

**Járomspórás gombák extracelluláris lipázainak vizsgálata:
enzimtermelés, hidrolitikus és szintetikus reakciók
jellemzése**

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

KOTOGÁN ALEXANDRA

Témavezetők:

DR. TAKÓ MIKLÓS

EGYETEMI ADJUNKTUS

DR. PAPP TAMÁS

EGYETEMI DOCENS

BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA



SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR

MIKROBIOLÓGIAI TANSZÉK

2017

Szeged

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

1. BEVEZETÉS	5
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	6
2.1. A járomspórás gombák (Mucoromycota) általános jellemzése	6
2.2. A Mucorales rend általános jellemzése	7
2.3. A Mortierellales rend általános jellemzése	9
2.4. A lipáz enzim és az általa katalizált reakciók jellemzése	10
2.4.1. Általános jellemzők	10
2.4.2. A katalizált reakciók jellemzése	12
2.4.3. Lipázok forrása, azonosítása, ipari termeltetése	17
2.4.4. A lipázok jelenlegi és lehetséges felhasználása	20
3. CÉLKITŰZÉSEK	28
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	30
4.1. Alkalmazott törzsek	30
4.2. Alkalmazott táptalajok és tápoldatok	30
4.3. Alkalmazott oldatok	31
4.4. Tenyésztési körülmények	32
4.5. A hidrolitikus aktivitás meghatározása	33
4.6. A fehérjekoncentráció meghatározása	34
4.7. Az átészterező aktivitás vizsgálata	34
4.8. Az észterező aktivitás vizsgálata	35
4.9. GC-FID analízis az alkil-észterek mennyiségének meghatározására	36
4.10. A lipáz enzimek tisztítása	36
4.11. Poliakrilamid gélelektroforézis	38
4.12. A hidrolitikus aktivitás biokémiai jellemzéséhez használt reakcióelegyek	39
4.13. Regioszelektivitás meghatározása vékonyréteg kromatográfias módszerrel	41
5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	43
5.1. Járomspórás gombák lipáztermelésének tesztelése	43
5.2. Lipid induktorok lipáztermelésre gyakorolt hatása	45
5.3. Lipáztermelés búzakarpa alapú fermentációkban	48
5.4. Lipáztermelés vizsgálata további mezőgazdasági- és élelmiszeripari melléktermékeken	52

5.5. Átészterező reakciók vizsgálata	54
5.5.1. Az átészterezés katalizálásának tesztelése.....	54
5.5.2. Az átészterező reakciók katalizálásának jellemzése	55
5.6.Észterező reakciók vizsgálata	65
5.6.1. Az észterezés katalizálásának tesztelése	65
5.6.2. Zsírsavpreferencia meghatározása észterező reakciókban.....	67
5.7. A lipáz enzimek tisztítása	68
5.8. A tisztított enzimek hidrolitikus aktivitásának biokémiai jellemzése.....	73
5.8.1. Az enzimaktivitás hőmérsékleti optimuma és stabilitása.....	73
5.8.2. Az enzimaktivitás pH optimumának és stabilitásának vizsgálata	76
5.8.3. A szubsztrátspecificitás meghatározása	78
5.8.4. Az enzimek jellemző kinetikai paraméterei	81
5.8.5. Az enzimek regioszelektivitásának meghatározása	82
5.8.6. Fém ionok és reagensek enzimaktivitásra gyakorolt hatása.....	84
5.8.7. Alkohokok és alkánok enzimaktivitásra gyakorolt hatása	86
6. ÖSSZEFOGLALÁS	92
7. SUMMARY	97
8. IRODALOMJEGYZÉK.....	102
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	120
10. MELLÉKLETEK.....	121

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Hollandia

DMSO: dimetil-szulfoxid

EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav

ETH: Swiss Federal Institute of Technology Culture Collection, Svájc

GC: Gas Chromatography (gázkromatográfia)

GC-FID: Gas Chromatography-Flame Ionization Detector (gázkromatográfia-lángionizációs detektor)

