mutattak ki: 0,5 %-os olajsav tartalomnál 4,5 U/ml 3%-os koncentrációnál pedig 8 U/ml enzimaktivitást mértek. Az olajpogácsa, avagy pellet a növényi részekből történő olajkivonás után keletkező melléktermék, melynek a fehérje mellett nagy a rost- és az energiatartalma is (Anand *et al.*, 2022). Kumar és munkatársai (2012) tizenkét különböző eredetű olajpogácsát alkalmaztak lipáz termelő baktériumok izolálására, majd vizsgálták a lipolitikus aktivitásukat. Kísérleteikkel alátámasztották, hogy az olajpogácsák, mint természetes szubsztrátumok alkalmasak lehetnek lipáz termeltetésre, s a legjobb termelő a *Staphylococcus sp.* volt.

A felületaktív anyagok közül a nemionos polietoxilált szorbitán (Tween) és a polioxietilén-oktilfenol (Triton) az egyik legszélesebb körben - szénforrásként vagy katalitikus reakciók induktoraként - használt vegyületek (Gutiérrez-Arnillas *et al.*, 2017). A tápközeg olíva- vagy kukoricaolaj kiegészítése mellett Tween 80 hozzáadásával növelni lehetett a *Y. lipolytica* 681 extracelluláris lipáz aktivitását (Corzo és Revah, 1999), s hasonló eredményre jutottak Domínguez és munkatársai (2003) a *Y. lipolytica* CECT 1240 esetén. Kísérleteik során mind a Tween 80, mind a Triton X-100 fokozta a lipáz termelést az olívaolaj, valamint a napraforgóolaj mellett.

A fermentációs technológia optimalásán túl, a rekombináns DNS technika is hatásosan növelheti az extracelluláris lipáztermelést (Darvishi *et al*, 2011). Etil-metánszulfonátos (EMS) és ultraibolya (UV) fény kezelésekkel hozták létre a *Y. lipolytica* DSM3286 mutánsait. Heterológ expresszió segítségével is elősegíthető egy vagy több specifikus lipáz nagymértékű ipari termelése (Yao *et al.*, 2021). A heterológ expressziós rendszerek előnye, hogy nem igényelnek lipideket és más induktorokat a bioszintézis elősegítéséhez, ennek következményeként a fermentációs folyamat egyszerűbben megvalósítható. A rekombináns lipáz előállítására egyre szélesebb körben alkalmaznak mikrobiális alapú expressziós rendszereket (Yao *et al.*, 2021).

3.5. A lipáz enzim ipari felhasználása

A lipáz enzim ipari célú felhasználása az elmúlt években dinamikusan bővült, s főleg a mikrobiális eredetű enzimeket részesítik előnyben (dos Santos *et al.*, 2022; Ali *et al.*, 2023). Bizonyított, hogy a *Y. lipolytica* biotechnológiai felhasználása ígéretes jövőbeni perspektívával rendelkezik, ugyanis számos alkalmazási területen jelentősen nőtt a felhasználása, melyet a 4. ábra hivatott bemutatni. Ipari alkalmazást tekintve az élelmiszeriparban a citromsav és a γ -dekalakton vagyis az őszibarack aroma előállításában, valamint a különböző élelmiszerek - sajtok, kolbászok- érlelésében van nagyobb szerepe. A *Y. lipolytica* élesztő környezetvédelmi jelentősége is növekszik, tekintve, hogy kiváló környezeti előnyökkel jár az alkalmazása, - széles pH és hőmérséklet tartományban alkalmazható -, így az ipari hulladékok kezelésében, a különféle ipari tevékenységekből származó szennyezések okozta kockázatok csökkentésében is szerepet kap. Ezek mellett a gyógyászatban való alkalmazása is egyre elterjedtebb. Fő felhasználási területei közé tartozik a bioenergia előállítás is (da Silva *et al.*, 2023).



4. ábra: *Y. lipolytica* eredetű lipázok főbb alkalmazási területei (da Silva *et al.*, 2023 nyomán)

3.5.1. Élelmiszeripar

A lipázok a modern élelmiszeripar szerves részévé váltak, leggyakrabban tejtermékekben, pékárukban, sör előállítása során és húsfeldolgozásban használják a minőség és a hozam növelése céljából. Ezenfelül bizonyos termékek aroma komponenseinek a kialakítására, valamint olajok és zsírok eltávolítására is alkalmasak, továbbá élelmezéstudományokban és bioszenzorokként is alkalmazhatóak (Pohanka, 2019; Negi, 2019). A tejipari alkalmazása a sajtok, tejszín és más tejtermékek ízének kialakítása, illetve javítása érdekében történik. A jellegzetes íz a tejszír hidrolízise során a szabad zsírból keletkező zsírsavak eredménye. Emellett ezek a zsírbontó enzimek a sajt érlelésének felgyorsításához is hozzájárulnak. A lipázokat a vajban és a margarinban ízfokozóként is alkalmazzák (Raveendran *et al.*, 2018; Sarmah *et al.*, 2018; Sindhu *et al.*, 2021). Az enzimet humán tejszírpótlók és olyan zsírok előállítására is felhasználják, amelyeknek hasonló az összetételük, mint a kakaóvajnak, emiatt a kakaóvaj helyettesítésére is használhatóak (Negi, 2019).

A lipázokat a felesleges zsírok eltávolítására alkalmazzák a hús- és a halfeldolgozó iparban a soványabb hús elérése végett (Salgado *et al.*, 2022). A kolbász fermentációja során a lipáz enzim kezelés növelte a szabad zsírsavtartalmat, továbbá fokozta a termék érzékszervi

jellemzőit (Chen *et al.*, 2017). A sütőiparban előszeretettel használnak zsírbontó enzimeket az érzékszervi tulajdonságok, valamint a pékáruk állagának és szerkezetének javítása céljából, az emulgeáló hatás fokozására (Casas-Godoy *et al.*, 2018). A kenyértésztába kerülő lipáz a triglicerideket digliceridekké, monogliceridekké és zsírsavakká hidrolizálja. A hidrolízis hatására növekszik a kenyér puhasága, mérete és az eltarthatósága, míg más enzimekkel való alkalmazással javítható a kenyér textúrája és a pékáru minősége. Édességekben a lipázt adalékanyagként emulgeáló lipidek előállítására használják. A csokoládéiparban fokozzák vele a karamell, a tejszokoládé, a vajkrém, továbbá az édes ízérzetet is (Negi, 2019). A lipázokat a teaiparban is használják a tea lipid összetételének csökkentésére és a többszörösen telítetlen zsírsavak koncentrációjának növelésére, ami javítja a tea érzékszervi tulajdonságait. Az alkohol gyártásban is alkalmazzák, mégpedig a sörfőzésnél a sajátos aroma jelleg kialakítása végett (Negi, 2019). Bioszenzorként a lipidtartalom közvetett mérésére alkalmazható, a trigliceridből felszabaduló glicerinnel mennyiségi meghatározásával. A lipázokat glükóz-oxidázzal kombinálva pH/oxigén elektródákra lehet rögzíteni, ezek lipid-bioszenzorként működnek, s triglicerid- és vérkoleszterin-meghatározásokban használhatók (Raveendran *et al.*, 2018; Sarmah *et al.*, 2018; Pohanka, 2019).

3.5.2. Környezetvédelem

Manapság egyre nagyobb hangsúlyt fektetnek mind a vállalatok, mind az egyes országok kormányai a környezetvédelemre. A nagy mennyiségben termelődő használt sütóolaj lebontásában kaphat szerepet a *Y. lipolytica* CECT 1240 törzs, mely esetében a kémiai oxigén igény 90%-os csökkenését figyelték meg (Dominguez *et al.*, 2010). Kísérletek során az ismegállapítást nyert, hogy ezen élesztő lipáz enzimének a talajvíz tisztításában is fontos szerepe lehet. A *Y. lipolytica* élesztőgomba ugyanis képes a nitrogénvegyületeket, akár a trinitrotoluolt (TNT) lebontani, mely vegyületek elsősorban olajfinomítók és fegyvergyárak közelében szivároghatnak a talajvízbe. Az élesztő laboratóriumi körülmények között a szennyező anyag koncentrációját ötvenedére csökkentette, ami - figyelemmel a TNT súlyos egészségkárosító hatására a máj, az emésztőrendszer és a látás tekintetében – kifejezetten kedvező alkalmazási lehetőséget nyújthat a jövőre nézve (Khilyas *et al.*, 2013). A talajvíz tisztítása mellett a szennyvíz kezelésében, a különböző maradványok eltávolításában is segíthet az enzim alkalmazása. A szennyvíz biológiai kezelése során a lipáz termelő baktériumok tenyésztése és a szennyvízbe való bejuttatása segítségül szolgál az élelmiszerhulladék, a tejipari hulladék, a gyapjából származó zsír, a trágya és az olajsajtoló üzemek szennyvizének kezelésében. A szennyvíztisztító telepeken a zsírok enzimatisztításával akár 90%-ban hidrolizálható a főként triglicerideket tartalmazó iszap. A lipáz enzimet élelmiszer-

feldolgozásból, textil-, papír-, bőr- és autógyártásból származó ipari szennyvíz kezelésére is használják (Sarmah *et al.*, 2018; Filho *et al.*, 2019).

3.5.3. Egészségmegőrzés és gyógyszergyártás

A gyógyszeripari, illetve az egészségügyi szektor számára is komoly lehetőséget tartogat a lipázok ipari célú felhasználása. Az elmúlt években elsősorban a diagnosztikai eszközök tervezése, illetve gyártása során használták fel az azon ismereteket, hogy az enzim kimutatható jelenléte, illetve emelkedő szintje korrelációt mutat bizonyos fertőzésekkel, illetve megbetegedésekkel. Így a vér magas lipáz szintje adott esetben utalhat a hasnyálmirigy működési zavarára, vagy sérülésére (Yao *et al.*, 2021). A *Y. lipolytica* alkalmas különféle terápiás és ipari fehérjék, illetve enzimek termelésére is, így a Lip2 nevezetű lipáz enzimét az exokrin hasnyálmirigy-elégtelenség gyógyítására használhatják terápiás szerként (Turki *et al.*, 2010).

A *Y. lipolytica*-nak fontos szerepe lehet az egészség megőrzésében is azáltal, hogy az elhízás csökkentését segítheti elő. Ezek az enzimek a zsírok emulgeálására való képességük miatt felhasználhatók emésztési zavarok esetén, így más enzimekkel, mint például a proteázokkal együtt segíthetik az emésztést. Az élesztő anyagcseréjének alaposabb ismerete és a hatékonyabb genetikai eszközök kifejlesztése új perspektívákat kínál ahhoz, hogy mint modellszervezetet alkalmazzák a zsírok felvételénél, tárolásánál, lerakódásánál, mobilizálásánál, a tároláshoz kapcsolódó lipidmetabolizmus mechanizmusainak tanulmányozásánál és a szabályozásánál. A lipázok további felhasználási területei közé tartozhatnak a daganatos és a gyulladásos betegségek, továbbá az elhízás és a cukorbetegség kezelése (Beopoulos *et al.*, 2009; Pérez *et al.*, 2019).

3.5.4. Textilipar

A lipáz felhasználása a textiliparban akkor indult jelentős növekedésnek, amikor felismerték, hogy alkalmazásával nagymértékben lehet javítani a szövetek festési eljárásának hatékonyságán. A lipáz ugyanis a gyártás során csökkenti a szövetekben maradt kenőanyagok szintjét, ezzel az anyag nedvszívó képessége a festés előtt nagymértékben javul. Szintén alkalmazzák még a farmer-, illetve pamutszövetek előállításánál is, ahol az anyagok úgynevezett írtelenítési eljárásában játszanak fontos szerepet (Hasan *et al.*, 2006; Choudhury és Bhunia, 2015).

3.5.5. Mosószer-gyártás

A lipázok a mosó- és tisztítószeres összetételében kulcsfontosságú funkcionális vegyületet alkotnak, és az összes előállított lipáz mintegy 32%-át használják ezen a területen. A lipázok a zsíros, olajos szennyeződések bontásában és eltávolításában mutatnak rendkívüli hatékonyságot. Kiemelendő előnyük a kémiai mosószerekkel szemben, hogy a mosás során nem keletkeznek a szennyvízben olyan kezelendő melléktermékek, melyek a környezetre terhelő hatást gyakorolnak. További előnyük, hogy magasabb hőmérsékleten és lúgos pH-n is aktívak és stabilak, továbbá a mosószerben jelenlévő proteázokkal és más felületaktív anyagokkal szemben toleránsak (Hasan *et al.*, 2006; Sarmah *et al.*, 2018).

3.5.6. Kozmetikai ipar

A lipázokat, köztük a *Y. lipolytica* lipázait, széles körben alkalmazzák a kozmetikai és parfümiparban. Számos felületaktív anyag, aromavegyület, illatanyag előállítására, emellett a testápolókban lágyítószerként használják őket (Sarmah *et al.*, 2018; Casas-Godoy *et al.*, 2018). A lavandulol az illóolajok alkotórésze, és fontos adalékanyag a parfüm- és kozmetikai termékekben. 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 (Brígida *et al.*, 2014).

3.5.7. Papíripar

Évente nagymértékben kerül feldolgozásra a lignocellulóz tartalmú biomassza a cellulóz- és papíriparban. A gyártás során gyakran észlelhető gyanta komoly problémát okoz, mivel enyvszerű lerakódást hoz létre a gépekben és a kész papírokon foltot hagy. Lipáz hozzáadásával a papírban lévő szennyező gyanták és olajok eltávolíthatók, s a gyantában jelenlévő trigliceridek körülbelül 90%-a lipáz enzim hatására glicerinné, monogliceridekké és zsírsavakká hidrolizálódik. Ez a biokatalizátor növeli a pépesedési sebességet, valamint fokozza a kész papír fehérségét és szilárdságát (Almeida *et al.*, 2018; Yao *et al.*, 2021).

3.5.8. Energiaipar

A növényi olajokból előállítható biodízel fejlesztése, kutatása az olaj- és energetikai szektor számára nagy lehetőséget rejt. A biodízel kiindulási anyaga a biomassa, mely zsírokból és növényi olajokból tevődik össze és a különböző olajok/zsírok alkohollal történő átészterezésével állítják elő. Számos előnye van az enzimatiszterezésnek a kémiai átészterezéssel szemben, mint például a mellékterméknek számító glicerintisztított formában való könnyű visszanyerése, a minimális hulladéktermelés, illetve a kisebb energia-felhasználás (Sarmah *et al.*, 2018). A *Y. lipolytica*, egyedülálló fiziológiájából adódóan a legmegfelelőbb szervezet bioüzemanyagok, olajkémiai anyagok és a dízelszerű tüzelőanyagok előállításához. Az elmúlt években számos olyan fejlesztést alkalmaztak az olajos élesztők tekintetében, mellyel fokozható a lipidek, szabad zsírsavak, zsírsav alapú vegyi anyagok (pl. zsíralkoholok) zsírsav-etil-észterek és alkánok termelése. E stratégiák közé tartozik a lipogén útvonal fluxusának és a bioszintetikus prekursoroknak a növelése és a lebomlási útvonalak blokkolása (Adrio, 2017). A Massachusetts-i Technológiai Intézet (MIT) kutatói a növényi alapanyagból történő bioüzemanyag gyártásban egy genetikailag módosított *Y. lipolytica* élesztőtörzs segítségével mintegy 30 százalékkal nagyobb hatékonysággal alakították át a növények cukortartalmát lipidekké. Ez a megoldás jelentősen csökkenti a biodízel előállítás költségeit, ezáltal fokozza versenyképességét az ásványi üzemanyagokkal szemben (Trafton, 2017).

3.6. Biológiai pigmentek eredete

A színezékek két nagy csoportra, szintetikus és természetes színezékekre oszthatók. Sen és munkatársai szerint (2019) 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 (Kumar *et al.*, 2015). E szempontokat figyelembe véve a gyártók számára fokozottan javasolt a természetes megoldások alkalmazása a színezékek tekintetében is. Számos előnnyel rendelkeznek, mivel 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 (Sen *et al.*, 2019).

A biológiai pigmentek, más néven egyszerűen pigmentek vagy biokrómok, minden élő anyagban megtalálhatók, vonzó színeket biztosítanak, és alapvető szerepet játszanak az organizmusok fejlődésében (Encyclopædia Britannica, Delgado-Vargas *et al.*, 2010). A természetes színezékek származhatnak növényekből (pl.: különféle zöltségek gyökereiből,

számos gyümölcsből), állatokból (pl.: rovarokból), algákból és mikroorganizmusok is termelhetik (Joshi *et al.*, 2003; Parmar és Phutela, 2015). Egyes fajokban a pigmentek nagyon hosszú ideig halmozódnak fel az egyén élettartama alatt (Lackmann *et al.*, 2019).

3.6.1. Mikrobiális pigmentek

A különféle mikrobák pl.: élesztők, penészgombák, baktériumok, mikroalgák számos pigmentet termelnek, melyek közül jelentősek a *Monascus*, *Rhodotorula*, *Bacillus*, *Yarrowia* és *Phaffia* eredetűek (4. táblázat). Ide sorolhatók többek közt az ankaflavin, a monascorubramin, a rubropunctatin, az asztaxantin, a torularhodin, és a melanin.

4.táblázat: Fontosabb pigment termelő mikroorganizmusok (Malik *et al.*, 2012; Panesar *et al.*, 2015; Sen *et al.*, 2019; Hatha *et al.*, 2023)

Mikroorganizmus	Pigmentek/Vegyület	Szín
Baktériumok		
<i>Agrobacterium aurantiacum</i>	Asztaxantin	Rózsaszín- Piros
<i>Brevibacterium sp</i>	Kantaxantin	Narancs-piros
<i>Flavobacterium sp</i>	Zeaxantin	Sárga
<i>Bacillus thuringiensis H-14</i>	Melanin	Sötétbarna
<i>Staphylococcus aureus</i>	Sztafiloxantin Zeaxantin	Arany sárga
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Piocianin	Kék-zöld
<i>Ashbya gossypii</i>	Riboflavin	Sárga
<i>Serratia sp</i>	Prodigiosin	Piros
<i>Janthinobacterium lividum</i>	Violacein	Lila
Penészek		
<i>Penicillium oxalicum</i>	Antrakion	Piros
<i>Monascus sp.</i>	Ankaflavin	Sárga
<i>Monascus sp.</i>	Monascorubramin Rubropunctatin	Piros-Narancssárga
<i>Aspergillus sp.</i>		Narancssárga-Piros
<i>Mucor circinelloides</i>	β -karotin	Sárga-Narancssárga
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	Likopin	Piros
Élesztők		
<i>Phaffia rhodozyma</i>	Asztaxantin	Rózsaszín-Piros
<i>Rhodotorula sp.</i>	Torularhodin	Narancssárga-Piros
<i>Yarrowia lipolytica</i>		Barna
Mikroalgák		
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Asztaxantin	Rózsaszín-Piros
<i>Dunaliella salina</i>	β -karotin	Sárga-Narancssárga
<i>Chlorella sp.</i>	Lutein	Sárga
Cianobaktériumok		
<i>Scytonema sp.</i>	Scytonemin	Vörös-barna
<i>Phormidium sp.</i>	Fikoeritrin	Piros
<i>Arthrospira (Spirulina) plantesis</i> <i>Pyrophyridium sp.</i> <i>Lyngbya sp.</i>	Fikocianin	Kék

Az ideális pigmenttermelő mikroorganizmusoknak toleránsnak kell lenniük a szélsőséges pH-val, a magas hőmérséklettel és az ásványi anyagokkal kapcsolatban, és megfelelő színhozamot kell biztosítaniuk. A másik lényeges szempont, hogy a mikrobák ne legyenek túlzottan érzékenyek, így ne csak szűk pH- és hőmérséklet-tartományon belül tudjanak termelni. Kiemelt, hogy legyenek toleránsak különböző ásványi anyagokra, sókra, illetve legyen bőséges a termelt pigment mennyisége (Kumar *et al.*, 2015; Nigam és Luke, 2016). Ezek a paraméterek erősen függenek a mikroba fajától, így általános érvényű szabályok nem azonosíthatóak, a kutatóknak kell tehát felmérni a felhasználni kívánt mikroorganizmus alkalmazhatóságának előnyeit és hátrányait.

Az alkalmazott mikroorganizmusok nem lehetnek sem patogének, sem toxikusak, továbbá előnyös, ha sokféle szén- és nitrogénforrást tudnak hasznosítani. Utóbbi a gazdaságosságot tekintve kiemelt fontossággal bír, hiszen a melléktermékek felhasználásával csökkenthető a pigment termelési folyamat költsége. Az egyes mikroorganizmusok pigment termelése nagymértékben függ az alkalmazott szén- és nitrogénforrástól (Kumar *et al.*, 2015). Például a *Monascus* fajok esetében az ammónium-klorid bizonyult a leghatékonyabbnak, *Aspergillus* törzsek esetében pedig az ammónium-foszfát.

3.7. Természetben előforduló pigmentek jellemzése

3.7.1. Karotinoidok

A karotinoidok, többszörösen telítetlen, zsírbanoldódó természetes pigmentek. Ezek a pigmentek felelősek a különféle gyümölcsök és zöldek élénk színeiért-, valamint algákban és fotoszintetizáló baktériumokban is jelen vannak. A nem fotoszintetizáló baktériumokban, élesztőkben és gombákban is megtalálhatóak, s védik ezeket a szervezeteket a fény és az oxigén által okozott káros hatásoktól. Több tucat karotinoid van az élelmiszereinkben, melyek többsége antioxidáns aktivitással rendelkezik. 1930-ban Karrer és Kuhn írta le a likopin, β -karotin, α -karotin, zeaxantin és lutein molekuláris összetételét (Ribeiro *et al.*, 2011). Globális piaci kutatások szerint 2016-2024 között a karotinoidok potenciális piaci részesedési aránya az élelmiszerek esetén 26,1%, italoknál 9,2%, gyógyszeripari területen 6,5%, kozmetikumok esetén 34,8%, takarmányoknál és étrend-kiegészítőknél 23,5%-ot érhet el (Venil *et al.*, 2020).

3.7.1.1 Karotin

A karotint először Wackenroder izolálta 1831-ben sárgarépából rubinvörös kristály formájában, extrakció útján (IARC, 1998). A világon forgalomba hozott β -karotin nagy részét kémiai szintézissel nyerik β -iononból. Alternatív megoldásként a β -karotin előállítása

biotechnológiai alapon is történhet, fonalas gombák, baktériumok, mikroalgák, valamint élesztők felhasználásával (Pavia és Russel, 1999, Ribeiro *et al.*, 2011, Zoz *et al.*, 2014).

3.7.1.2 Asztaxantin

Az asztaxantin egy lazacfélékben és rákokban megtalálható, jellegzetes rózsaszín színt biztosító karotinoid. Emellett élesztők, mikroalgák és baktériumok is képesek szintetizálni. Jelenleg e pigment a piac fő hajtóereje, *Haematococcus pluvialis* mikroalga felhasználásával kereskedelmi forgalomban is kapható. Az asztaxantin kulcsszerepet játszik a reprodukzív folyamatok közvetítésében. Ezenkívül szokatlan antioxidáns aktivitással rendelkezik, ami a kapszulázott termék piacának fellendülését okozta. Az asztaxantin fogyasztással összefüggésben vannak olyan egészségügyi előnyök is, mint például a szív-érrendszeri betegségek megelőzése, az immunrendszer fellendítése, a *Helicobacter pylori* elleni bioaktivitás és a szürkehályog megelőzése. Az asztaxantin egészségügyi előnyeivel kapcsolatos kutatások nagyon frissek, és főként *in vitro* vagy humán preklinikai vizsgálatokon alapul (Higuera-Ciapara *et al.*, 2007; Sen *et al.*, 2019).

3.7.1.3 Zeaxantin

A zeaxantin a sárga kukorica fő pigmentje, a neve is innen származik. 40 szénatomból álló, sárga színű karotinoid, mely megtalálható a kukorica mellett, a tojássárgájában, a narancsban, néhány sárga színű gyümölcsben és zöldségekben, a lucernában és a körömvirág virágában. Mikroorganizmusok közül a *Flavobacterium* fajok és a *Staphylococcus aureus* is termeli. A zeaxantin fontosságát hangsúlyozzák az életkorral összefüggő makuladegeneráció – mely a vakság vezető oka - megelőzésében játszott kritikus szerepe miatt (Sajilata *et al.*, 2008; Sen *et al.*, 2019).

3.7.1.4 Likopin

A likopin a vörös színű karotinoid, amely elsősorban a paradicsomfélékben, de néhány más gyümölcsben vagy zöldségben is megtalálható. Élesztők és penészgombák egyaránt képesek szintetizálni. Az oxidatív stresszt fontos etológiai tényezőként ismerik el számos krónikus betegség kialakulásának okaért, beleértve a rákot, a szív-és érrendszeri betegségeket, a csontritkulást és a cukorbetegséget. Az antioxidánsok fontos szerepet játszanak az oxidatív stressz sejtekre gyakorolt káros hatásainak enyhítésében. Az epidemiológiai, szövettani és állatkísérletek meggyőző bizonyítékokat szolgáltatnak a likopin szerepéről a krónikus betegségek megelőzésében (Bramley, 2000, Rao *et al.*, 2006).

3.7.1.5 Torularhodin

A torularhodin egy tetraterpén karotinoid biopigment, amely számos vörös élesztőben megtalálható, például a *Rhodotorula glutinis* és a *Sporobolomyces ruberrimus* is szintetizálja. A torularhodin jelentős antioxidáns aktivitást mutat, amely elősegíti a membránok stabilizálását stressz esetében. Emellett megakadályozhatja bizonyos daganatos betegségek kialakulását is, és fokozhatja az immunrendszer működését is. E pigment ipari előállítása még fejlesztési szakaszban van, folyik a legkedvezőbb termelő törzsek keresése, valamint a tápközegek és környezeti paraméterek beállítása (Zoz *et al.*, 2014).

3.7.2. Szaftiloxantin

A szaftiloxantin egy arany pigment, amelyet a *Staphylococcus aureus* baktérium termel. Ez a pigment virulencia faktorként szolgál a baktérium számára, és feltételezések szerint kettős funkciója van: antioxidánsként védelmet nyújt az oxidáló szerek hatása ellen, amelyek az immunválasz általános formái az emberi testben, valamint a sejtmembránt stabilizálja, hasonlóan, mint a koleszterin az emberi sejtekben (Miears, 2018).

3.7.3. Piocianin

A piocianin pigment egy fenazin, amely egy nitrogéntartalmú heterociklusos vegyület. Vízoldható kékes zöld pigment, amelyet nagy mennyiségben állít elő a *P. aeruginosa*. Az 1-hidroxi-N-metil-fenazin redox aktív másodlagos metabolit, mely hozzájárul a baktériumok túléléséhez. Kevés ismeret van a PhzM és PhzS elnevezésű két enzimről, amelyek a fenazin-1-karbonsav prekursorból származó piocianin szintézisében játszanak szerepet (Jayaseelan *et al.*, 2014). A piocianin további jellemzője, hogy antibiotikus hatással rendelkezik baktériumok, gombák és protozoák ellen (Sudhakar *et al.*, 2015).

3.7.4. Riboflavin

A riboflavin sárga színű, vízben oldódó vitamin, amelyet sok mikroorganizmus termel. A riboflavin hagyományos kémiai szintézisét a közelmúltban felváltották a kereskedelmi szempontból versenyképes különféle biotechnológiai eljárások. Ezen folyamatok alkalmazásával a költségek fele megtakarítható, a hulladék- és energiaigény csökkenthető. Jelenleg három mikroorganizmust használnak ipari riboflavin előállításra. A Hemiscomycetes *Ashbya gossypii*, fonalas gombát, a *Candida famata* élesztőt, és egy Gram pozitív baktériumot a *Bacillus subtilis*-t. Mindhárom szervezetre jellemző, hogy sárga színű kolóniákat képez, így a riboflavin termelés egyértelműen felismerhető (Stahmann *et al.*, 2000).

3.7.5. *Monascus* pigmentek

A *Monascus* gomba által termelt pigmentek közül az ankaflavin sárga, a rubropunctatin narancssárga, és a monascorubramin pedig lilás-piros színű. Ezeket a pigmenteket főleg sejthez kötött állapotban termeli a mikroorganizmus. Vízben rosszul oldódnak, hőre érzékenyek, 2 - 10 közötti pH-tartományban instabilak és elhalványulnak a fény hatására (Blanc *et al.*, 1994, Bühler *et al.*, 2015, Fabre *et al.*, 1993).

3.7.6. Antrakinon

A gombák, mint az ökológiai szempontból érdekesebb pigmentek forrásai, bizonyos fajai stabil színezékeket, például antrakinont termel. Az antrakinon származékokat korábban már izolálták a *Dermocybe sanguinea* gombából. Számos antrakinon származékot azonosítottak különféle gombákban és zuzmókban. Ezen metabolitok után azért érdeklődik a tudomány, mert sokuk jelentős antibiotikus aktivitással rendelkezik, elsősorban a Gram-pozitív baktériumok és a *Pseudomonas aeruginosa* ellen hatékonyak. Az antrakinonokról kimutatták azt is, hogy antiprotozoális és citotoxikus hatással is rendelkeznek. E pigmentekkel kapcsolatban is folynak kísérletek, különösen a textilipari felhasználhatóságukkal összefüggésben (Nagia és El-Mohamedy, 2007).

3.7.7. Prodigiosin

A prodigiosin egy sokoldalú vörös pigment, amelyet különféle mikroorganizmusok, például *Serratia marcescens*, *Vibrio psychoerythrus*, *Rugamonas rubra*, *Streptovorticillium rubroreticuli* is termelnek. Ismert, hogy antibakteriális, rákmegelőző és antibiotikus aktivitással rendelkezik (Malik *et al.*, 2012). Már sikeresen alkalmazták színezőanyagként joghurtban, tejben és szénsavas üdítőkben is (Sen, *et al.*, 2019). Manapság a prodigiosint hatékony természetes biológiai védekező szernek tekintik a káros algákkal szemben (Venil *et al.*, 2013).

3.7.8. Cianobaktériumok által termelt pigmentek

Scytonemin

A scytonemin egy cianobaktériumokban található extracelluláris vörös-barna színű burokpigment, amelyet fényvédő tulajdonsága miatt tanulmányoznak. Kimutatták, hogy a tirozin és a triptofán a scytonemin bioszintézisének prekursorai. A scytonemin „bevonatként” működik a cianobaktériumok sejtfelületén, mivel ezek a prokarióta sejtek UV-A sugárzás alatt termelődnek. Elnyeli az UV-sugárzás nagy részét, mielőtt az elérné a fotorendszert, így megakadályozza a magas UV-sugárzás okozta károsodást. Ezt a tulajdonságát fel lehet használni UV-védő (fényvédő) készítmények előállításánál, például aszkorbinsavval

kombinálva. Emellett gyulladáscsökkentő és sejtszaporodást gátló (antiproliferatív) hatása is van (Saini *et al.*, 2018; Hatha *et al.*, 2023).

Fikoeritrin

A fikoeritrin egy vörös színű fikobiliprotein, amely különböző osztályokba sorolható. Az egyes osztályok nevét azon organizmus alapján adták, amelyből először izolálták őket, így a rodofitákból, a vörös-tengeri alga Baigiales-ből és a cianofitákból. Ezt a vegyületet széles körben tanulmányozzák természetes élelmiszerszínezékként, vércukorszint-csökkentő anyagként, fluoreszcens jelölőként, antioxidánsként, valamint fénygyűjtő fehérjeként betöltött szerepe miatt is (Saini *et al.*, 2018; Hatha *et al.*, 2023).

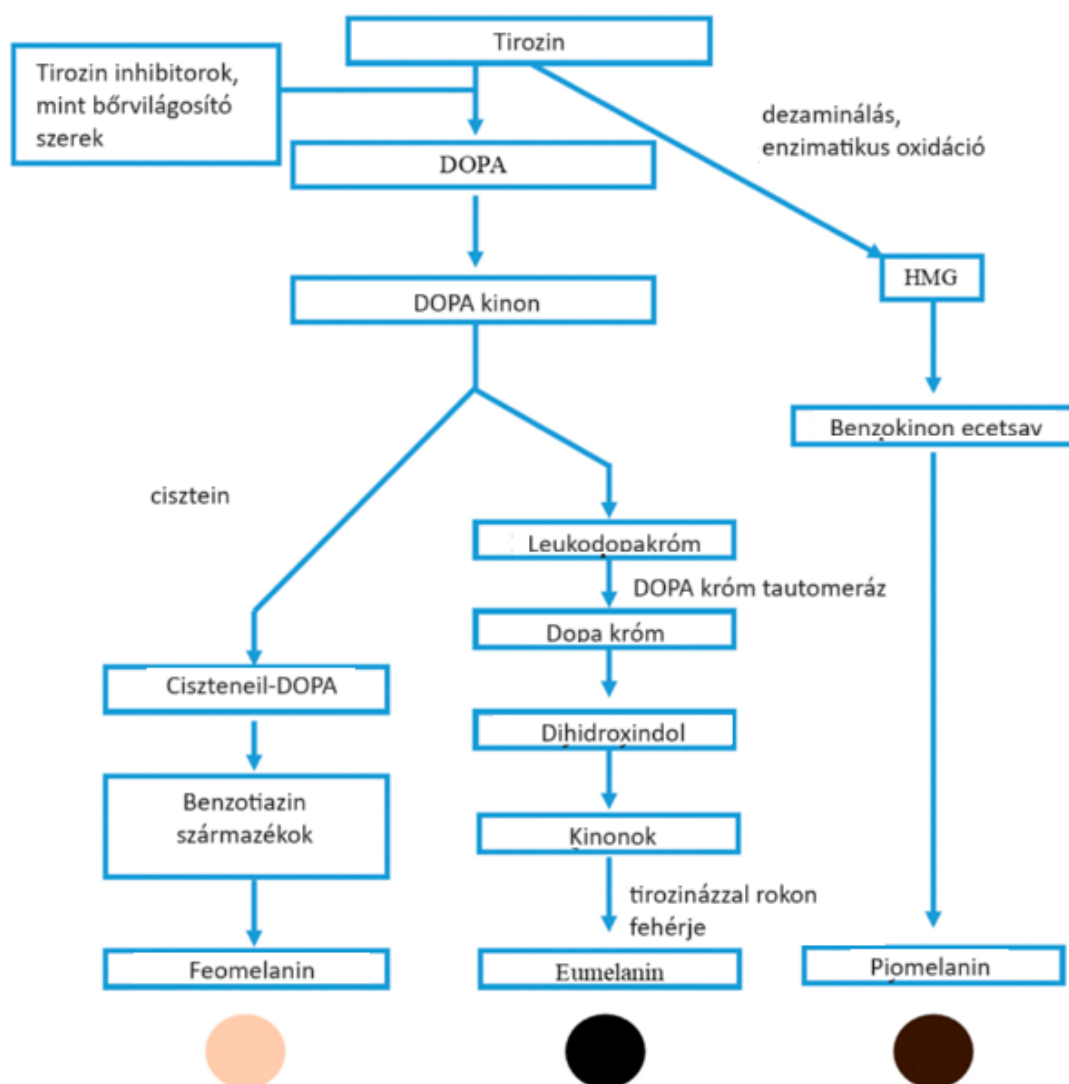
Fikocianin

A fikocianin természetes kék pigment és szinte minden fikobiliproteint tartalmazó organizmusban jelen van, túlnyomórészt cianobaktériumokban, többek között az *Arthrospira* (*Spirulina*) *plantensis*, az *Arthrospira* (*Spirulina*) *maxima*, a *Pyrophyridium* *sp.* és a *Synechocystis* *sp.* is termeli. A fikocianint alkalmazzák élelmiszer-adalékanyagként cukorkákban, fagylaltokban és egyéb tejtermékekben egyaránt, emellett kozmetikumokban is felhasználják, valamint fontos szerepe van a gyógyászatban, mivel gyulladásgátló, rákellenes és antioxidáns hatása is ismert (Saini *et al.*, 2018; Hatha *et al.*, 2023).

3.7.9. Melanin

A melanin kifejezés a görög „melanos” szóból ered, amely sötétet, illetve feketét jelent (Belozerskaya *et al.*, 2017). A melanin a definíciója szerint, „heterogén polimer, amely fenolok oxidációjából, majd a köztes fenolok és a keletkező kinonok polimerizációjából származik”. (Di Salvo *et al.*, 2023). A melaninok a pigmentek változatos csoportját alkotják, úgynevezett ubiquiter pigmentek, tehát minden élő szervezetben jelen vannak. A melaninok barna, illetve fekete színe mellett sok más szín is megfigyelhető. A melaninok hidrofób és negatív töltésű vegyületek. A melaninok fontos szerepet játszanak a mikroorganizmusokban a termikus, a kémiai (nehézfémek és oxidálószeres) és a biokémiai stressz (a napsugárzás és UV sugárzás hatására keletkező reaktív oxigén) ellen. A mikrobák által szintetizált melanin a fémionokkal való kelátképző képességet mutat. A melaninoknak fontos biológiai aktivitása van, ideértve az antimikrobiális hatást, a daganatellenes hatást, az antivenin aktivitást és a májvédő hatást (El-Ahmady *et al.*, 2017). Publikáltak a gyulladásgátló aktivitással rendelkező bakteriális melaninokról is (Plonka és Grabacka, 2006). A melanin immunofarmakológiai tulajdonságai iránt nagy érdeklődést mutatnak, mivel ígéretes lehet az AIDS kezelése szempontjából (Wang

et al., 2006). Bioszintézis útjuk alapján a melaninok három csoportba sorolhatók: eumelanin, feomelanin és allomelanin (5. ábra) (Di Salvo et al., 2023).



5. ábra: A melanin bioszintetikus útvonalának sematikus ábrázolása (Di Salvo et al., 2023 nyomán)

3.7.9.1 Eumelanin

Az eumelanin a melanin biopigmentek családjába tartozik. Az emberekben és az állatokban az eumelanin a melanin leggyakoribb típusa, amely a bőr, a haj és a szemek feketétől barnáig terjedő elszíneződéséért felelős. Különbőféle mikroorganizmusok képesek különböző típusú melanint termelni, beleértve az eumelanint is, az emlősök melanin útvonalához hasonló útvonalon keresztül (Di Salvo et al., 2023). Jó példa erre egy kísérlet során felhasznált, JM109-ből származó *E. coli* törzs, mely esetében a MEL gént T5 fág promotor és két lac operátor transzkripció szabályozása alá helyezték. Ennek a rekombináns törzsnek a tenyésztése LB tápközegben 0,4 g/l eumelanint eredményezett. A szintetikus biológia alkalmazását, az adaptív laboratóriumi evolúciót (ALE) és a mutagenézis lehetőségeinek alkalmazását kell értékelni

ahhoz, hogy a jelenlegi melanintermelő törzseket fejlesszük. Az ALE használata lehetővé teszi összetett fenotípusok tervezését. Egy kísérlet során az aromás aminosavak intracelluláris koncentrációjára reagáló szintetikus bioszenzor modult kombináltak ALE-vel, hogy lehetővé tegyék egy továbbfejlesztett *S. cerevisiae* törzs létrehozását mukonsav termeléséhez. Ez a törzs fokozott fluxust mutat a közös aromás aminosav-útvonalon, így bevett módszerekkel módosítható az L-tirozin szintézis fokozására. Ilyen módosítással a hivatkozott tanulmányban kifejlesztett *S. cerevisiae* törzs ígéretes eumelanin termelő lehet (Martínez *et al.*, 2019).

Az elmúlt évtizedben az eumelanint sokféle szempontból vizsgálták, többek között az UV fénnel szembeni ellenállását és antioxidáns tulajdonságát (Di Mauro, 2017). Mára bebizonyosodott, hogy szabadgyök megkötő képességgel rendelkeznek (Cecchi *et al.*, 2019). Előállítás a tirozin és/vagy fenilalanin oxidációja útján megy végbe, a reakció folyamán a tirozinból tirozináz enzim segítségével 3,4-dihidroxi-fenilalanin (DOPA), majd DOPA kinon keletkezik. Ezt követően 5,6-dihidroxi-indol (DHI) vagy 5,6-dihidroxi-indol-2-karbonsav (DHICA) keletkezik, melyek polimerizációja révén jön létre az eumelanin (Plonka és Grabacka, 2006; Di Mauro, 2017).

3.7.9.2 Feomelanin

A feomelanin elsősorban a vörös hajban, szeplőkben vagy tollakban van jelen. Kémiai szerkezetében kén molekula található az eumelaninnal ellentétben (Di Salvo *et al.*, 2023). A feomelanin könnyebben kezelhető az eumelaninhoz képest, továbbá a többi pigmenthez hasonlóan lúgos közegben oldható (Solano, 2014). A feomelanin egy prekursor molekulából, az 5-ciszteinil-DOPAból származik. A képződése az eumelaninhoz hasonlóan indul, azonban a DOPAquinon vegyület cisztein jelenlétében alakul tovább, majd ezt követő polimerizációs folyamatok révén benzotiazinok különböző formái alakulnak ki. A feomelanin benzotiazin egységekből épül fel, ezek kapcsolódása révén alakul ki a feomelanin (Solano, 2014; Di Salvo *et al.*, 2023).