K_m: Michaelis-Menten állandó

Log P_{ov}: *n*-oktanol/víz megoszlási hányados

NBS: N-brómszukcinimid

NRRL: Agricultural Research Service Culture Collection, USA

pNF: *para*-nitrofenol

pNFP: *para*-nitrofenil-palmitát

PUFA: polyunsaturated fatty acid (többszörösen telítetlen zsírsav)

SDS: sodium dodecyl sulfate (nátrium-lauril-szulfát)

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (nátrium-lauril-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis)

SmF: submerged fermentation (süllyesztett fermentáció)

SSF: solid state fermentation (szilárd fázisú fermentáció)

SZMC: Szeged Microbiological Collection (Szegedi Mikrobiológiai Törzsgyűjtemény)

V_{max}: maximális reakciósebesség

1. BEVEZETÉS

A lipáz enzimek a zsírok és olajok fő összetevőinek, a triglicerideknek glicerinné és szabad zsírsavakká történő hidrolízisét katalizálják. Vízmentes, vagy alacsony víztartalmú közegben azonban képesek az észter kötések szintézisére és áthelyezésére is (Gupta és mtsi., 2004). Biológiai jelentőségükön kívül ipari és biotechnológiai felhasználásuk is számottevő. Lipáz enzimeket széles körben alkalmaznak a gyógyszer-, élelmiszer-, bőr-, és a detergens iparban, a papírgyártásban, a környezetgazdálkodás területén, illetve számos szerves szintézisnél és a biodízel előállításánál (Salis és mtsi., 2007). Lipázokat a növények, az állatok és a mikroorganizmusok is képesek termelni, azonban a kereskedelmi forgalomban kapható lipáz enzimek többsége mikrobiális eredetű, baktériumok vagy gombák (elsősorban fonalas gombák) által termelt (Jaeger és Reetz, 1998). A mikrobákkal történő enzimtermeltetés fő előnye, hogy viszonylag nagy mennyiségű enzim állítható elő gazdaságos körülmények között (Treichel és mtsi., 2010). Emellett a különböző mikroorganizmusokból származó lipázok eltérő biokémiai jellemzőkkel, azaz szubsztrátspecifitással, hőmérséklet és pH optimummal, stabilitással, stb., rendelkezhetnek. Előnyös tulajdonságokkal rendelkező enzimek azonosítása kiemelt jelentőséggel bír a különböző ipari folyamatok fejlesztésében.

A járomspórás gombák a fonalas gombák egyik legjelentősebb képviselői. A csoportba tartozó fajok többsége szaprotróf, általában talajban, korhadó növényi részekben, komposztban fordulnak elő. Ökológiai szerepük mellett jó néhány faj orvosi, ipari, biotechnológiai, illetve mezőgazdasági szempontból is jelentős. A járomspórás gombák extracelluláris (sejten kívüli térbe kiválasztott) enzimek (pl. amilázok, proteázok) és szerves savak termelésében jelentősek, így különböző biotechnológiai folyamatokban hasznosíthatók (Gottfredsen, 1990, Ferreira és mtsi., 2013; Papp és mtsi., 2016).

A járomspórás gombák jó extracelluláris enzimtermelőkként ismertek, de csak néhány ide tartozó faj által termelt lipázt izoláltak eddig, illetve használnak fel egyes ipari folyamatokban. Az enzimek termelésére, hidrolitikus és szintetikus aktivitására és biokémiai jellemzőire vonatkozó ismeretek is viszonylag korlátozottak. Ugyanakkor a biotechnológiai és ipari fejlesztések új lipázok iránti igénye további enzimek azonosítását és jellemzését teszi szükségessé. Doktori munkám során az ipari fejlesztésekben és az alap kutatásban egyaránt hasznosítható lipáztermelő járomspórás gombatorzsek és lipáz enzimek azonosítását tűztük ki célul. Vizsgáltuk az enzimtermelést különböző tenyésztési körülményeken, tisztítottunk termelt enzimeket, valamint lipáz-katalizált hidrolitikus és szintetikus reakciókat is jellemeztünk.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A járomspórás gombák (*Mucoromycota*) általános jellemzése

A kutatócsoportunk által vizsgált törzsek a fonalas gombák egyik nagy csoportjába, a *Mucoromycota* törzsbe tartoznak (Spatafora és mtsi., 2016). A hagyományos morfológiai különbségeken alapuló rendszerezés molekuláris taxonómiai elemzésekkel történő felülvizsgálata során a korábban közös eredetűnek gondolt *Zygomycota* törzs polifiletikusnak bizonyult, és az egyes járomspórás gomba csoportokat eltérő altörzsekbe és törzsekbe helyezték. Ezek közül a *Mucoromycota* törzs tartalmazza a korábbi *Mucorales*, *Mortierellales* és *Endogonales* rendeket (Hibbett és mtsi., 2007, Spatafora és mtsi., 2016).

A *Mucoromycota* csoportba tartozó gombák közös jellemzője, hogy általában cönocitikus micéliummal rendelkeznek, azaz hifáikban nincsenek válaszfalak, így a gombafonalak soksejtmagvúak. Harántfalak csak a gametangiumok és a sporogén szervek kialakulásakor keletkeznek. Gyors növekedés és sporuláció jellemzi őket. Sejtfalukat főleg kitin és kitozán alkotja. Néhány fajra jellemző a morfológiai dimorfizmus képessége, azaz mind fonalas, mind élesztőszerű növekedésre is képesek. A morfológia függ a tápközeg összetételétől, illetve oxigén ellátottságától, így főleg oxigénhiányos, vagy magas hexóz tartalmú környezetben képesek élesztőszerű növekedésre (Orlowski, 1991; Lee és mtsi., 2013). Szaporodásukra jellemző, hogy ivartalanul sporangiospórákkal, ivaros úton pedig zigo-, azaz járomspórákkal szaporodnak. Ivaros szaporodásuk a víz jelenlétéhez nem kötődik. Ivaros spóraalakjuk a két gametangium fúziójával létrejövő járomspóra, azaz zigospóra (gör *zygos* = járom, *iga*), melyről e gombák a nevüket is kapták. A járomspóra jellegzetes alakú, vastag falú képződmény, melyet gyakran rövid hifákból álló csomó burkol. A *Mucoromycota* tagjai, különösen az általunk is vizsgált *Mortierellales* és a *Mucorales* rendekbe tartozók, gyakori összetevői a trágya és a talaj mikoflórájának. A fajok többsége szaprotróf életmódot folytat, azaz energiaszükségletüket elpusztult növény, állat vagy élettelen szerves anyagok lebontásából fedezik. Talajban, korhadékban, rothadó gyümölcsökön, zöldségeken és komposztban fordulnak elő. Az *Endogonales* renden belül mikorrhizaképző fajok is megtalálhatók, melyek változatos növényfajokkal képesek szimbiózis kialakítására (Sánchez-Blanco és mtsi., 2004). Ismert néhány opportunistá patogén képviselő is, melyek főleg legyengült immunrendszerű betegeknél okozhatnak fertőzéseket (Dodémont és mtsi., 2015).

2.2. A Mucorales rend általános jellemzése

A Mucoromycota legtöbb fajt tartalmazó csoportja a Mucorales rend. Az ide tartozó gombafajok többségére az intenzív növekedés és nagy tömegű hifaképzés jellemző. A micélium általában nem szeptált. Többségük szaprotróf szervezet, elsősorban talajban, korhadó növényi részeken, valamint komposztálódó szerves maradványokon fordul elő. Néhány törzs jelentős raktári kártevőként ismert, köszönhetően a magas cukor-, és sókoncentráció tűrő képességüknek (Ray és Ravi, 2005), így komoly problémákat okozhatnak zöldségek, gyümölcsök és gabonafélék tárolásánál, illetve konzervgyártás során. Néhány, a rendbe tartozó faj növény, gomba, állat vagy humán parazitaként ismert. Az utóbbi évtizedekben jelentősen megnőtt az azonosítottan a Mucorales rendbe tartozó gombafajok által kiváltott humán fertőzések száma. Ezen megbetegedéseket a szakirodalom összefoglaló néven mukormikózisoknak nevezi. A mukormikózisok számának növekedése mögött a molekuláris módszerekkel történő gyors és pontos azonosítás elterjedése, valamint az immunszuppresszált betegek (így pl. a daganatos és cukorbeteg) számának növekedése áll (El-Herte és mtsi., 2012).