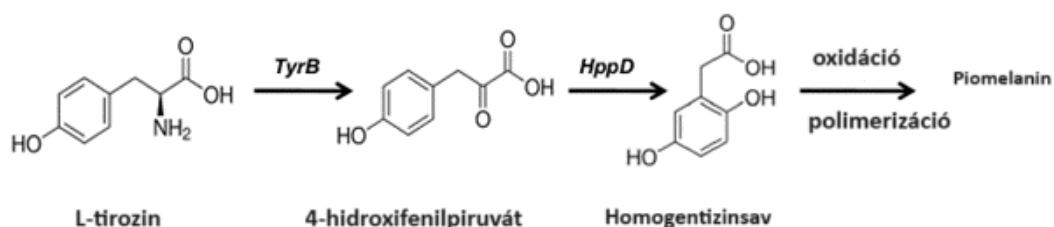
3.7.9.3 Allomelanin

Az allomelanin a növényekben, gombákban és baktériumokban található melanin típus, amely az állatok eumelaninjához hasonló kémiai összetételű, valamint hasonló képződési útvonalat mutat. Az allomelanin esetében a fő különbség, hogy az állati eredetű eu- és feomelaninhoz képest nem tartalmaz nitrogén csoportot (Plonka és Grabacka, 2006). Az allomelanin színe az oxidáció mértékétől függően a sötétbarnától egészen a teljesen fekete színig változhat (Solano, 2014). Az allomelaninok csoportjába tartozik a piomelanin is (Plonka és Grabacka, 2006).

3.7.9.4 Piomelanin

A piomelaninok nagy molekulatömegű pigmentek, amelyek fenolos vagy indol vegyületek oxidatív polimerizációjával képződnek, és általában sötétbarnák vagy feketék, s a mikroorganizmusoktól az emberekig minden szervezet termeli őket. Jelenleg a piomelaninok még mindig rejtélyes biopigmentek, amelyek szerkezete és meghatározási módszerei nem tisztázottak, kiforrottak (Mahmood *et al.*, 2015).

Ismert, hogy a *Y. lipolytica* szintetizál barna színanyagot, ez a barna pigment a piomelanin (Tahar *et al.*, 2019). Ezek az extracelluláris úton termelődő pigmentek és a tirozin katabolizmus között összefüggés mutatható ki. A tirozin katabolikus útja a *Y. lipolytica*-ban a hidroxi-fenil-ecetsav oxidációjával kezdődik p-hidroxi-fenil-acetaldehiddá, mely tovább oxidálódik homogentizinsavvá. Barna pigmentek akkor keletkeznek, amikor a homogentizinsav felhalmozódik a közegben. A tirozin kimerülése során az élesztő homogentizinsavat, p-hidroxi-fenil-etanolt és p-hidroxi-fenil-ecetsavat akkumulál a közegben, a két utóbbi ap-hidroxi-fenil-acetaldehid spontán diszproporcionálódásából származhat. Ez a sav spontán oxidálódhat és polimerizálódhat, ami piomelaninek képződéséhez vezet. A piomelanin szintézisének folyamata a 6. ábrán látható. A Mn^{2+} felgyorsítja és fokozza a homogentizinsav oxidatív polimerizációját, a tejsav pedig fokozza az Mn^{2+} stimuláló szerepét. A lúgos körülmények szintén felgyorsítják a pigment képződését (Carreira, *et al.*, 2001 a).



6. ábra: A piomelanin bioszintézise homogentizinsav (HGA) útvonalon (Tahar *et al.*, 2019).

TyrB: aromás aminosav aminotranszferáz enzim,

HppD: 4-hidroxifenil-piruvát-dioxigenáz enzim

3.8. Mikrobiális pigment termelést befolyásoló tényezők

A mikrobiális eredetű pigmentek termelése független az évszaktól, a földrajzi helytől, továbbá jobban szabályozhatók. A Mikroorganizmusok alkalmazásával egyszerűen, gyorsan és gazdaságosan megvalósítható a folyamat, mindezek mellett legtöbbször stabilabb színanyag érhető el (Nigam és Luke, 2016).

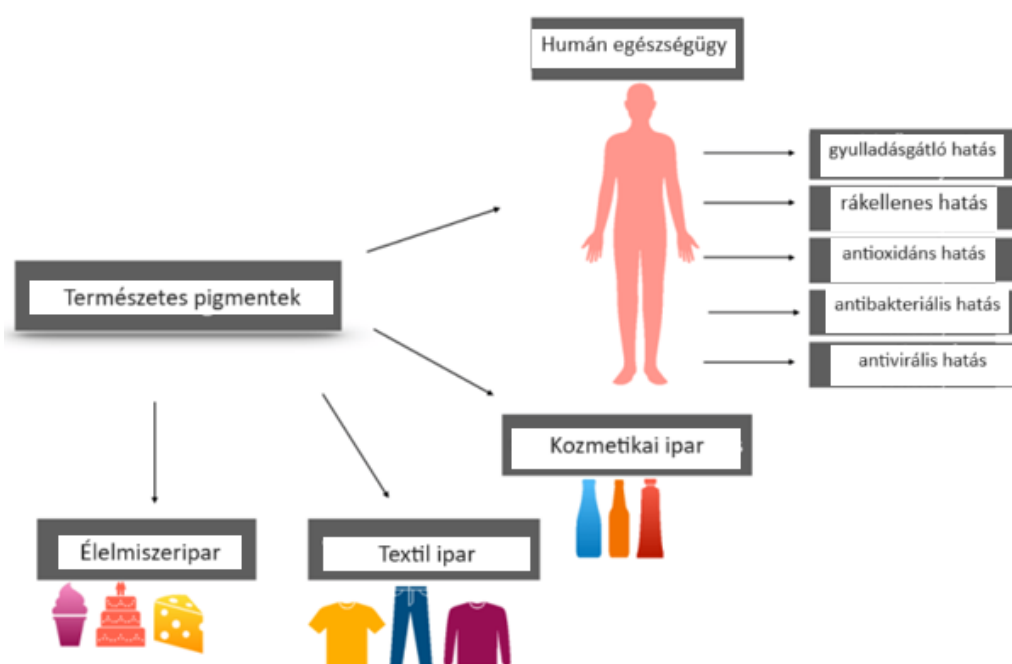
Általánosságban elmondható, hogy a mikrobiális pigmenttermelést befolyásoló, korábban említett fő tényezők, mint a hőmérséklet, a pH, a szénforrás, a nitrogénforrás, a

fermentáció típusa, az ásványi anyagok, a nedvességtartalom a levegőztetési arány, a táptalaj reológiája és a morfológia mellett a fény intenzitása is fontos tényező lehet. Ezen tényezőket figyelembe kell venni az anyagcsere megértéséhez (Bühler *et al.*, 2015).

Az inkubáció hőmérséklete a mikroorganizmus típusától függ. Amíg *Monascus spp.* esetében 25-28°C optimális a pigment termeléshez, addig a *Pseudomonas* esetében 35-36°C szükséges (Joshi *et al.*, 2003). A táptalaj pH-ja befolyásolja a mikrobák növekedését és a pigmenttermelést is. Az optimális pH a *Monascus sp.* és *Rhodotorula* esetében a pH 5,5-6,5, valamint pH 4,0-4,5. A semleges vagy enyhén lúgos pH a likopin képződését segíti elő, míg a savas pH a β -karotin szintézist. A pigmenttermelő mikroorganizmusok esetében a micélium növekedését a szénforrás típusa befolyásolja, szénforrás lehet például glükóz, fruktóz, maláta, laktóz, galaktóz stb. Általában a glükóz és a különféle oligoszacharidjai jó szénforrásnak bizonyulnak a pigmenttermelés szempontjából. Az ásványi anyagok fontos szerepet játszanak a pigment termelésben. A Zn például *A. oryzae* esetében gátolja a növekedést folyékony közegben, viszont szilárd közeg esetében közepesen erőteljes növekedés és pigmentáció figyelhető meg (Joshi *et al.*, 2003).

3.9. Pigmentek általános felhasználása a különféle iparágakban

A pigmentek számos iparág, különösen az élelmiszeripar, a textilipar, a gyógyszeripar, és a kozmetikai ipar számára fontosak (Malik *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2015), a 7. ábrán láthatóak a főbb alkalmazási területei.



7. ábra: A természetes pigmentek alkalmazási területeinek összefoglaló diagramja (Di Salvo *et al.*, 2023 nyomán)

A természetes forrásokból származó színanyagokat széles körben használják a különféle iparágakban. Jelenleg a kereskedelmi melanint, a közönséges tintahal, más néven szépia (*Sepia officinalis*) kivonatából állítják elő. A közelmúltban a mikroorganizmusok általi melanin-előállítás egyre kutatottabb téma lett, mint a szintetikus termékek környezetbarát és gazdaságos alternatívája (Guo *et al.*, 2014).

3.9.1. Élelmiszeripar

A színek fontos szerepet töltenek be azokban az ételekben, amelyeket megeszünk (Dufossé, 2006). Az élelmiszeriparban az étel színe is jelzi annak frissességét, állagát, ennek érdekében színezőanyagokat is használnak. Az étel megfelelő tápanyag tartalma mellett, annak jó textúrája, íze és a színe is fontos tényező, hogy a fogyasztó számára megfelelő legyen. Az élelmiszeriparban számos mikroorganizmus (baktérium, gomba, élesztő) által termelt színanyagot használnak, és egyre nagyobb az érdeklődés ezek minél szélesebb körben való felhasználásáról (Dufossé, 2006). A különböző pigmentek élelmiszeripari felhasználását az 5. táblázat szemlélteti. A természetes színezékeket bébiételekben, reggeli gabonapelyhekben, tésztákban, szószokban, ömlesztett sajtokban, gyümölcsitalokban, vitaminokkal dúsított tejtermékekben és egyes energiasitalokban használják. A természetes színezékek emellett környezetbarátnak minősülnek (Malik *et al.*, 2012). A becslések szerint az univerzális élelmiszer-színezékek piaca 2022-re elérte a 3,75 milliárd USD-t. A piacot elsősorban az Egyesült Államok (FDA) és az Európai Unió (EFSA) élelmiszerbiztonságért felelős szervezeteinek előírásai határozzák meg, amelyek erősíteni kívánják a természetes színezékek iránti termékkeresletet, a megbízható termékek iránti érdeklődést és a további tudományos kutatásokat. A természetes pigmentek közül a vörös színt alkalmazzák a leggyakrabban ugyanis a fogyasztókat ez az árnyalat vonzza a legjobban (Di Salvo *et al.*, 2023).

5.táblázat: Különféle pigmentek és felhasználásuk az élelmiszeriparban (Bühler *et al.*, 2015, Rana *et al.*, 2021, Di Salvo *et al.*, 2023)

Mikroorganizmus	Pigment	Felhasználás
<i>Aphanizomenonflos-aquae</i> , <i>Spirulina sp.</i> , <i>Pseudomonas spp.</i>	Piocianin	Édesség, fagylalt
<i>Serratia marcescens</i> , <i>Pseudoalteromonas rubra</i>	Prodigiosin	Joghurt, tej, szénsavas italok
<i>Lycopersicon esculentum</i> , <i>Fusarium sp.</i>	Likopin	Hús színezés
<i>Dunaliella salina</i> , <i>Blakeslea trispora</i> , <i>Mucor circinelloides</i> , <i>Phycomycesblakes leeanus</i> , <i>Rhodotorula sp.</i>	β -karotin	Gyümölcslevek, italok, vaj, margarin és sajtok, a baromfi tojássárgájának, a halhús és a rákhéj színének növelése
<i>Monascus sp.</i>	Ankaflavin	rizsbor, húskészítmények
<i>Bradyrhizobium spp.</i> , <i>Halobacterium sp.</i>	Kantaxantin	sajt, édesség, snack, ital, sör, bor, halhús és hús színének növelése

3.9.2. Gyógyszeripar

A gyógyszeriparban és az egészségügyben elsősorban antioxidánsként alkalmazzák a mikrobiális pigmenteket (Rao *et al.*, 2017). A reaktív oxigén gyökök (ROS) növekedése az emberi szervezetben növeli az autoimmun betegségek, a cukorbetegség és a rák kockázatát (Rathera *et al.*, 2023). Az antioxidánsok olyan molekulák, amelyek késleltetik vagy gátolják a sejtkárosodást azáltal, hogy az alacsony molekulatömegű antioxidánsok biztonságosan kölcsönhatásba léphetnek a szabad gyökökkel, ezáltal leállíthatják a láncreakciót, mielőtt megsérülnének az életképes molekulák (Lobo *et al.*, 2010). Emellett antimikrobiális szerként is széleskörűen használják a biokrómokat, számos patogén mikroorganizmus ellen (Rao *et al.*, 2017). Biológiai potenciáljukat effektív vagy gátló, letális vagy szubletális koncentrációban fejezik ki, amely pl.:50%-os tumornövekedésgátlást stb. jelent (Rathera *et al.*, 2023). Az utóbbi időben számos kísérletet végeztek a mikrobiális pigmentek hatékony rákellenes gyógyszerként való kivonásával és alkalmazásával kapcsolatban (Rathera *et al.*, 2023). A mikrobiális pigmentek egyik legjelentősebb előnye, hogy képesek szelektíven megcélózni a rákos sejteket, miközben az egészséges sejteket sértetlenül hagyják. Ez a pigmentmolekulák és a rákos sejtekben aktív biokémiai útvonalak közötti specifikus kölcsönhatásoknak köszönhető. Ez a sajátosság a mikrobiális pigmenteket ígéretes jelöltekké teszi a rák diagnosztizálására és

kezelésére (Di Salvo *et al.*, 2023). A különböző pigmentek gyógyszeripari felhasználást a 6. táblázat szemlélteti.

6.táblázat: Különféle pigmentek és felhasználásuk a gyógyszeriparban (Agarwal *et al.*, 2023 nyomán)

Mikroorganizmus	Pigment	Felhasználás
<i>Agrobacterium aurantiacum</i> , <i>Paracoccus carotinifaciens</i>	Asztaxantin	Antioxidáns hatású készítmények, rákellenes készítmények, gyulladáscsökkentők
<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Flavobacterium</i> spp., <i>Paracoccus zeaxanthinifaciens</i>	Zeaxantin	Antioxidáns hatású készítmények
<i>Serratia marcescens</i>	Prodigiosin	Rákellenes készítmények, immunszuppresszánsok
<i>Chromobacterium violaceum</i> , <i>Collimonas</i> sp., <i>Duganella</i> sp., <i>Pseudoalteromonas</i> sp.	Violacein	Gombaellenes és antibakteriális készítmények, rákellenes készítmények

3.9.3. Textilipar

A szintetikus festékek költséghatékonyságuk, erős fényük és mosásállóságuk miatt komoly versenylőnnyel rendelkeznek a természetes festékekkel szemben. A korábban kifejtett előnyök mellett környezet- és egészségvédelmi szempontból azonban előnyösebb a mikrobiális pigmentek használata, melyek különböző színárnyalatokat hoznak létre különböző textíliákban. A különböző pigmentek textilipari felhasználást a 7. táblázat szemlélteti.

7.táblázat: Különféle pigmentek és felhasználásuk a textil iparban (Kumar *et al.*, 2015 nyomán)

Mikroorganizmus	Pigment	Felhasználás
<i>Vibrio</i> spp.	Prodigiosin	Gyapjú, nylon, akril és selyem
<i>Chromobacterium violaceum</i>	Violacein	Pamut, selyem, műselyem, jacquard műselyem, akril, szatén
<i>Serratia marcescens</i>	Piros Prodigiosin	Akril, poliészter, poliészter mikroszálas, selyem és pamut

3.9.4. Kozmetikai ipar

A kozmetikai termékek biológiai és kémiai vegyületek keverékei. A kozmetikai iparban különféle mikrobiális vegyületeket használnak. A biológiai forrásokból, például növényekből és más szervezetekből származó összetevők jelentik a termékek fő forrását (Di Salvo *et al.*, 2023). Természetes színanyagok használatára törekednek, mivel azok nem okoznak bőrirritációt (Honda *et al.*, 1995). A baktériumok és gombák metabolitjai a természeti javak egyik legolcsóbb, leginkább megújuló és újszerű forrását jelentik. A mikrobiális pigmentek használatának legnagyobb előnye a kiváló minőségű termékekkel való biológiai kompatibilitásuk és az alacsony környezetterhelés. A mikrobiális pigmenteket különböző árnyalatokhoz alkalmazzák a kozmetikumokban (8. táblázat), rúzsokban, szájfényekben, szemceruzákban, szemhéjfestékekben, testápoló krémekben, szappanokban, naptejekben, napozás utáni krémekben és bőrápoló termékekben (Hochstein *et al.*, 2009, Di Salvo *et al.*, 2023). A vízzoldható melaninokat nagyobb UV-védettség elérése érdekében napvédő készítményekben használják (Shrishailnath *et al.*, 2010).

8.táblázat: Különféle pigmentek és felhasználásuk a kozmetikai iparban (Sharma *et al.*, 2023 nyomán)

Mikroorganizmus	Pigment	Felhasználás
<i>Halomonas venusta</i>	Melanin	UV-védelem
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Asztaxanthin	Csökkenti a bőr pigmentációját, antioxidáns, ránceltávolító és hidratáló szerek
<i>Corynebacterium autotrophicum</i>	Zeaxantin	UV-védelem, antioxidáns, bőrhidratálók, nedvességmegtartó
<i>Monascus purpureus</i> NMCCPF01	Rubropunctamin, Monascin, Ankaflavin	Fényvédő krémek és egyéb krémek
<i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Axophiala dermatitidis</i>	Melanin	Bőrvilágosító és depigmentáló szerek
<i>Rhodospiridium</i> , <i>Ustilago</i> ,	Karotinoidok	Fényvédő krémek

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1. A kísérletekhez felhasznált *Yarrowia* törzsek

A kutatási munkám során felhasznált törzseket a 9. táblázat szemlélteti:

9. táblázat: A kísérletekhez felhasznált *Yarrowia* törzsek és eredetük

Nemzetség	Törzs	Eredet
<i>Yarrowia</i>	<i>bubula</i> 441/4	darált sertéscomb
<i>Yarrowia</i>	<i>divulgata</i> NCAIM Y.02062	csirkemell
<i>Yarrowia</i>	<i>divulgata</i> 5257	darált sertéscomb
<i>Yarrowia</i>	<i>divulgata</i> 445/4	darált marhahús
<i>Yarrowia</i>	<i>lipolytica</i> 854/4	darált sertéscomb
<i>Yarrowia</i>	<i>lipolytica</i> 1/4	Edami sajt
<i>Yarrowia</i>	<i>lipolytica</i> 6/3	túró
<i>Yarrowia</i>	<i>porcina</i> NCAIM Y.02102	darált sertéscomb
<i>Yarrowia</i>	<i>porcina</i> 859/4	darált sertéslapocka
<i>Yarrowia</i>	<i>yakushimensis</i> NCAIM Y.02049	<i>Hodotermopsis sjostedti</i> rovar
<i>Yarrowia</i>	<i>yakushimensis</i> NCAIM Y.02050	<i>Hodotermopsis sjostedti</i> rovar
<i>Yarrowia</i>	<i>yakushimensis</i> NCAIM Y.02052	<i>Hodotermopsis sjostedti</i> rovar

A törzseket a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteménye (NCAIM) biztosította számomra.

4.2. Alkalmazott tápközegek

A tápközegek minden esetben autoklávban kerültek sterilizálásra 121 °C-on, 15 percen keresztül.

4.2.1. Ferdeagar

A kísérleteim során Élesztőkivonat-Pepton-Glükóz (YEPD) ferdeagart alkalmaztam a *Yarrowia* élesztők átoltására és fenntartására, melyet a 10. táblázatban leírtak alapján készítettem el.

10. táblázat: YEPD ferdeagar

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

4.2.2. Pigment screeneléshez felhasznált tápagar

Carreira és munkatársai (2001 b) által *Y. lipolytica* elkülönítéséhez alkalmazott tirozin tartalmú tápagart alkalmaztam (11. táblázat) a pigment termelés screeneléséhez, mellyel lemezöntést végeztem.

11. táblázat: A pigment termelés screeneléséhez használt tápközeg összetevői

Összetevő	Mennyiség
Pepton	5 g
Élesztőkivonat	5 g
Tejsav	4,504 g
Tirozin	1,819 g
MnSO ₄ *H ₂ O	0,106 g
Agar	25 g
Desztillált víz	1000 ml

4.2.3. Inokulum tápközeg

Az inokulum tápközeg összetételét a 12. táblázatban tüntettem fel.

12. táblázat: Inokulum tápközeg

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

4.2.4. A lipáz fermentációhoz használt tápközégek

Alap fermentációs tápközeg

A lipáz termelésre irányuló fermentációhoz YEPD tápközeget használtam fel a 13. táblázatban látható összetétel szerint.

13. táblázat: Lipáz fermentációhoz alkalmazott YEPD tápleves

Összetevő	Mennyiség
Glükóz	20 g
Pepton	6,4 g
Élesztőkivonat	10 g
Desztillált víz	1000 ml

Természetes szubsztrátum, valamint Tween 80 tartalmú YEPD tápleves

Különböző természetes szubsztrátummal (növényi olajok -olívaolaj – kontrollként és olajpogácsák), és Tween 80-nal (Thermo Fisher Scientific) kiegészített YEPD tápközegeket alkalmaztam az optimalizációs kísérletek során a 14. és a 15. táblázatokban látható összetétel szerint. Az alkalmazott növényi olajok kereskedelmi forgalomban kaphatóak. Az olívaolajat Spanyolországban palackozták és a TESCO-Global Zrt. forgalmazza. A kókuszolajat a Coco Trade Kft., a dióolajat az Olajútó Szövetkezet, a szőlőmagolajat az AKA Kft. (Gere Attila pincészet), a napraforgóolajat a Bunge Zrt., a kukoricaolajat az Agri-Corn Kft, a repceolajat pedig a BIOGOLD Natur Kft. gyártja. A szezámolajat Franciaországban palackozták, s az Auchan Magyarország Kft. forgalmazza. Használt sütőolajként napraforgó eredetűt alkalmaztam. A pelleteket (tökmag, aranylenmag, napraforgómag, mogyoró, kendermag) a Gabona és Iparinövény Technológia Tanszék biztosította.

14. táblázat: Természetes szubsztrátumot és Tween 80-t tartalmazó YEPD tápleves

Összetevő	Mennyiség
Glükóz	20 g
Pepton	6,4 g
Élesztő kivonat	10 g
Természetes szubsztrátum	1%
Tween 80	0,5 g
Desztillált víz	1000 ml

15. táblázat: Központi elrendezésű kísérlettervezés során alkalmazott olívaolaj és Tween 80 mennyiségei

Beállítás	Faktor kombinációk		Koncentráció	
	Olívaolaj	Tween 80	Olívaolaj (v/v%)	Tween 80 (m/v%)
1	-1,41	0	0,295	0,05
2	-1	1	0,5	0,07
3	0	1,41	1	0,0782
4	1	1	1,5	0,07
5	1,41	0	1,705	0,05
6	1	-1	1,5	0,03
7	0	-1,41	1	0,0218
8	-1	-1	0,5	0,03
9	0	0	1	0,05
10	0	0	1	0,05

Olívaolaj, Tween 80 és Triton X-100 tartalmú YEPD tápleves

A lipáz enzim termelésének optimalizálására irányuló kísérletekhez 1% olívaolaj, Tween 80 és Triton X-100 tartalmú (Reanal Laborvegyszer Kft.) YEPD táplevest is használtam.

Mindehhez a 16. táblázat alapján mértem be a Tween 80 és Triton X-100 megfelelő mennyiségeit.

16. táblázat: Központi elrendezésű kísérlettervezés során alkalmazott Triton X-100 és Tween 80 mennyiségei

	Faktor kombinációk		Koncentráció	
Beállítás	Triton X-100	Tween 80	Triton X-100 (m/v%)	Tween 80 (m/v%)
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

4.2.5. A pigment fermentációhoz használt tápközegek

Alap fermentációs tápközeg

A pigment fermentációkhoz a 17. táblázatban feltüntetett összetevőkből készített alap tápközeg került alkalmazásra.

17. táblázat: Pigment fermentációs alap tápközeg

Összetevő	Mennyiség
KH ₂ PO ₄	4 g
MgSO ₄ *7 H ₂ O	2,5 g
MnSO ₄ *5 H ₂ O	0,106 g
Desztillált víz	1000 ml

Kiegészítést tartalmazó fermentációs tápközeg

A fermentációs alap tápközeget a 18. táblázatban összefoglalt komponensekkel egészítettem ki a pigment termelés fokozása érdekében.

18. táblázat: A pigment termelés vizsgálatára készített tápközegek összetétele (az alap tápközeg kiegészítő komponensei és alkalmazott koncentrációjuk)

	 tirozin	 glicin	 L-glutamin	 L-aszparagin	 tejsav
1.tápközeg	0,27 g/l	-	-	-	-
2.tápközeg	0,27 g/l	1 g/l	1 g/l	1 g/l	-
3.tápközeg	0,27 g/l	1 g/l	1 g/l	1 g/l	5,46 g/l

4.3. Enzimaktivitás méréshez felhasznált oldatok

Szubsztrátum

A lipáz enzim aktivitásának mérésénél 25mM-os para-nitrofenil-laurát szubsztrát került alkalmazásra 96%-os etanolban feloldva. Az egyes mérésekhez mindig frissen készítettem a szubsztrátumot.

Leállító reagens

0,1 N nátrium-karbonát (Na_2CO_3) oldat, melyhez 1000 ml desztillált vízben feloldottam 5,13g nátrium-karbonátot.

Sörensen puffer

A pH optimum meghatározáshoz a puffert pH=5-8 tartományban készítettem el m/15 dinátrium-hidrogén-foszfát (11,876 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) és m/15 kálium-dihidrogén-foszfát (9,078 g/l KH_2PO_4) oldatok megfelelő arányú összemérésével, összetételük a 19. táblázatban került ismertetésre.

19. táblázat: Az alkalmazott Sørensen pufferek összetétele

pH	Na ₂ HPO ₄ *12 H ₂ O (ml)	KH ₂ PO ₄ (ml)
5	0,95	99,05
5,5	3,90	96,9
6	12,1	87,9
6,5	31,3	68,7
7	61,2	38,8
7,2	72,6	27,4
7,5	85,2	14,8
8	96,9	3,1

McIlvaine puffer

A pH=6,5 értékű puffert 0,2 m dinátrium-hidrogén-foszfát (71,66 g/l Na₂HPO₄*12 H₂O) és 0,1 m citromsav (21,008 g/l) oldatok megfelelő arányú összemérésével készítettem el. 100 ml pufferhez a dinátrium-hidrogén-foszfát oldatból 71 ml-t mértem, majd kiegészítettem a citromsavval.

4.4. Alkalmazott módszerek

4.4.1. 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.

4.4.2. 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 négyszögben számoltam meg az élesztő sejteket. Ezt követően a kapott eredményeket átlagoltam és sejt/ml-ben adtam meg a sejtszámot a hígítás figyelembevételével.

4.4.3. 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,

illette az optimális környezeti paraméterek meghatározásánál a fermentációkat 5 v/v%-nyi 24 óras 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 rázatósi sebesség mellett (kivétel a levegőztetés hatásának vizsgálatakor, 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.

4.4.4. Lipáz enzim aktivitásának mérése

Meghatározott időközönként mintát vettem az extracelluláris lipáz aktivitás méréséhez a fermentáció során. 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 extracelluláris lipáz enzimaktivitás méréséhez. Szükség szerint a minták hígításra kerültek. Minden esetben kettő párhuzamos aktivitás mérést hajtottam végre. A lipáz aktivitást a p-nitro-fenil-laurát mesterséges szubsztrátumból az enzimoldat által felszabaduló p-nitrofenol mennyiségének meghatározásával állapítottam meg (Becker *et al.*, 1997). Az enzimaktivitás meghatározásához összemértem a 20. táblázatban feltüntetett reakcióelegyeket. 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 Na₂CO₃ oldattal állítottam le a folyamatot és centrifugálást követően 405 nm-en mértem a minták abszorbanciáját. A 4.4.5. fejezetben ismertetett módszerrel egyszeres, illetve kétszeres sejtfeltárást végeztem, amely után az intracelluláris enzimaktivitást határoztam meg, az extracelluláris lipáz aktivitás mérésével megegyező eljárást alkalmazva.

20. táblázat: Az enzimaktivitás mérésének reakcióelegyei

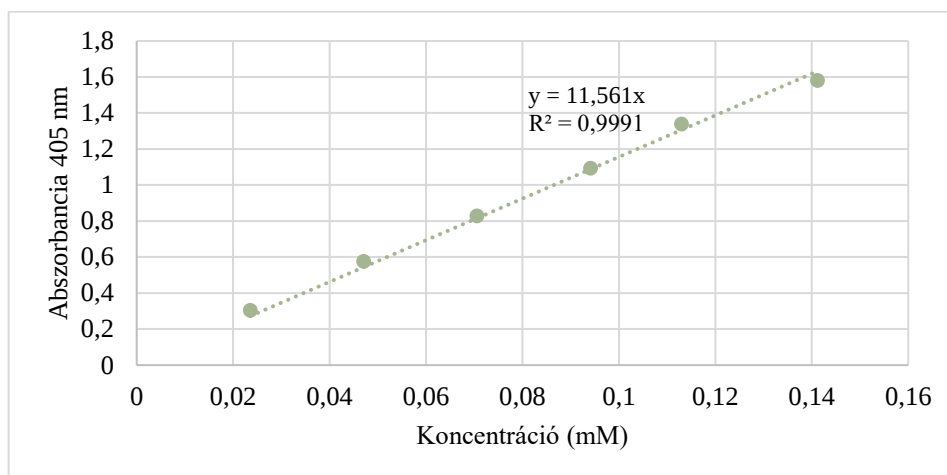
	Desztillált víz (µl)	Szubsztrátum (µl)	Puffer (µl)
Műszer vak	125	-	725
Szubsztrátum vak	25	100	725
Enzim vak	100	-	725
Minta	-	100	725

4.4.5. Kalibráció

Az enzimaktivitás mérés során alkalmazott mesterséges szubsztrátumból az enzim reakció során p-nitrofenol szabadul fel. Az enzimaktivitás érték megadásához a p-nitrofenol koncentráció és az abszorbancia közötti összefüggés meghatározása szükséges. A kalibrációs egyenest 0,4 mM para-nitrofenol oldatból készítettem, a 21. táblázatban feltüntetett hígítási sor felhasználásával, s Na_2CO_3 hozzáadásával. Az egyes koncentrációk esetén megmértem az abszorbanciákat, majd az átlagolt abszorbancia értékeket a koncentrációk függvényében ábrázoltam: a pontokra lineáris trendvonalat illesztettem, így megkaptam a kalibrációs egyenest, amelyet a 8. ábra mutat be.

21. táblázat: Kalibráció során alkalmazott hígítási sor

0,4 mM-os p-nitrofenol (μl)	desztillált víz (μl)	Na_2CO_3 (μl)
50	800	250
100	750	250
150	700	250
200	650	250
250	600	250
300	550	250



8. ábra: p-Nitrofenol kalibrációs egyenes

A következő egyenlet alapján számoltam ki a lipáz enzimaktivitását:

$$\text{Lipáz aktivitás} = \frac{(\text{Abszorbancia minta} - \text{Abszorbancia enzimvak} - \text{Abszorbancia szubsztrátumvak})}{11,561 \cdot \text{reakció idő}} \cdot \text{hígítás (U/L)}$$

4.4.6. Sejtfeltárás

Az intracelluláris enzimek esetében az enzim kinyerésére sejtfeltárási módszer alkalmazása szükséges. Az intracelluláris lipáz aktivitás méréséhez bizonyos időközönként vett 25 ml mintát centrifugacsőbe tettem és 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, homogenizáltam a sejteket összerázással, illetve szükség esetén Vortex keverő segítségével. 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 rázással, illetve Vortex keverővel összekevertem. Az így kapott szuszpenziót használtam fel a sejtfeltáráshoz. Laboratóriumi méretekben számos sejtfeltárási eljárás ismert, ezek közül a kísérleteim során a French Press nagy nyomású homogenizátort alkalmaztam.

A sejtfeltárás elve:

A feltárás alapja a nyomás gyors változása, illetve a sejten belüli és a sejten kívüli nyomások különbsége. A berendezésben ugyan elérhető a 40000 psi nyomás (~275 MPa) is, az élesztő sejtek feltáráshoz azonban már 800 psi is elegendőnek bizonyul. A berendezésen belül ez a nyomásérték jellemző intracellulárisan is. Ahogy a minta a fojtószelepen át elhagyja a berendezést, az extracelluláris nyomás az atmoszférikusra csökken, az intracelluláris viszont nem, ez a nyomáskülönbség okozza a sejtek szétrobbanását.

4.4.7. 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):

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

A módszer elve:

Egy beágyazott faktoriális vagy tört faktoriális tervet tartalmaz a Box-Wilson-féle központi elrendezésű kísérletterv, ennek 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. Mivel két faktorom volt, így az α értéke 1,414 volt.

4.4.8. 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 optimalálása során, amikor 10^6 sejt/ml, $5 \cdot 10^6$ sejt/ml és 10^7 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.

4.4.9. 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 4 ml mintából 1,5 ml-t Eppendorf-csőbe mértem és 10000 rpm-en 10 percig centrifugáltam, majd az abszorbanciákat a felülúszót használva 400 nm-en határoztam meg.

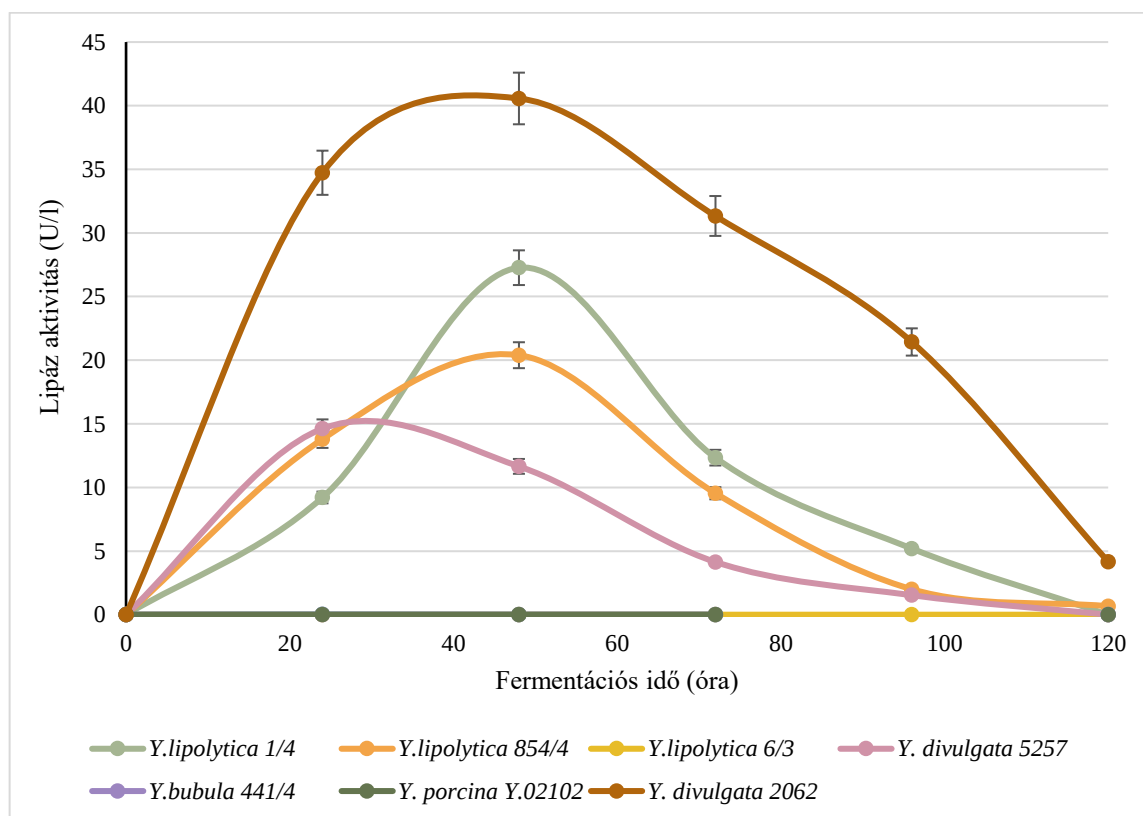
5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

5.1. *Yarrowia* törzsek lipáz termelésének vizsgálata

A lipáz enzim ipari célú felhasználása az elmúlt évtizedekben érezhetően növekedett, felhasználják az élelmiszeriparban, a gyógyszeriparban, a papíriparban, 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.

5.1.1. Lipáztermelő törzsek szelektálása

Hét különböző *Yarrowia* törzs extracelluláris lipáz termelését vizsgáltam YEPD alap tápközegeben (9. ábra). A fermentáció 5 napig zajlott, és a lipáz aktivitást naponta ellenőriztem.



9. ábra. *Yarrowia* törzsek extracelluláris lipáz aktivitása YEPD alap tápközegeben

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 tápközegeben. 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*

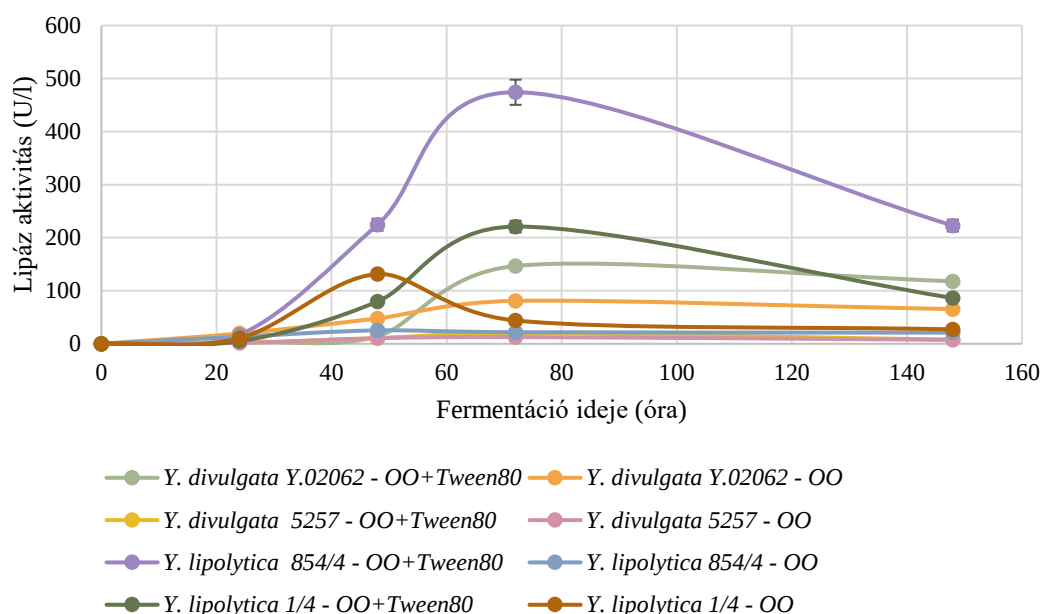
NCAIM Y.02062 törzsek esetében figyelhetjük meg. A lipáz aktivitás meredeken csökkent 48-72 óra között a *Y. lipolytica* törzsek mindegyikénél. A legjobb értéket a *Y. divulgata* NCAIM Y.02062 adta a 48. órában, 40,56 mU maximális aktivitással. A többi törzstől eltérően a lipáz aktivitást a fermentáció 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. A *Y. lipolytica* lipáz termelését több kutató is vizsgálta (Corzo és Revah, 1999; Destain *et al.*, 1997; Domínguez *et al.*, 2003; Fickers *et al.*, 2004; Galvagno *et al.*, 2011), és ezt a fajt ipari szinten is kiváló lipáz termelőnek tartják. Megemlítendő ugyanakkor, hogy a *Y. lipolytica* KKP 379 törzsnél YEPD tápközegben a hidrofób szubsztrátok hiánya miatt nem sikerült nagy mennyiségű extracelluláris lipáz aktivitást kimutatni (Fabiszewska *et al.*, 2014). Ezen tény alapján a kutatómunkám folytatásában különféle adalékanyagokat vizsgáltam az enzimaktivitás fokozása céljából.

Kevés szakirodalmi adat áll rendelkezésre a *Y. divulgata* lipáz termelő képességével kapcsolatban, azonban az általam mért eredmények biztató alkalmazási lehetőséget vetnek fel.

5.1.2. Az olívaolaj és a Tween 80 hatása a *Yarrowia lipolytica* és a *Yarrowia divulgata* törzsek lipáz termelésére

Köztudott, hogy az olívaolaj erősen indukálja a *Y. lipolytica* élesztő lipáz szekrécióját (Paludo *et al.*, 2018). Erre alapozva az alaptápközeget 1% olívaolajjal, mint induktorrall egészítettem ki. A kísérletet a *Y. lipolytica* 854/4, a *Y. lipolytica* 1/4, a *Y. divulgata* NCAIM Y.02062, és a *Y. divulgata* 5257 törzsekkel végeztem el, a fermentációs folyamat 148 órán át folyt, és az extracelluláris lipáz aktivitást naponta nyomon követtem. A *Y. lipolytica* 854/4 törzs enzimaktivitása 13 U/l volt a 24. órában, majd a 48. órában 25 U/l-re nőtt, végül a fermentációs folyamat végén körülbelül 20 U/l-re csökkent (10. ábra). A *Y. lipolytica* 1/4 törzs esetében az extracelluláris lipáz aktivitás a 48. órában érte el a csúcst (131 U/l), majd 72. órára 44 U/l-re, végül a fermentáció végén 24 U/l-re esett vissza. A *Y. divulgata* NCAIM Y.02062 törzs lipáz aktivitása 72 óra elteltével mutatott maximális értéket (81 U/l), és a 148. órás fermentációig változatlan maradt. Eredményeim alapján hasonló tendenciákat figyeltem meg minden vizsgált törzs esetében, nevezetesen 10 g/l olívaolaj hatékonyan indukálja a *Y. lipolytica* 1/4, a *Y. lipolytica* 854/4, a *Y. divulgata* 5257 és a *Y. divulgata* NCAIM Y.02062 törzsek lipáz termelését. Az olívaolaj serkentő hatását a lipáz termelésre több tanulmány is megerősítette. Galvagno és munkatársai (2011) 1,0 g/l olívaolaj szerves nitrogénforrásként való hozzáadásával a lipáz termelés jelentős növekedéséről számoltak be, a *Y. lipolytica* 681 törzs lipáztermelését szignifikánsan ($p < 0,05$) növelte az olíva- vagy kukoricaolaj szénforrásként és induktorként történő alkalmazása. Darvishi és munkatársai (2009), valamint Paludo és munkatársai (2018)

kísérleteikben az általam is alkalmazott 10 g/l (1%) olívaolaj koncentrációnál mutatták ki a maximális extracelluláris lipáz aktivitást *Y. lipolytica* esetében. Pignède és munkatársai (2000) azonban azt találták, hogy az 50 g/l koncentráció hatékonyabb induktor, mint a 10 g/l olívaolaj. Iqbal és Rehman (2015) a *Bacillus subtilis* növekedésének és lipáz termelésének növekedéséről számoltak be 0,5–1%-os olívaolaj koncentráció mellett. Acikel és munkatársai (2011) optimálisnak a 0,5 % -os koncentrációban alkalmazott napraforgóolajat találták az *R. delemar* által termelt lipáz aktivitás vizsgálata során. Nunes és munkatársai (2014) azt is megállapították, hogy az olívaolaj az intracelluláris lipáz termelésére is jelentős serkentő hatással volt a *Y. lipolytica* esetében. Domínguez és munkatársai (2003) megfigyelték, hogy a napraforgóolaj a legjobb induktor lipolitikus aktivitást tekintve, összehasonlítva az olajsavval, olívaolajjal vagy a tributirinnal. A maximális aktivitást az általam tapasztaltakkal ellentétben, a fermentáció 8 napján mérték.



10. ábra: A *Yarrowia* törzsek által termelt extracelluláris lipáz aktivitás változásai különböző tápközegekben (OO – olívaolaj)

A Tween 80 *Yarrowia* élesztők lipáztermelésére gyakorolt hatását 1% olívaolajat tartalmazó tápközegben vizsgáltam. A Tween 80-at 0,05% koncentrációban alkalmaztam és mind az extracelluláris (10. ábra), mind az intracelluláris aktivitást naponta mértem a fermentációs folyamat során, 6 napon keresztül (22. táblázat). 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, illetve

anélkül a 48. órában 25 U/l volt megfigyelhető. Mindeközben ennek a törzsnak a maximális intracelluláris aktivitása a Tween 80 nélküli tápközegben 467 U/l volt, míg a Tween 80 -t is tartalmazó táptalajban csak 122 U/l (21. táblázat). Ez azt jelenti, hogy a Tween 80 hozzáadása közel 20x-osára növelte az extracelluláris, illetve csökkentette az intracelluláris aktivitást ezen élesztő törzsnél. A Tween 80 egy felületaktív, nemionos polioxietilén detergens, amelynek hidrofób része általában egy alkiláncból, a hidrofíl része pedig töltetlen etilén-oxid egységekből áll (Helisto és Korpela, 1998). Általában a Tween 80 serkenti a lipáz bioszintézist és szekréciót, mivel növeli a sejtek permeabilitását és megkönnyíti a lipáz átjutását a sejtmembránon keresztül (Papagora *et al.*, 2013). Ezt a jelenséget a megváltozott sejtmembrán permeabilitásnak vagy a felületaktív anyagok sejthez kötött lipázra gyakorolt hatásának tulajdonítják. Ezzel magyarázható, az extracelluláris aktivitás növekedésének mértéke.

A *Y. lipolytica* 1/4 törzs esetében 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, ami azt jelenti, hogy az aktivitás 126 U/l-ről Tween 80 mellett 273 U/l-re nőtt. Érdekes módon e törzsnél az intracelluláris aktivitás Tween 80 alkalmazása mellett szignifikánsan nagyobb volt, mint nélküle.

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.

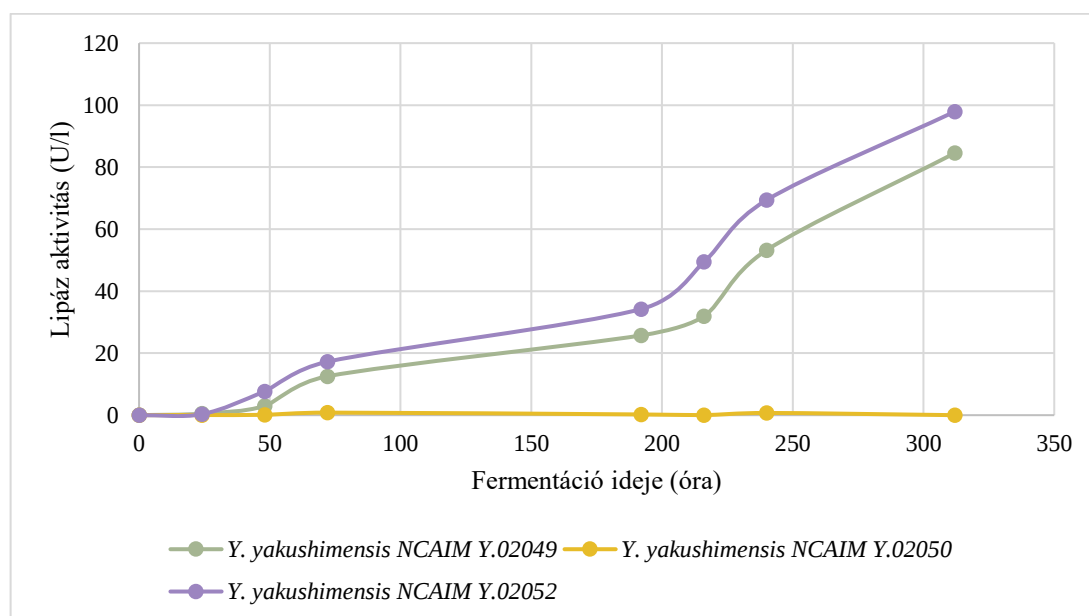
Mindazonáltal, hogy a felületaktív anyagok növelik a lipáz termelést, hatásuk a felületaktív anyag típusától és a vizsgált törzstől is függ (Domínguez *et al.*, 2003). Corzo és Revah (1999) is megerősítette, hogy az extracelluláris lipáz aktivitás növelhető Tween 80 hozzáadásával 0,5-2 g/l koncentráció tartományban, a biomassa-koncentráció változása nélkül. Eredményeim alapján a Tween 80 hatásosnak bizonyult az extracelluláris lipáz aktivitás fokozására minden törzs esetében, míg az intracelluláris aktivitásra csak a *Y. lipolytica* 1/4 törzsnél volt serkentő hatással.

22. táblázat: Különböző *Yarrowia* élesztőtörzsek intracelluláris lipáz aktivitása a 72. órában olívaolajat, valamint olívaolajat és Tween 80-at tartalmazó tápközegekben

Törzs	Lipáz aktivitás (U/l)	
	Olívaolaj (1%) tartalmú tápközeg	Olívaolaj (1%) és Tween 80 (0,05%) tartalmú tápközeg
<i>Y. divulgata</i> 5257	22	8
<i>Y. divulgata</i> NCAIM Y.02062	117	80
<i>Y. lipolytica</i> 1/4	126	273
<i>Y. lipolytica</i> 854/4	467	122

5.1.3. *Yarrowia yakushimensis* törzsek lipáz enzim termelésének vizsgálata

Az olívaolaj lipáz termelés fokozó hatásának megerősítését követően további három *Y. yakushimensis* törzs screenelésével folytattam a kutatásaimat, melynek célja volt, hogy még több, eddig kevésbé ismert és kutatott *Yarrowia* törzs lipáz termelő képességéről legyen információ. Vizsgálatomhoz 1 % olívaolajat tartalmazó YEPD tápközeget választottam, a és követtem az extracelluláris lipáz aktivitás alakulását 2 hetes fermentáció során a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02049, *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02050 és *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052 törzsek esetén. A kísérlet eredményeit a 11. ábra mutatja.



11. ábra: *Y. yakushimensis* törzsek extracelluláris lipáz aktivitásának alakulása olívaolaj tartalmú YEPD tápközegekben

A törzsek lipáz aktivitását áttekintve kitűnik, hogy a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02050 törzs lipáz enzim aktivitása 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 enzintermelésük. 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. Az eredményeket a 23. táblázat tartalmazza.

23. táblázat: *Y. yakushimensis* törzsek extracelluláris és intracelluláris lipáz aktivitása a 144. órában olívaolaj és Tween 80 tartalmú YEPD tápközegben

Törzs	Extracelluláris lipáz aktivitás (U/l)	Intracelluláris lipáz aktivitás (U/l)
<i>Y. yakushimensis</i> NCAIM Y.02049	605	116
<i>Y. yakushimensis</i> NCAIM Y.02052	773	123

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. Az is egyértelműen látszik az adatokból, hogy a *Y. lipolytica* és a *Y. divulgata* törzsekhez hasonlóan ezen élesztőknél is az intracelluláris lipáz aktivitás nagysága elmaradt az extracelluláris aktivitáséhoz képest.

5.1.4. Az olívaolaj és a Tween 80 koncentráció hatásának vizsgálata az extracelluláris lipáztermelésre

Az olívaolaj és a Tween 80 koncentrációjának optimalizálása a kiválasztott *Yarrowia* törzsek extracelluláris lipáz termelésének maximalizálása érdekében a válaszfelületi módszerek (RSM) közül, központi elrendezésű statisztikai modell (CCD) alkalmazásával történt (Nwabueze, 2010). Az enzimaktivitásokat különböző fermentációs időpontokban vizsgáltam, a 72. órás fermentáció eredményeit a 24. táblázat tartalmazza.

24. táblázat: A különböző *Yarrowia* törzsek 72. órában mért lipáz aktivitása olívaolaj, valamint Tween 80 tartalmú YEPD tápközegekben

	Lipáz aktivitás a 72. órában (U/l)			
Beállítás	<i>Y. lipolytica</i> 854/4	<i>Y. lipolytica</i> 1/4	<i>Y. divulgata</i> Y.02062	<i>Y. divulgata</i> 5257
1	305	74	99	120
2	301	181	134	107
3	612	354	258	222
4	570	221	217	192
5	599	202	238	282
6	240	137	191	182
7	233	96	78	151
8	289	114	147	96
9	504	166	158	182
10	530	173	161	187

Az eredmények alapján látható, hogy a legnagyobb aktivitás értékeket a négy törzs közül 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 eredményei között nincs nagy mértékű eltérés, sem az egyes beállítások során mért aktivitás értékek, sem pedig a törzsek maximum értékei tekintetében. Továbbá az is megállapítható, hogy a nagyobb olívaolaj és/vagy Tween 80 koncentráció nagyobb lipáz aktivitást eredményez, ez fordítva is igaz, ugyanis az kisebb koncentrációk esetében kisebb aktivitás értékeket detektáltam.

A varianciaanalízis (ANOVA) azt mutatta, hogy a *Y. lipolytica* 854/4 törzs esetében a lineáris és másodfokú változók varianciája, valamint a köztük lévő kölcsönhatás 95%-os, illetve 90%-os szinten szignifikánsan hasonló volt (25. táblázat). Ezenkívül a *Y. lipolytica* 854/4, 1/4, a *Y. divulgata* NCAIM Y.02062 és 5257 törzseknél a modell illeszkedésének megfelelőségét mutató értékek (LoF) 85%-os, 93%-os, 98%-os és 92%-os szinten voltak szignifikánsak. A *Y. lipolytica* 1/4 törzs esetében a két lineáris változó varianciáinak-hasonlósága 96 %-os szinten, míg a két másodfokú változóé 93 %-os szinten volt szignifikáns.

25. táblázat: Varianciaanalízis olívaolaj és Tween 80 faktorok esetében

Faktor	<i>Y. lipolytica</i> 854/4		<i>Y. lipolytica</i> 1/4		<i>Y. divulgata</i> . Y.02062		<i>Y. divulgata</i> 5257	
	F érték	p érték	F érték	p érték	F érték	p érték	F érték	p érték
Olívaolaj (%)(elsőfokú)	151,59	0,05	315,51	0,04	5563,74	0,01	1491,02	0,02
Olívaolaj (%)(másodfokú)	41,28	0,10	84,76	0,07	61,16	0,08		
Tween 80 (%) (L)	290,21	0,04	1425,55	0,02	3789,22	0,01	133,10	0,06
Tween 80 (%) (Q)	66,31	0,08	104,31	0,06	52,19	0,09	40,67	0,10
Olívaolaj x Tween 80	75,76	0,07	3,11	0,33	162,65	0,05		
Illeszkedés megfelelősége	24,69	0,15	117,26	0,07	1137,95	0,02	92,20	0,08

Míg a *Y. divulgata* NCAIM Y.02062 törzs esetén a teljes másodrendű polinomikus modell különböző változóinak varianciája szignifikánsan, legalább 91%-ban hasonló volt, addig a *Y. divulgata* 5257 törzs esetében a részleges modell alkalmazása mellett bizonyultak szignifikánsnak a független változók varianciáinak a hasonlóságai (90% vagy magasabb szinten (25. táblázat)). A regresszió analízist az ANOVA eredményei alapján végeztem, és az Eq. 1, Eq. 2, Eq. 3. és Eq.4. egyenletek szerinti modelleket alkalmaztam az extracelluláris lipáz aktivitás változásának leírására 72. órás fermentációnál.

$$Y_1 = 518 + 159 X_1 - 110 X_1^2 + 220 X_2 - 139 X_2^2 + 159 X_1 X_2 \quad (\text{Eq. 1})$$

$$Y_2 = 170 + 61 X_1 - 41 X_1^2 + 129 X_2 + 46 X_2^2 + 8 X_1 X_2 \quad (\text{Eq. 2})$$

$$Y_3 = 159 + 81 X_1 + 11 X_1^2 + 67 X_2 + 10 X_2^2 + 20 X_1 X_2 \quad (\text{Eq. 3})$$

$$Y_4 = 180 + 100 X_1 + 30 X_2 - 20 X_2^2 \quad (\text{Eq. 4})$$

Ahol:

Y₁: a *Y. lipolytica* 854/4 törzs lipáz aktivitása 72 órás fermentáció után

Y₂: a *Y. lipolytica* 1/4 törzs lipáz aktivitása 72 órás fermentáció után

Y₃: a *Y. divulgata* NCAIM Y.02062 törzs lipáz aktivitása 72 órás fermentációnál

Y₄: a *Y. divulgata* 5257 törzs lipáz aktivitása 72 órás fermentáció után

X₁: az olívaolaj koncentrációja (%)

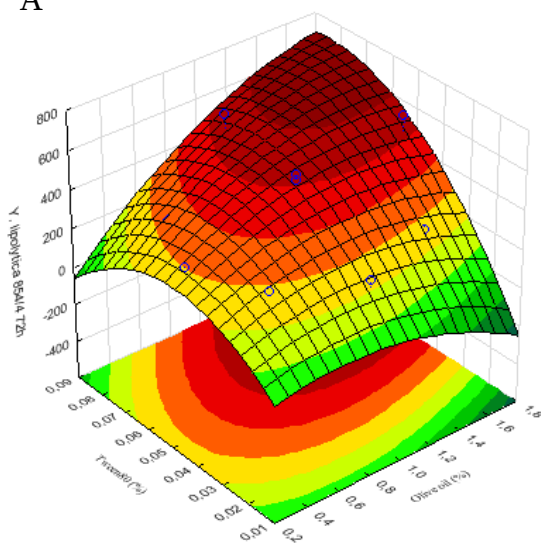
X₂: a Tween80 koncentrációja (%)

A regressziós együtthatók szignifikancia szintjeit t-próbával vizsgáltam, és az értékek (kivéve két változó közötti kölcsönhatást a *Y. lipolytica* 1/4 törzs esetében) több mint 90%-os szinten illeszkednek. A lipáz aktivitás az olívaolaj és a Tween 80 koncentráció függvényében ábrázolt válaszfelület diagramjai a 12. ábrán láthatóak. Ezen eredmények alapján a független változók (olívaolaj és Tween 80) optimális koncentrációját az alábbiak szerint határoztam meg a vizsgált koncentráció tartományban:

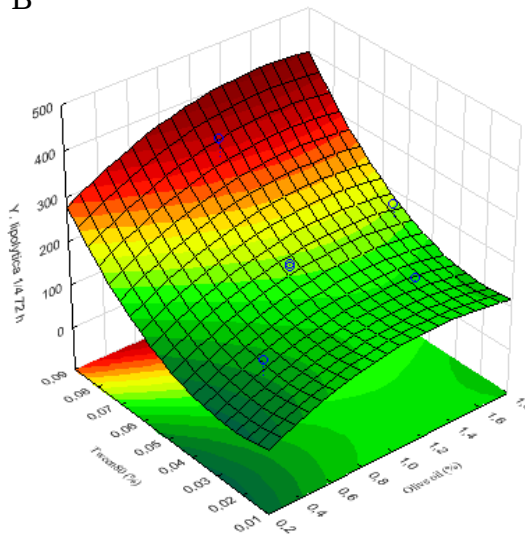
- *Y. lipolytica* 854/4 törzs: 1,6 % olívaolaj, 0,065 % Tween 80
- *Y. lipolytica* 1/4 törzs: 1,4 % olívaolaj, 0,09 % Tween 80
- *Y. divulgata* NCAIM Y.02062 törzs: 1,6 % olívaolaj, 0,09 % Tween 80
- *Y. divulgata* 5257 törzs: 1,6 % olívaolaj, 0,06 % Tween 80

Ezeket az értékeket validáltam és kísérlet útján igazoltam a releváns törzs fermentációjával, a fent említett koncentrációkkal kiegészített tápközeg alkalmazásával.

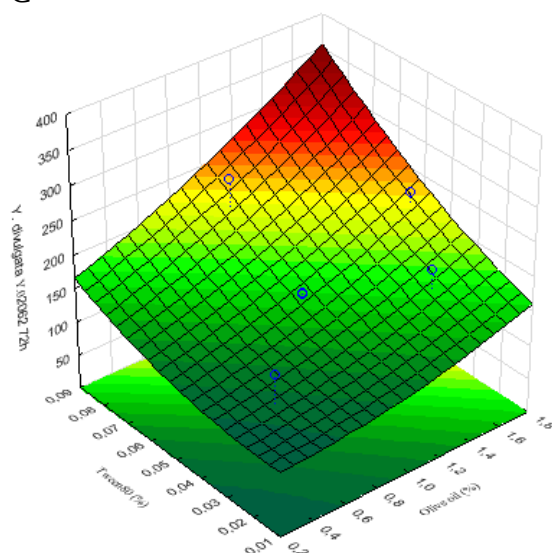
A Fitted Surface; Variable: *Y. lipolytica* 854/4 72h



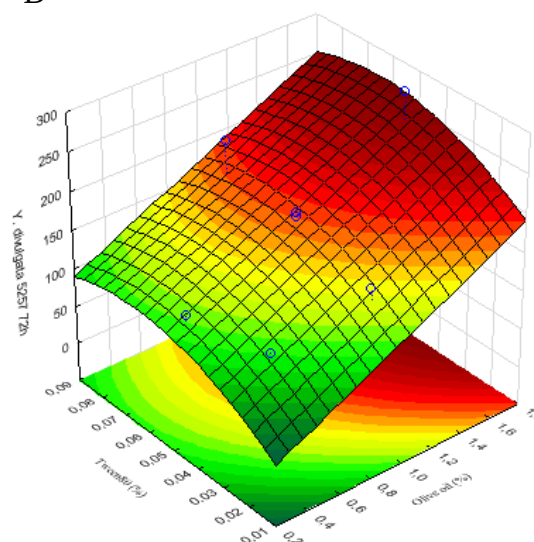
B Fitted Surface; Variable: *Y. lipolytica* 1/4 72 h



C Fitted Surface; Variable: Y. divulgata Y.02062 72h



D Fitted Surface; Variable: Y. divulgata 5257 72h



12. ábra: A különböző törzsek lipáz aktivitásának válaszfelület diagramjai az olívaolaj és a Tween 80 koncentrációjának függvényében. A: *Y. lipolytica* 854/4 törzs, B: *Y. lipolytica* 1/4 törzs, C: *Y. divulgata* Y.02062 törzs, D: *Y. divulgata* 5257 törzs

A *Y. lipolytica* Wt-11 mutáns élesztő lipáz termelését növelte a 0,1%-os koncentrációban alkalmazott Tween 80, de a nagyobb mennyiség gátló hatásának bizonyult (Ping *et al.*, 2017). Vizsgálatomban a *Y. divulgata* Y.02062 és a *Y. divulgata* 5257 törzseknél a legnagyobb lipáz aktivitást az 1,6% olívaolajat, valamint az előbbi élesztő esetében 0,09%, az utóbbinál pedig 0,06% Tween 80-at tartalmazó tápközegnél határoztam meg. Boekema és munkatársai (2007) kimutatták, hogy a Tween 80 0,1%-os koncentrációban drámaian megnövelte az *Burkholderia glumae* baktérium extracelluláris lipáz aktivitását.

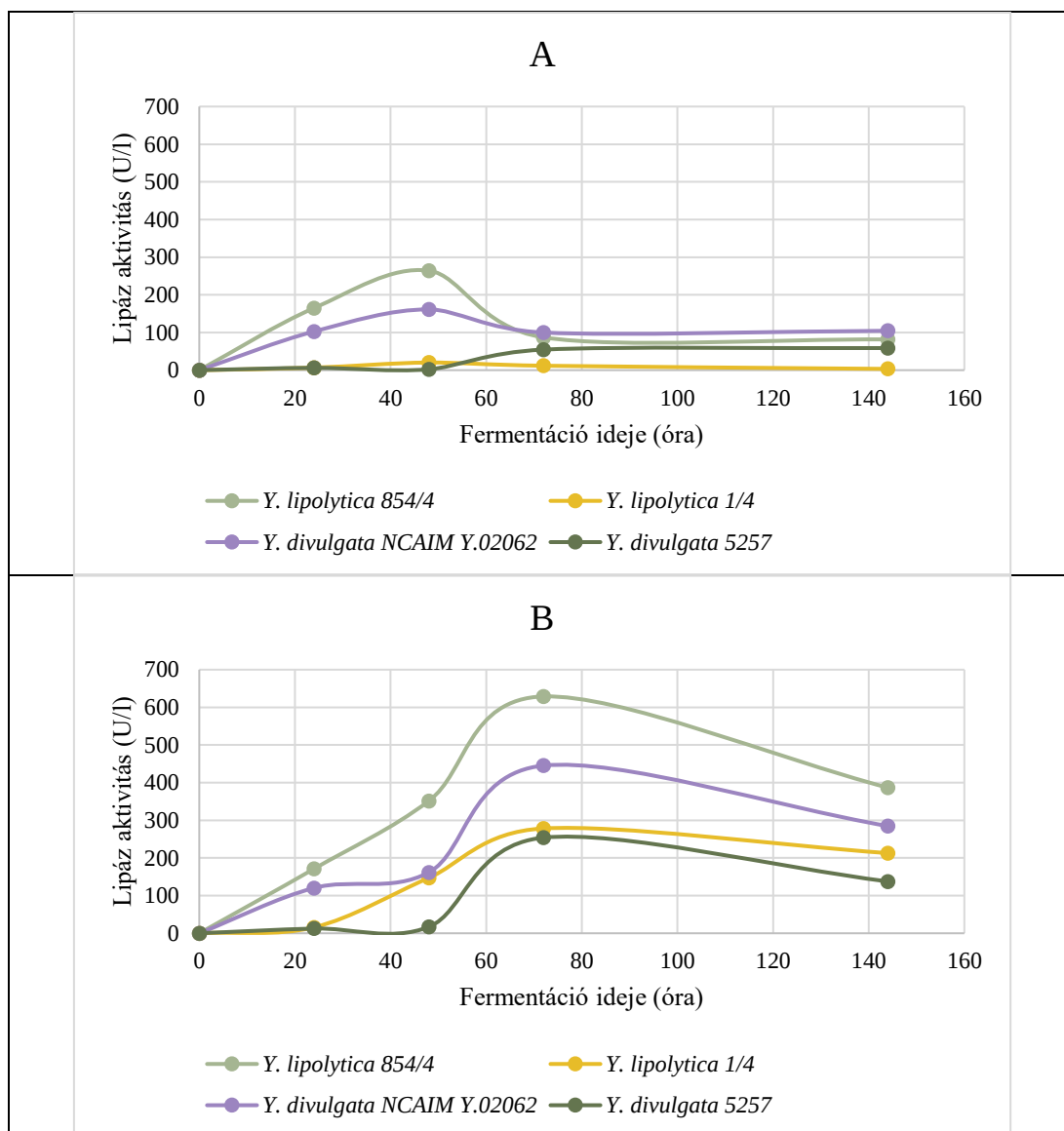
A szakirodalmak alapján lipáz termelésre a leggyakrabban alkalmazott olívaolaj koncentráció az 1%. Ezzel szemben az enzim termelés fokozására a legígéretesebb Tween 80 koncentráció 0,05-0,1% között van. Papagora és munkatársai (2013) lipázt termelő élesztőket izoláltak szárazon sózott olajbogyóból (Thassos fajta), amelyeket később *Debaryomyces hansenii* élesztőként azonosítottak. A screenelés során 0,1% Tween 80-at adtak a táptalajhoz, mely 1%-ban olívaolajat tartalmazott, s megállapították, hogy a Tween 80 elősegítette a lipáz termelést. Az alkalmazott Tween 80 koncentráció optimálisnak bizonyult, ugyanis az előzetes kísérletek azt mutatták, hogy a Tween 80 nagyobb koncentrációban gátolja a lipáz aktivitást (Boekema *et al.*, 2007).

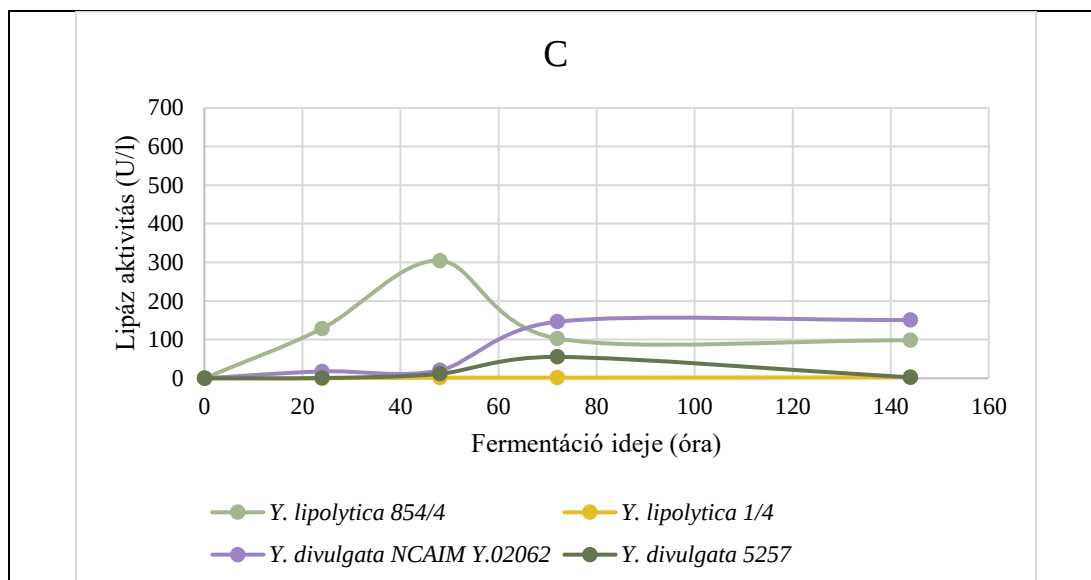
Az olívaolajat az 55–83%-os olajsav tartalmának köszönhetően az extracelluláris lipáz szintézis aktivátorának tekintik, amely a Lip2 gén promoterének az indukálója. Mindazonáltal nem minden extracelluláris lipázt aktivál az olívaolaj, és úgy gondolják, hogy a sejtfalhoz kötött

lipázokat az olajsav nem stabilizálja. A *Y. lipolytica* KKP 379 extracelluláris lipáz termelését az olívaolajat is tartalmazó tápközegben lévő lipidek indukálták (Fabiszewska *et al.*, 2014).

5.1.5. Rázatási sebesség hatása a lipáz termelésre

A *Y. lipolytica* egy obligát aerob élesztő, ezáltal az intenzív levegőztetés optimalizált keverősebesség alkalmazása mellett pozitívan befolyásolja a lipáz termelését (Lopes *et al.*, 2019). Mindazonáltal kevés kutató foglalkozott eddig a levegőztetés hatásának kérdésével lipáz szekréció szempontjából, így a következő kísérletem során a rázatási sebesség optimalizálást tűztem ki célul 6 napos fermentáció során, olívaolaj és Tween 80 tartalmú YEPD tápközegben.





13. ábra: A levegőztetés hatása 100 rpm (A) 130 rpm (B) és 160 rpm (C) rázatási sebesség alkalmazása mellett az extracelluláris lipáz termelésre különböző *Yarrowia* törzsek esetében

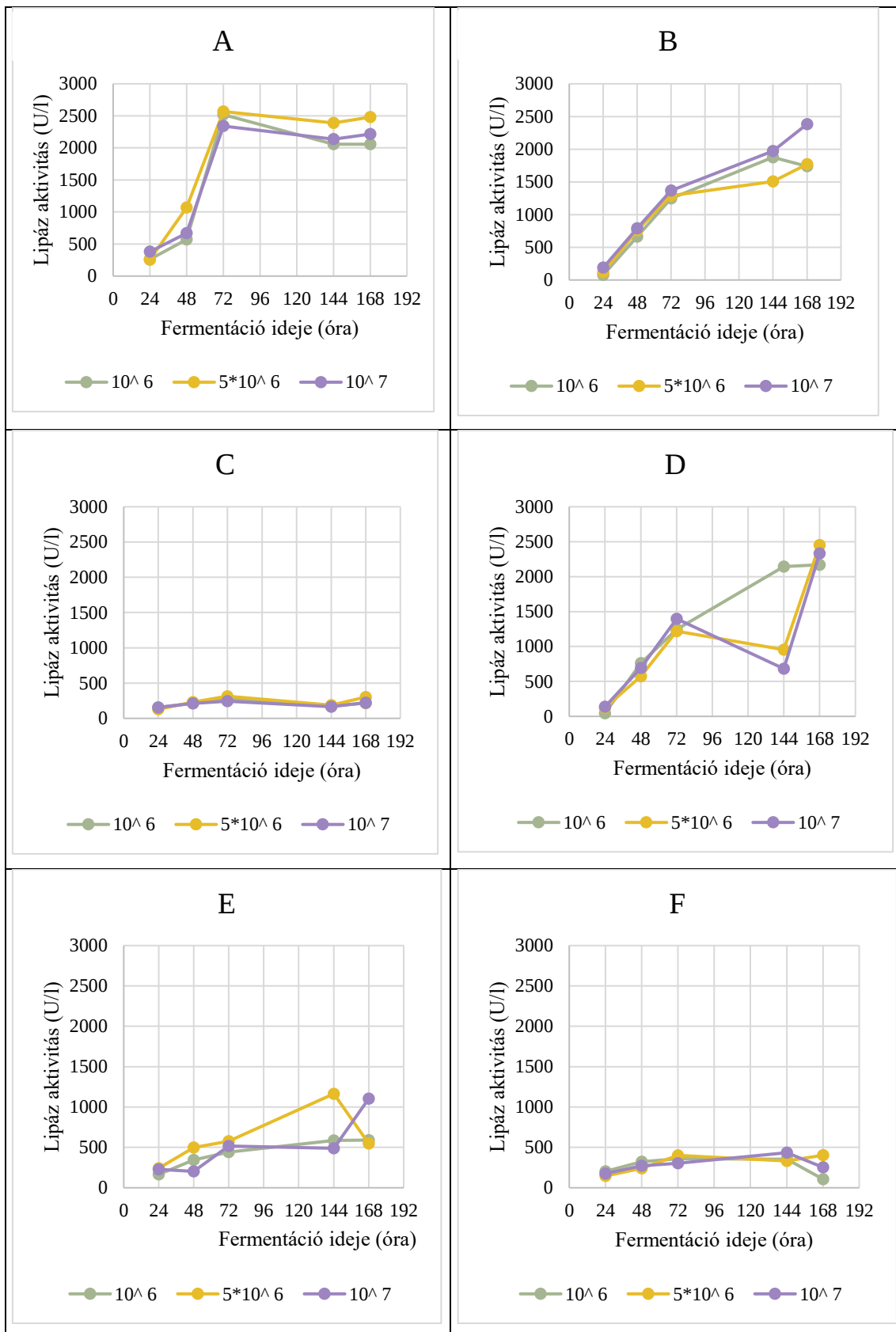
A 13. ábrán láthatóak a fermentáció során mért lipáz aktivitás adatok 100 rpm, 130 rpm és 160 rpm fordulatszám mellett. 100 rpm beállításon a legjobb termelő törzs a *Y. lipolytica* 854/4 élesztő volt, maximum érték a 48. órában 264,25 U/l volt. A *Y. divulgata* NCAIM Y.02062 élesztőnél szintén a fermentáció második napján volt maximális a lipáz termelés, míg a *Y. lipolytica* 1/4 törzsénél a 72. órában, a *Y. divulgata* 5257-nél pedig a 6. napon. 130 rpm rázatási sebesség mellett az összes törzs esetében a maximumokat a fermentáció harmadik napján mértem, tehát a lipáz termelés időben kitolódott az előző beállításhoz képest szinte minden törzsnél. 72 óra után az enzim termelés lecsökken. A legjobb termelő törzs újfent a *Y. lipolytica* 854/4 élesztő 628,83 U/l maximum értékkel. Minden törzs esetében a maximum értékek nagyobbak voltak az előző beállításhoz képest. 160 rpm rázatási sebesség alkalmazása mellett is a *Y. lipolytica* 854/4 törzs volt a legproduktívabb lipáz termelő, azonban a maximuma (304,55 U/l) elmarad a 130 rpm ráztatás melletti legnagyobb értéktől, de meghaladja a 100 rpm fordulatszámon elért maximális aktivitás értékeit. E beállítás során is a 48. órában volt a legnagyobb az aktivitás, majd a 72. órát követően stagnálás, illetve némi csökkenés figyelhető meg az összes törzs esetében.

Összességében megállapítható, hogy az optimális rázatási sebesség a vizsgált *Yarrowia* 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 képest. Ezt az eredményt a szakirodalmi adatok is alátámasztják. Amaral és munkatársai (2008) *Y. lipolytica* megnövekedett lipáz szintézisét tapasztalták a közegbe történő gázoldódás fokozása révén, melyet meglepő módon perfluorodekalin alkalmazásával értek el. Veerapagu

és munkatársai (2013) a kutatásuk során a rázatási sebesség hatását vizsgálták a *Pseudomonas gessardii* baktérium lipáz enzim termelésére. A kísérletük során szintén megállapították, hogy a rázatási sebesség megfelelő mértékű emelése a lipáz termelés növekedését eredményezi, mely a fokozottabb oxigénátviteli sebességnek tudható be, illetve megnövekedett az érintkezési felület a közeg összetevői között a Tween 80 alkalmazása révén. Kutatási eredmények bizonyítják azt is, hogy a fordulatszám bizonyos szint fölé növelése fordított hatáshoz vezet, ugyanis a nagyobb rázatási sebesség nagyobb nyíróerőt eredményez, ami negatív hatással lehet az enzimaktivitásra (Liu *et al.*, 2011; Veerapagu *et al.*, 2013). Erre a megállapításra jutott Elibol és Özer (2000) is, akik a kísérletük során a *Rhizopus arrhizus* fonalasgomba lipáz aktivitást vizsgálták négy különböző rázatási sebességnél (75, 100, 150 és 200 rpm). A maximális lipolitikus aktivitást 150 rpm esetében detektálták. E felett a ráztatás negatív hatását állapították meg a lipáz bioszintézisre, melyet a fehérjeszerkezetben fellépő változásokra vezettek vissza. Az enzimek ugyanis érzékenyek a mechanikai erőre, ami olyan mértékben megzavarhatja egy molekula speciális alakját, mely denaturálódást okoz. Eredményeim alapján az a konklúziót vonható le, hogy a 160 rpm rázatási sebesség már negatívan hat az enzimtermelésre, így a további kísérletek során 130 rpm rázatási sebességet használtam.

5.1.6. Inokulum mennyiség optimalizálása

Az inokulum mennyiség optimalizálása nagyon fontos tényező a fermentációs folyamatok során, mivel az inokulum koncentráció növelése negatívan befolyásolhatja az enzimtermelést a rendelkezésre álló tápanyagokért való versengés miatt. Hasonló módon az alacsony mennyiség az enzimszekréció mérséklését eredményezheti a sejtszám csökkenése miatt (Reddy *et al.*, 2008). Munkám során vizsgáltam az inokulum kiindulási sejtszámának a hatását a lipáz termelésre egy *Y. lipolytica*, három *Y. yakushimensis* és kettő *Y. divulgata* törzs esetében. A kísérlethez három különböző sejtkoncentráció került kiválasztásra, amelyek a következők: 10^6 TKE/ml, $5 \cdot 10^6$ TKE/ml és 10^7 TKE/ml. A lipáz fermentáció során olívaolaj tartalmú YEPD táplevest alkalmaztam, amelyhez 0,05% Tween 80 kiegészítést használtam.



14. ábra: Az inokulum mennyiségének hatása az extracelluláris lipáz enzim termelésére a *Y. lipolytica* 854/4 (A), *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02049 (B), *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02050 (C), *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052 (D), *Y. divulgata* NCAIM Y.02062 (E), és *Y. divulgata* 5257 (F) törzsek esetében

A 14. ábrán feltüntetett eredményekből kitűnik, hogy a legtöbb törzs esetében az $5 \cdot 10^6$ TKE/ml sejtkoncentráció esetén mértem a legnagyobb aktivitást, így a *Y. lipolytica* 854/4 törzs (14. A ábra) esetén is, ahol az aktivitás elérte a 2567,25 U/l-t a harmadik napra. Szintén e koncentráció volt a leghatékonyabb a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02050 törzsnél (14. C ábra) a hét napos fermentáció során, ezen élesztőnél 314,2 U/l aktivitást detektáltam, mely a legalacsonyabbnak bizonyult a maximum értékek között. Szintén az $5 \cdot 10^6$ TKE/ml sejtkoncentrációjú inokulummal beoltott fermentációs tápközeg esetében volt mérhető a legnagyobb enzim aktivitás a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052 (14. D ábra) törzs kapcsán, mely 2453,3 U/l értéket ért el a hetedik napra. A *Y. divulgata* NCAIM Y.02062 törzsnél mért enzimaktivitás értékeket a 14. (E) ábra szemlélteti. A grafikont nézve is szembetűnő, hogy jelentősen nem emelkedik a lipáz aktivitás a hét napos fermentáció során, a maximálisan elért aktivitás érték 1164,26 U/l szintén az $5 \cdot 10^6$ TKE/ml-s koncentráció esetében volt detektálható a 144. órában.

A 10^7 TKE/ml sejtkoncentrációjú inokulummal beoltott fermentációs tápközeg eredményezte a legnagyobb aktivitást a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02049 törzs (16. B ábra) esetében, amellyel sikerült 2382,5 U/l-es aktivitás értéket elérni a hetedik napra. E koncentráció mellett mértem legnagyobb értéket a *Y. divulgata* 5257 törzsnél is (14. F ábra) a hatodik napon, azonban ebben az esetben a második legalacsonyabb enzimaktivitás figyelhető meg, mindössze a 434,43 U/l.

A 10^6 TKE/ml sejtkoncentrációjú inokulummal beoltott fermentációs tápközeg egyik vizsgált törzs esetében sem bizonyult a leghatékonyabbnak. Megjegyzendő ugyanakkor, hogy az egyes törzsek esetében alkalmazott különböző inokulum mennyiségek nagymértékben nem befolyásolták az enzimaktivitás eredményességét. A *Y. lipolytica* 854/4 törzs esetében 10^6 TKE/ml koncentráció mellett a maximumhoz közel azonos, 2518,8 U/l -t megközelítő értéket kaptam, míg a 10^7 TKE/ml esetében pedig 2340,6 U/l -t. Ehhez hasonló aktivitásértékek voltak detektálhatók a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02049 és Y.2052 törzseknél is, vagyis összehasonlítva e törzsek maximum értékeit a *Y. lipolytica* 854/4 eredményével megállapítható, hogy érdembeli különbség nincs, mind a három törzs 2300-2600 U/l közötti aktivitás értéket produkált. Ezzel szemben a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02050 törzs és a *Y. divulgata* 5257-es törzs maximum értéke nagyságrendileg elmarad e három törzs aktivitásához képest.