A rend számos tagja ismert, mint tradicionális távol-keleti ételek (pl. tempeh) fermentációjához szükséges starter kultúrák alkotói (Nakajima és mtsi., 2005). Ezen élelmiszerek főleg szójabab és rizs alapúak, elsősorban Ázsiában, Afrikában és Dél-Amerikában kedveltek és elterjedtek. A rendbe tartozó fajok ipari alkalmazása szintén jelentős; számos törzset használnak keményítőhidrolízisre, valamint oxálsav, fumársav, tejsav, ecetsav és citromsav előállításra (Gottfredsen, 1990; Outtrup és Boyce, 1990; Papp és mtsi., 2016). Az általuk termelt, főleg extracelluláris enzimeket a fermentációs ipar változatos területein alkalmazzák (pl. amiláz, lipáz, proteáz, celluláz enzimek termeltetésére) (Ferreira és mtsi., 2013). Emellett egyes törzseiket kémiai vegyületek biokonverziójára is alkalmazzák (szteroid transzformáció; hidrokortizon és prednizolon előállítás) (Mohamed és El-Hadi, 2010). Felhasználják továbbá élelmiszer és takarmány adalékok, gyógyszerkészítmény alapanyagok (pl. likopin, karotinoid), és kitozán termeltetésére is (Hoffmann és mtsi., 2013).

A Mucorales rend egyik legnagyobb és legismertebb nemzetsége a *Rhizopus* nemzetség. Közös jellemzőjük a gyors növekedés, valamint hogy a sporangiumaik apofízissal rendelkeznek, a zigospóra-szuszpenzorok szemben állók, a sporangiofórok eredésénél rizoidokat és sztolonokat képeznek. Elsősorban talajban, korhadó növényi részeken, élelmiszerek felületén vagy poros felszíneken fordulnak elő, azonban néhány képviselőjük másodlagos növényi vagy opportunistá humán patogén (El-Herte és mtsi., 2012). A *Rhizopus*

nemzetség legjobban jellemzett fajai a *Rh. stolonifer*, a *Rh. oryzae*, és a *Rh. microsporus*. A *Rhizopus* nemzetségben számos olyan törzset találunk, melyek élelmiszeriparban betöltött szerepe, illetve biotechnológiai felhasználása jelentős. Kiemelendő, hogy néhány tradicionális távol-keleti étel (pl. tempeh) fermentációjához szükséges starter kultúra alkotója a *Rh. microsporus* var. *oligosporus* fonalas gomba, mely a szójababot enzimatikus úton részlegesen bontja, átalakítja, megnöveli annak emészthetőségét és tápanyagtartalmát (Hachmeister és Fung, 1993; Chang és mtsi., 2009). A *Rhizopus* nemzetség tagjai emellett számos egyéb élelmiszeripari termék fermentálásában is részt vesznek, így a szójaszós (*Rh. oryzae*, *Rh. javanicus*), szaké (*Rh. arrhizus*), sufu (*Rhizopus* sp.) és ragi (*Rh. chinensis*) előállításában játszanak fontos szerepet. A kiindulási alapanyagul szolgáló szója vagy rizs enzimatikus előemésztését extracelluláris enzimeik révén valósítják meg. A *Rh. oryzae* élelmiszeripari felhasználása rendkívül elterjedt és biztonságos. Toxikológiai vizsgálatokkal bizonyították, hogy a *Rh. oryzae* által termelt Lipáz D enzimpreparátum biztonságosan alkalmazható az élelmiszerek zsír- és olajtartalmának módosítására (Flood és Kondo, 2003). Biotechnológiai szempontból igen jelentős a *Rh. oryzae* tejsavtermelő képessége is (Bai és mtsi., 2003; Maas és mtsi., 2006). A *Rh. oryzae*, az élesztők mellett, etanol előállításában is alkalmazható (Karimi és mtsi., 2006).