Az összes törzs esetében elmondható, hogy a különböző inokulum koncentráció számottevően nem befolyásolta az enzimtermelést. Colla és munkatársai (2016) szubmerz fermentáció során vizsgálták fonalgombák (*Aspergillus niger* vagy *Aspergillus flavus*) lipáz termelését. A Plackett–Burman Design vizsgálatokban kapott lipolitikus aktivitás eredményeit varianciaanalízissel értékelték ki, és arra jutottak, hogy az inokulum mennyisége nem

befolyásolta szignifikánsan ($p > 0,1$) a szubmerz fermentáció során történő lipáz termelést. Godoy és munkatársai (2009) *Penicillium simplicissimum* fonalgombával végzett szilárd fázisú fermentációjuk során szintén ugyanezen megállapítást tették, hogy az inokulum koncentráció nem szignifikáns jelentőségű lipáz termelés szempontjából.

5.1.7. Az extracelluláris lipáztermelés fokozásának vizsgálata Tween 80 és Triton X-100 alkalmazásával

E 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, melynek során a Tween 80, illetve a Triton X-100 indukáló hatását vizsgáltam válaszfelületi módszer (RSM) részét képező központi elrendezésű statisztikai modell (CCD) alkalmazásával. A fermentációs tápközegek beoltásakor az egyes törzsek esetén meghatározott optimális sejtkoncentrációt használtam. Az enzimaktivitásokat különböző fermentációs időpontokban vizsgáltam, minden törzs esetében a legnagyobb aktivitást adó fermentációs idő szerinti eredményeket a 26. táblázat tartalmazza. A két faktor, s a szignifikáns hatás tanulmányozása végett a mintákat statisztikai módszerrel is kielemeztem.

26. táblázat: A különböző *Yarrowia* törzsek legnagyobb lipáz aktivitást adó fermentációs idő esetén mért eredményei Tween 80, Triton X-100, valamint olívaolaj tartalmú YEPD tápközegekben

Beállítás	Lipáz aktivitás (U/I)				
	168. óra	168. óra	168. óra	168. óra	144. óra
	<i>Y. lipolytica</i> 854/4	<i>Y. yakishimensis</i> Y.02049	<i>Y. yakishimensis</i> Y.02052	<i>Y. divulgata</i> Y.02062	<i>Y. divulgata</i> 5257
1	2297	1688	1475	1238	1037
2	2415	2101	1543	1444	1113
3	2550	2077	1395	1202	987
4	1753	1927	1398	1227	1147
5	1952	1950	1115	1203	1036
6	1615	1745	1187	1205	1008
7	2494	1798	1290	1262	942
8	2290	1142	1336	1275	1436
9	2261	1220	1112	1239	1484
10	2249	1217	1274	1281	1445

Az eredmények alapján látható, hogy a legnagyobb aktivitás értékeket az öt vizsgált élesztő közül a *Y. lipolytica* 854/4 törzsnél mértem, s az is megállapítható, hogy az egyes beállítások során kapott enzimaktivitás értékek között a legtöbb törzs esetében van különbség. A maximális aktivitásokat szinte minden élesztő esetében az fermentáció utolsó 7. napján detektáltam, kivételt képez ez alól a *Y. divulgata* 5257, melynél már a 6. napon. A *Y. lipolytica* 854/4 törzsnél általánosságban megállapítható, hogy a nagyobb Triton X-100 tartalom nem kedvezett a lipáz termelésnek. A legnagyobb aktivitásokat a kisebb Triton X-100 és a nagyobb Tween 80 koncentrációnál, valamint a két felületaktív anyag azonos koncentrációban történő alkalmazása esetében detektáltam. A két felületaktív anyag kisebb mennyiségű, de azonos koncentrációban történő alkalmazása a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02049-nél a legkisebb, míg a *Y. divulgata* 5257-nél a legnagyobb aktivitás értékeket eredményezte. A *Y. divulgata* NCAIM Y.02062 élesztőnél szinte minden beállítás esetében hasonló aktivitás értékeket mértem.

A varianciaanalízis (ANOVA) eredményei szerint (27. táblázat) a *Y. divulgata* NCAIM Y.02062 törzs ($p=0,01$), illetve a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02049 törzs esetén az enzimtermelésre a legjelentősebb szignifikáns hatást ($p=0,01$) a Tween 80 másodfokú koefficiense (Tween 80 (Q)) adta. E törzsek esetén a lineáris Tween 80 is jelentős mértékben befolyásolta az enzimaktivitást, figyelemmel arra, hogy a p -értékei ($p=0,03$; $p=0,05$) ebben az esetben is szignifikánsak voltak már 95%-os valószínűségi szinten. Továbbá ugyanezen a valószínűségi szinten a Tween 80 másodfokú koefficiense a *Y. divulgata* 5257 törzs enzimaktivására is szignifikáns hatással volt ($p=0,04$). Míg a *Y. lipolytica* 854/4 és a *Y. divulgata* NCAIM Y.02062 törzsének enzimtermelését a Triton X-100, addig a *Y. divulgata* 5257 törzsét a másodfokú Triton X-100 befolyásolta jelentősen ($p=0,07$; $p=0,08$; $p=0,07$). Az előbb említetteken kívül a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02049 törzs enzimaktivására még a Triton X-100 másodfokú koefficiense is szignifikáns hatással volt ($p=0,03$). A *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052 törzs esetében két lineáris változó hat szignifikánsan az enzimtermelésre 90%-os konfidencia intervallumon. A *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02049 törzs lipáz hozamára ($p=0,08$) a kölcsönhatási tag (Tween 80 + Triton X-100) jelentős hatást gyakorolt. A *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052 törzs lipáz szintézisét ($p=0,08$) a lineáris Tween 80 erőteljesen fokozta.

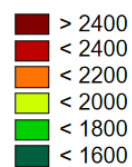
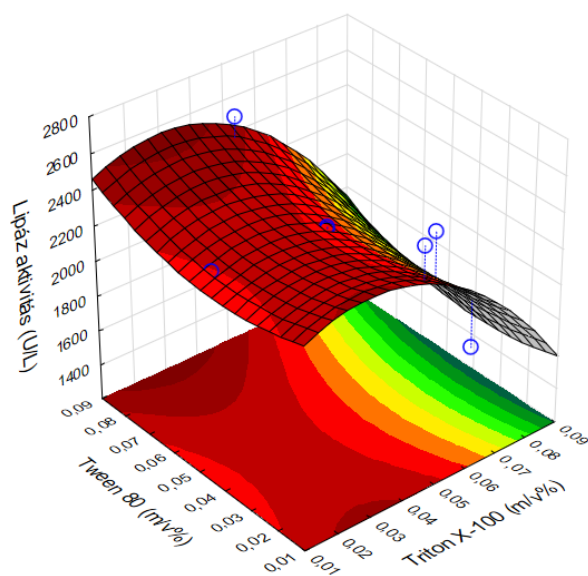
27. táblázat: Varianciaanalízis Triton X-100 és Tween 80 faktorok esetében

Faktor	<i>Yarrowia lipolytica</i> 854/4		<i>Yarrowia. yakushimensis</i> NCAIM Y.02049		<i>Yarrowia. yakushimensis</i> NCAIM Y. 02052		<i>Yarrowia. divulgata</i> Y.02062		<i>Yarrowia. divulgata</i> 5257	
	F	p	F	p	F érték	p érték	F	p	F	p
Triton X-100 (%) (L)	5,97	0,07	2,7	0,17	9,97	0,034	2,27	0,21	0,86	0,4
Triton X-100 (%) (Q)	1,33	0,31	10,79	0,03	2,26	0,207	0,01	0,91	5,75	0,07
Tween 80 (%) (L)	0,21	0,67	10,17	0,03	4,97	0,08	0,23	0,65	0,08	0,79
Tween 80 (%) (Q)	0,2	0,67	16,24	0,015	4,27	0,1	0,002	0,96	8,47	0,04
Triton X-100 Tween 80	0,0007	0,98	5,2	0,08	0,0005	0,98	0,86	0,4	2,33	0,2

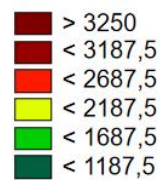
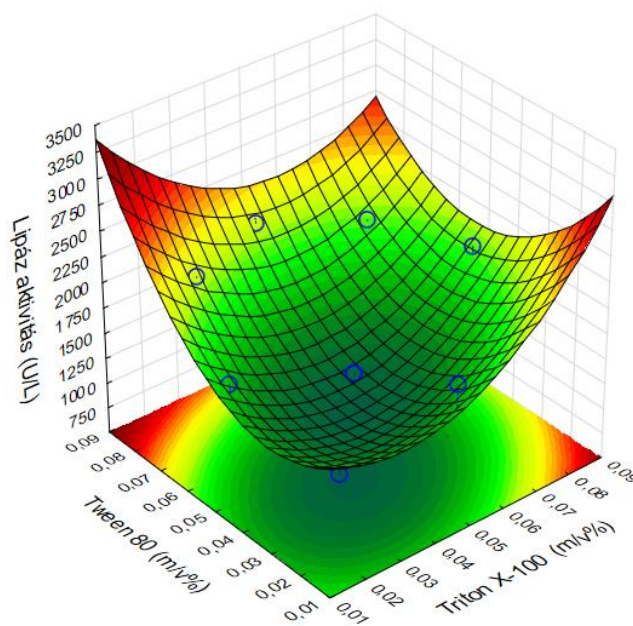
A 15. ábrán láthatóak a lipáz aktivitásnak a Tween 80 és a Triton X-100 koncentráció függvényében ábrázolt válaszfelület diagramjai. Ezen eredmények ismeretében a független változók (Tween 80 és Triton X-100) optimális koncentrációja az alábbiak szerint határozható meg:

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

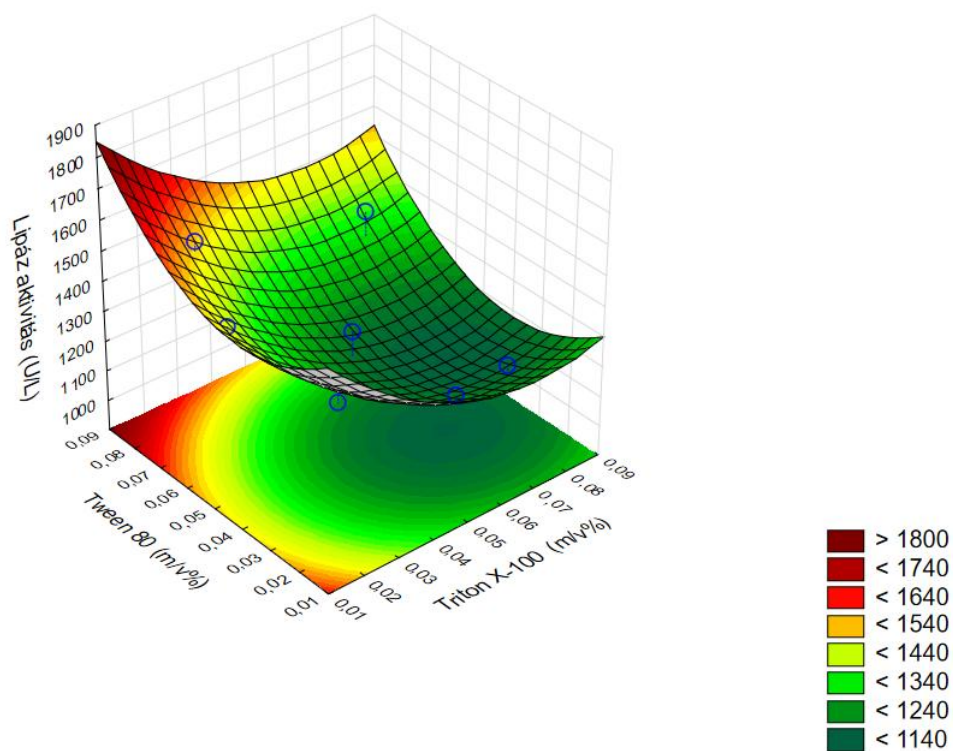
A



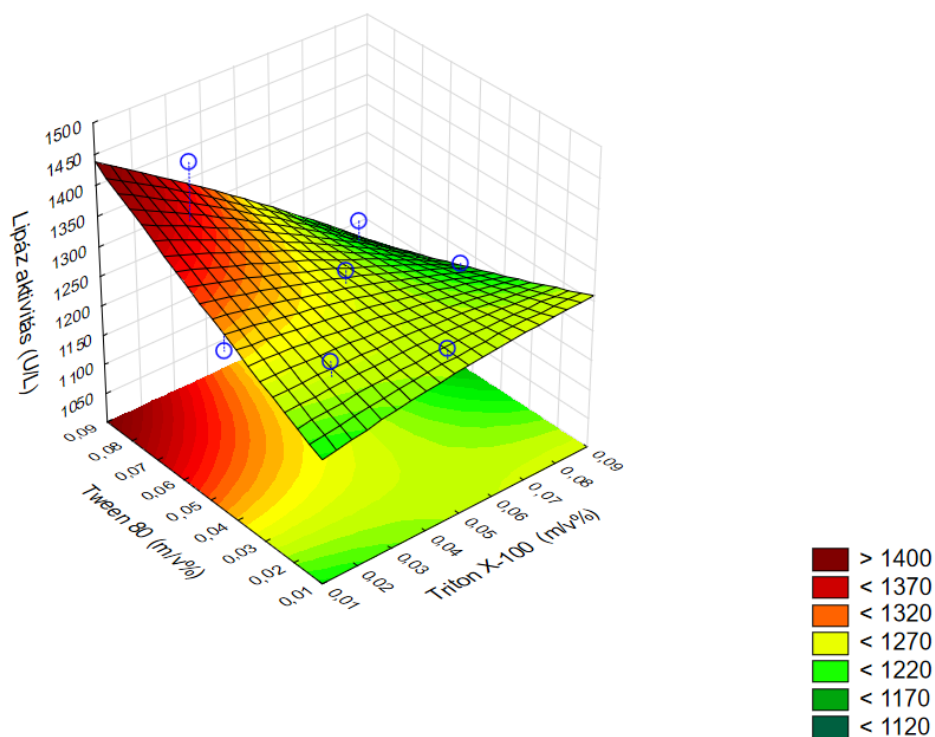
B



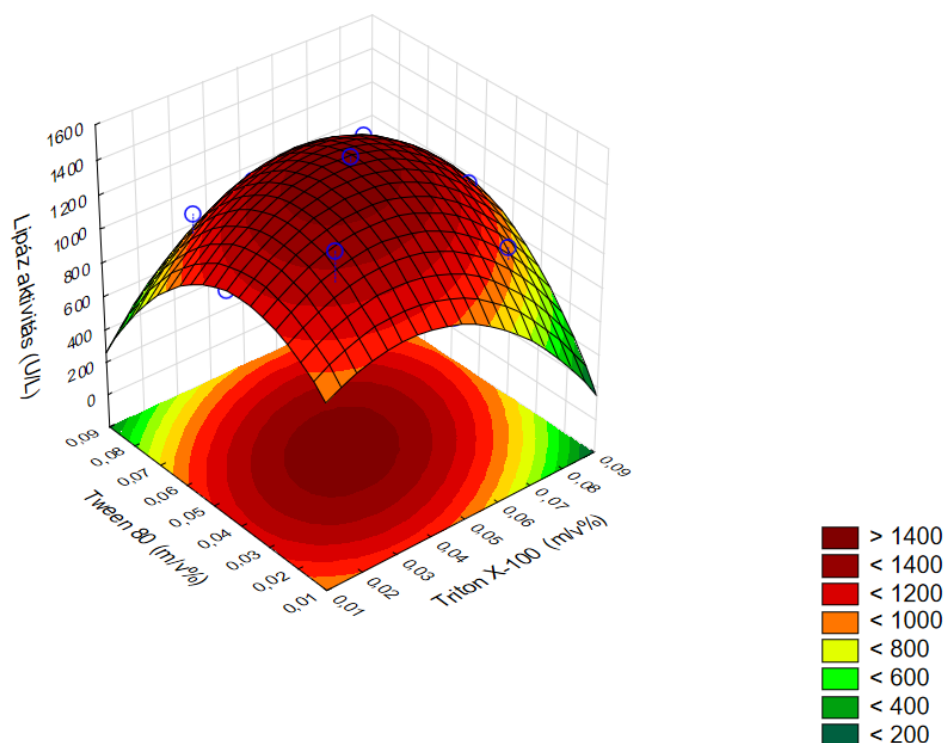
C



D



E



15. ábra: A különböző törzsek lipáz aktivitásának válaszfelületi diagramja a Triton X-100 és a Tween 80 koncentrációjának függvényében. *Y. lipolytica* 854/4 (A), *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02049 (B), *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052 (C) *Y. divulgata* NCAIM Y.02062 (D) törzsek esetén a 168. órában, *Y. divulgata* 5257 (E) törzs esetén a 144. órában

A Triton X-100 és a Tween 80 nemionos polioxietilén detergenssek, és vizes oldatokban két fázist képeznek a hőmérséklet növekedésével: egy detergennel dúsított, más néven koacervát fázist és egy detergensben szegényített fázist. Pozitív korreláció áll fenn a fehérje hidrofóbsága és a koacervát fázisba való felosztása között, ami igazolta, hogy az ilyen rendszerekben a fehérje-detergens kölcsönhatások főként hidrofóbok (Salameh és Wiegel, 2010).

Kanimozhi és Perinbam (2010) munkájuk során a *Pseudomonas sp.* Lp1_baktérium lipáz termelésének fokozásával foglalkoztak, amely során többféle adalékanyag hatását is nyomon követték. Kutatásaik során, a vizsgált 0,2% (v/v) koncentrációban alkalmazott Triton X-100 és a Tween 80 felületaktív anyagok közül a Tween 80 bizonyult hatékonyabbnak. Kísérletem során azt tapasztaltam, hogy a Triton X-100 az élesztőgombáknál is indukáló hatást gyakorolt az enzim termelésre, de növelt koncentrációban való alkalmazása nem indukálta a lipáz szekréciót. A felületaktív anyagot nem tartalmazó mintákhoz képest a *Candida rugosa* esetén 0,45 g/l Triton X-100 jelenléte ötszörösére növelte az enzimtermelést (Perna *et al.*, 2017). A Triton X-100, mint ionos felületaktív anyag indukálja a lipáz aktivitást, az enzim-szubsztrát

kölcsönhatás befolyásolásával. A kísérletem eredményeiből én is azt állapítottam meg, hogy a felületaktív anyagok pozitívan hatnak az enzimtermelésre.

5.1.8. Lipáz aktivitás alakulása az optimálási folyamat során

A 28. táblázatban szereplő eredmények alapján jól látható, hogy az alábbi öt *Yarrowia* törzs esetében az optimálásokat követően nagyságrendekkel nagyobb aktivitást sikerült elérni a kezdeti aktivitáshoz képest.

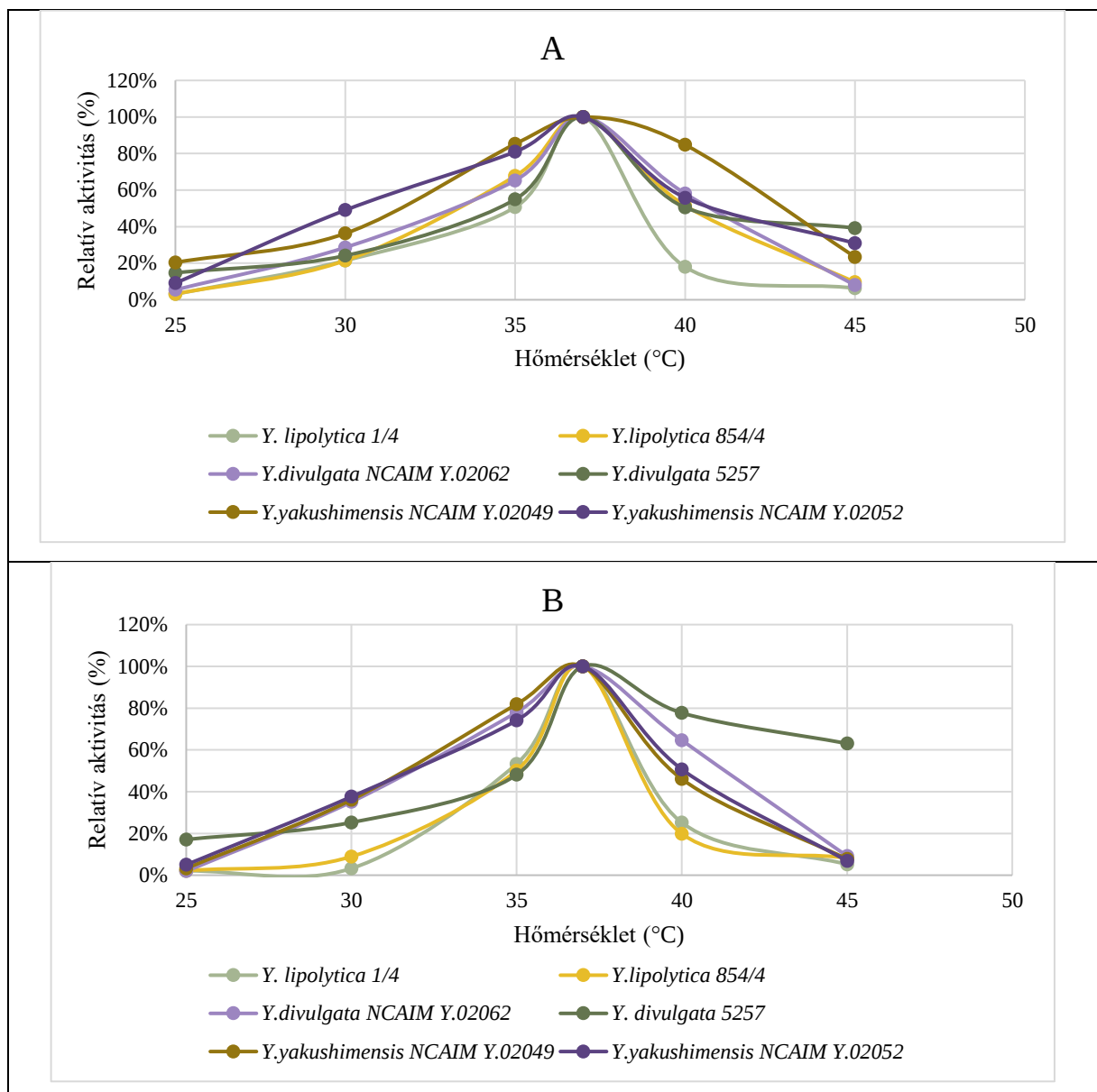
28. táblázat: *Yarrowia* törzsek lipáz aktivitásának alakulása az optimálási folyamat során

Törzs	Kezdeti aktivitás (U/l) YEPD+olívaolaj	Optimálásokat követő aktivitás (U/l)	Növekedés mértéke
<i>Y. lipolytica</i> 854/4	25,23	2567,25	101x
<i>Y. divulgata</i> 5257	25,17	1484,3	58x
<i>Y. divulgata</i> NCAIM Y.02062	26	1444,34	55x
<i>Y. yakushimensis</i> NCAIM Y.02049	84,53	2382,5	28x
<i>Y. yakushimensis</i> NCAIM Y.02052	97,92	2453,3	25x

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. A legnagyobb mértékű, 101-szeres lipáz aktivitás növekedést a *Y. lipolytica* 854/4 törzsnél értem el az optimálási kísérleteket követően, a kezdeti értékhez képest.

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

Meghatároztam a 6 kiválasztott *Yarrowia* törzs eredetű extracelluláris és intracelluláris nyers enzimek pH- és hőmérséklet-optimumát. A hőmérséklet optimálás során a lipáz aktivitást 25°C - 45°C közötti hőmérsékleti tartományban mértem, 5°C-onkénti emeléssel, pH 7,2 Sörensen pufferben, melynek eredményeit a 16. ábra szemlélteti.



16. ábra: A négy *Yarrowia* törzs extracelluláris (A) és intracelluláris (B) lipáz enzimeinek hőmérséklet optimuma

Az extracelluláris frakciók esetében a lipáz aktivitás 25°C és 37°C között azonos tendenciát mutatott, 37°C-on érve el a maximumot, ezt követően drasztikusan visszaesett. A *Y. lipolytica* 1/4 törzs enzimaktivitása 40°C-on az optimum mintegy 20%-ára, 45°C-on pedig 10%-ára esett vissza.

Az intracelluláris frakciók esetében hasonló tendenciák figyelhetők meg. Az inkubációs hőmérséklet 25°C-ról 37°C-ra történő emelése a lipáz aktivitás növekedését eredményezte. A maximális aktivitást 37°C-on mértem, minden nyers enzimmérszítménynél.

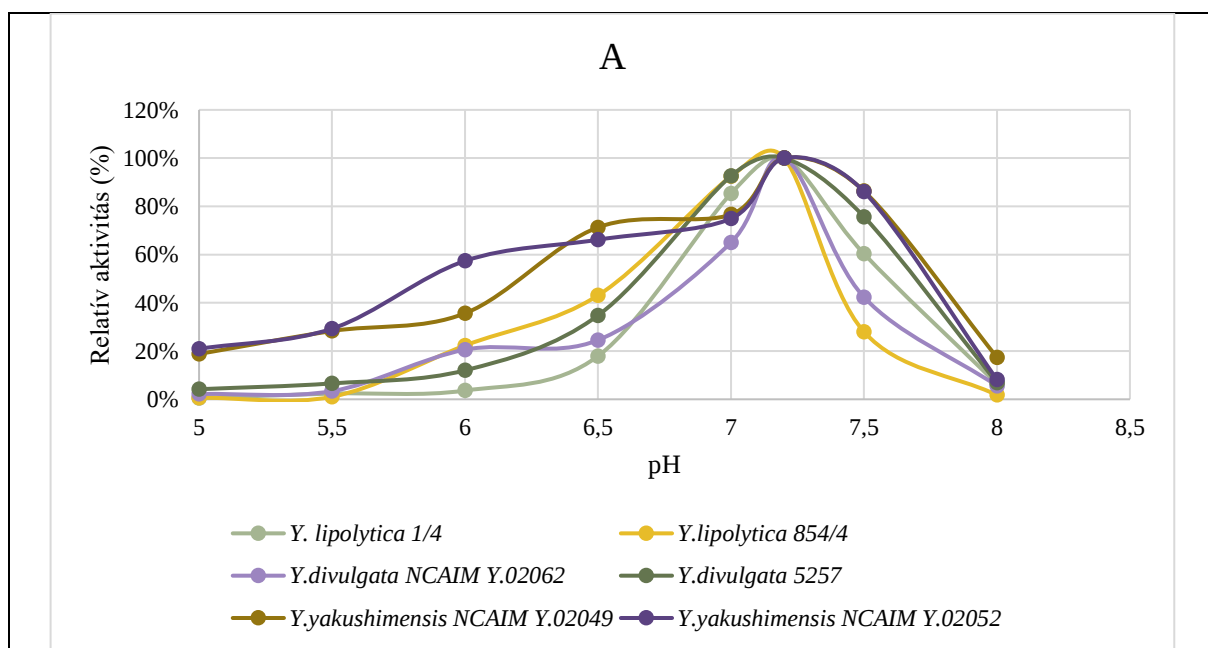
A szakirodalom is a 37 °C-os hőmérsékleten tanulmányozza a *Y. lipolytica* lipáz enzim aktivitását. Corzo és Revah (1999) munkájuk során megfigyelték, hogy a *Y. lipolytica* 681 törzs

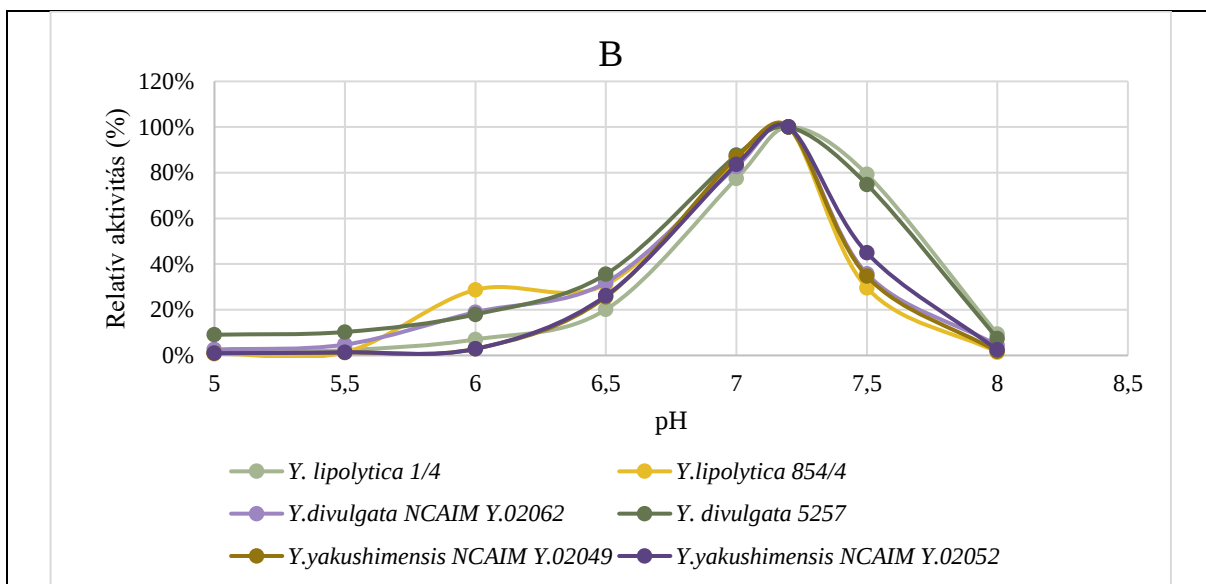
maximális lipáz aktivitása 37°C-on volt. A *Y. lipolytica* CBS 6303 törzs és a *Y. lipolytica* LgX64.81 mutáns törzs lipáz aktivitásának optimális hőmérséklete szintén 37 °C (Destain *et al.* 1997; Fickers *et al.*, 2006). Carvalho és munkatársai (2017) a *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 törzs által termelt lipáz enzim optimális hőmérséklet tartományát szintén 35-40°C közöttinek állapították meg.

A *Y. divulgata* 5257 törzs esetében mind az intra-, mind az extracelluláris lipázok stabilabbak voltak 45°C-on, mint a többi vizsgált törzsé. Ezen a hőmérsékleten végzett enzimaktivitás mérést követően intracelluláris esetben a maximális érték 63%-a, extracellulárisnál pedig a 39%-a volt megfigyelhető.

A *Y. lipolytica* Lip2 magas hőmérsékleten instabil, már 40 °C felett gyorsan elveszíti aktivitását. Termostabilitása javítható kombinált diszulfid kötések tervezésével a különböző régiók között (interregionális diszulfid kötések). A *Y. lipolytica* 4S mutáns (négyeszeres mennyiségű diszulfid kötést tartalmazó mutáns) törzsből származó lipáz optimális hőmérséklete 35 °C-ról 40 °C-ra, míg az 5S (ötszörös mennyiségű diszulfid kötést tartalmazó mutáns) és 6S (hatszoros mennyiségű diszulfid kötést tartalmazó mutáns) mutánsokból származó lipázoké 55 °C-ra emelkedett (Li *et al.*, 2019). A diszulfid kötések általában stabilizálják a fehérjék szerkezetét, ezáltal növelik termostabilitásukat. Eredményeim alapján feltehető, hogy a *Y. divulgata* 5257 törzsből származó lipázfehérje gazdagabb diszulfid kötésekben.

A pH lipáz enzimaktivitásra gyakorolt hatásának meghatározása során pH 5- pH 8 tartományban Sørensen puffereket alkalmaztam. A méréseket az optimálisnak talált 37°C-on végeztem el (17. ábra).





17. ábra: *Yarrowia* törzsek extracelluláris (A) és intracelluláris (B) lipáz enzimeinek pH optimuma

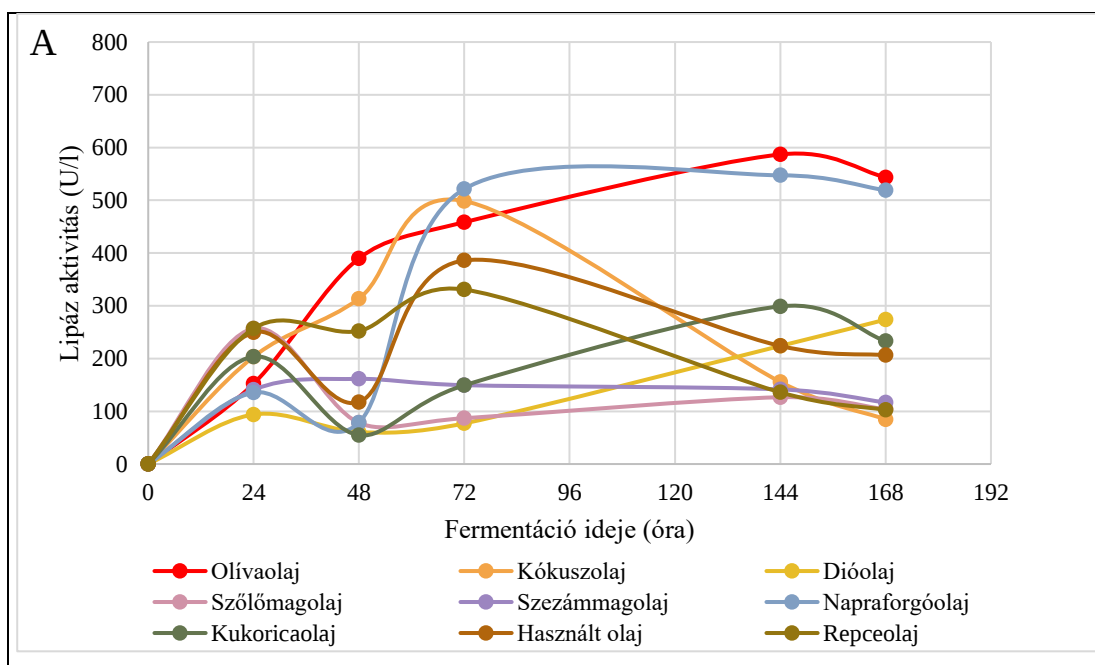
Az összes vizsgált frakció, beleértve az intracelluláris és extracelluláris preparátumokat is, pH 7,2 -n mutatott optimális értéket, s a két szélső pH-érték esetén (pH 5 és pH 8) szignifikánsan alacsonyabb enzimaktivitást határoztam meg. A pH 7,5 értéknél a *Y. lipolytica* 1/4 és a *Y. divulgata* 5257 törzsek intracelluláris lipáz aktivitása szignifikánsan nagyobb volt, mint a többi vizsgált törzs esetében. Carvalho és munkatársai (2017) arról számoltak be, hogy a *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 törzs által termelt lipáz enzim pH optimuma pH 6-7 tartomány közé esik. Más kutató csoportok is optimálisnak tartották a pH 7-et a *Y. lipolytica* lipáz aktivitása szempontjából (Destain *et al.*, 1997; Fickers *et al.*, 2006). Érdekes módon egyes szerzők (Li *et al.*, 2019; Zieniuk *et al.*, 2019), akik a lipáz aktivitást szintén vizsgálták pH 7,2 értéken, nem találták ezt a kémhatást optimálisnak a *Yarrowia* eredetű lipázok számára.

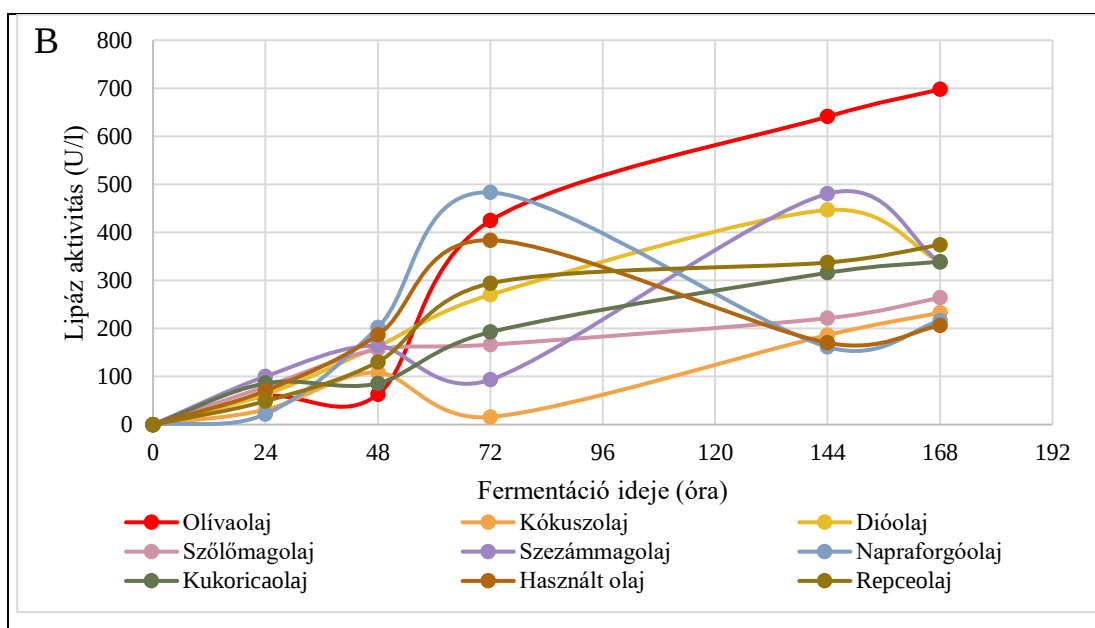
A diszulfid kötések az enzimek pH stabilitását is befolyásolhatják, a többszörös diszulfid kötések tervezése javíthatja azt. Ezt bizonyítja, hogy a *Y. lipolytica* 5S és 6S vad típusú törzseknél a pH stabilitás pH 4,0-9,0 közötti tartományról (vad törzs) pH 3,0-11,0 közöttire bővült (mutáns törzs), s 24 órás 25 °C-on történő inkubáció után megőrizte eredeti aktivitásának több mint 75%-át (az aktivitás vizsgálata 30°C-on történt) (Li *et al.*, 2019).

5.1.10. Növényi olajok és olajpogácsák alkalmazhatóságának vizsgálata lipáz enzim termelésére

5.1.10.1 Növényi olajok vizsgálata

A kutatómunkám folytatásaként növényi olajok, mint természetes szubsztrátumok lipáz enzim termelésre gyakorolt hatását hasonlítottam össze 1%-os koncentrációban alkalmazva. Szakirodalmi adatok figyelembevételével a következő olajokra esett a választásom: olívaolaj (kontrollként), kókuszolaj, dióolaj, szőlőmagolaj, szezámolaj, napraforgóolaj, kukoricaolaj, használt sütőolaj és repceolaj. A kísérlet eredményeit a 18. ábra szemlélteti. A méréseket a két legnagyobb lipáz aktivitást adó törzzsel, a *Y. lipolytica* 854/4-es és a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052-sel hajtottam végre 7 napos fermentáció során.





18. ábra: *Y. lipolytica* 854/4 (A) és *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052 (B) élesztőgombák lipáz aktivitásának alakulása az idő függvényében 1% növényi olaj és Tween 80 tartalmú YEPD tápközegeben

Mind a két vizsgált törzsnél elmondható, hogy az összes felhasznált szubsztrátumon történt lipáz enzim termelés, azonban az egyes olajok esetében eltérő mértékben. Mind a *Y. lipolytica* 854/4, mind a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052 értékei alapján a legjobb induktornak az olívaolaj bizonyult, ennek magyarázata a magas olajsav tartalmában keresendő, hisz kutatások már igazolták, hogy a *Y. lipolytica* lipáz termelését fokozza az olajsav (Fickers *et al.*, 2004). Az olívaolaj alkalmazása során az előbbi törzsnél 586,88 U/l aktivitás érték volt detektálható a 144. órában, utóbbinál pedig 697,6 U/l a fermentáció utolsó napján. Emellett a napraforgóolajat tartalmazó tápközegek aktivitás értéke volt még kimagasló a *Y. lipolytica* 854/4 törzsnél 547,36 U/l értékkel a 144. órában, illetve a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052 esetében 483,17 U/l a 72. órában. Megemlítendő, hogy csak úgy, mint az olívaolaj a napraforgóolaj is viszonylag magas olajsav tartalommal rendelkezik (Rauf *et al.*, 2017). A szezámogolaj alkalmazása mellett a *Y. lipolytica* 854/4 törzsnél az aktivitás mindössze 161,4 U/l volt a 48. órában. Viszont a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052 élesztőnél a szezámogolaj kiegészítést tartalmazó táplevesen a 144. órában mért maximális aktivitás azonos a napraforgóolajával, melyet a 3. napon mértem. Érdekes kiemelni a használt sütőolajat is, mely bár korántsem a leghatékonyabb induktor, viszont számos növényi olajnál jobbnak bizonyult mindkét törzs esetében, továbbá nem hagyható figyelmen kívül a beszerzési költsége, ami a töredéke a többi növényi eredetű olajénak, ezért gazdasági szempontból is igen előnyös lenne az alkalmazása.