A ***Mucor*** nemzetség fajai jellegzetes világos színű telepeket képeznek, mely később a spórákérésével megbarnul, megfeketedik. A nemzetség tagjaira az apofízis nélküli sporangium a jellemző. A fajok többsége inkább a mezofil tartományban képes a növekedésre, de előfordul néhány termotoleráns faj is közöttük (de Hoog és mtsi., 2000). Többségük szaprotróf, talajban, növényevő állatok ürülékén fordulnak elő, néhány faj pedig raktározott élelmiszerek kártevőiként is ismert (Salem és mtsi., 2016, Saito és mtsi., 2016). A *Mucor* nemzetség legjobban jellemzett fajai a *M. circinelloides*, a *M. racemosus*, a *M. hiemalis* és a *M. rouxii*, melyek gyakori laboratóriumi tesztorganizmusok. A *M. circinelloides* kiemelkedő karotinoid termelése miatt került a kutatások középpontjába (Papp és mtsi., 2005). A *M. racemosus* és *M. hiemalis* fajok jó proteáz és egyéb enzim termelő képességük miatt ipari folyamatokban hasznosíthatók (Sumantha és mtsi., 2006). A *Mucor* törzsek közt számos jó extracelluláris amiláz, lipáz és proteáz termelő található (Alves és mtsi., 2002).

A ***Rhizomucor*** nemzetségbe két termofil faj a *R. pusillus* és *R. miehei* tartozik, melyeket a *Mucor* nemzetségtől elsősorban a zigospóra eltérő alakja miatt különítették el (Vágvölgyi és mtsi., 1999; Salar és Aneja, 2007). Fontos képviselői a komposztálásban résztvevő mikrobaközösségeknek, köszönhetően extracelluláris enzimeiknek, mellyel képesek a szerves maradványokat hatékonyan lebontani (van Heerden és mtsi., 2002; Langarica-Fuentes

és mtsi., 2014). A *Rhizomucor* nemzetség törzseinek biotechnológiai és élelmiszeripari alkalmazása jelentős, néhány törzs kiemelkedő lipáz- és proteáz termelőként ismert. Lipázaikat elsősorban a vegyiparban, változatos szintetikus és hidrolitikus reakciók katalizálásában hasznosítják (Rodrigues és Fernandez-Lafuente, 2010). A *R. miehei* kereskedelmi forgalomban is kapható aszpartil proteázát a sajtgyártás során alkalmazzák a tejfehérje (kazein) koagulálására. A hagyományosan használt borjú oltóenzimmel (rennin) szemben, a gombaenzim megtermelhető mennyisége kevésbé korlátozott, valamint kazeinbontó aktivitása hatékonyabb, specifikusabb (Alves és mtsi., 2005), így jelenleg ez a piacvezető mikrobiális készítmény a rennin oltóenzim helyettesítésére (Leite Júnior és mtsi., 2015 és 2016). A *Rhizomucor* törzsek proteázait ezen kívül mosószer adalékanyagként, illetve a bőriparban is hasznosítják (Pandey és mtsi., 1999).

A *Gilbertella* nemzetség egyetlen fajt foglal magába. A *Gilbertella persicaria* raktári kártevője lehet gyümölcsöknek és zöldségeknek. Elsősorban őszibarack romlását okozhatja (Papp és mtsi., 2003). Gyakran izolálható talajból és trágyából is. Jellegzetessége, hogy a sporangium egyetlen hosszanti irányú hasadással nyílik fel. A sima falú spórák csúcsi részein vékony fonalszerű függelékek vannak. A viszonylag kevésbé vizsgált járomspórás nemzetségek/fajok közé tartozik.