A *Y. lipolytica* 854/4 (A) törzsnél kedvező szubsztrátumok közé sorolható a kókuszolaj is, melynél a maximum lipáz aktivitás érték közel 500 U/l volt a 3.napon. Számos kutatást végeztek a kókuszolaj lipáz termelésre gyakorolt hatásával kapcsolatban, s a legtöbb esetben megállapították, hogy indukáló hatásának magyarázata a nagyobb mennyiségű rövid szénláncú telített zsírsav tartalom, illetve a zsírsav-észterek összetétele volt (Gowthami *et al.*, 2015; Savalas *et al.*, 2021). A *Y. lipolytica* 854/4 élesztőnél ezt az indukáló hatást én is tapasztaltam, így elmondható, hogy ez az élesztő hasznosítja a telített zsírsavakat is, szemben a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052-vel, mely elsősorban a telítetlen zsírsavak bontására képes, melyek mind az olívaolajban, mind a napraforgóolajban nagy mennyiségben jelen vannak (Guo *et al.*, 2018; Rauf *et al.*, 2017).

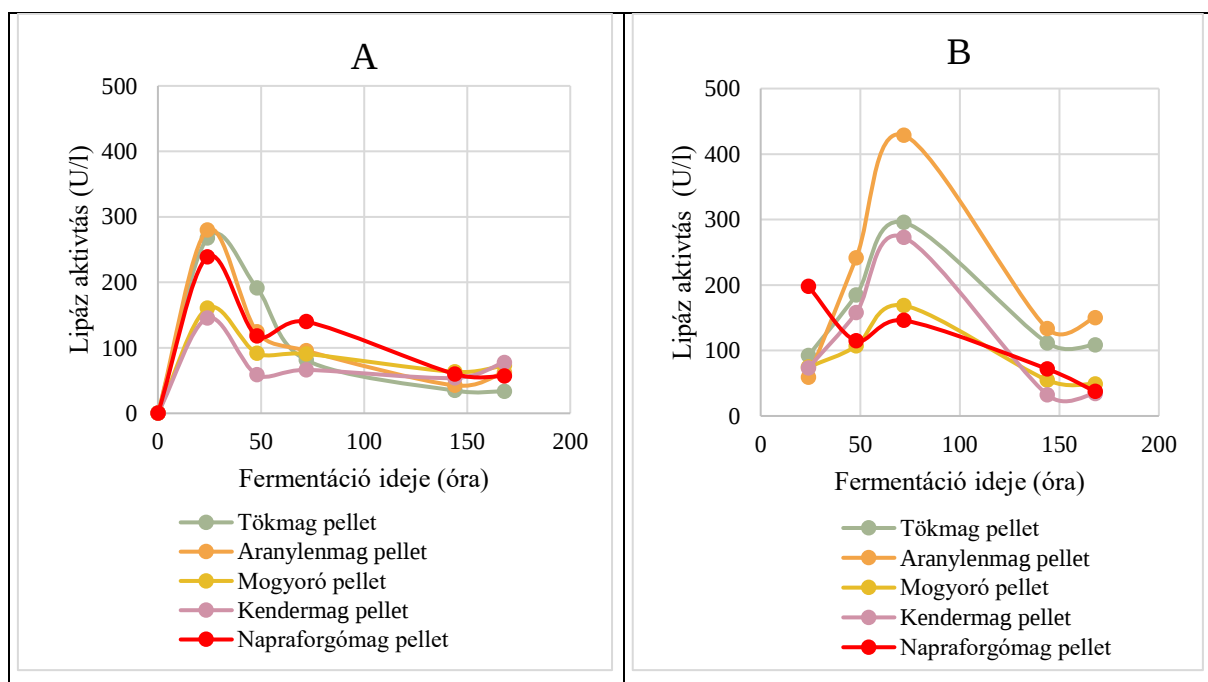
Darvishi és munkatársai (2009) megállapították, hogy a *Y. lipolytica* lipáz termelésére az általuk kiválasztott olajok közül az olívaolaj bizonyult a legjobb szubsztrátumnak, hasonlóan a kutatásaim során kapott eredményekhez. Egy másik kutatócsoport, Suci és munkatársai (2018) *Bacillus subtilis* esetén vizsgálták, a használt sütőolaj lipáz termelésre gyakorolt hatását. A maximális aktivitást (4,96 U/ml) 84 órás fermentáció során érték el. Az általam végzett vizsgálatok is alátámasztják, hogy a használt sütőolaj fermentációját nem érdemes 3 napnál tovább végezni, mivel a maximális lipáz termelést mind a két törzs esetében a 3. napon detektáltam és utána csökkeni kezdett az aktivitás. Fabiszewska és Bialecka-Florjańczyk (2014) is vizsgálták *Yarrowia lipolytica* KKP 379 élesztő lipáz termelését különböző növényi olajtartalmú tápközegekben. Eredményeik alapján a növényi olajok – kutatásukban legjobban a kukoricaolajos tápközeg – fokozó hatással bírtak a lipáz termelésre. Saygün és munkatársai (2014) hasonló kutatást végeztek a *Yarrowia lipolytica* YB 423-12 élesztőgombával kapcsolatban, az általuk mért aktivitási értékek is megerősítették, hogy a növényi olajok serkentően hatottak az aktivitásra.

Összességében megállapítható, hogy mind a két törzs esetében a legjobb szubsztrátumnak az olívaolaj és a napraforgóolaj bizonyult, illetve, míg az olívaolajnál a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052, addig a napraforgóolajnál a *Y. lipolytica* 854/4 élesztő esetén mértem nagyobb lipáz aktivitást.

5.1.10.2 Növényi eredetű olajpogácsák vizsgálata

Az elmúlt néhány évtizedben megnövekedett a mezőgazdaság és az ipar különböző ágazataiból származó szerves maradványok kiaknázása iránti lehetőségek kutatása. Mivel az olajpogácsákat (magvakból történő olajkivonás után nyert melléktermékek) kevés területen használják fel, emiatt nagyrészt hulladékként kezelik, így környezetterhelést jelentenek. A növényi maradványok, mint a korpa, héj és gyümölcsmagvak, valamint pelleték potenciális

nyersanyagként hasznosulhatnak a biofolyamatok során, mivel kiváló táptalajként szolgálnak a mikroorganizmusok szaporodásához, biztosítva számukra az alapvető tápanyagokat. Alkalmazásuk a fermentációs technológia területén biológiailag aktív metabolitok előállítását eredményezheti (Ramachandran *et al.*, 2007). Az újrahassznosítás eredményeként nemcsak a környezetet lehetne kímélni, hanem az ipari folyamatokba visszavezetve például a lipáz termeléshez felhasználni, ezzel is kialakítani és támogatni egy fenntartható gazdasági körforgást. Ezen tényekre s felvetésekre alapozva következő kísérletemben 5 féle pellet – tökmag, aranylenmag, napraforgómag, mogyoró és kendermag – felhasználásával végeztem enzimfermentációt, melynek eredményeit a 19. ábra szemlélteti.



19. ábra: *Y. lipolytica* 854/4 (A) és *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052 (B) élesztőgombák lipáz aktivitásának alakulása az idő függvényében növényi pellet szubsztrátumokon

A növényi eredetű olajokhoz hasonlóan a pelleték esetében is az összes tápközegekben mind a két élesztő törzs termelt lipáz enzimet. A *Y. lipolytica* 854/4 esetében a maximális lipáz aktivitást minden olajpogácsánál a 24. órában mértem. Az ezt követő napokon vett minták mérési eredményei alapján csökkenő tendencia mutatható ki az aktivitásban. A *Y. lipolytica* 854/4-gyel szemben a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052 esetén a lipáz aktivitás maximum értékei a 72. órában voltak mérhetők, kivéve a napraforgómag pelletet, amelynél a lipáz aktivitás a 24. órát követően már nem növekedett. Mind a *Y. lipolytica* 854/4, mind a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052 törzs esetében az egyik legnagyobb enzim aktivitás az aranylenmag pelletnél volt megfigyelhető (279,8 U/l és 428,68 U/l), amelyet a tökmag pelleten

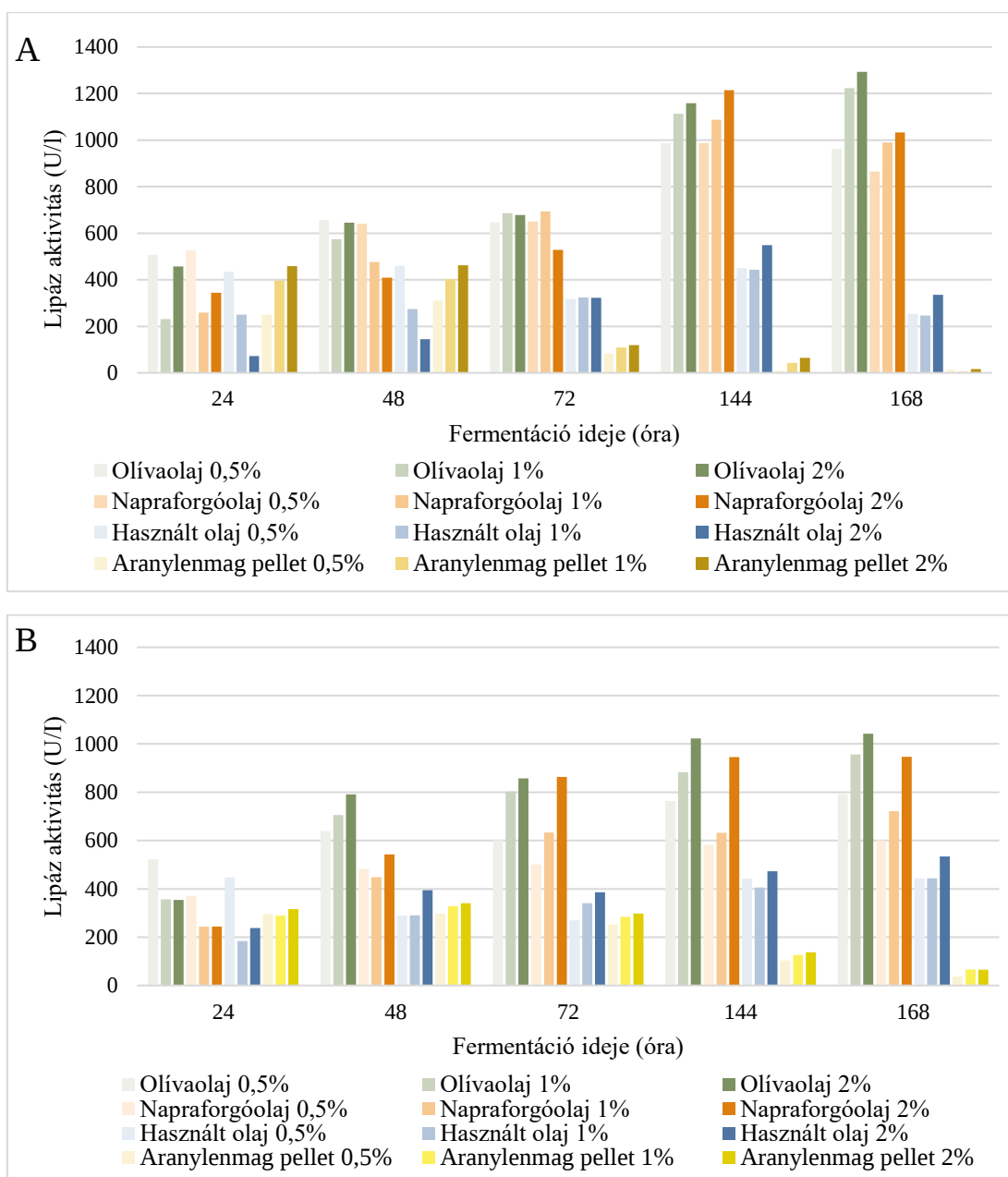
elért aktivitás értéke követ (267,45 U/l és 295,43 U/l). Az aranylenmag szintén gazdag többszörösen telítetlen zsírsavakban (Lemahieu *et al.*, 2015), ez a tény magyarázatul szolgálhat a jobb indukáló képességére.

A szakirodalom megerősíti, hogy a növényi alapú pelleték fokozzák az enzimtermelést (Salihu *et al.*, 2016; Amin és Bhatti, 2014; Gowthami *et al.*, 2015). Ez a konklúzió vonható le az én eredményeimből is, látható, hogy a pelleték indukálták a lipáz termelést

Farias és munkatársai (2014) *Y. lipolytica* élesztő lipáz termelését vizsgálták gyapotmag pelleten 48 órás szilárd szubsztrátumú fermentáció során. Megállapították, hogy a *Y. lipolytica* képes volt növekedni és lipázt termelni a pelletet tartalmazó tápközegben. A fermentáció 28. órájában tapasztaltak nagy mennyiségű enzim aktivitást. Több kutatásnál is arra figyeltek fel, hogy az olajpogácsák szubsztrátumként való felhasználásakor a lipáz termelés egy-két napos fermentációnál a legnagyobb (Kumar *et al.*, 2012; Szymczak *et al.*, 2021). A kísérletem eredménye alátámasztja ezt, ugyanis a *Y. lipolytica* 854/4 törzsnél a 24. órában mértem a maximumokat minden pelletnél.

5.1.11. Természetes szubsztrátumok koncentrációjának optimalizálása az extracelluláris lipáz termelés szempontjából

Az előző kísérletek eredményei szerint mind a *Y. lipolytica* 854/4, mind a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052 esetében az olívaolaj és a napraforgóolaj bizonyult a legjobb induktoroknak, míg az olajpogácsákat tekintve az aranylenmag volt a leghatékonyabb. Gazdasági szempontból ezen szubsztrátumok mellett a használt olaj alkalmazásában is rejlik potenciál. Ezen információk ismeretében a célom az volt, hogy megállapítsam, a *Y. lipolytica* 854/4-es és a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052 törzsek lipáz enzim aktivitása hogyan függ az alkalmazott növényi szubsztrátum koncentrációjától egy hetes fermentáció során (20. ábra). Az alábbi koncentrációkat alkalmaztam a szubsztrátumok esetében: 0,5 %, 1 %, és 2 %.



20. ábra A *Y. lipolytica* 854/4 (A) és a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052 (B) lipáz aktivitásának alakulása az idő függvényében különböző koncentrációjú természetes növényi eredetű szubsztrátumokon

A lipáz aktivitás alakulása alapján a *Y. lipolytica* 854/4 és a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052 élesztőtörzs esetében kijelenthető, hogy a szubsztrátum koncentráció növekedésével az enzimaktivitás is fokozódik. A legjobb induktornak mindkettő törzs esetén az olívaolaj mondható, ugyanis e szubsztrátumnál 1293,57 U/l, illetve 1042,3 U/l aktivitás értéket detektáltam a 168. órában (2%-os koncentráció esetében), míg a 2 % napraforgóolajat tartalmazó minta enzimaktivitása az előbbinél 1214,43 U/l volt a 144. órában, illetve az utóbbi esetében 946,71 U/l a 168. órában. Az aranylenmagot és a 0,5 % használt olajat tartalmazó minták esetén az értékek jóval elmaradnak az olívaolaj alkalmazása során észlelt maximumhoz

képest. A legkevésbé hatékony szubsztrátumnak az aranylenmag pellet minősíthető mindkét törzsnél, hiszen minden koncentrációnál e szubsztrátum esetében mértem a legalacsonyabb lipáz aktivitási értékeket, vagyis kijelenthető, hogy az olajok eredményesebbnek bizonyultak. Az aranylenmag pellet esetén a 48. órában lehetett észlelni a maximális lipáz aktivitásokat, ezt követően az aktivitás csökkenni kezdett. mindhárom koncentrációnál.

A *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052 lipáz aktivitás értékeket tekintve még megemlíteném, hogy a használt olajat tartalmazó tápközegek esetében detektált maximum enzimaktivitás jóval elmarad a másik két növényi olaj esetében mért maximumoktól.

Rajesh és munkatársai 2010-ben a *Trichoderma reesei* lipáz termelésének optimalizálása során megállapították, hogy a lipáz termelésre legjobb szubsztrátum a 2 %-os olívaolaj. A kísérletem során is kijelenthető, hogy a legnagyobb maximális lipáz aktivitás mind a két törzs esetében a 2 %-os olívaolaj esetében volt detektálható. Salgado és munkatársai (2020) 1 %-os és 3 %-os koncentrációjú olívaolaj szubsztrátum alkalmazásának a *Magnusiomyces capitatus* lipáz termelésére gyakorolt hatását vizsgálták meg, s a maximumot a 3 % olívaolajat tartalmazó minta mutatta a fermentáció 4 napján, míg kutatásom során 7 napos fermentációval értem el a maximumot olívaolajokat tartalmazó tápközegekben.

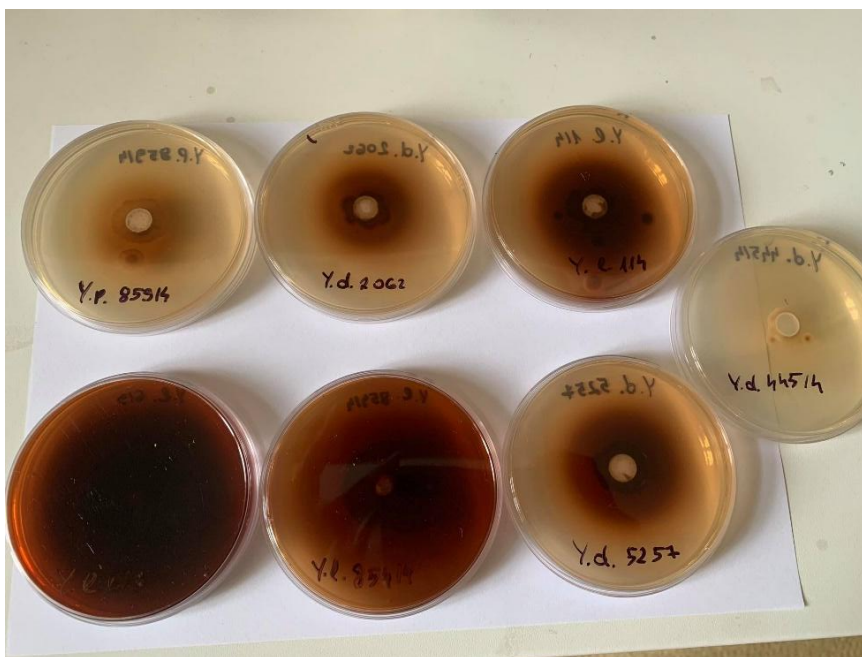
A használt olaj ugyan nem tűnt a leghatékonyabb induktornak, azonban a koncentrációjának 1%-ról 2%-ra való növelésével, már 20%-os aktivitás emelkedést lehetett elérni. Megemlíteném, hogy a fermentáció elején (24. óra) a 0,5%-os koncentrációban történő alkalmazása volt a leghatékonyabb. Kijelenthető, hogy bár a lipáz aktivitás értékek elmaradnak az olívaolajtól, az optimalizálásával valószínűleg az aktivitás növekedését eredményezné.

5.2. *Yarrowia* törzsek pigment termelésének vizsgálata

Kutatómunkám során a különféle *Yarrowia* élesztők lipáz aktivitása mellett az egyes törzsek barna színű pigment termelését is vizsgáltam. Ahogy azt már említettem 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.

5.2.1. *Yarrowia* törzsek screenelése pigment termelésre

Hét különböző *Yarrowia* törzs screenelését végeztem el Carreira és munkatársai (2001 b) által *Y. lipolytica* elkülönítéséhez alkalmazott tirozin tartalmú tápagon, agardiffúziós módszert alkalmazva (21. ábra). 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. A tápközegben lévő tirozin bomlásából származó homogentizinsav *Yarrowia* sejtek körüli felhalmozódása, majd lúgos környezetbeni auto-oxidációja és polimerizációja révén keletkezik a barna színű (feltehetőleg piomelanin) pigment (Carreira *et al.*, 2001 b).

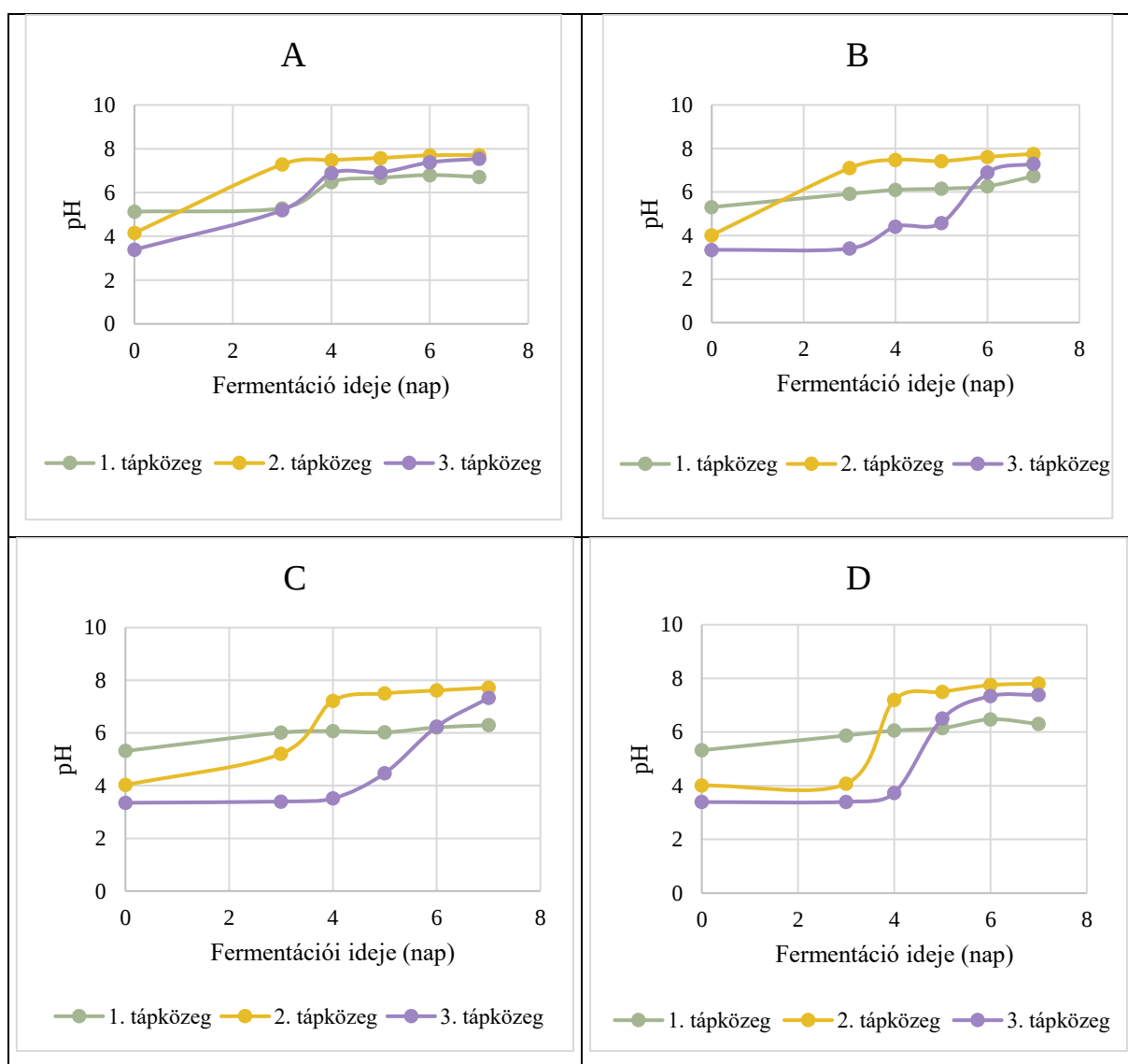


21. ábra: *Yarrowia* törzsek 1 hetes screenelése pigment termelésre agardiffúziós módszerrel
(felső sor: *Y. porcina* 859/4, *Y. divulgata* NCAIM Y.02062, *Y. lipolytica* 1/4
Y. divulgata 445/4;
alsó sor: *Y. lipolytica* 6/3, *Y. lipolytica* 854/4, *Y. divulgata* 5257)

Az agardiffúziós módszer alapján látható, hogy valamennyi törzs termelt pigmentet, viszont különböző mértékben. A legkevésbé jó termelőnek a *Y. divulgata* 445/4 és a *Y. porcina* 859/4, a leghatékonyabbnak pedig a *Y. lipolytica* 6/3 bizonyult. A fenti 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.

5.2.2. 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 tápközegek egyike csak tirozin kiegészítést, egy másik az összes komponenst, míg a harmadik a tejsav kivételével a további felsorolt komponenseket tartalmazta. Carreira és munkatársai (2001) szerint tirozin tartalmú közegben a barna pigment termelés elősegítéséhez szükséges a lúgos kémhatás. Az egyes mintavételek során nyomon követtem a pH változását (22. ábra) és az abszorbancia értékeket 400 nm-en (23. ábra) a pigment termelés ellenőrzésére. Az inkubáció időtartama legalább egy hét volt.



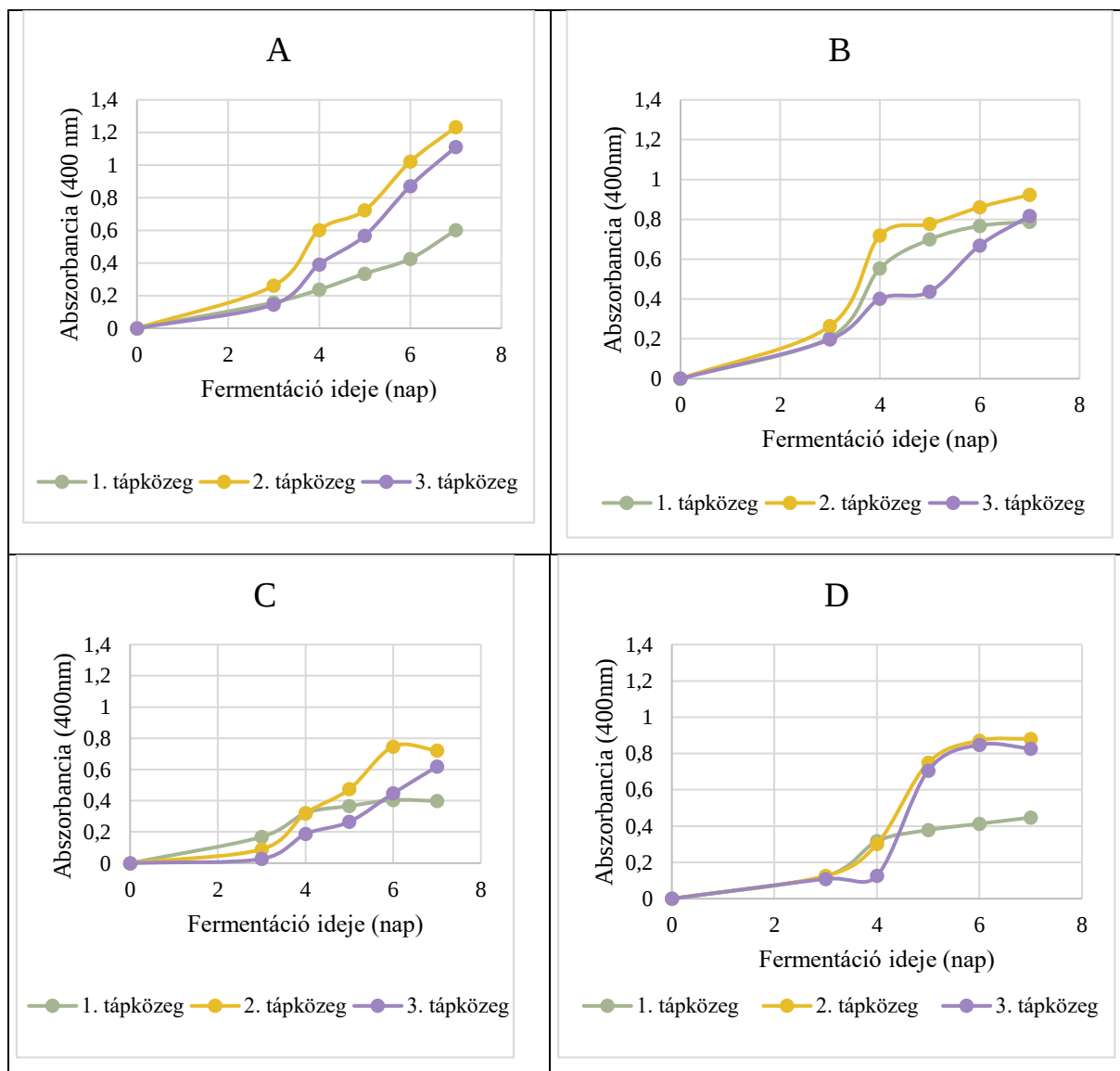
22. ábra: *Y. lipolytica* 6/3 (A), *Y. lipolytica* 854/4 (B), *Y. divulgata* NCAIM Y.02062 (C), *Y. divulgata* 5257 (D) törzsek pH változásának alakulása különböző tápközegekben (1. tápközeg: tirozin tartalmú alaptápközeg, 2. tápközeg: tirozin, glicin, L-glutamin, L-aszparagin aminosav kiegészítés, 3. tápközeg: tejsavval kiegészített 2. tápközeg)

Az egyes tápközegek pH értékeinek alakulásából látható, hogy a csak tirozint tartalmazó 1. tápközeg fermentációja során nem volt akkora változás a kémhatásban, az értékek hasonló intervallumban mozogtak valamennyi törzs esetében, a *Y. lipolytica* törzseknél pH 5,1-6,8 a *Y. divulgata* élesztőknél pedig pH 5,3-6,3-ös értékek között. Továbbá megállapítható az is, hogy az 1. tápközeg esetében voltak a legkisebbek az abszorbancia értékek valamennyi vizsgált élesztőnél, ezért ez nem bizonyult olyan hatékonynak a pigment termelés szempontjából, mint a másik két tápközeg. Ez egyrészt a pH alakulására vezethető vissza (maximum értékei elmaradtak a többi tápközegétől), másrészt a tápközeg összetételére. Viszont kiemelném, hogy a *Y. lipolytica* 854/4 közel hasonló abszorbancia értékeket adott mind a három tápközeg esetében. Az 1. tápközegnél 0,788 a 2-nál 0,923 és a 3-nál 0,817 abszorbancia értékeket detektáltam.

Megfigyelhető mind a négy törzsnél, hogy a tejsav nélküli, de minden egyéb komponenst tartalmazó 2. tápközegben indult be leggyorsabban a pigment termelődés. Ez szorosan összefügg a pH alakulásával, ugyanis a *Y. lipolytica* 6/3-nál a kezdeti pH 4,15 már az első mintavételi napon pH 7,28-ra nőtt, a *Y. lipolytica* 854/4-nél pedig 4. napra elérte pH 7,48 értéket. A két *Y. divulgata* törzs kapcsán is elmondható, hogy a semlegeshez közeli pH tartományt (pH 6), már a 4. napra elérték. Az eredmények alapján kijelenthető, hogy nem csak a barna színanyag termelése indult el hamarabb a 2. tápközeg alkalmazása mellett, hanem a legnagyobb abszorbancia értékek is e táplevesben voltak detektálhatók. A *Y. lipolytica* 6/3 1,23-as a *Y. lipolytica* 854/4 törzs meg 0,92-es abszorbancia maximummal jellemezhető a fermentáció 7. napján. A *Y. divulgata* NCAIM Y.02062 és a *Y. divulgata* 5257 szintén a 2. tápközeg mellett mutatta a legnagyobb abszorbancia értékeket-előbbi esetében 0,74, utóbbinál 0,88 volt - azonban ezek az értékek alacsonyabbnak bizonyultak a két *Y. lipolytica* törzséhez képest.

Valamennyi törzs esetén megállapítható, hogy a 3. vagyis a tejsav kiegészítést is tartalmazó tápközegnél kezdetben igen lassú pH emelkedés következett be, s a legtöbb törzsnél csak a fermentáció 6. napjára érte el a semleges kémhatást. Kivételt képez ez alól a *Y. lipolytica* 6/3, melynél már a 4. napon. A pH alakulásával összhangban volt a pigment termelés, ugyanis szinte minden törzsnél az 5. ill.6. napon mértem nagyobb abszorbancia értékeket, s a maximumokat minden élesztő esetében a 7. napon detektáltam. A tejsav alkalmazása Joshi (2003) eredményei alapján pigment termelést fokozó hatással bír, azonban az eredményeim ezt a megállapítást nem támasztják alá, hiszen a tejsav tartalmú tápközeg esetében nem növekedtek az abszorbancia értékek a 2. tápközeghez képest. Ennek magyarázata abban keresendő, hogy a pH a tejsav tartalom miatt lassan emelkedett, és csak a 6. napon érte el azt a pH tartományt, amelynél már hatékonyan termelődik a pigment. Azonban megjegyezném, hogy a *Y. divulgata*

5257 törzsnél a 3. tápközegnél mért maximum (0,84) hasonlóan alakult a 2. tápközeg alkalmazása mellett mért maximális abszorbancia értékhez (0,88).



23. ábra: *Y. lipolytica* 6/3 (A), *Y. lipolytica* 854/4 (B), *Y. divulgata* NCAIM Y.02062 (C), *Y. divulgata* 5257 (D) törzsek színanyag termelésének alakulása különböző tápközegekben (1. tápközeg: tirozin, 2. tápközeg: tirozin mellett glicin, L-glutamin, L-aszparagin aminosav kiegészítés, 3. tápközeg: tejsavval kiegészített 2. tápközeg)

A pH mellett a tápközeg összetételének is fontos szerepe van a pigment szintézisben. Larroude és munkatársai (2021) a *Y. lipolytica* törzsek barna pigment termelését vizsgálták, s kimutatták, fenilalanin vagy tirozin jelenlétében a barna pigment gyorsabban megjelent, és mennyisége már a 10. napra is nagyon markáns volt. Ezek az eredmények megegyeznek a Carreira és munkatársai (2001 b) kutatásának eredményeivel, miszerint a pigment prekursorok felhalmozódnak az extracelluláris környezetben az exponenciális növekedési fázisban, majd a pigmentképződés a stacioner fázisban megy végbe a prekursorok oxidációja révén. Tahar és

munkatársai (2019) munkájuk során a *Y. lipolytica* W29 élesztő barna pigmenttermelést követték nyomon 148 órán keresztül. Megállapították, hogy tirozin, L-aszparagin és glicin jelenlétében a barna pigmentek felszabadulása a tápközegben már a tenyésztés korai szakaszában megindult, majd a barnás szín intenzitása folyamatosan nőtt a 120. óráig. Kutatásom során én is arra az eredményre jutottam, hogy akár egy 7 napos fermentáció is elegendő lehet pigment termeltetésre. Aghajanyan és munkatársai (2005) tanulmányukban a *Bacillus thuringiensis* által termelt melanin oldható frakciójának hidrolizálása utáni aminosavtartalmat vizsgálták, és a teljes melanin tömegének összesen 20%-a aminosavakból, többek között aszparaginsavból, metioninból, treoninból, izoleucinból, szerinből, leucinból, glutaminsavból, tirozinból, prolinból, fenilalaninból, glicinből, alaninból, valinból, argininből állt. E vizsgálat eredményéből arra következtettek, hogy az aminosavak jelenléte jótékony hatással van a melanin termelésre, melyet a vizsgálatomban nekem is sikerült bizonyítanom. A pigment termelés fokozásával kapcsolatos tejsav alkalmazásáról a szakirodalom nem tekinthető egységesnek. Usuki és munkatársai (2003) kutatásukban arra a megállapításra jutottak, hogy a tejsav elnyomja a melanin képződését azáltal, hogy közvetlenül gátolja a tirozináz aktivitást, továbbá nemcsak az epidermisz forgalmának felgyorsítása révén hathat a pigment elváltozásokra, hanem közvetlenül gátolja a melanin képződését a melanocitákban. Ezzel szemben Carreira és munkatársai (2001 a) szerint a tejsav serkenti a barnulási folyamatot abban az esetben, ha Mn^{2+} van a rendszerben azzal, hogy fokozza az ion stimuláló szerepét.

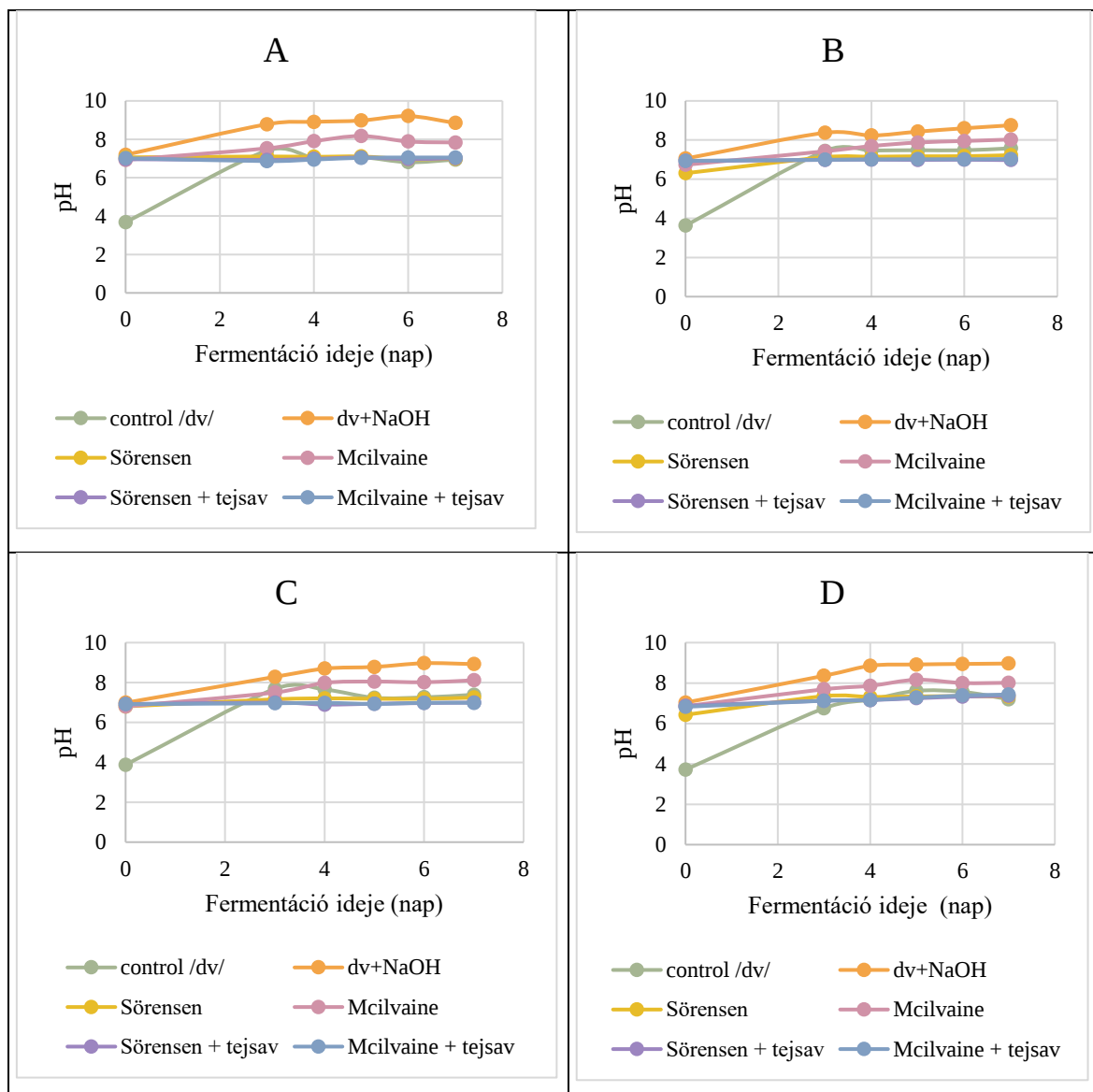
5.2.3. A kiindulási tápközeg puffer jellegének hatása a pigment termelésre

Annak ismeretében, hogy a pH befolyásolja a pigment termelést, jelen kísérlet sorozatom folyamán különféle pufferek, valamint adalékanyagok hatását vizsgáltam, melyek pontos összetételét a 29. táblázatban tüntettem fel (az aminosav kiegészítést tartalmazó 2. tápközeget használtam alaptápközegnek), s nyomon követtem a pH, valamint a pigment termelés alakulását.

29. táblázat: A pH hatásának vizsgálatára készített tápközégek összetétele (alaptápközegként az aminosav kiegészítést tartalmazó 2. tápközeget használtam)

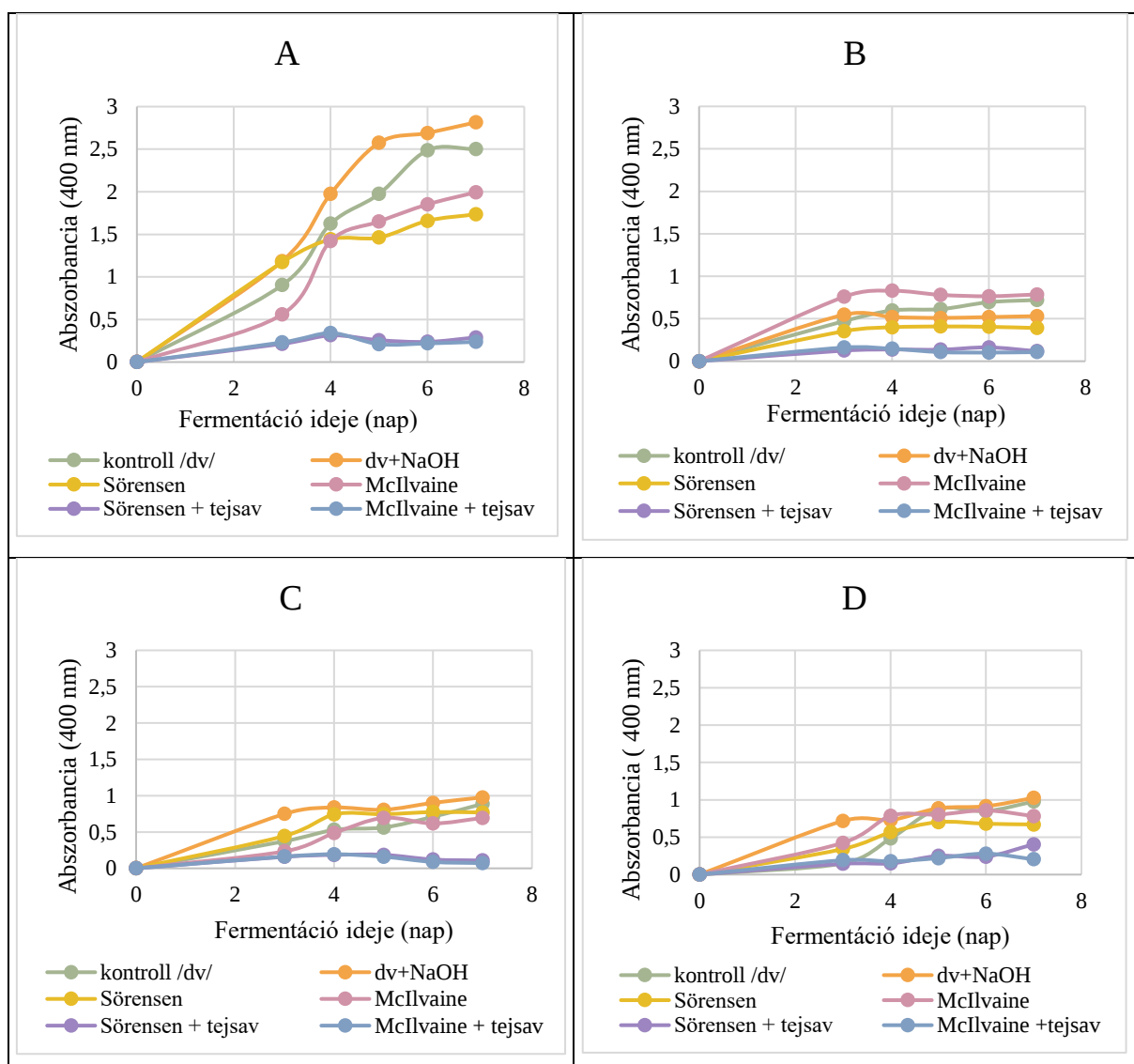
	Desztillált víz	Desztillált víz, pH állítás NaOH-val (pH7)	Sörensen puffer pH7	McIlvaine puffer pH7	tejsav* pH7
1. tápközeg	+				
2. tápközeg		+			
3. tápközeg			+		
4. tápközeg				+	
5. tápközeg			+		+
6. tápközeg				+	+

*A tejsav adagolást követően Na_2HPO_4 oldattal visszaállítottam a kémhatást pH 7-re.



24. ábra: *Y. lipolytica* 6/3 (A), *Y. lipolytica* 854/4 (B), *Y. divulgata* NCAIM Y.02062 (C), *Y. divulgata* 5257 (D) törzsek esetében a pH változása pufferelt tápközegekben

A pH időbeni alakulása (24. ábra) alapján elmondható, hogy az egyes görbék lefutása nagyon hasonlóan alakult az összes törzsnél. A legnagyobb pH értékeket (pH 8,7- pH 9) minden esetben a desztillált vízzel készített, NaOH oldattal pH 7-re állított tápközegek esetében mértem. Elmondható, hogy a fermentáció 4. napjától kezdve a pH értékek csak minimálisan növekedtek, inkább stagnáltak az összes tápközegnél, minden vizsgált törzs esetében.



25. ábra: *Y. lipolytica* 6/3 (A), *Y. lipolytica* 854/4 (B), *Y. divulgata* NCAIM Y.02062 (C), *Y. divulgata* 5257 (D) törzsek színanyag termelésének alakulása különböző összetételű pufferek hatására

A mért abszorbancia eredmények alapján (25. ábra) rögzíthető, hogy a leghatékonyabb termelő törzs a *Y. lipolytica* 6/3 volt, 2,81 maximális abszorbancia értéket elérve, mely közel háromszorosa a másik három törzs maximális abszorbanciáinak. A *Y. divulgata* NCAIM Y.02062 törzsnél a maximális abszorbancia érték 0,976 volt. A két pufferezelt tápközeg közül a McIlvaine volt a hatékonyabb szinte minden törzsnél, kivéve a *Y. divulgata* NCAIM Y.02062 élesztőnél, ahol is a Sörensen. Az összes törzsnél az egy hetes fermentáció elég hosszúnak bizonyult, a 120. óra után minimális növekedés, stagnálás látható a 400 nm-en mért abszorbancia értékeket tekintve. *Y. lipolytica* 854/4 törzs esetében a leghatékonyabb tápközeg a pH 7-s McIlvaine pufferrel készített volt, az összes többi törzs esetében viszont a NaOH oldattal beállított desztillált vízzel készült, ez alapján kijelenthető, hogy a NaOH használata a pH

szabályozásához ideális lehet pigment termelés szempontjából. Musa és Yusof (2019) munkájuk során a fény jelenlétét, a pH hatását és a rázatási sebességeket tanulmányozták, hogy meghatározzák az ideális paramétereket különböző baktériumok növekedésére, valamint pigment termelésére. A lúgosabb pH értékek beállításához ők is NaOH-t használtak. A legmegfelelőbb kémhatásnak a pH 6-t találták pigment képződés szempontjából. Méndez és munkatársai (2011) a *Penicillium purpurogenum* GH2 penészgomba vörös pigment szintetizálásának pH szabályozásához szintén a NaOH használata mellett döntöttek. A pH 7- pH 7,5 intervallumot találták optimálisnak a vörös pigment szintéziséhez. Gmoser és munkatársai (2018) a *Neurospora intermedia* fonalasgomba színanyagtermelését kutatták, s a pH pigment termelésre gyakorolt hatásának a vizsgálatához szintén NaOH -t alkalmaztak a megfelelő pH értékek beállításánál. Eredményeik alapján a pH 3,5 kedvezett a pigment szintézisnek. Az összes vizsgált törzs esetében a legkevésbé optimális beállításnak a tejsav kiegészítést tartalmazó pufferelt tápközegek bizonyultak. A *Y. lipolytica* 854/4 törzs kivételével a többi törzsnél a tejsav kiegészítést nem tartalmazó pufferelt tápközegek hatékonyabbak voltak a kontrolhoz képest. A 4 törzs közül a legkisebb maximális abszorbancia értéket (0,786) a *Y. lipolytica* 854/4 törzs esetében mértem.

A NaOH szervesetlen vegyület használatának oka lehet, hogy egyszerűen beszerezhető, és gyorsan, s könnyen beállítható vele a megfelelő pH. Azonban az eredményeim alapján nincs jelentős különbség a desztillált vízzel készített és a NaOH kiegészítést is tartalmazó tápközegek maximumai között, így a *Yarrowia* élesztőgombák esetében nem szükséges a tápközeghez pH-t befolyásoló komponenseket adni.

5.2.4. Rázatási sebesség hatása a pigment termelésre

A ráztatás döntő fontosságú az aerob fermentációs rendszerek tömegátadási ellenállásának leküzdésében, és az oxigénátviteli sebesség közvetlenül összefügg a rázatási sebességgel (Liu et al., 2006). Tekintve, hogy a *Y. lipolytica* egy obligát aerob élesztő, az optimalizált keverősebesség alkalmazása pozitívan befolyásolhatja az anyagszerefolyamatokat, s ezáltal a pigment termelést is. Ramesh és munkatársai (2022) azt írják tanulmányukban, hogy általában a pigmentet szintetizáló baktériumok, illetve a penész- és élesztőgombák nagyon érzékenyek a fizikai-kémiai paraméterekre. Az általuk feltárt szakirodalmi adatok alapján, megállapították, hogy a legtöbb mikroba fajtól függetlenül, 100–150 rpm sebesség mellett termel pigmenteket. A kísérletem során három különböző rázatási sebesség – 100 rpm, 130 rpm és 160 rpm – hatását vizsgáltam a pigmenttermelésre az egy hetes fermentáció során, melyhez az aminosavakat tartalmazó (2.) tápközegét alkalmaztam kiegészítés nélkül. A színanyagtermelés eredményeit a 30. táblázat szemlélteti.

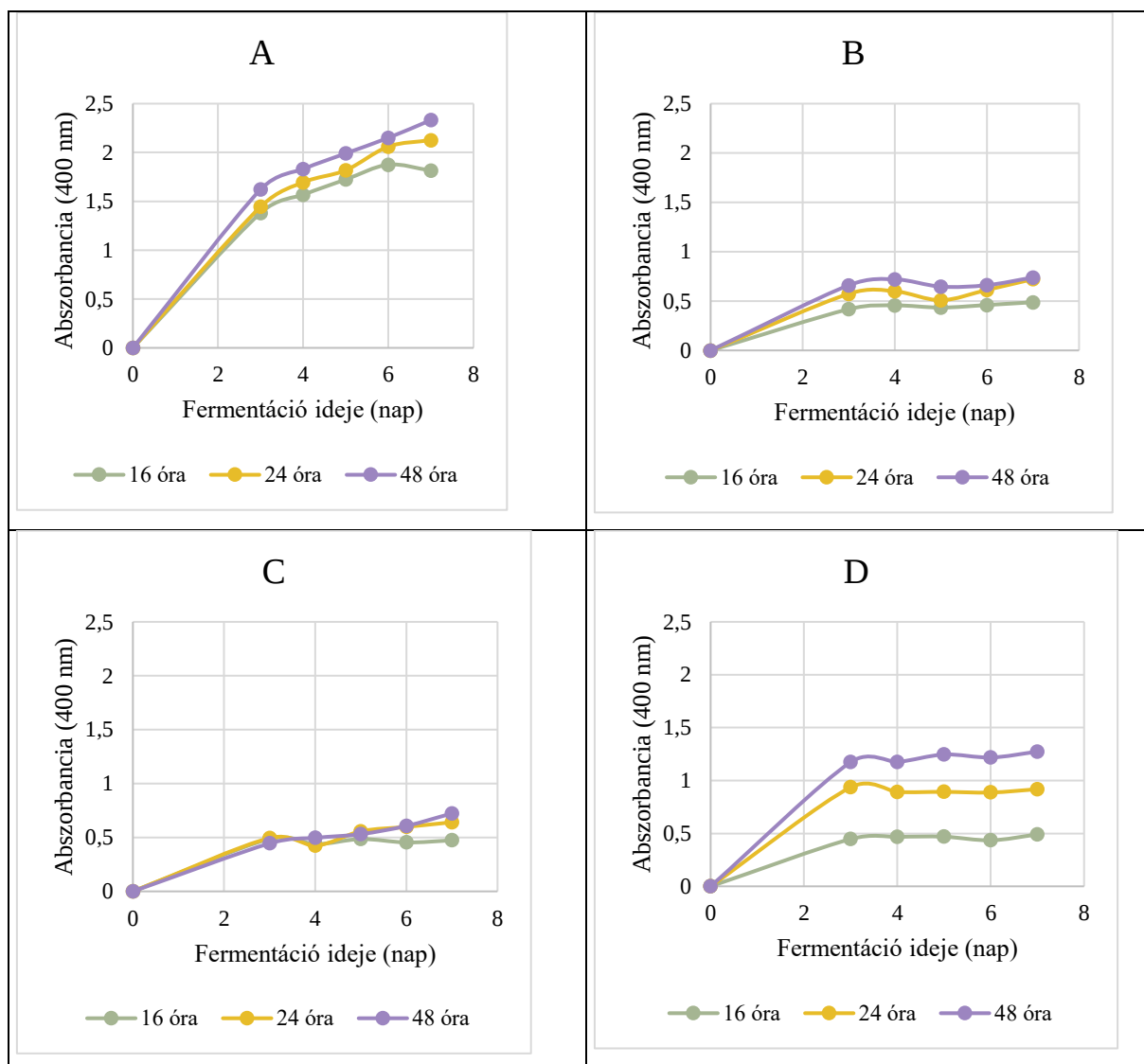
30. táblázat: Különböző *Yarrowia* törzsek 400 nm-en mért abszorbancia maximum értékei különböző rázatási sebességek alkalmazása mellett

Törzs	Ráztatási sebesség		
	100 rpm	130 rpm	160 rpm
<i>Y. lipolytica</i> 6/3	2,43	2,31	2,23
<i>Y. lipolytica</i> 854/4	0,68	0,78	0,87
<i>Y. divulgata</i> NCAIM Y.02062	0,74	0,85	0,82
<i>Y. divulgata</i> 5257	1,10	0,94	0,94

A kísérlet eredményei alapján megállapítható, hogy a különböző törzsek esetében különböző fordulatszámok eredményezték a nagyobb abszorbancia értékeket. A fermentáció 7. napján mértem a maximumot szinte minden törzs esetében az összes ráztatási sebesség mellett. Míg a *Y. lipolytica* 6/3, valamint a *Y. divulgata* 5257 törzseknél a leghatékonyabb a 100 rpm-n történő ráztatás, addig a *Y. lipolytica* 854/4 törzsnél a 160 rpm-n történő levegőztetés volt. A 130 rpm a *Y. divulgata* NCAIM Y.02062 törzsnek kedvezett a legjobban. A legjobb termelőnek a *Y. lipolytica* 6/3 bizonyult mind a három alkalmazott fordulatszám mellett, a másik három törzs maximum értékei is igen hasonlóan alakultak, nagyságrendi különbség nem volt közöttük. Számos kutató találta optimálisnak és alkalmazta az enyhébb ráztatási sebességeket (100-180 rpm) pigment fermentáció során. Lv és munkatársai (2017) a *Monascus purpureus* gomba sárga pigment termeléséhez a 180 rpm-t találták legjobbnak, nagyobb ráztatási sebesség mellett a színanyag csökkenését tapasztalták. Cho és munkatársai (2002) a *Paecilomyces sinclairii* penésszel, Shatila és munkatársai (2013) az *Exiguobacterium aurantiacum* FH baktérium törzzsel termeltettek előbbi esetében nagy mennyiségű vörös, utóbbinál pedig narancssárga pigmentet 150 rpm ráztatási sebesség mellett. A nagy sebességű kevertetés nagy nyírási sebességet eredményez, ami fonalgombák esetében micéliumrepedést okoz, és ennek következtében csökkenti a pigmentek képződését. Ezért egyensúlyt kell teremteni a magas oxigéntranszfer elősegítése és az alacsony hidrodinamikai stressz fenntartása között a tenyésztési környezetben (Ochoa és Gomez, 2009). Valószínűsíthető, hogy a nagy nyírófeszültség az élesztők számára sem ideális, és a sejtek károsodását okozhatja. Az eredményeim és a szakirodalmi adatok alapján egységesen 130 rpm ráztatási sebességet alkalmaztam kutatómunkám folytatásában.

5.2.5. Az inokulum kor hatásának vizsgálata

A továbbiakban tanulmányoztam, hogyan befolyásolja a fermentációs tápközegben a pigment termelést az élesztőknek az inokulum tápközegben való felszaporítási ideje. A kísérleti inokulum tenyésztési időintervallumokat 16, 24 és 48 órában határoztam meg. A beoltást követően a fermentáció 28° C-on, 130 rpm rázatási sebesség mellett ment végbe, egy héten keresztül. Az abszorbancia értékeket a 26. ábra szemlélteti.



26. ábra: *Y. lipolytica* 6/3 (A), *Y. lipolytica* 854/4 (B), *Y. divulgata* NCAIM Y.02062 (C), *Y. divulgata* 5257 (D) törzsek pigment termelése különböző korú inokulumok alkalmazásával

A vizsgálat során a 400 nm-en mért abszorbancia érték közül a legalacsonyabbak az összes felhasznált törzsnél a 16 órás inokulummal készített mintákban voltak észlelhetőek. A *Y. lipolytica* 6/3 törzs esetében a termelt színanyag 1,8-as abszorbanciát ért el, a *Y. lipolytica* 854/4-es törzsnél pedig 0,48-at. A két *Y. divulgata* élesztőnél is a maximum 0,4 körül alakult

ezen inokulum használata során. A legnagyobb abszorbancia értékeket minden élesztőnél a 48 órás inokulum használata mellett mértem, azonban a 24 és a 48 órás inokulummal beoltott fermentációs tápközegek 400 nm-en mért maximális abszorbancia értékei között nem volt számottevő különbség a vizsgált törzseknél. A *Y. lipolytica* 6/3-nál 2 körüli abszorbanciákat a *Y. lipolytica* 854/4-es törzsnél 0,72 és 0,74 értéket detektáltam a 7. napon. A *Y. divulgata* NCAIM Y.02062 törzsnél is a 24 órás és a 48 órás inokulummal indított fermentáció esetén az utolsó napon vett mintában nagyon hasonló (0,6-0,7 közötti) abszorbancia volt mérhető. A legnagyobb különbséget *Y. divulgata* 5257 törzsnél tapasztaltam, melynél a 48 órás inokulum használatával közel 40%-kal magasabb volt az abszorbancia értéke.

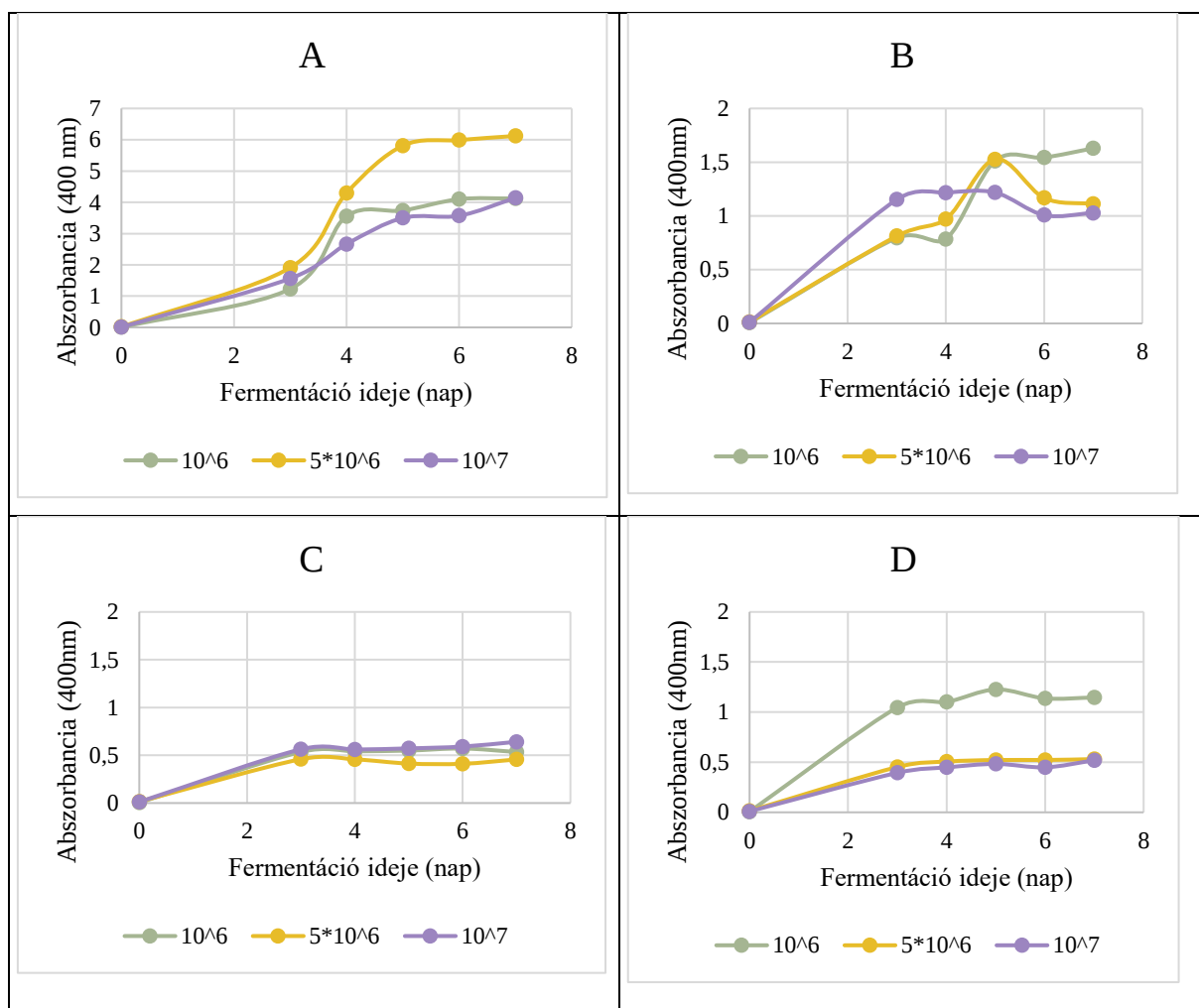
Tarangini és Mishra (2014) a munkájuk során gyümölcshulladékot használtak fel melanin termeltetésre *Bacillus safensis* 24 órás inokulumának alkalmazásával. Marova és munkatársai (2012) több élesztő törzs (*Sporobolomyces roseus*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula mucilaginosa*) összehasonlítását végezte el karotin termelés szempontjából. Munkájuk során a fermentációs tápközeget minden esetben 24 órás inokulum tenyészetrel oltották be. Sinha és munkatársai (2021) szintén 24 órás inokulum tenyészeteket alkalmaztak két élesztő, a *Rhodospiridium toruloides* és a *Rhodotorula glutinis* Y1 törzsek karotin fermentációjának vizsgálatakor. Thaira és munkatársai (2016) a kutatásuk során a *Pseudomonas stutzeri* HMGM-7 törzs melanin szintéziséhez szükséges paramétereket optimalizálták, többek között az inokulum korának (6, 12, 18, 32 óra) hatását is tanulmányozták. Eredményeik nyomán azt állapították meg, hogy az oltóanyag korának növelése a biomassza növekedését eredményezi. A biomassza legnagyobb mennyisége a 32 órás inokulum alkalmazása mellett volt észlelhető. A melanin termelés hatékonysága szempontjából azonban nincs olyan nagy jelentősége, a legnagyobb pigment hozamot a 12. órás inokulum használata során érték el, de 6. és a 12. órás inokulum alkalmazása melletti pigment termelésben csupán minimális eltérés volt.

Az eredményeim, továbbá a szakirodalmi adatok alapján megállapítható, hogy ugyan az inokulum kora hatással bír a fermentációs folyamat eredményességére, mégis a 24 órás inokulum tenyésztési időtartamot választottam ki a további kísérleteim megvalósításához gazdasági és technológiai szempontokat mérlegelve.

5.2.6. Az inokulum mennyiség hatásának vizsgálata

Az inokulum kiindulási sejtszámának a pigment termelésre gyakorolt hatását is vizsgáltam a 2-2 db *Y. lipolytica* és *Y. divulgata* törzs vonatkozásában. A kísérlethez három sejtkoncentráció került kiválasztásra, amelyek a következők: 10^6 sejt/ml, $5 \cdot 10^6$ sejt/ml és 10^7 sejt/ml. Ennek megfelelően a 24 órás inokulum tenyészet abszorbanciáját 600 nm-en mértem,

majd Bürker-kamra segítségével megállapítottam az inokulum pontos sejtkoncentrációját, ezt követően meghatároztam a tervezett kiindulási sejtszám eléréséhez szükséges inokulum mennyiséget. A beoltást követően a fermentáció 28° C-on, 130 rpm rázatási sebesség mellett történt egy héten keresztül. A mért abszorbancia értékek alakulását a különböző inokulum mennyiség hatására a 27. ábrán láthatjuk.



27. ábra: *Y. lipolytica* 6/3 (A), *Y. lipolytica* 854/4 (B), *Y. divulgata* NCAIM Y.02062 (C), *Y. divulgata* 5257 (D) törzsek pigment termelése különböző inokulum mennyiségek alkalmazásával

A 10⁶ TKE/ml sejtkoncentráció volt a legkedvezőbb a *Y. lipolytica* 854/4 és a *Y. divulgata* 5257-es törzs tekintetében. Előbbi törzsnél a hetedik napra sikerült 1,6-os abszorbanciát elérni, miközben a pigmenttermelés fokozatos növekedést mutatott, ugyanakkor megjegyzendő, hogy a másik *Y. lipolytica* törzshöz képest (4,12) csak negyed akkora volt az abszorbancia e sejtkoncentráció alkalmazása mellett. A *Y. divulgata* 5257 élesztő esetében ennél a sejtkoncentrációnál kiemelkedően jó eredményt kaptam a többi beállításnál mért abszorbancia értékekhez képest, vagyis e törzsnél jelentős befolyásoló tényezőként értékelhető

az inokulum mennyisége. A maximális abszorbancia érték 1,15 volt. A két alkalmazott *Y. divulgata* törzs közül egyértelműen ez az élesztő bizonyult hatékonyabb pigment termelőnek.

Az $5 \cdot 10^6$ TKE/ml sejtkoncentrációjú inokulummal beoltott fermentációs tápközeg esetében következett be a legkedvezőbb pigment termelés a *Y. lipolytica* 6/3 esetében, ahol az abszorbancia a hatodik napra érte el a 6-ot, mely igen jó színanyag termelésről tanúskodik. Ugyanakkor megjegyezném azt is, hogy a másik két koncentrációnál is e törzs esetében voltak a legnagyobb abszorbancia értékek detektálhatóak.

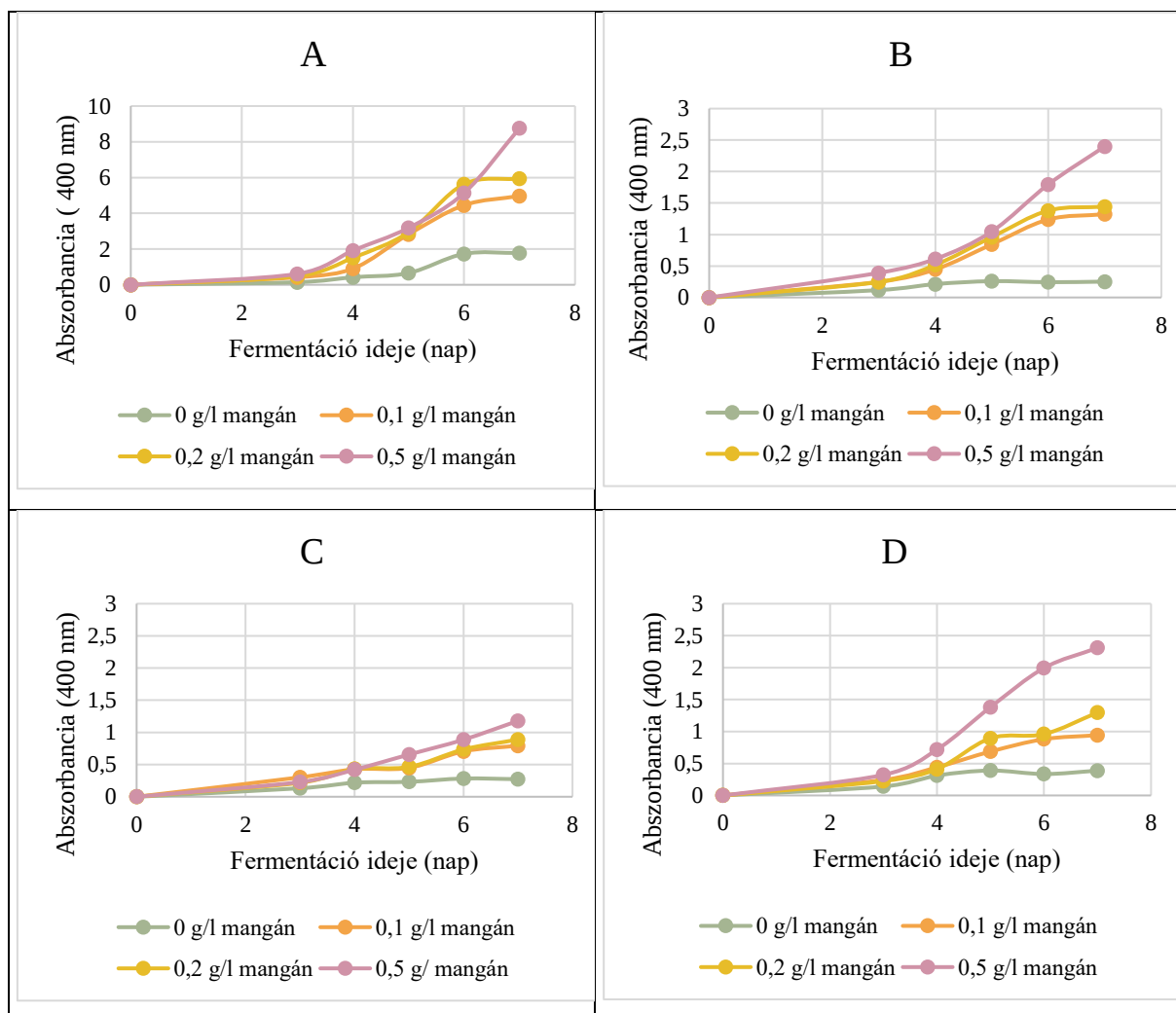
A 10^7 TKE/ml-es sejtkoncentráció mellett érte el a maximum abszorbancia értéket (0,64) a *Y. divulgata* NCAIM Y.02062 törzs, ugyanakkor a grafikont nézve is szembetűnő, hogy olyan jelentősen nem emelkednek a mért értékek a 7 napos fermentáció során. A legnagyobb mértékű pigment termelés a harmadik napig végbe is megy, onnantól minimális emelkedést tapasztaltam csak az abszorbancia értékekben. E törzsnél hasonló eredményt mutattak a különböző inokulum mennyiségek, nagy eltérés nem volt tapasztalható az egyes koncentrációk maximum értékei között.

Az inokulum mennyiségének pigment termelés befolyásoló hatását Trejo-Tapia és munkatársai (2003) is kiemelik, mivel kísérletükben 10 g/l inokulumot tartalmazó tápközeg 7-szeresére növelte a *Lavandula spica* D.C. kék pigment termelékenységét a kontroll tápközeghez képest, mely 5 g/l inokulumot tartalmazott. Az egyes mikroorganizmusok esetében eltérő, hogy milyen koncentrációjú inokulum a megfelelő színanyagfermentáció során. Garcia-Cortes és munkatársai (2021) a *Rhodotorula mucilaginosa* AJB01 törzs pigment fermentációjakor 10^8 sejt/ml koncentrációjú inokulum mennyiséget alkalmaztak. Míg Kim és munkatársai (2002) 7%-os beoltást használtak *Monascus* sp. J101 törzs pigment fermentációjánál, addig Saha és munkatársai (2015) 1%-os inokulálást tartottak hatékonyak a *Sporidiobolus pararoseus* DAGIII törzs pigment szintéziséhez. Libkind és Broock (2006) eddig feltáratlan patagóniai élőhelyekről származó új élesztő izolátumokat tanulmányoztak, s vizsgálták a karotinoid fermentációt is, melyhez 5%-os beoltási térfogatot használtak. Kutatásom során én is arra a következtetésre jutottam, hogy az egyes törzsek esetében más és más inokulálási térfogat a hatékonyabb a színanyag termeltetéshez.

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

Számos kutató vizsgálta az egyes nyomelemek színanyag szintézisre gyakorolt hatását. Guo és munkatársai (2019) szerint a fémionok (pl.: Ba, Fe, Mg, Ca, Zn és Co) és különösen egyes nyomelemek (pl.: Al, Zn és Mn) nagyon fontosak a karotinoidok szintézisében a *Rhodotorula* fajok esetében. Poorniammal és munkatársai (2015) a *Monascus purpureus* gomba vörös pigment termelésének fokozása kapcsán azt állapították meg, hogy a mangán erőteljesebb

fokozó hatással bírt, mint a kalcium vagy a vas. Ennek okát abban látták, hogy a mangán a pigment bioszintéziséhez szükséges különböző enzimek kofaktoraként működik. Carreira és munkatársai (2001 b) kimutatták, hogy a mangán jelenléte (1mM) pozitívan befolyásolja a *Y. lipolytica* pigment termelését. Ezen tudományos eredményekre alapoztam a következő kísérleti tervem, melyben a Mn^{2+} hatását vizsgáltam különböző koncentrációban alkalmazva (0; 0,1; 0,2 és 0,5 g/l), desztillált vízzel készített tápközegben 130 rpm rázatási sebesség mellett, s az összes élesztő esetében 24 órás a számára ideális mennyiségű inokulumot alkalmaztam a fermentációs tápközeg beoltásához. A kísérlet eredményeit a 28. ábra szemlélteti.



28. ábra: A Mn^{2+} hatása a *Y. lipolytica* 6/3 (A), *Y. lipolytica* 854/4 (B), *Y. divulgata* NCAIM Y.02062 (C), *Y. divulgata* 5257 (D) törzsek pigment termelésére

A 28. ábrán egyértelműen látható, hogy a görbék lefutása az egyes törzsek esetében nagyon hasonlóan alakul. 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. De fontos megemlíteni, hogy abszorbancia növekedés mangán nélkül is

megvalósult, ez a sejtek tirozin fogyasztása miatt lehet. A 0,5 g/l mangánt tartalmazó tápközeg esetében mértem a legnagyobb abszorbancia értékeket, minden élesztőnél. A *Y. lipolytica* 6/3 esetében 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. Elmondható az is, hogy a 0,1 és a 0,2 g/l-es koncentráció között számottevő eltérés nem volt egyik törzsnél sem, így az egyértelműen megállapítható, hogy az eddig használt 0,1g/l koncentrációt megduplázni nem elegendő. A legjobb pigment termelőnek ugyanúgy, mint az összes többi kísérletnél a *Y. lipolytica* 6/3 bizonyult, a tápközegek színe a fermentáció utolsó napján (29. ábra) már szinte fekete színű volt. A két *Y. divulgata* közül az 5257-es volt a hatékonyabb színanyag szintetizáló.



29. ábra: A *Y. lipolytica* 6/3 élesztő fermentleve a fermentáció utolsó napján különböző Mn^{2+} koncentrációk alkalmazása mellett

A kísérlet eredményeiből egyértelműen levonható a konklúzió miszerint a Mn^{2+} jótékony hatással bír a *Yarrowia* élesztők pigment szintézisére. Carreira és Loureiro (1998) kimutatta, hogy a Mn^{2+} erőteljesen fokozza a *Y. lipolytica* pigmenttermelését. Carreira és munkatársai (2001 b) eredményei azt mutatták, hogy bár ez a fémion nem nélkülözhetetlen a pigmentek előállításához, jelentősen felgyorsítja és intenzívebbé teszi a folyamatot. Ezt én is tapasztaltam, ugyanis mangán jelenléte nélkül a pigment termelés időben később indult be, tekintve, hogy nagyobb abszorbancia értékeket mértem azokban a tápközegekben, amelyek tartalmaztak mangánt már a fermentáció harmadik napján minden törzs esetében. A Mn^{2+}

jelenlétében a pigmentek a növekedés exponenciális fázisában képződtek, és ugyanebben a fázisban a barnulás is exponenciális kinetikát követett. Ez arra utal, hogy a Mn^{2+} elősegíti a prekursor szinte azonnali polimerizációját, amely ebben a fázisban exponenciálisan szabadul fel a sejtekből. A pigmentképződést azonban nem befolyásolta, amikor a sejtek el lettek távolítva, és a prekursor az EDTA kelátképző szer jelenlétében autooxidálódott. Mivel a sejteket csak 12 óra inkubáció után távolították el, a tápközeg már enyhén elszíneződött, ezért lehetségesnek tartották, hogy a Mn^{2+} katalizátorként működhet az oxidációs folyamat első szakaszában. Bár a Mn^{2+} kapcsán már beszámoltak arról, hogy elősegíti a tirozin katabolitok kémiai átalakulását pigmentekké (Barnett *et al.*, 1983), az is elképzelhető, hogy a Mn^{2+} elősegítheti a prekursor szintézisét (Carreira *et al.*, 2001). Ez magyarázhatja a Mn^{2+} hiányában elért alacsonyabb színintenzitást.

5.2.8. Pigment termelés alakulása az optimálási folyamat során

A 31. táblázatban összefoglaltam, hogy mind a négy *Yarrowia* élesztőnél az optimálási folyamatot követően nagyobb abszorbancia értékeket kaptam a kezdetihez képest. 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.

31. táblázat: *Yarrowia* törzsek pigment termelésének alakulása az optimálási folyamat során

Törzs	Kezdeti abszorbancia érték (2. tápközeg)	Optimálásokat követő abszorbancia érték	Növekedés mértéke
<i>Y. lipolytica</i> 6/3	1,23	8,76	7,1X
<i>Y. lipolytica</i> 854/4	0,92	2,4	2,6 X
<i>Y. divulgata</i> 5257	0,88	2,31	2,62X
<i>Y. divulgata</i> NCAIM Y.02062	0,72	1,18	1,63X

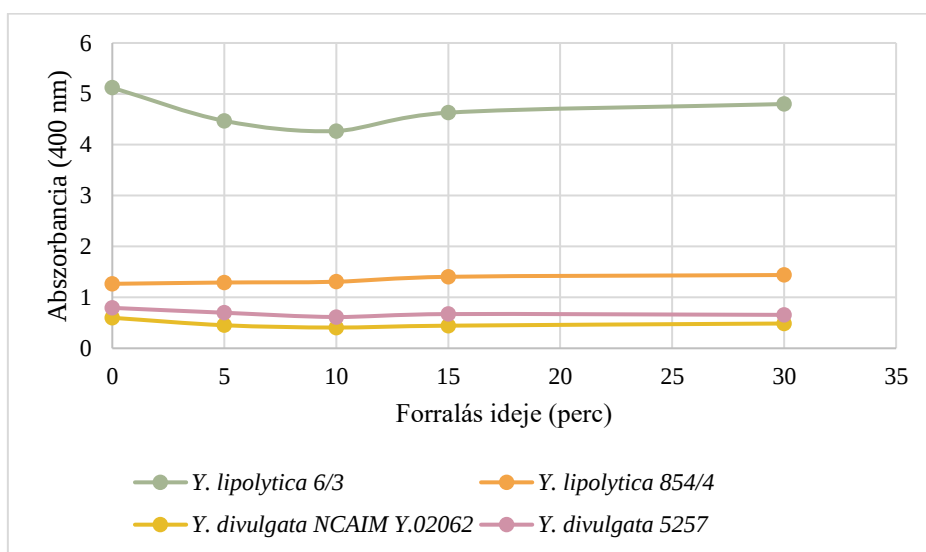
5.2.9. A pigmentek stabilitásának vizsgálatai

Az esetleges későbbi ipari felhasználás céljából különösen fontosnak tartottam, hogy megvizsgáljam a *Yarrowia* törzsek által termelt színanyagok stabilitását, ugyanis erről egyöntetű szakirodalmi forrást nem találtam. Minden törzs esetében 24 órás, a számára ideális mennyiségű inokulumot alkalmaztam a fermentációs tápközeg beoltásához. A fermentációt 130

rpm rázatási sebességen végeztem, egy héten keresztül. Különösképp az élelmiszeripari alkalmazásnál szokásos környezeti körülményeket vettem figyelembe, illetve ennek megfelelően választottam ki a kísérleteim paramétereit. Ezek alapján forralási, fagyasztási, illetve különböző fény- és hőmérsékleti viszonyok mellett tárolási vizsgálatokat végeztem el.

5.2.9.1 Forralási vizsgálat

A vizsgálat előtt megmértem minden törzsnél a fermentáció során keletkezett pigmentek abszorbanciáját, melyeket a kiindulási értékeknek tekintettem. A mintákat ezután 5, 10, 15 és 30 percig forraltam, majd megmértem az abszorbanciát, melyeket a 30. ábrán tüntettem fel.