Az *Umbelopsis* nemzetség tagjait korábban a *Mortierella* génuszba sorolták, de valószínűleg közelebb állnak a Mucorales rendbe tartozó fajokhoz. Az *Umbelopsis* és a *Micromucor* nemzetséget egységesen az *Umbelopsis* nemzetség tagjaiként tartják számon. A nemzetség a Mucorales rend egyik bazális csoportját képezi. Nagyon kevésbé jellemzett csoport, legismertebb képviselőik az *U. versiformis*, *U. ramanniana* és az *U. isabellina*. A nemzetség tagjaira a lassú növekedés, és a bársonyos felszínű telepképzés jellemző (Wang és mtsi., 2013). Biotechnológiai potenciáljukat elsősorban a többszörösen telítetlen zsírsavak (PUFA: Polyunsaturated Fatty Acid) termelése adja (Grantina-Ievina és mtsi., 2014).

2.3 A *Mortierellales* rend általános jellemzése

A járomspórás gombák kevésbé vizsgált, ugyanakkor fajgazdag és számos iparilag hasznosítható taggal rendelkező rendje. Az elsőként izolált *Mortierella polycephala* faj mellett ma már körülbelül 100 faj ismert. Legjelentősebb nemzetségei a *Mortierella*, *Dissophora* és *Gamsiella*. A rendbe tartozó fajok elsősorban talajban, bomló szerves anyagon fordulnak elő. Számos faj képes változatos PUFA termelésére, valamint különböző szerves vegyületek átalakítására, így biotechnológiai felhasználásuk ígéretes (Wagner és mtsi., 2013).

A *Mortierella* nemzetség tagjai főleg szaprotrófik, erdei talajok humuszképződésében töltenek be fontos szerepet (Gaspar és mtsi., 1999). Előfordul közöttük azonban opportunistá patogén faj is; a *Mo. wolfii* fertőzés elsősorban szarvasmarháknál és más haszonállatoknál okozhat vetélést, de leírtak már más, a gomba által okozott szisztémás, neurológiai elváltozásokat is állatokban (Davies és mtsi., 2010). A *Mortierella* fajok morfológiai jellegzetessége a zonális (azaz világos- és sötétebb zónák váltakozását mutató) telepképzés, illetve a szinte pókháló finomságú micéliumaik. Melegkedvelő (*Mo. wolfii*), mezofil és hidegkedvelő fajaik egyaránt ismertek. A nemzetség legismertebb faja az iparban is alkalmazott *Mo. alpina*. Kiemelkedő lipid akkumuláló képessége miatt nagy biotechnológiai jelentőséggel bír, elsősorban hosszú szénláncú, többszörösen telítetlen zsírsavak (pl. arachidonsav) előállítására használják (Ji és mtsi., 2014). Az utóbbi években a *Mortierella* nemzetség tagjai között számos ígéretes lipid termelő törzset azonosítottak; az általuk létrehozott úgynevezett 'lipid testek' (lipid bodies) különböző esszenciális zsírsavakat és triglicerideket tartalmaznak. Ennek köszönhetően a nemzetség fajainak jelentősége és ipari felhasználása fokozatosan nő (Dyal és Narine, 2005). Emellett a nemzetség tagjai különböző szerves vegyületek biotranszformációjára is képesek (Holland, 2001), így biotechnológiai potenciáljuk több szempontból is ígéretes.

A *Dissophora* nemzetség tagjai erdei talajlakó szaprofita szervezetek, melyek optimális növekedésükhöz 20 °C alatti hőmérsékletet igényelnek (Benny, 2009). A *Gamsiella multidivariata* fajt magába foglaló *Gamsiella* nemzetség szintén a kevésbé jellemzett járomspórás gombacsoportok közé tartozik (Benny, 2007).