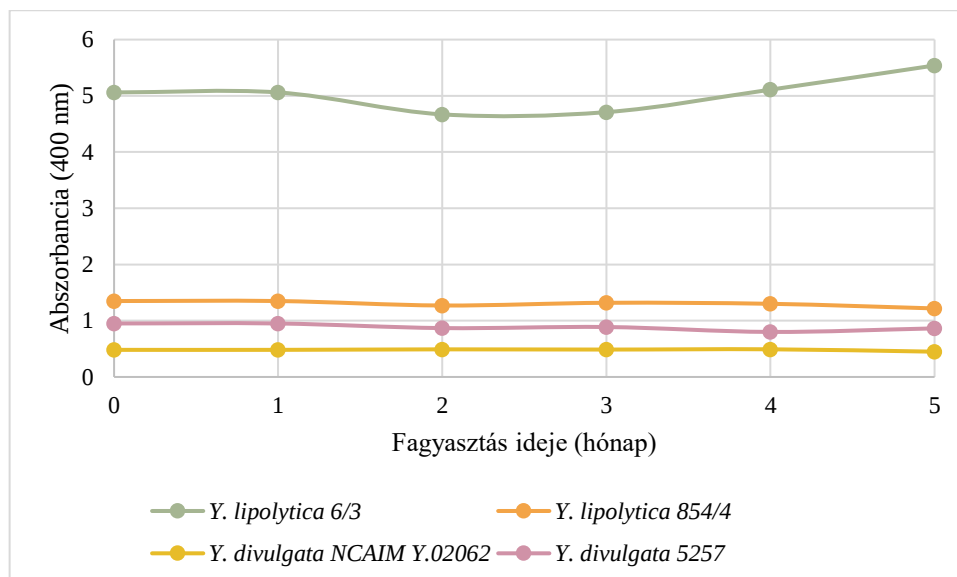


30. ábra: *Yarrowia* törzsek által termelt pigmentek stabilitása forralás során

A méréseim alapján megállapítható, hogy a minták színe nem halványodott még 30 perc forralás után sem. A *Y. lipolytica* 6/3 törzs esetén megfigyelhető az értékekben egy enyhe csökkenés, de ezt valószínűleg csak mérési vagy mintavételezési hiba okozhatta, hiszen a forralási időtartam növelésével nem csökkent tovább. A többi törzs esetén is elmondható, hogy az értékek szinte változatlanok, bomlás nem volt tapasztalható, a színanyag stabil maradt a forralási körülmények között.

5.2.9.2 Fagyasztási vizsgálat

A -18°C-on fagyasztóban tárolt minták abszorbanciáját havonta megmértem a pigment stabilitásának ellenőrzése, követése végett.



31. ábra: *Y. lipolytica* 6/3 (A), *Y. lipolytica* 854/4 (B), *Y. divulgata* NCAIM Y.02062 (C), *Y. divulgata* 5257 (D) törzsek által termelt pigmentek stabilitásának alakulása fagyasztva

Mint ahogy azt a 31. ábrán is láthatjuk az abszorbancia értékek stagnáltak, nagy eltérést nem tapasztaltam az egyes minták között. Csak a *Y. lipolytica* 6/3-as törzs abszorbancia értékei voltak változékonyak, de ennek oka az lehet, hogy a nagymennyiségű pigmentet eléggé nehezen tudtam homogenizálni. E mintavételezési nehézségekkel magyaráznom, hogy kissé hullámzóak a mérés eredményei ebben az esetben, de a többi törzs kapcsán minden alkalommal azonos abszorbanciát mértem. Összegezve rögzíthető, hogy a fagyasztás során stabilak a pigmentek, a színintenzitás nem csökkent.

5.2.9.3 Tárolási vizsgálat

A fermentációt követően a mintákat négy különböző környezetben helyeztem el a pigment stabilitásának követése céljából. Vizsgáltam a hőmérséklet és a fényben való tárolás hatását is, így szobahőmérsékleten és hűtött körülmények között, valamint fénynek kitett világos helyen és sötétben tárolt fermentlevek stabilitását 5 hónapig követtem. Az eredményeket a 32. táblázatban tüntettem fel.

32. táblázat: *Yarrowia* eredetű pigment tartalmú fermentlevek stabilitásának vizsgálata különböző tárolási körülmények között

Törzsek	Kindulási érték	Tárolási körülmény	2. hét	4. hét	8. hét	12. hét	16. hét	20. hét
<i>Y. lipolytica</i> 6/3	7,22	sötét, szobahő	7,35	7,56	7,40	7,96	8,07	7,25
		világos, szobahő	7,07	6,96	7,56	8,13	8,81	7,50
		sötét, hűtött	7,08	6,60	6,55	6,74	7,11	6,86
		világos, hűtött	6,95	6,55	6,26	7,39	7,91	6,97
<i>Y. lipolytica</i> 854/4	1,47	sötét szobahő	1,62	1,65	1,67	1,72	1,73	1,70
		világos szobahő	1,62	1,61	1,59	1,72	1,68	1,63
		sötét hűtő	1,64	1,67	1,54	1,68	1,66	1,62
		világos hűtő	1,60	1,64	1,51	1,66	1,66	1,82
<i>Y. divulgata</i> NCAIM Y.02062	0,51	sötét szobahő	0,55	0,46	0,55	0,58	0,60	0,65
		világos szobahő	0,55	0,45	0,50	0,53	0,55	0,48
		sötét hűtő	0,49	0,46	0,40	0,47	0,51	0,59
		világos hűtő	0,50	0,51	0,46	0,52	0,51	0,52
<i>Y. divulgata</i> 5257	1,15	sötét szobahő	1,28	1,12	1,27	1,22	1,23	1,29
		világos szobahő	1,21	1,17	1,23	1,29	1,21	1,22
		sötét hűtő	1,32	1,28	1,57	1,34	1,33	1,28
		világos hűtő	1,22	1,21	1,18	1,33	1,34	1,36

A 32. táblázat alapján látható, hogy a magas pigmenttartalmú minták esetében ismét hullámszerű volt jellemző a mért értékeknél, de valószínűleg ez csak az egyenetlen pigment eloszlásnak tudható be, ugyanis hiába homogenizáltam alaposan a mintákat Vortex készülékkel, még így is maradhettek csomók a fermentlevekben. Ettől eltekintve nagymértékű csökkenés nem jellemző egyik törzsnél és egyik környezeti paraméter esetén sem, ezért az eredményekből egyértelműen az olvasható ki, hogy a mikrobiális pigment teljesen stabil, különböző hőmérsékletek és fényviszonyok között nem bomlik le hosszú tárolás során sem.

A pigmentek stabilitását számos kutató vizsgálta az évek során, azonban a *Yarrowia* eredetű barna pigment ilyen típusú vizsgálatairól szinte nem áll rendelkezésre szakirodalmi forrás. Wang és munkatársai (2006) a növényi eredetű melanin stabilitásának vizsgálata során arra a megállapításra jutottak, hogy a melanin ultraibolya és látható fényben, 25-100 °C tartományban történő melegítés során, lúgos oldatban, redukálószerrel használatkor egyaránt stabilnak, só jelenlétében viszonylag stabilnak bizonyult, ellenben erős oxidálószerrel szemben (KMnO₄, K₂Cr₂O₇ és NaOCl) nem volt az. Huang és munkatársai (2024) a *Mesona chinensis*-ből származó melanin (MCM) pigment szerkezetét jellemezték és stabilitását tanulmányozták. Az eredményekből arra következtettek, hogy az MCM szerkezete összhangban van a teofillin szerkezetével, és főként fenolos savakból, terpenoidokból és szerves savakból áll. A stabilitás értékelések azt mutatják, hogy az MCM stabil fehér fényben,

ultraibolya fényben, semleges és lúgos környezetben, és alacsony érzékenységet mutat a redukálószerre. Fu és munkatársai (2022) megállapították, hogy a redukálószer (Na₂SO₃, nátrium-benzoát), a hő, a fény, a mikrohullámok, az oxidálószer és a szokásos élelmiszer-adalékanyagok nem befolyásolták a *Sporisorium reilianum* eredetű L-25 melanin stabilitását. Ezen paraméterekkel szemben a közeg kémhatása erősen befolyásoló hatással bír melaninra. A pH 2 -7 közötti tartományban barnásvörös színből, sötétbarna színűvé vált, ha a közeg pH értéke lúgosabb volt, mint 8. Kutatómunkám során sikerült a *Yarrowia* élesztők által termelt barna pigment stabilitását bizonyítanom számos körülmény között.

6. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

A doktori dolgozatomban a *Yarrowia* élesztők anyagcseretermékei közül vizsgáltam a különböző törzsek lipáz aktivitását, valamint melanin-szerű pigment termelését. Mindkét metabolit esetében először törzsszelekciót végeztem, majd ezt követően optimalizációs folyamatokat hajtottam végre szubmerz fermentációk sorozatával. Kutatómunkám második fázisában, az ipari hasznosításuk lehetőségeivel foglalkoztam, a lipáz enzim körforgásos gazdaságban való alkalmazását térképeztem fel, továbbá a pigment stabilitásának alakulását követtem nyomon különféle környezeti körülmények esetén.

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 aktivitást detektáltam, azonban az extracelluláris frakcióban számottevően nagyobb aktivitás értékeket határoztam meg minden törzs esetében.

Az enzim termelés fokozására irányuló optimalizációs vizsgálatokat (olívaolaj és Tween 80 hatása; rázatási sebesség hatása; inokulum mennyiség hatása; Triton X-100 és Tween 80 különböző koncentrációinak hatása) több törzsszel is elvégeztem, melynek 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. Az összes vizsgált frakció, beleértve az intracelluláris és extracelluláris preparátumokat is, pH 7,2 -n mutatott optimális értéket, s a két szélső pH-érték esetén (pH 5 és pH 8) szignifikánsan alacsonyabb enzimaktivitást határoztam meg. Az extracelluláris és intracelluláris frakciók esetében is a lipáz aktivitás 25 °C és 37 °C között

azonos növekvő tendenciát mutatott, 37°C-on érte el a maximumot, ezt követően drasztikusan visszaesett.

Növényi olajokat, így olívaolajat (kontrollként), kókuszolajat, dióolajat, szőlőmagolajat, szezámolajat, napraforgóolajat, kukoricaolajat, használt sütőolajat és a repceolajat, mint szubsztrátumokat 1% koncentrációban alkalmazva screeneltem extracelluláris lipáz enzim termeltetésre 0,05% Tween 80-t tartalmazó YEPD tápközegben *Y. lipolytica* 854/4, és *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052 törzsek esetében. 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 5 féle pellet (tökmag, aranylenmag, napraforgómag, mogyoró és kendermag), mint természetes szubsztrátum alkalmazhatóságát is vizsgáltam lipáz termelésre. A legnagyobb enzim aktivitás az aranylenmag pelletnél, majd a tökmag pelletnél volt megfigyelhető.

A természetes szubsztrátumokon történő extracelluláris lipáz termelés optimalizálása során az olívaolajat, a napraforgóolajat, a használt sütőolajat és az aranylenmag pelletet 0,5 %, 1 %, és 2 %-os koncentrációban alkalmaztam. Mind a kettő élesztőnél a 2% koncentráció alkalmazása mellett volt észlelhető a legnagyobb enzimaktivitás minden szubsztrátum esetében. 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, viszont ezen szubsztrátumból nagyobb mennyiség is alkalmazható lenne alacsony beszerzési költsége végett, ami nem csupán gazdaságos felhasználást biztosít, de 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, hisz egy ipari melléktermékről beszélünk melyet nagyrészt hulladékként kezelnek, ennek következtében terheli a környezetet.

Barna pigment termelés:

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

A pigment termelés fokozása érdekében a fermentáció körülményeinek optimalizálását is elvégeztem (tápközeg szelektálás, pH hatása, rázatási sebesség hatása, inokulum mennyiségének, valamint korának 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 fermentáció optimalizálását követően elvégeztem a megtermelt színanyag stabilitásának vizsgálatát. A forralás hatásának vizsgálata során arra a következtetésre jutottam, hogy a minták színe nem halványodott még 30 perc forralás után sem. A -18°C-os fagyasztás sem befolyásolta a megtermelt pigment színét, stabil maradt mindegyik törzs esetében az 5 hónapos vizsgálat alatt.

A tárolási kísérletek esetében az eredményekből egyértelműen látható, hogy a vizsgálat teljes időtartama alatt (5 hónap) a pigment stabil volt a különböző hőmérsékletek (szobahőmérséklet és 4°C) és fényviszonyok (sötétben és fényben való tárolás) tekintetében.

Javaslatok

Barna pigment termelés:

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.

7. 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 buffer) és hőmérséklet optimum 37°C voltak.

3. Megvizsgáltam a használt sütóolaj (olcsó, környezetterhelő hulladék) alkalmazhatóságát a *Yarrowia* élesztő lipáz enzim előállítására és azt tapasztaltam, hogy a 0,5%-ban használt sütóolajat és 0,05% Tween 80-t tartalmazó YEPD tápközegekben hasonló lipáz titer érhető el, mint 0,5% olívaolaj szubsztrátumot tartalmazó tápközegekben 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 tápközegekben, 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.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

A *Yarrowia lipolytica* az egyik legszéleskörűbben tanulmányozott és élelmiszeripari szempontból az egyik legjelentősebbnek tartott élesztőgomba, mely rendkívül erős lipolitikus és proteolitikus aktivitásáról, pigmenttermelő képességéről ismert. Az élelmiszeriparon belüli sokrétű felhasználhatósága mellett hasznosítják citromsav termelésénél, tisztítószeriparban, az egészségügyi területén, gyógyszeriparban, valamint a bioüzemanyag gyártás számára is lehetőségeket rejt, továbbá a környezetvédelemben is fontos szerepet tölthet be. Sokáig úgy gondolták, hogy nemzetségének egyetlen képviselője, azonban az utóbbi években bizonyossá vált, hogy nem egyetlen fajról, hanem egy komplex csoportról van szó, melynek tagjait hagyományos módszerekkel sok esetben tévesen azonosítottak *Yarrowia lipolytica*-ként. Meggyőződésem, hogy a *Yarrowia* nemzetség több faja is alkalmas lehet ipari területeken való alkalmazásra, ezért kutató munkám során eddig kevésbé ismert és/vagy kutatott fajokkal foglalkoztam.

A munkám során célul tűztem ki az élesztőgombák lipáz enzim és pigment termelő képességének feltérképezését, melynek megvalósítására az alábbi *Yarrowia* törzseket használtam fel: *Yarrowia lipolytica* 854/4, 6/3, 4/1, *Yarrowia divulgata* NCAIM Y.02062, 5257, 445/4, *Yarrowia yakushimensis* NCAIM Y.02049, NCAIM Y.02050, NCAIM Y.02052, *Yarrowia porcina* NCAIM Y.02102, 859/4, *Yarrowia bubula* 441/4. Az ígéretesebb törzsekkel a fermentáció körülményeinek optimalizálásával a kívánt metabolitok termelésének a fokozását céloztam meg. A fermentációs folyamatok optimalizálásán túl a lipáz enzimmél az ipari melléktermékek, mint természetes szubsztrátumok alkalmazását vizsgáltam, hiszen egyre nagyobb hangsúly helyeződik a körforgásos gazdaság kialakítására. A termeltetett barna színanyag esetében pedig a stabilitásának a feltérképezését végeztem fel, az esetleges későbbi ipari felhasználhatóság végett.

Kutatómunkám első lépéseként a lipáz termelő *Yarrowia* törzsek rangsorolását végeztem el YEPD táplevesben, mely során megállapítottam, hogy a *Y. lipolytica* 854/4, és 1/4 mellett a *Y. divulgata* NCAIM Y.02062, és 5257 törzs termeli a lipázt nagyobb mennyiségben a többi vizsgált törzzsel szemben.

A legjobb törzsek kiválasztását követően optimalizációs feladatokat végeztem el a lipáz enzim aktivitásának növelése érdekében. Az olívaolajnak és a Tween 80-nak a lipáz termelésre gyakorolt hatásvizsgálata során minden vizsgált törzs esetében hasonló tendenciákat figyeltem meg, nevezetesen az olívaolaj 1%-a hatékonyan indukálja lipáz termelésüket. Továbbá 0,05 % koncentrációban alkalmazva a Tween 80 is hatásosnak bizonyult az extracelluláris lipáz

aktivitás fokozására minden vizsgált törzsnél, míg az intracelluláris aktivitásra csak a *Y. lipolytica* 1/4 törzsnél volt serkentő hatással.

Olívaolaj tartalmú YEPD tápközegben vizsgáltam további, eddig kevésbé ismert törzs - a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02049, NCAIM Y.02050 és NCAIM Y.02052 – lipáz termelő képességét. Az eredmények alapján a *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02049 és a NCAIM Y.02052 törzs jó lipáz termelőnek mutatkozott. Utóbbi két törzsnél olívaolaj és Tween 80 tartalmú tápközegben is elvégeztem mind az extra-, mind az intracelluláris aktivitásmérést, és megállapítottam, hogy a Tween 80-nak is van indukáló hatása.

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. Az eredmények alapján látható, hogy 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, minél több olívaolaj, valamint Tween 80 van jelen, annál nagyobb az enzimaktivitás, így kutatómunkám folytatásában ezen komponenseket tartalmazó YEPD táplevest használtam.

Kevés szakirodalmi adat áll rendelkezésre a levegőztetés hatásának kérdésével 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. Így kutatómunkám folytatásában ezt rázatási sebességet alkalmaztam.

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.

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.

Mindezen optimalizációs folyamatok eredményeként a *Y. divulgata* törzsek esetén több, mint 50-szeres, a *Y. lipolytica* 854/4 törzsnél több, mint 100-szoros aktivitás növekedést mutattam ki.

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 mérés során 30°C -tól 45°C -ig terjedő hőmérséklet tartományban mértem meg az enzimaktivitást, s a legnagyobb aktivitás érték 37°C -on volt mind a kettő frakciónál. A pH optimalizálást különböző pH értékű (pH 5 - pH 8) Sörensen pufferek segítségével végeztem el. Az eredményekből azt a konklúziót lehet levonni, hogy pH 7,2 Sörensen puffer használata esetén a legnagyobb a lipáz aktivitás mind az extracelluláris, mind az intracelluláris frakció esetén.

Az optimalizációs vizsgálatokat követően lipáz enzim termelés szempontjából növényi olajokat (olívaolaj (kontrollként), kókuszolaj, dióolaj, szőlőmagolaj, szezámolaj, napraforgóolaj, kukoricaolaj, használt sütőolaj és a repceolaj), mint természetes szubsztrátumokat hasonlítottam össze 1%-os koncentrációban alkalmazva. A vizsgálatot a két legjobb enzimtermelő törzsszel (*Y. lipolytica* 854/4, *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052) végeztem el. Az eredményeimből megállapítható, hogy mind a két törzs esetében 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

enzimfermentációhoz potenciálisan hasznosítható hulladék alkalmazásában is van potenciál, ugyanis számos olajhoz képest hatékonyabbnak bizonyult a használata mind a két törzsnél.

A körforgásos gazdaság térhódítása és kiemelkedő fontossága révén a következő kísérletemben ipari melléktermék (olajpogácsa) enzimfermentáláshoz 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, azonban míg előbbi esetében a lipáz aktivitás már a 24. órában elérte a maximális értéket, addig az utóbbinál csak a 72. órában.

Az előző kísérletek eredményei szerint a legjobbnak talált olajok (olíva, napraforgó) és pellet (aranylenmag), valamint a használt sütőolaj koncentráció növelésének hatását (0,5%, 1% és 2%) is elvégeztem lipáz termelésre mind a két törzsszel (*Y. lipolytica* 854/4, *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052). 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 hatékonynak. Mind a két élesztőgomba esetében a legnagyobb lipáz aktivitást a 2%-os olívaolaj szubsztrátumnál mértem. 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.

Kutatómunkám másik nagy témaköre a *Yarrowia* élesztők barna színanyag termelésének vizsgálata volt, mely során 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 tápagon. Mindegyik alkalmazott élesztő termelt színanyagot, igaz eltérő mértékben. 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, s végeztem optimálási kísérleteket a pigment termelés fokozása érdekében szubmerz fermentációk során.

Először tápközeg optimálást végeztem, a fermentációs alap tápközeget a tirozin, mellett különböző aminosavakkal - glicin, L-glutamin, L-aszparagin -, valamint egyes esetekben tejsav komponensekkel egészítettem ki. Az alkalmazott törzsek közül a *Y. lipolytica* 6/3 törzs 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. Megemlítendő, hogy a csak aminosav kiegészítést tartalmazó tápközeg alkalmazása volt a leghatékonyabb minden törzsnél. A kísérlet eredményeiből az is látszik, hogy a semleges pH tartomány kedvez a pigment szintézisnek. A kívánt kémhatás elérését különböző pufferek (McIlvaine, Sørensen) 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. Ismételtén vizsgáltam a tejsav hatását a pigment szintézisre a pufferekhez adagolva, majd a pH-t semlegesre állítva.

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 kiindulási tápközegek között, így a kutatómunkám folytatásához gazdasági szempontok alapján a kontrollként alkalmazott tápközeget választottam.

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 a különböző törzsek esetében különböző fordulatszámok bizonyultak a legjobbnak. A levegőztetés mértéke azonban nagyságrendileg nem befolyásolta a pigment szintézisét, így a további kísérletem során 130 rpm rázatási sebességet alkalmaztam.

Tanulmányoztam, hogyan befolyásolja a fermentációs tápközegben a pigment termelést az élesztőknek az inokulum tápközegben való felszaporítási ideje. A kísérleti inokulum tenyésztési időintervallumokat 16, 24 és 48 órában határoztam meg. Az eredményeim, továbbá a szakirodalmi adatok alapján megállapítható, hogy bár az inokulum kora hatással bír a fermentációs folyamat eredményességére, munkám folytatásához gazdasági és technológiai szempontokat mérlegelve a 24 órás inokulum tenyésztési időtartamot választottam ki.

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.

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). A kísérlet eredményeiből egyértelműen levonható a konklúzió miszerint a Mn^{2+} jótékony hatással bír a *Yarrowia* élesztők pigment szintézisére, s a nagyobb Mn^{2+} koncentráció alkalmazása nagyobb pigment hozamot eredményez. A 0,5 g/l alkalmazása mellett jelentős szintézis volt tapasztalható.

A legjobb pigment termelőnek a *Y. lipolytica* 6/3 bizonyult, melynél az optimálási folyamatok eredményeként hétszer nagyobb abszorbancia értéket detektáltam a kezdetihez képest.

Az esetleges későbbi ipari felhasználás céljából különösen fontosnak tartottam, hogy megvizsgáljam a *Yarrowia* törzsek által termelt színanyagok stabilitását. Az optimálási vizsgálatokat követően tanulmányoztam az élelmiszeripari alkalmazásnál szokásos környezeti körülményeket, figyelembe véve a forralás, a fagyasztás, illetve különböző fény- és hőmérsékleti viszonyok melletti tárolásnak a pigment stabilitására gyakorolt hatását.

A forralási vizsgálat során megállapítottam, hogy a minták abszorbancia értékei szinte változatlanok maradtak a 30 perces forralást követően, bomlás nem volt tapasztalható, a színanyag stabil a forralási körülmények között.

Vizsgáltam a hőmérséklet és a fényben való tárolás hatását is, szobahőmérsékleten és hűtött körülmények között, valamint, fénynek kitett világos helyen és sötétben tárolt fermentlevek stabilitását is követtem, továbbá a fagyasztás hatását is néztem. Nagymértékű csökkenés nem jellemző egyik törzsnél és egyik környezeti paraméter esetén sem. Az eredményekből egyértelműen az olvasható ki, hogy a pigment teljesen stabil, különböző hőmérsékletek és fényviszonyok között nem bomlik le, hosszú tárolás során sem. A fagyasztási vizsgálat során a -18°C -on fagyasztóban tárolt minták abszorbanciáját havonta megmértem a pigment stabilitásának ellenőrzése végett, mely során azt tapasztaltam, hogy az abszorbancia értékek stagnáltak az egyes törzsek esetében, nagy eltérés nem volt megfigyelhető az idő előrehaladtával sem.

Összességében, a fermentációs folyamatok optimálásának eredményeként növelhető a *Yarrowia* élesztők metabolitjainak termelése, továbbá megállapítható, hogy a *Y. divulgata*, valamint *Y. yakushimensis* fajok is rendelkeznek biotechnológiai potenciállal, így ígéretesek lehetnek a *Y. lipolytica* mellett széleskörű ipari felhasználásra.

SUMMARY

Yarrowia lipolytica is one of the most extensively studied and industrially important yeast species. It is known for its strong lipolytic and proteolytic activity as well as its ability to produce pigments. Besides its wide range of applications in the food industry, it is used in citric acid production and in the detergent industry. In addition, this yeast has great potential for the pharmaceutical and healthcare sectors. Furthermore, it also play an important role in biofuel production, and environmental protection. It was long thought to be the only species in its genus: However, recent studies have confirmed that it is a complex group of species, many of which were misidentified as *Yarrowia lipolytica* using traditional methods. So far, because of the industrial importance, most studies focused only on the *Y. lipolytica* species, and less attention was paid to other ones, especially new isolates. No doubt that studies of these new isolates have significant importance and results will contribute new evidence to the community to understand this yeast genus as well as to develop industrial applications.

My research focused on the lipase enzyme and pigment production capabilities of yeast strains, using the following *Yarrowia* strains: *Yarrowia lipolytica* 854/4, 6/3, 4/1; *Yarrowia divulgata* NCAIM Y.02062, 5257, 445/4; *Yarrowia yakushimensis* NCAIM Y.02049, NCAIM Y.02050, NCAIM Y.02052; *Yarrowia porcina* NCAIM Y.02102, 859/4; and *Yarrowia bubula* 441/4. For the most promising strains, the optimisation of the desired metabolites production was aimed by optimizing the fermentation conditions. Furthermore, the use of industrial by-products as natural substrates for the production of lipase enzyme was also examined considering the circular economy models. Additionally, the stability of the brown pigment produced was investigated for potential industrial applications.

The extracellular lipase production of seven different *Yarrowia* strains was screened in the basal medium. Two strains of *Y. divulgata* NCAIM Y.02062 and 5257, as well as *Y. lipolytica* 1/4 strain and *Y. lipolytica* 854/4 strain achieved higher activities in the screening process, therefore these were selected for further studies.

In terms optimization of lipase production it can be concluded, that 1% olive oil effectively induced lipase production in all strains tested. Additionally, Tween 80 at a concentration of 0.05% was found to be effective in enhancing the extracellular lipase activity for all strains, whereas it was effective in the intracellular activity only in the case of *Y. lipolytica* 1/4 strain. Further experiments were performed for the lipase production capabilities of lesser-known *Y. yakushimensis* strains (NCAIM Y.02049, NCAIM Y.02050, NCAIM Y.02052) in YEPD broth with olive oil. The results demonstrated that *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02049 and NCAIM Y.02052 exhibited strong lipase production. Additional tests to evaluate both extracellular and

intracellular activities were performed for these two strains in media supplemented with both olive oil and Tween 80. It was found that Tween 80 also had an inductive effect.

Optimisation of the concentration of olive oil and Tween 80 for maximising extracellular lipase production by selected strains was performed using central composite design (CCD) a part of the response surface method.

The equations describe the model were established, and the concentrations required for maximum enzyme production were determined. The highest activity was measured for *Y. lipolytica* 854/4, and significant differences in enzyme activity were observed among different settings. The other three examined strains (*Y. lipolytica* 1/4, *Y. divulgata* 5257, *Y. divulgata* NCAIM Y.02062) showed less variation in both activity levels and maximum enzyme production. Generally, it can be concluded that the higher concentration of olive oil and Tween 80, the higher the enzyme activity. For further research, YEPD broth containing both compounds were applied.

Due to the limited literature is available on the effect of aeration on lipase secretion in *Yarrowia* yeasts, this was also investigated. It was found that the most effective shaking speed for *Y. lipolytica* 1/4, *Y. lipolytica* 854/4, *Y. divulgata* 5257, and *Y. divulgata* NCAIM Y.02062 was 130 rpm. Under this condition, lipase production was significantly more efficient, as these four yeasts produced 2-3 times more enzyme than at 100 or 160 rpm. Therefore, this shaking speed was applied in the further experiments.

Optimizing the amount of inoculum is also a critical factor in fermentation processes. The effect of initial cell concentration on lipase production in *Y. lipolytica* 854/4, *Y. divulgata* 5257, *Y. divulgata* NCAIM Y.02062, and three *Y. yakushimensis* strains at cell concentrations of 10^6 , 5×10^6 , and 10^7 CFU/mL were examined. The lowest concentration (10^6 CFU/ml) was not the most effective for any strain. However, no significant differences in enzyme production were observed between 5×10^6 and 10^7 CFU/mL, so a 24-hour inoculum at the optimal concentration for each strain was applied in the following fermentations.

To enhance enzyme production, the effect of Triton X-100 and Tween 80 on lipase activity was investigated using a central composite design (CCD) with five *Yarrowia* strains (*Y. lipolytica* 854/4, *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02049, *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052, *Y. divulgata* NCAIM Y.02062, *Y. divulgata* 5257) in YEPD broth with olive oil. Statistical analysis confirmed that both Tween 80 and Triton X-100 had significant effects on enzyme production. While higher concentrations (0.07-0.09%) of Tween 80 were more effective, Triton X-100 was beneficial at lower concentrations (0.01-0.02%).

As a result of these optimization processes, a more than 50-fold increase in activity was observed in *Y. divulgata* strains and a more than 100-fold increase in *Y. lipolytica* 854/4.

In addition, the pH and temperature optima for extracellular and intracellular crude lipase enzymes derived from *Y. lipolytica* 1/4, *Y. lipolytica* 854/4, *Y. divulgata* 5257, *Y. divulgata* NCAIM Y.02062, *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02049, and *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052 were determined. Enzyme activity assay was performed in a temperature range of 30°C to 45°C. and the highest activity detected at 37°C. The pH was optimized using Sorensen buffers (pH 5–8) and pH 7.2 was found to be optimal for lipase activity in both fractions.

Various vegetable oils (olive oil as a control, coconut oil, walnut oil, grapeseed oil, sesame oil, sunflower oil, corn oil, used cooking oil, and rapeseed oil) were compared as natural substrates for lipase enzyme production of *Y. lipolytica* 854/4 and *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052 strain at a 1% concentration. The results showed that olive oil and sunflower oil were the best inducers for both strains. Specifically, *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052 exhibited the highest lipase activity when olive oil was used as substrate, while *Y. lipolytica* 854/4 performed best with sunflower oil. In addition, used frying oil, as a potentially recyclable waste for enzyme fermentation, demonstrated promising efficiency compared to several other tested oils.

Due to the increasing importance of circular economy principles, an experiment was designed to investigate the feasibility of using industrial by-products (oilseed cakes) for lipase enzyme fermentation. Five different oilseed pellets—pumpkin seed, golden flaxseed, sunflower seed, peanut, and hemp seed were tested. Among them, golden flaxseed pellet proved to be the best inducer for both *Y. lipolytica* 854/4 and *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052. However, while *Y. lipolytica* 854/4 reached maximum lipase activity at 24 hours, *Y. yakushimensis* NCAIM Y.02052 did not achieved this until 72 hours.

The effects of different concentrations (0.5%, 1%, and 2%) of the most promising plant oils (olive and sunflower), pellet (golden flaxseed), and used frying oil on the lipase production for both strains were investigated. The results generally showed that the higher the substrate concentrations, the higher the enzymatic activity. For both yeast strains, olive oil and sunflower oil were the most effective inducers at both 1% and 2%, and 2% concentrations, respectively. The highest lipase activity was observed with a 2% olive oil substrate. Although the used frying oil was not the most efficient inducer, increasing its concentration in the fermentation medium significantly enhanced the lipase activity. In contrast, golden flaxseed pellet was the least effective substrate, yielding the lowest lipase activity at all tested concentrations.

Another major focus of my research was to study brown pigment production in *Yarrowia* yeast strains. Seven different *Yarrowia* strains (*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, and *Y. divulgata* 5257) were screened on agar containing tyrosine. All strains produced pigments, but at different levels. For further optimization experiments *Y. lipolytica* 6/3, *Y. lipolytica* 854/4, *Y. divulgata*

NCAIM Y.02062, and *Y. divulgata* 5257 strains were selected and tested in submerged fermentation. The fermentation medium was first optimised by supplementing the basal medium (containing tyrosine) with different amino acids - glycine, L-glutamine, and L-asparagine - and, in some cases, lactic acid. Among the tested strains, *Y. lipolytica* 6/3 exhibited the highest pigment production in the medium supplemented with amino acids. Between the two *Y. divulgata* strains, *Y. divulgata* 5257 proved to be the better pigment producer. There is some debated in the literature about the effect of lactic acid as an inducer, but my experiments showed that its inclusion led to increased pigment synthesis in most strains compared to the basal medium. Overall, the most effective medium for all strains was the one supplemented with amino acids only. Additionally, it can be concluded that a neutral pH range favored the pigment synthesis. To achieve the required pH, different buffer systems (McIlvaine and Sørensen) were used and also adjusted the pH with NaOH in amino acid supplemented media, comparing the results with a control medium prepared by water. When lactic acid was tested in combination with buffers and the pH was adjusted to neutral, pigment synthesis was generally enhanced.

The most effective was the medium contained NaOH for *Y. lipolytica* 6/3, *Y. divulgata* NCAIM Y.02062, and *Y. divulgata* 5257, whereas for *Y. lipolytica* 854/4, the McIlvaine buffer without lactic acid supplementation was the best. However, no significant differences were observed between the different initial media. Based on economic aspects, the control medium prepared with water was applied for further studies.

The effect of different shaking speeds (100 rpm, 130 rpm, and 160 rpm) on pigment synthesis was investigated, since *Y. lipolytica* is an obligate aerobic yeast and aeration can enhance metabolic processes and therefor increase pigment production. The results showed that the optimum speed varied between strains, but overall, aeration had no significant ieffect on pigment synthesis. Consequently, 130 rpm was used for further experiments.

The effect of inoculum age on pigment production was also investigated. 16, 24, and 48 hours were used for inoculum growth. The findings, supported by literature data, showed that while inoculum age influences fermentation efficiency, a 24-hour inoculum was the most practical choice based on economic and technological aspects.

Furthermore, the effect of initial inoculum cell density on pigment production was studied using concentrations of 10^6 , 5×10^6 , and 10^7 cells/mL. The results showed that cell concentration had a significant effect on pigment synthesis. The optimum concentrations were 5×10^6 CFU/mL for *Y. lipolytica* 6/3, 10^6 CFU/mL for *Y. lipolytica* 854/4 and *Y. divulgata* 5257, and 10^7 CFU/mL for *Y. divulgata* NCAIM Y.02062. These values were used in further fermentations.

Trace elements also affect pigment synthesis, so the effect of Mn^{2+} at different concentrations (0, 0.1, 0.2, and 0.5 g/L) were investigated. The results clearly showed that Mn^{2+} had a positive effect on the pigment synthesis of *Yarrowia*, the higher the Mn^{2+} concentrations, the higher the pigment yields. A concentration of 0.5 g/L Mn^{2+} resulted in the highest absorbance. During the optimisation process, *Y. lipolytica* 6/3 was the most efficient pigment producer among the tested strains, achieving a sevenfold increase in absorbance compared to the initial value.

For potential applications in the food industry, the stability of the pigments produced by *Yarrowia* strains was investigated including boiling, freezing, and storage under different light and temperature conditions. Boiling tests showed that the pigment absorbance remained unchanged after 30 minutes of boiling, indicating high thermal stability.

Storage tests under different temperature and light conditions (room temperature vs. refrigeration and freezing at $-18^{\circ}C$, and exposure to light exposure vs. darkness) demonstrated that pigment stability remained high over time under all conditions. The results confirmed that *Yarrowia* pigments do not degrade over long storage periods under various environmental conditions.

In summary, optimization of fermentation processes can improve the production of *Yarrowia* metabolites. Furthermore, *Y. divulgata* and *Y. yakushimensis* species show promising biotechnological potential besides *Y. lipolytica*, suggesting their potential for broad industrial applications.

9. IRODALOMJEGYZÉK

Acikel U., Ersan M., Acikel Y. S. (2011): The effects of the composition of growth medium and fermentation conditions on the production of lipase by *R. delemar*, *Turk. J. Biol.* 35, 35-44, DOI: 10.3906/biy-0902-14

Adrio, J. L. (2017): Oleaginous yeasts: Promising platforms for the production of oleochemicals and biofuels. *Biotechnol Bioeng.* 114(9), 1915-1920. DOI: 10.1002/bit.26337.

Agarwal, H., Bajpai S., Mishra A., Kohli I., Varma A., Fouillaud M., Dufossé L. Joshi, N.C. (2023): Bacterial Pigments and Their Multifaceted Roles in Contemporary Biotechnology and Pharmacological Applications. *Microorganisms*, 11, 614. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030614>

Aghajanyan, A. E.; Hambardzumyan, A. A.; Hovsepyan, A. S.; Asaturian, R. A.; Vardanyan, A. A.; Saghiyan, A. A. (2005): Isolation, purification and physicochemical characterization of water-soluble *Bacillus thuringiensis* melanin. *Pigment Cell Research* 18(2), 130–135. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.2005.00211.x>

Ali, S., Khan S. A., Hamayun M., Lee I. J. (2023): The recent advances in the utility of microbial lipases: A review. *Microorganisms*, 11 (2), 510., <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020510>

Almeida, A. F. D., Terrasan, C. R. F., Terrone, C. C., Tauk-Tornisiello, S. M., and Carmona, E. C. (2018). Biochemical properties of free and immobilized *Candida viswanathii* lipase on octyl-agarose support: hydrolysis of triacylglycerol and soy lecithin. *Process Biochem.* 65, 71–80. DOI: 10.1016/j.procbio.2017.10.019

Amaral, P. F. F.; Freire, M. G.; Rocha-Leao, M. H. M.; Marrucho, I. M.; Coutinho, J. A. P.; Coelho, M. A. Z. (2008): Optimization of oxygen mass transfer in a multiphase bioreactor with perfluorodecalin as a second liquid phase. *Biotechnol. Bioeng.* 99, 588–598.

Amin, M., Bhatti, H. N. (2014): Effect of physicochemical parameters on lipase production by *Penicillium fellutanum* using canola seed oil cake as substrate. *International Journal of Agriculture and Biology*, 16(1). https://www.researchgate.net/profile/Misbah-Amin/publication/285953245_Effect_of_Physicochemical_Parameters_on_Lipase_Production_by_Penicillium_fellutanum_using_Canola_Seed_Oil_Cake_as_Substrate/links/5c502795458515a4c748066a/Effect-of-Physicochemical-Parameters-on-Lipase-Production-by-Penicillium-fellutanum-using-Canola-Seed-Oil-Cake-as-Substrate.pdf

Anand J., Ramamoorthy K., Sagaya John Paul J., Sreekala K. G., Sathuvan M., Bhavani L., Nagaraj S. (2022): Oil cake extract as low-cost alternative media for increasing lipid and biomass productivity in *Scenedesmus quadricauda* for biofuel applications. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-10. <https://doi.org/10.1007/s13399-022-03135-3>

Azhar, S. H. M., Abdulla, R., Jambo, S. A., Marbawi, H., Gansau, J. A., Faik, A. A. M., Rodrigues, K. F. (2017): Yeasts in sustainable bioethanol production: A review, *Biochemistry and Biophysics Reports*, 10, 52-61, ISSN 2405-5808, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.03.003>.

Barnett, T. A., Valenzuela, D., Riner, S., Hageman, J. H. (1983): Production by *Bacillus subtilis* of brown sporulation-associated pigments. *Canadian Journal of Microbiology*, 29(1), 96-101. DOI: <https://doi.org/10.1139/m83-015>

- Barriga, E. J. C., Libkind, D., Briones, A. I. (2011): Yeasts biodiversity and its significance: case studies in natural and human-related environments, ex situ preservation, applications and challenges, In: Grillo, O. (Ed.): Changing Diversity in Changing Environment, InTech, Europe, 55-86.
- Becker P., Abu-Reesh I., Markossian S., Antranikian G., Märkl H. (1997): Determination of the kinetic parameters during continuous cultivation of the lipase-producing thermophile *Bacillus* sp. IHI-91 on olive oil, *Appl Microbiol Biotechnol* 48, 184-190, DOI: <https://doi.org/10.1007/s002530051036>
- Belozerskaya, T. A., Gessler, N. N., & Aver'yanov, A. A. (2017): Melanin pigments of fungi. *Fungal Metabolites*, 263-291.
- Beopoulos A., Chardot T., Nicaud J-M (2009): *Yarrowia lipolytica*: A model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation. *Biochimie*. 9(6), 692-696.
- Blanc, P. J., Loret, M. O., Santerre, A.L., Pareilleux, A., Prome, D., Prome, J. C., Laussac J. P., Goma G. (1994): Pigments of *Monascus*, *J. Food Sci.* 59, 862–865. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1994.tb08145.x>
- Boekema B. K. H. L., 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), DOI: <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. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms160920774>
- Bramley, P. M. (2000): Is lycopene beneficial to human health?, *Phytochemistry*, 54(3), 233-236, ISSN 0031-9422, DOI: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00103-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00103-5).
- 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. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.11.016>
- Butinar, L., Santos, S., Spencer-Martin, I., Oren, A., Gunde-Cimerman, N. (2005): Yeast diversity in hypersaline habitats. *FEMS Microbiology Letters*. 244(2), 229-34.
- Bühler, R.M.M., Müller, B.L., Moritz, D.E. *et al.* (2015): Influence of light intensity on growth and pigment production by *Monascus ruber* in submerged fermentation. *Appl Biochem Biotechnol* 176, 1277–1289, DOI: <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1645-8>
- Carvalho T., Finotelli P. V., Bonomo R. C. F., Franco M., Amaral P. F. F. (2017): Evaluating aqueous two-phase systems for *Yarrowia lipolytica* extracellular lipase purification, *Process Biochemistry*, 53, 259-266, ISSN 1359-5113, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.11.019>.
- Carreira, A., Loureiro, V. (1998): A differential medium to detect *Yarrowia lipolytica* within 24 hours. *Journal of Food Mycology*, 1, 3-12.