2.4. A lipáz enzim és az általa katalizált reakciók jellemzése

2.4.1. Általános jellemzők

A lipázok (triacilglicerol-hidrolázok; EC 3.1.1.3) szerin-hidroláz enzimek, melyek a trigliceridek, a természetes zsírok és olajok legfőbb összetevőinek hidrolízisét katalizálják. Működésükhöz kofaktorokat nem igényelnek. Az észter kötéseket hasító hidrolitikus aktivitásukat vizes közegben mutatják, azonban vízmentes, vagy alacsony víztartalmú reakcióközegben szintetikus aktivitásra is képesek, mely során az észter kötések kialakulását, vagy áthelyezését katalizálhatják (Divakar és Manohar, 2007).

A lipáz enzimek a szintén észter kötéseket bontó észteráz enzimektől abban különböznek, hogy a lipázok olaj-víz határfelületen működnek, így képesek a vízben nem

oldódó zsírsav-észtereket is hasítani, ellentétben az észterázokkal, melyek csak a vízben oldódó észterek hidrolízisét végzik (Lotti és Alberghina, 2007). A lipázok a karboxilészterázokon belül olyan önálló csoportot alkotó lipolitikus enzimek, melyek képesek a vízben nem oldódó karboxilészterekről a hosszú szénláncú zsírsav molekulákat felszabadítani (Ali és mtsi., 2012). A Nemzetközi Biokémiai és Molekuláris Biológiai Egyesület (International Union of Biochemistry and Molecular Biology; <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>) nomenklaturája alapján a lipázok az EC 3.1.1.3. besorolást kapták, ahol az első szám (3-as) arra utal, hogy a hidrolázok csoportjába tartoznak, a második szám (1-es) mutatja, hogy az észter kötést hasítják. Az utolsó két szám (1-es és 3-as) a szubsztrát jellegét konkretizálja: karbonsav észtert, azon belül trigliceridet hasító enzim definiálható lipáz enzimeként.

A lipázok az α/β hidrolázok családjába tartoznak; közös tulajdonságuk a parallel β -redő motívumokból és az azokat körülvevő α -hélixekből álló konzervált régiók jelenléte. Ezen szerkezet több hidrolitikus enzimben megtalálható, így például számos proteázban, karboxipeptidázban, vagy acetilkolin-észteráz enzimben (Jaeger és mtsi., 1999). A lipázok többségének aktív centrumában hasonló aminosavak jelenléte figyelhető meg, melyek az úgynevezett katalitikus triádot alkotják; ezek a szerin, aszparaginsav vagy glutaminsav és a hisztidin aminosavak. Az aktív centrumban jelen lévő aminosavak a glicin- X_1 -szerin- X_2 -glicin konszenzus motívumot mutatják, ahol az X_1 = hisztidin és az X_2 = aszparagin vagy glutaminsav (Gilham és Lehner, 2005; Aravindan és mtsi., 2007). A katalitikusan aktív szerin aminosav egy β -redő és egy α -hélix által kialakított hajtű szerkezetben helyezkedik el a konzervált pentapeptid szekvenciában (Kapoor és Gupta, 2012). Az aktív centrum az úgynevezett zseb struktúra belsejében található. A zseb felszínét elsősorban hidrofób aminosavak alkotják, amelyek így képesek kapcsolódni a hidrofób szubsztráthoz. A zseb és az aktív centrum eltérő méretének és alakjának köszönhetően a lipázok változatos szubsztrátspecifitást mutatnak (Pleiss és mtsi., 1998). Röntgen krisztallográfiai vizsgálatokkal a humán hasnyálmirigy lipáz (Winkler és mtsi., 1990) mellett a *R. miehei* gombából származó lipáz (Brady és mtsi., 1990) háromdimenziós szerkezetét határozták meg elsőként. Azóta több enzim molekuláris felépítése is ismertté vált, így többek között a *Pseudomonas aeruginosa* (Jaeger és mtsi., 1993), *Thermomyces lanuginosus* (Brzozowski, 1993), *Candida rugosa* (Cygler és Schrag, 1999), *Bacillus subtilis* (Pouderoyen és mtsi., 2001), *Rh. niveus*, *Rh. delemar* és *Rh. chinensis* (Yu és mtsi., 2016).