- Carreira, A. Ferreira, L. M. Loureiro, V. (2001 a): Brown pigments produced by *Yarrowia lipolytica* result from extracellular accumulation of homogentisic acid. *Appl Environ Microbiol* 67(8), DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.67.8.3463-3468.2001>
- Carreira, A., Ferreira, L. M., Loureiro, V. (2001 b). Production of brown tyrosine pigments by the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Applied Microbiology*, 90(3), 372-379. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01256.x>
- Casas-Godoy L., Duquesne, S., Bordes, F., Sandoval, G., Marty, A. (2012): Lipases: An overview. In: Sandoval, G. (ed.): Lipases and phospholipases: methods and protocols. *Methods in molecular biology*. Humana Press, New York, pp. 3-30.
- 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
- 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>
- Cavallo, E., Charreau, H., Cerrutti, P., Foresti, M. L. (2017): *Yarrowia lipolytica*: A model yeast for citric acid production. *FEMS Yeast Res.* 17, 8. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fox084>
- Cecchi, T., Pezzella, A., Di Mauro, E., Cestola, S., Ginsburg, D., Luzi, M., Santato, C. (2019): On the antioxidant activity of eumelanin biopigments: a quantitative comparison between free radical scavenging and redox properties. *Natural Product Research*, 34(17), 2465–2473. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1542391>
- Chen, Q., Kong B., Han Q., Xia X., Xu L. (2017): The role of bacterial fermentation in lipolysis and lipid oxidation in Harbin dry sausages and its flavour development. *LWT*, 77, 389-396., <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.075>
- Cho, Y. J., Hwang, H. J., Kim, S. W., Song, C. H., Yu, J., W. (2002): Effect of carbon source and aeration rate on broth rheology and fungal morphology during red pigment production by *Paecilomyces sinclairii* in a batch bioreactor, *Journal of Biotechnology* 95, 1, 25 April, Pages 13-23, [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00445-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00445-X)
- Choudhury, P., Bhunia, B. (2015): Industrial application of lipase: a review. *Biopharm J*, 1(2), 41-47.
https://www.researchgate.net/profile/Payel_Choudhury_nit_Agartala/publication/293133846_Industrial_application_of_lipase_a_review/links/6049b1efa6fdcc4d3e56078f/Industrial-application-of-lipase-a-review.pdf
- Coelho, M. A. Z., Amaral, P. F. F., & Belo, I. (2010): *Yarrowia lipolytica*: an industrial workhorse. Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology, 2, 930-940.
- Colla, L. M.; Primaz, A. L.; Benedetti, S.; Loss, R. A.; de Lima, M.; Reinehr, C. O.; Bertolin, T. E.; Costa, J. A. V. (2016): Surface response methodology for the optimization of lipase production under submerged fermentation by filamentous fungi, *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 2, 461-467, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.01.028>.

- Corzo G., Revah S. (1999): Production and characteristics of the lipase from *Yarrowia lipolytica* 681. *Bioresource Technology* 70(2):173-180, DOI: [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00024-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00024-3)
- Darvishi, F., Destain, J., Nahvi, I., Thonart, P., Zarkesh-Esfahani, H. (2011): High-level production of extracellular lipase by *Yarrowia lipolytica* mutants from methyl oleate. *N Biotechnol.* 28. 6. 756-760. DOI: 10.1016/j.nbt.2011.02.002.
- Darvishi, F., Nahvi, I., Zarkesh-Esfahani, H., Momenbeik, F. (2009): Effect of plant oils upon lipase and citric acid production in *Yarrowia lipolytica* yeast. *BioMed Research International*, (1), 562943.
- da Silva, J. L., Sales, M. B., de Castro Bizerra, V., Nobre, M. M. R., de Sousa Braz, A. K., da Silva Sousa, P., Cavalcante, A. L. G., Melo, R. L. F., Gonçalves De Sousa Junior, P., Neto, F. S. et al. (2023): Lipase from *Yarrowia lipolytica*: Prospects as an Industrial Biocatalyst for Biotechnological Applications. *Fermentatio*, 9, 581. <https://doi.org/10.3390/fermentation9070581>
- Deák T., Kiskó, G., Maráz, A., Mohácsiné Farkas Cs. (2006): Élelmiszer mikrobiológia. 1 fejezet. Élelmiszerek mikrobiális ökológiája, 3. fejezet Mikroorganizmusok áttekintése. Mezőgazda Kiadó, Magyarország https://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/2011_0001_521_Elelmiszer-mikrobiologia/ch03s03.html
- 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>
- Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. R., Paredes-López, O. (2010). Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains—characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40 (3), pp. 173-289.
- Destain J., Roblain D., Thonart, P. (1997): Improvement of lipase production from *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology Letters* 19, 105–108, DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1018339709368>
- Di Mauro, E., Xu, R., Soliveri, G., Santato, C. (2017): Natural melanin pigments and their interfaces with metal ions and oxides: emerging concepts and technologies. *MRS Communications*, 7 (2), pp. 141-151. DOI: <https://doi.org/10.1557/mrc.2017.33>
- Di Salvo E., Lo Vecchio G., De Pasquale R., De Maria L., Tardugno R., Vadalà R., Nicola Cicero N. 2023: Natural pigments production and their application in food, health and other industries., *Nutrients* 15(8), 1923; <https://doi.org/10.3390/nu15081923>
- Divakar S., Manohar B. (2007): Use of lipases in the industrial production of esters. In: Polaina J., MacCabe A. P. (eds.): *Industrial Enzymes. Structure, Function and Applications*. Springer, Dordrecht, pp. 283-300
- Domínguez, A.; Deive, F.J.; Sanromán, M.A.; Longo, M. 2003: Effect of lipids and surfactants on extracellular lipase production by *Yarrowia lipolytica*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 78, 1166–1170. <https://doi.org/10.1002/jctb.922>.

- Dominguez A., Deive F.J., Sanromán M.A., Longo M. (2010): Biodegradation and utilization of waste cooking oil by *Yarrowia lipolytica* CECT 1240. *European Journal of Lipid Science and Technology* 112: 1200-1208, DOI: <https://doi.org/10.1002/ejlt.201000049>
- dos Santos R., M., Battaglia Hirata, D., de Alencar Figueira Angelotti, J. (2022): Lipases: Sources of acquisition, ways of production, and recent applications. *Catalysis Research*, 2(2), 1-43. doi:10.21926/cr.2202013
- Dufossé, L. (2006): Microbial production of food grade pigments. *Food Technology and Biotechnology*, 44 (3), 313-323. <https://hrcak.srce.hr/109913>
- Eastmond, P. J. (2006): SUGAR-DEPENDENT1 encodes a patatin domain triacylglycerol lipase that initiates storage oil breakdown in germinating Arabidopsis seeds. *Plant Cell* 18, pp. 665-675, DOI: <https://doi.org/10.1105/tpc.105.040543>
- El-Ahmady El-Naggar, N., El-Ewasy S. M. (2017): Bioproduction, characterization, anticancer and antioxidant activities of extracellular melanin pigment produced by newly isolated microbial cell factories *Streptomyces glaucescens* NEAE-H, *Scientific Reports* 14;7:42129 DOI: <https://doi.org/10.1038/srep42129>
- 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)
- Encyclopædia Britannica*: Biochrome - biological pigment, Retrieved 27. January 2010., <https://www.britannica.com/science/biochrome>
- Fabiszewska, A. U., Bialecka-Florjanczyk, E. (2014): Factors influencing synthesis of extracellular lipases by *Yarrowia lipolytica* in medium containing vegetable oils. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 4(3), 231., <https://www.proquest.com/openview/321aadd80104f0b7e25ba02870af0336/1?pq-origsite=gscholar&cbl=1966353>
- Fabiszewska, A. U.; Stolarzewicz, I. A.; Zamojska, W. M.; Bialecka-Florjanczyk, E. (2014): Carbon source impact on *Yarrowia lipolytica* KKP379 lipase production. *Appl. Biochem. Microbiol.* 50, 404–410. DOI: <https://doi.org/10.1134/S000368381404005X>.
- Fabre, C. E., Santerre, A. L., Loret, M. O., Baberian, R., Pareilleux A., Goma, G., Blanc, P. J., (1993): Production and food applications of the red pigments of *Monascus ruber*, *J. Food Sci.* 58 (1993) 1099–1102, 1110 DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1993.tb06123.x>
- Farias, M. A., Valoni, E. A., Castro, A., Coelho, M. A. (2014): Lipase production by *Yarrowia lipolytica* in solid state fermentation using different agro industrial residues. *Chemical Engineering Transactions*, 38, 301-306., <https://doi.org/10.3303/CET1438051>
- 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>
- 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, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.09.004>

- Filho, D. G., Silva, A. G., Guidini, C. Z. (2019): Lipases: sources, immobilization methods, and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103, 7399-7423., <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10027-6>
- Fu, X., Xie, M., Lu, M., Shi, L., Shi, T., Yu, M. (2022): Characterization of the physicochemical properties, antioxidant activity, and antiproliferative activity of natural melanin from *S. reiliana*. *Scientific Reports*, 12(1), 2110. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-05676-z>
- Galvagno M. A., Iannone L. J., Bianchi J., Kronberg F., Rost E., Carstens M. R., Cerrutti P. (2011): Optimization of biomass production of a mutant of *Yarrowia lipolytica* with an increased lipase activity using raw glycerol. *Rev Argent Microbiol.* 43(3):218-25. DOI: 10.1590/S0325-75412011000300010
- Garcia-Cortes, A., Garcia-Vásquez, J. A., Aranguren, Y., Ramirez-Castrillon, M. (2021): Pigment production improvement in *Rhodotorula mucilaginosa* AJB01 using design of experiments. *Microorganisms*, 9(2), 387. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020387>
- Ghosh, P. K., Saxena, R. K., Gupta, R., Yadav, R. P., & Davidson, S. (1996): Microbial lipases: production and applications. *Science Progress* 79(2) 119–157. <http://www.jstor.org/stable/43421608>
- Gmoser, R.; Ferreira, J. A.; Lundin, M.; Taherzadeh, M.J.; Lennartsson, P. R. (2018): Pigment Production by the Edible Filamentous Fungus *Neurospora Intermedia*. *Fermentation* 4, 11. <https://doi.org/10.3390/fermentation4010011>
- Godoy, M. G.; Gutarra, M. L. E.; Maciel, F. M.; Felix, S. P.; Bevilaqua, J. V.; Machado, O. L. T.; Freire, D. M. G. (2009): Use of a low-cost methodology for biodegradation of castor bean waste and lipase production. *Enzyme and Microbial Technology*, 44, 5, 317-322, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.01.002>.
- Gouliamova, D. E., Dimitrov, R. A., Guéorguiev, Smith, M. T., Groenewald M. (2017): *Yarrowia parophonii*. *Fungal Planet* 628
- Gonçalves, F. A. G., Colen, G., Takahashi, J. A. (2014): *Yarrowia lipolytica* and its multiple applications in the biotechnological industry. *The Scientific World Journal*, 2014: 476207. DOI: 10.1155/2014/476207.
- Gowthami, P., Muthukumar, K., Velan, M. (2015): Utilization of coconut oil cake for the production of lipase using *Bacillus coagulans* VKL1. *Biocontrol Science*, 20(2), 125-133.
- Groenewald, M., Boekhout, T., Neuvéglise, C., Gaillardin, C., Van Dijck, P. W., Wyss, M. (2014): *Yarrowia lipolytica*: safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential. *Critical Reviews in Microbiology*, 40 (3), 187-206.
- 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 (5):1023-1028. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10482-013-9882-8>
- Guo, J., Rao, Z., Yang, T., Man, Z., Xu, M., Zhang, X. (2014): High-level production of melanin by a novel isolate of *Streptomyces kathirae*, *FEMS Microbiology Letters*, 357, 1, 85–91, <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12497>

- Guo, Z., Jia, X., Zheng, Z., Lu, X., Zheng, Y., Zheng, B., Xiao, J. (2018): Chemical composition and nutritional function of olive (*Olea europaea* L.): A review. *Phytochemistry Reviews*, 17, 1091-1110. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11101-017-9526-0>
- Guo, Y.; Xie, S.; Yuan, J. S.; Kao, K.C. (2019): Effects of seawater on carotenoid production and lipid content of engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Fermentation* 5(1) 6. <https://doi.org/10.3390/fermentation5010006>
- Gutiérrez-Arnillas, E., Arellano M., Deive F. J., Rodríguez A., Sanromán M. A. (2017): Unravelling the suitability of biological induction for halophilic lipase production by *Halomonas* sp. LM1C cultures, *Bioresour. Technol.*, 239, 368-377, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.128>
- Hasan F., Shah A. A., Hameed A. (2006): Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*. 39 235–251, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.10.016>
- Hatha, A. M., Sumayya, N. S. (2023): Antioxidants from marine cyanobacteria. In *Marine Antioxidants* (pp. 119-131). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-95086-2.00010-2>
- Heard, G. M., Fleet, G. H. (1999): CANDIDA | *Yarrowia (Candida) lipolytica*, (ed) Robinson, R. K., *Encyclopedia of Food Microbiology*, Elsevier, pp. 360-365. <https://doi.org/10.1006/rwfm.1999.0285>
- Helisto, P., Korpela, T., (1998): Effects of detergents on activity of microbial lipases as measured by the nitrophenyl alkanoate esters method. *Enzyme Microb. Technol.* 23, 113–117, DOI: [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(98\)00024-6](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(98)00024-6)
- Higuera-Ciapara I., Félix-Valenzuela L., Goycoolea F. M., (2007): Astaxanthin: A Review of its chemistry and applications, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, <https://doi.org/10.1080/10408690590957188>
- Hochstein, V., Schoen, S. (2009): *U.S. Patent No. 7,485,183*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Honda, S., Takekoshi, Y., Arai, Y. (1995): *U.S. Patent No. 5,380,359*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Huang, Y., Zhu, H., Cheng, Y., Zhao, C., Xu, Y., Wang, Z., Chen, X., Zhao, Y., Tian, Y. (2024): Isolation, purification, characterization and stability analysis of melanin pigment from *Mesona chinensis*. *Food Chemistry*, 141249. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.141249>
- IARC International Agency for Research on Cancer (1998): *Handbooks of Cancer Prevention. Carotenoids* 15. p.
- Iqbal S. A., Rehman A. (2015): Characterization of lipase from *Bacillus subtilis* I-4 and its potential use in oil contaminated wastewater, *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 58, 789-797, DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-89132015050318>
- Jayaseelan, S., Ramaswamy, D. & Dharmaraj, S. Pyocyanin: production, applications, challenges and new insights. *World J Microbiol Biotechnol* 30, 1159–1168 (2014). <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1552-5>
- Joshi, V. K., Attri, D., Bala, A., Bhushan, S. (2003): Microbial pigments. *Indian Journal of Biotechnology*. 2:362-369 <https://nopr.niscpr.res.in/handle/123456789/11334>

- 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
- Kanimozhi S, Perinbam K. (2010): Optimization of Media Components and Growth Conditions to Enhance Lipase Production by *Pseudomonas* sp. Lp1. *Biomed Pharmacol J.*, 3(2).: <http://biomedpharmajournal.org/?p=1562>
- Khilyas, I. V., Ziganshin, A. M., Pannier, A. J., Gerlach, R. (2013): Effect of ferrihydrite on 2,4,6-trinitrotoluene biotransformation by an aerobic yeast. *Biodegradation*. 24 (5): 631–644, DOI: <https://doi.org/10.1007/s10532-012-9611-4>
- Kim, H. J., Kim, J. H., Oh, H. J., Shin, C. S. (2002): Morphology control of *Monascus* cells and scale-up of pigment fermentation. *Process Biochemistry*, 38(5), 649-655. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00095-X](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00095-X)
- Kiran, S., Arshad, Z., Nosheen, S., Kamal, S., Gulzar, T., Majeed, M. S., Jannat, M., Rafique, M. A. (2016): Microbial lipases: production and applications: a review. *J Biochem Biotechnol Biomater*, 1(2), 7-20.
- Kumar, A., Parihar, S. S., Batra, N. (2012): Enrichment, isolation and optimization of lipase-producing *Staphylococcus* sp. from oil mill waste (Oil cake), *Journal of Experimental Sciences* 3(8): 26-30, ISSN: 2218-1768, Available Online: <http://jexpsciences.com/>
- Kumar, A., Vishwakarma, H. S., Singh, J., Dwivedi, S., Kumar, M. (2015): Microbial pigments: production and their applications in various industries. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*. 5(1):203-212.
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., Boekhout T. (2011): The Yeasts, a Taxonomic Study. Volume 5. Amsterdam: Elsevier, 2080 p. ISBN: 9780444521491
- Lackmann, Alec R.; Andrews, Allen H.; Butler, Malcolm G.; Bielak-Lackmann, Ewelina S.; Clark, Mark E. (2019). "Bigmouth Buffalo *Ictiobus cyprinellus* sets freshwater teleost record as improved age analysis reveals centenarian longevity". *Communications Biology*. 2 (1). DOI:[10.1038/s42003-019-0452-0](https://doi.org/10.1038/s42003-019-0452-0). ISSN 2399-3642.
- Lemahieu, C., Bruneel, C., Ryckebosch, E., Muylaert, K., Buyse, J., & Foubert, I. (2015). Impact of different omega-3 polyunsaturated fatty acid (n-3 PUFA) sources (flaxseed, *Ischrysis galbana*, fish oil and DHA Gold) on n-3 LC-PUFA enrichment (efficiency) in the egg yolk. *Journal of functional foods*, 19, 821-827. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.04.021>
- Li L., Zhang S., Wu W., Guan W., Deng Z., Qiao H. (2019): Enhancing thermostability of *Yarrowia lipolytica* lipase 2 through engineering multiple disulfide bonds and mitigating reduced lipase production associated with disulfide bonds. *Enzyme and Microbial Technology*, 126, 41-49, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.03.008>
- Libkind, D., van Broock, M. (2006): Biomass and carotenoid pigment production by patagonian native yeasts. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22, 687-692. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11274-005-9091-3>
- Liu, Y. S., Wu, J. Y., Ho, K. P. (2006): Characterization of oxygen transfer conditions and their effects on *Phaffia rhodozyma* growth and carotenoid production in shake-flask cultures. *Biochemical Engineering Journal*, 27(3), 331-335. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.08.031>

- Liu, C-H.; Chen, C-Y.; Wang, Y-W.; Chang, J-S. (2011): Fermentation strategies for the production of lipase by an indigenous isolate *Burkholderia* sp. C20, *Biochemical Engineering Journal*, 58–59, 96–102 <https://doi.org/10.1016/j.bej.2011.09.001>
- Liu, K. F., Li, X. H., Hui, F. L. (2018): *Yarrowia brassicae* f.a., sp. nov., a new yeast species from traditional Chinese sauerkraut. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 68(6):2024–2027. DOI: 10.1099/ijsem.0.002783
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N. (2010): Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4 (8), 118. DOI: [10.4103/0973-7847.70902](https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902)
- Lopes, M.; Miranda, S. M.; Alves, J. M.; Pereira, A. S.; Belo, I. (2019): Waste Cooking Oils as Feedstock for Lipase and Lipid-Rich Biomass Production. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 121, 1800188.
- López-Trujillo, J., Mellado-Bosque, M., Ascacio-Valdés, J. A. (2023): Prado-Barragán, L.A.; Hernández-Herrera, J.A.; Aguilera-Carbó, A.F. Temperature and pH optimization for protease production fermented by *Yarrowia lipolytica* from agro-industrial waste. *Fermentation* 9, 819. <https://doi.org/10.3390/fermentation9090819>.
- 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
- Lv, J., Zhang, B-B., Liu, X-D., Zhang, C., Chen, L., Xu, G. R., Chi, P., Cheung K. (2017): Enhanced production of natural yellow pigments from *Monascus purpureus* by liquid culture: The relationship between fermentation conditions and mycelial morphology, *Journal of Bioscience and Bioengineering* Volume 124, Issue 4, October, Pages 452–458, <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.05.010>
- 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>
- Mahmood, H. M., Mohammed, A. K., Flayyih, M. T. A. (2015): Purification and physiochemical characterization of pyomelanin pigment produced from local *Pseudomonas aeruginosa* isolates, *World Journal of Pharmaceutical Research*, Volume 4, Issue 10, 289–299, ISSN 2277– 7105, https://wjpr.s3.ap-south-1.amazonaws.com/article_issue/1443596604.pdf
- Martínez-Martínez M., Bargiela R., Ferrer M. (2017): Metagenomics and the search for industrial enzymes. In: Brahmachari, G. (ed.): *Biotechnology of microbial enzymes*. Academic Press, Oxford, pp. 167–184
- Martínez, L. M., Martinez, A., Gosset, G. (2019): Production of melanins with recombinant microorganisms, *Front Bioeng Biotechnol.* 2019; 7: 285. Published online 2019 Oct 24. DOI: [10.3389/fbioe.2019.00285](https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00285)
- Malik, K., Tokkas, J., Goyal, S. (2012). Microbial pigments: a review. *Int J Microbial Res Technol*, 1(4), 361–365.
- Marova, I., Carnecka, M., Halienova, A., Certik, M., Dvorakova, T., Haronikova, A. (2012): Use of several waste substrates for carotenoid-rich yeast biomass production. *Journal of Environmental Management*, 95, 338–342. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2011.06.018>

- 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
- Méndez, A., Pérez, C., Montañéz, J. C., Martínez, G., Aguilar, C., N. (2011): Red pigment production by *Penicillium purpurogenum* GH2 is influenced by pH and temperature. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 12, 961–968. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1100039>
- Miears, W. H. (2018): Staphyloxanthin mutants of *Staphylococcus aureus* and their response to antimicrobials, Angelo State University, BSc thesis <http://hdl.handle.net/2346.1/30859>
- Musa, N. N., Yusof, N. Z. (2019): Chemical and physical parameters affecting bacterial pigment production, *Science Direct Materials Today: Proceedings* 19. 1608–1617, <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.11.189>
- Nascimento F. V. D., Lemes A. C., Castro A. M. D., Secchi A. R., Zarur Coelho M. A. (2022): A Temporal Evolution Perspective of Lipase Production by *Yarrowia lipolytica* in Solid-State Fermentation. *Processes*, 10(2), 381. <https://doi.org/10.3390/pr10020381>
- Nagia, F. A., EL-Mohamedy, R. S. R. (2007): Dyeing of wool with natural anthraquinone dyes from *Fusarium oxysporum*, *Dyes and Pigments*, 75, 3, 550-555 <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2006.07.002>
- Nagy E., Niss M., Dlačny D., Arneborg N., Nielsen D.S., Péter G. (2013): *Yarrowia divulgata* f.a., sp. nov., a yeast species from animal-related and marine sources. *International Journal of Systematic and Evolutional Microbiology*. 63:4818-4823. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.057208-0>
- Nagy E., Dlačny D., Medeiros A.O., Péter G., Rosa C.A. (2014): *Yarrowia porcina* sp. nov. and *Yarrowia bubula* f.a. sp. nov., two yeast species from meat and river sediment. *Antonie van Leeuwenhoek*, 105 (4):697-707. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10482-014-0125-4>
- Negi, S. (2019): Lipases: A promising tool for food industry. *Green Bio-processes: Enzymes in Industrial Food Processing*, 181-198. ISBN: 978-981-13-3262-3, <https://doi.org/10.1007/978-981-13-3263-0>
- Nicaud, J. M. (2012): *Yarrowia lipolytica*. *Yeast*, 29 (10), 409-418.
- Nigam, P. S., Luke, J. S. (2016). Food additives: production of microbial pigments and their antioxidant properties. *Current Opinion in Food Science*, 7, 93-100. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.02.004>
- Nunes, P. M. B., Martinsa, A. B., Brigidab, A. I. S., Míguez da Rocha-Leãoa, M. H., Amarala P. (2014): Intracellular Lipase production by *Yarrowia lipolytica* using different carbon sources. *Chemical Engineering Transactions*. Vol. 38. A publication of The Italian Association of Chemical Engineering. www.aidic.it/cet
- 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(9), 1768–1776, DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02256.x>

- Obradors, N., Montesinos, J. L., Valero, F., Lafuente, F. J., Sola, C. (1993): Effects of different fatty acids in lipase production by *Candida rugosa*. *Biotechnology letters*, 15, 357-360., <https://doi.org/10.1007/BF00128276>
- Ochoa, F. G, Gomez, E. (2009): Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: an overview. *Biotechnol. Adv.* 27(2), 153–176. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.10.006>
- Paiva, S. A. R., Russell, R. M. (1999): β -Carotene and other carotenoids as antioxidants. *Journal of the American College of Nutrition*, 18(5), 426–433. <https://doi.org/10.1080/07315724.1999.10718880>
- Paludo, M. P.; Degani de Oliveira, K. S.; Trevisol, T. C.; Fernandes de Medeiros Burkert, J. (2018): Isolation of lipase-producing yeast from industrial oily residues in different culture media. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci* 7, 2348–2362. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.701.283>.
- Panesar, R., Kaur, S., Panesar, P. S. (2015): Production of microbial pigments utilizing agro-industrial waste: a review. *Current Opinion in Food Science*, 1, pp. 70-76.
- Park, Y. K., Ledesma-Amaro, R. (2023): What makes *Yarrowia lipolytica* well suited for industry? *Trends in Biotechnology*, 41(2), 242-254, <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2022.07.006>
- Papagora, C., Roukas, T., Kotzekidou, P., (2013): Optimization of extracellular lipase production by *Debaryomyces hansenii* isolates from dry-salted olives using response surface methodology. *Food and Bioprocess Processing*, 91(4), 413-420, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2013.02.008>
- Parmar, M., Phutela, U. G. (2015): Biocolors: the new generation additives. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 4(7), 688-694.
- Patel, A. K., Singhanian, R. R., Pandey, A. (2017): Production, purification, and application of microbial enzymes. In: Brahmachari G. (ed.) *Biotechnology of microbial enzymes*. Academic Press, Oxford, pp. 13-41.
- 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
- Péter, G., Nagy, E. S., Dlačny, D. (2019): Systematics, diversity and ecology of the genus *Yarrowia* and the methanol-assimilating yeasts. In: Sibirny, A. (eds) *Non-conventional yeasts: from basic research to application*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-21110-3_9
- 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>
- Pignède G., Wang H., Fudalej F., Gaillardin C., Seman M., Nicaud J.M. (2000): Characterization of an extracellular lipase encoded by Lip2 in *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Bacteriology*. 182(10), 2802-2810 DOI: <https://doi.org/10.1128/JB.182.10.2802-2810.2000>
- Ping L., Yuan X., Zhang M., Chai Y., Shan S. (2017): Improvement of extracellular lipase production by a newly isolated *Yarrowia lipolytica* mutant and its application in the biosynthesis of L-ascorbyl palmitate, *International Journal of Biological Macro-molecules*. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.016>
- Plonka, P., Grabacka, M. (2006): Melanin synthesis in microorganisms: biotechnological and medical aspects. *Acta Biochimica Polonica*, 53(3). 429-443.
- Pohanka, M. (2019): Biosensors and bioassays based on lipases, principles and applications, a review. *Molecules* 24, 616. <https://doi.org/10.3390/molecules24030616>.
- Poorniammal, R., Gunasekaran, S., Murugesan, R. (2015): Statistical optimization of culture medium for yellow pigment production by *Thermomyces* sp. *Journal of Applied and Natural Science*, 7(1), 203-210. DOI: <https://doi.org/10.31018/jans.v7i1.590>
- Rajesh, E. M., Arthe, R., Rajendran, R., Balakumar, C., Pradeepa, N., Anitha, S. (2010): Investigation of lipase production by *Trichoderma reesei* and optimization of production parameters. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural & Food Chemistry*, 9(7). ISSN: 1579-4377
- Rai, A. K., Jeyaram, K. (2017): Role of Yeasts in Food Fermentation. In: Satyanarayana, T., Kunze, G. (eds) *Yeast Diversity in Human Welfare*. Springer, Singapore. pp. 83-113 https://doi.org/10.1007/978-981-10-2621-8_4
- Rakicka, M., Kieroń, A., Piotr, Hapeta P., Neuveglise-Degouy, 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>
- Ramachandran, S., Singh, S. K., Larroche, C., Soccol, C. R., Pandey. A. (2007): Oil cakes and their biotechnological applications – A review, *Bioresource Technology*, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.08.002>
- Ramesh, C.; Prasastha, V. R.; Venkatachalam, M.; Dufossé, L. (2022): Natural Substrates and Culture Conditions to Produce Pigments from Potential Microbes in Submerged Fermentation. *Fermentation* 8, 460. DOI: <https://doi.org/10.3390/fermentation8090460>
- Rana, B., Bhattacharyya, M., Patni, B., Arya, M., Joshi, G. K. (2021): The Realm of Microbial Pigments in the Food Color Market. *Front. Sustain. Food Syst.* 5:603892. doi: 10.3389/fsufs.2021.603892
- Rao, A. V., Ray, M. R., Rao, L. G. (2006): Lycopene, Advances in Food and Nutrition Research, *Academic Press*, Volume 51, Pages 99-164, ISSN 1043-4526, ISBN 9780120164516, [https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(06\)51002-2](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(06)51002-2).
- Rao, M. P. N., Xiao, M., Li, W. J. (2017): Fungal and Bacterial Pigments: Secondary Metabolites with Wide Applications, *Front. Microbiol.*, 8 1113, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01113>

- Rathera, L. J., Mirb, S. S., Ganiea, S. A., Islamc, S., Lia, Q. (2023): Research progress, challenges, and perspectives in microbial pigment production for industrial applications - A review, *Dyes and Pigments* 210, 110989 <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2022.110989>
- 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
- Rauf, S., Jamil, N., Tariq, S. A., Khan, M., Kaya, Y. (2017): Progress in modification of sunflower oil to expand its industrial value, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97: 1997-2006, DOI: <https://doi.org/10.1002/jsfa.8214>
- Ray, A. (2012): Application of lipase in industry. *Asian Journal of Pharmacy and Technology*, 2(2), 33-37.
- Reddy, L. V. A.; Wee, Y., Yun, J.; Ryu, H. (2008): Optimization of alkaline protease production by batch culture of *Bacillus* sp. RKY3 through Plackett-Burman and response surface methodological approaches, *Bioresour. Technol.*, 99, pp. 2242-2249, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.05.006>
- Ribeiro, B. D., Barreto, D. W., Coelho, M. A. Z. (2011): Technological Aspects of β -Carotene Production, *Food and Bioprocess Technology* 4(5), 693-701, DOI: [10.1007/s11947-011-0545-3](https://doi.org/10.1007/s11947-011-0545-3)
- Saha, N., Samanta, A. K., Chaudhuri, S., Dutta, D. (2015): Characterization and antioxidant potential of a carotenoid from a newly isolated yeast. *Food Science and Biotechnology*, 24, 117-124. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10068-015-0017-z>
- Saini, D. K., Pabbi, S., Shukla, P. (2018): Cyanobacterial pigments: Perspectives and biotechnological approaches. *Food and chemical toxicology*, 120, 616-624. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.08.002>
- Sajilata, M.G., Singhal, R.S., Kamat, M.Y. (2008): The Carotenoid Pigment Zeaxanthin—A Review, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7(1), January 29-49, DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2007.00028.x>
- Salameh, M. A., Wiegel, J. (2010): Effects of Detergents on Activity, Thermostability and Aggregation of Two Alkalithermophilic Lipases from *Thermosyntropha lipolytica*, *Open Biochem J.*, 4: 22–28. DOI: 10.2174/1874091X01004010022
- Salgado, V., Fonseca, C., Lopes da Silva, T., Roseiro, J. C., Eusébio, A. (2020): Isolation and identification of *Magnusiomyces capitatus* as a lipase-producing yeast from olive mill wastewater. *Waste and Biomass Valorization*, 11, 3207-3221., DOI: <https://doi.org/10.1007/s12649-019-00725-7>
- Salgado, C. A., dos Santos, C. I. A., Vanetti, M. C. D. (2022): Microbial lipases: Propitious biocatalysts for the food industry. *Food Bioscience*, 45, 101509., DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101509>
- Salihu, A., Alam, M. Z., AbdulKarim, M. I., Salleh, H. M. (2012): Lipase production: an insight in the utilization of renewable agricultural residues. *Resources, Conservation and Recycling*, 58, 36-44. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2011.10.007>

- Salihu, A., Bala, M., Md. Alam, Z. (2016): Lipase production by *Aspergillus niger* using sheanut cake: An optimization study, *Journal of Taibah University for Science*, 10(6), 850-859, ISSN 1658-3655, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jtusci.2015.02.011>.
- 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>
- Savalas, L. R. T., Sirodjudin, S., Gunawan, E. R., Aini, R. Y., Suhendra, D., Basri, N. H., Ardhuha, J., Ningsih, B. N. S. (2021): Biochemical Properties of Coconut (*Cocos nucifera* L.) Lipase. *Philippine Journal of Science*, 150(5).
- Saygün, A., Şahin-Yeşilçubuk, N., Aran, N. (2014): Effects of Different Oil Sources and Residues on Biomass and Metabolite Production by *Yarrowia lipolytica* YB 423-12. *J Am Oil Chem Soc* 91, 1521–1530. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11746-014-2506-2>
- Sen, T., Barrow, C. J., Deshmukh, S. K. (2019): Microbial pigments in the food industry—Challenges and the way forward. *Frontiers in Nutrition*, 6, 1-36.
- 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)
- Sharma N, Shekhar P, Kumar V, Kaur H, Jayasena V. (2024): Microbial pigments: Sources, current status, future challenges in cosmetics and therapeutic applications. *J Basic Microbiol*. 64(1), 4-21. DOI: 10.1002/jobm.202300214. Epub 2023 Oct 20. PMID: 37861279.
- Shatila, F., Yusef, H., Holail, H. (2013): Pigment production by *Exiguobacterium aurantiacum* FH, a novel Lebanese strain. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 2(12), 176-191.
- Shrishailnath, S., Kulkarni, G., Yaligara, V., Kyoung, L., Karegoudar, T. B. (2010): Purification and Physiochemical Characterization of Melanin Pigment from *Klebsiella* sp., GSK, *J. Microbiol. Biotechnol.*, 20(11), 1513–1520
- Sindhu, R., Shiburaj, S., Sabu, A., Fernandes, P., Singhal, R., Mathew, G. M., Nair, I.C., Jayachandran, K., Vidya, J., Porto de Souza Vandenbergh, 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. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815781-7.00016-0>
- Sinha, S., Singh, G., Arora, A., Paul, D. (2021): Carotenoid production by Red Yeast isolates grown in agricultural and "Mandi" waste. *Waste and Biomass Valorization*, 12, 3939-3949. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01288-8>
- Solano, F. (2014). Melanins: skin pigments and much more—types, structural models, biological functions, and formation routes. *New Journal of Science*, 2014(1), 498276. DOI: <https://doi.org/10.1155/2014/498276>
- 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. DOI: <https://doi.org/10.1002/ejlt.200800073>

- Spencer, J. F., Ragout de Spencer, A. L., Lalue C. (2002): Non-conventional yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol.* 58(2). 147-56. DOI: 10.1007/s00253-001-0834-2. PMID: 11878307.
- Stahmann, K. P., Revuelta, J. L. and Seulberger, H. (2000): Three biotechnical processes using *Ashbya gossypii*, *Candida famata*, or *Bacillus subtilis* compete with chemical riboflavin production. *Appl. Microbiol. Biotech.*, 53: 509–516. DOI: <https://doi.org/10.1007/s002530051649>
- Sudhakar, T., Karpagam, S., Premkumar, J. (2015): Biosynthesis, antibacterial activity of pyocyanin pigment produced by *Pseudomonas aeruginosa* SU1. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(3), 921-924.
- Szymczak, T., Cybulska, J., Podleśny, M., Frąc, M. (2021): Various perspectives on microbial lipase production using agri-food waste and renewable products. *Agriculture*, 11(6), 540., DOI? <https://doi.org/10.3390/agriculture11060540>
- Tahar, B. I., Kus-Liśkiewicz, M., Lara, Y., Javaux, E., Fickers, P. (2019). Characterization of a nontoxic pyomelanin pigment produced by the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology Progress*, e2912. DOI: <https://doi.org/10.1002/btpr.2912>
- Tarangini, K., Mishra, S. (2014): Production of melanin by soil microbial isolate on fruit waste extract: two step optimization of key parameters. *Biotechnology Reports*, 4, 139-146. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.btre.2014.10.001>
- Thaira, H., Bhosle, S. S., Balakrishnan, R., Raval, K. (2016): Selection of Medium and Optimization of Process Parameters for Melanin Biosynthesis from *Pseudomonas stutzeri* HMGM-7. In: B. D., P., Gummadi, S., Vadlani, P. (eds) *Biotechnology and Biochemical Engineering*. Springer, Singapore. DOI: https://doi.org/10.1007/978-981-10-1920-3_1
- Tomaszewska, L., Rywińska, A., Gładkowski, W. (2012): Production of erythritol and mannitol by *Yarrowia lipolytica* yeast in media containing glycerol. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 39, 1333–1343. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10295-012-1145-6>.
- Trafton, A. (2017): A step toward renewable diesel - Chemical engineers program yeast to convert plant sugars into oils. *MIT News Office*.
- 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
- Trejo-Tapia, G., Arias-Castro, C., Rodríguez-Mendiola, M. (2003): Influence of the culture medium constituents and inoculum size on the accumulation of blue pigment and cell growth of *Lavandula spica*. *Plant cell, tissue and organ culture*, 72(1), 7-12. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1021270907918>
- Turki S., Mrabet G., Jabloun Z., Destain J., Thonart P., Kallel H. (2010): A highly stable *Yarrowia lipolytica* lipase formulation for the treatment of pancreatic exocrine insufficiency. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 57, 139-149. DOI: <http://dx.doi.org/10.1042/BA20100272>
- Usuki, A., Ohashi, A., Sato, H., Ochiai, Y., Ichihashi, M. and Funasaka, Y. (2003), The inhibitory effect of glycolic acid and lactic acid on melanin synthesis in melanoma cells. *Experimental Dermatology*, 12, 43-50. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0625.12.s2.7.x>

Ülker, S., Karaoglu, S. A. (2012): Purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis* f. *corticola* isolated from soil. *J. Biosci. Bioeng.* 114, 385-390. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.04.023>

Vakhlu, J., Kour, A. (2006): Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. *Electronic Journal of Biotechnology.* ISSN: 0717-3458. 9.1. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso – Chile

Veerapagu, M., Narayanan A. S., Ponmurugan, K., Jeya, K. R., (2013): Screening selection identification production and optimization of bacterial lipase from oil spilled soil. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research.* 6(3), 62-67.

Venil, C. K., Zakaria, Z. A., & Ahmad, W. A. (2013): Bacterial pigments and their applications. *Process Biochemistry*, 48(7), 1065-1079.

Venil, C. K., Dufossé, L., & Renuka Devi, P. (2020). Bacterial pigments: sustainable compounds with market potential for pharma and food industry. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4, 100. DOI: <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.00100>

Wang, H., Pan, Y., Tang, X., Huang, Z. (2006): Isolation and characterization of melanin from *Osmanthus fragrans* seeds, *LWT - Food Science and Technology*, 39(5), 496-502 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.04.001>

Yao W., Liu K., Liu H., Jiang Y., Wang R., Wang W., Wang T. (2021): A valuable product of microbial cell factories: microbial lipase. *Frontiers in Microbiology*, 12, 743377. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.743377>

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>

Zhou Y., Zhao W., Lai Y., Zhang B., Zhang D. (2020): Edible plant oil: global status, health issues, and perspectives. *Frontiers in Plant Science*, 11, 1315. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01315>

Zoz, L., Carvalho J. C., Soccol V. T., Casagrande T. C., Cardoso, L. (2014): Torularhodin and Torulene: Bioproduction, Properties and Prospective Applications in Food and Cosmetics - a Review, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-8913201400152>

Internetes hivatkozások:

Internet 1: Trigliceridek hidrolízise <https://lipase.weebly.com/lipase.html>

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném hálásan megköszönni **Dr. Bujna Erikának**, témavezetőmnek, a rengeteg segítséget melyet önzetlenül nyújtott. Segített a kísérleteim megtervezésében és értékelésében, valamint szakmai fejlődésemhez minden feltételt biztosított. A lelkesedése tovább fokozta az én lelkesedésemet is, így mindig örömmel kezdhettem egy-egy újabb ötlet megvalósításába.

Köszönettel tartozok **Dr. Nguyen Duc Quang** Professzor Úrnak, hogy értékes tanácsokkal emelte dolgozatom színvonalát, ötleteivel segített a felmerülő problémák megoldásában, illetve rengeteg segítséget nyújtott az eredményeim publikálása során.

Köszönetemet szeretném kifejezni a **Biomérnök és Erjedésipari Technológia Tanszék munkatársainak, kollégáimnak**, sokat köszönhetek nekik nem csak szakmai téren, hanem az élet más területein is. Köszönöm az évek során nyújtott támogatásukat, segítségüket.

Köszönet **doktorandusz társaimnak**, akik ötleteikkel, véleményükkel segítettek a dolgozat elkészítésében.

Továbbá köszönöm **hallgatóimnak**, a kitartó munkájukat, amit a szakdolgozatok és TDK pályaművek készítése során nyújtottak.

Nagyon hálás vagyok a **Családomnak** és **Páromnak**, biztatásukért, türelmükért, és, hogy mindvégig mellettem álltak.