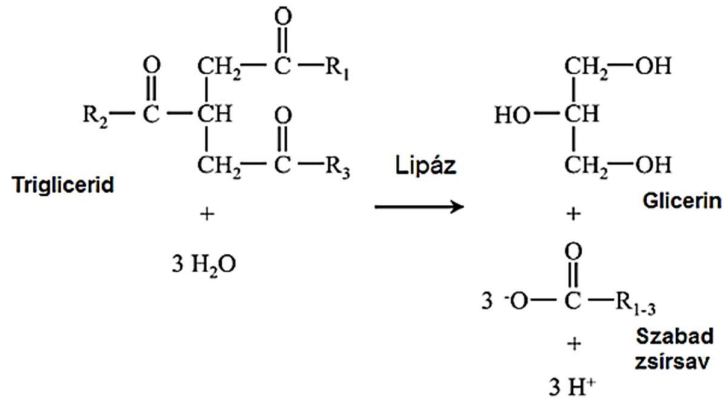
Az élőlényekben a lipáz enzimek jelenléte esszenciális, fontos szerepet töltenek be a lipid és lipoprotein metabolizmusban (Sharma és mtsi., 2001). A lipidek legfőbb biológiai funkciója az energiaszolgáltatás. Az élő szervezetek a zsírok és olajok bontásából származó

energiát anyagcsere folyamataik energiafelhasználásának fedezésére használják fel. Az állati szervezetek és a gombák tartalék tápanyagai főként a lipidek közül kerülnek ki, ellentétben a növények többnyire szénhidrát típusú tartalék vegyületeivel. Eukariótákban a lipáz enzimek legtöbbször organelumba (pl. lizoszómába) zárva találhatóak, de előfordul, hogy a sejten kívüli térbe juttatják ki az enzimet (Lotti és Alberghina, 2007). Humán és állati szervezetekben az emésztőrendszerben termelődik, a táplálkozással bekerült trigliceridek lebontását végzi (nyál, gyomor és hasnyálmirigy lipáz) (Casas-Godoy és mtsi., 2012). Emellett egyes lipázok termelődését a hormonrendszer szabályozza (hormon-szenzitív lipázok), melynek köszönhetően éhezés esetén fokozódik a zsírszövetben raktározott zsírok lipáz enzimek általi lebontása (Greenberg és mtsi., 2001). Növényekben a lipázok elsősorban a magok csírázásában, valamint a gyümölcsök érésében töltenek be fontos szerepet, köszönhetően a magban vagy a gyümölcsben lévő lipidek enzimatis lebonatásának, módosításának (Eastmond, 2006). Alacsonyabb rendű eukariótáknál és baktériumoknál a lipáz gyakran szekretált, de sejtfaikötött vagy intracelluláris (sejten belüli) előfordulás is lehetséges. A *Thermus thermophilus* baktérium például sejtfaikötött, intra-, és extracelluláris lipázt is termel (Deive és mtsi., 2009). Az extracelluláris térbe juttatott enzim feladata a nagy méretű lipid szubsztát lebontása kisebb molekulákká, ezzel a sejt számára felvehető formába alakítása. Néhány opportunistá patogén faj esetében igazolták, hogy virulencia faktorként szolgálhat (pl. *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *Staphylococcus* sp.) (Trofa és mtsi., 2011; Saising és mtsi., 2012). A lipázok nélkülözhetetlenek a sejtfaépítésben és működésben jelentős lipidek, így a membránalkotó lipid vegyületek előállításában is. A lipidszármazékok részt vesznek a sejtek jelátviteli folyamataiban is (Gilham és Lehner, 2005). Az eukarióta lipázok gyakran glikoziláltak, ami szerepet játszik az enzimek aktivitásában, stabilitásában, szekréciójában, illetve a fehérje oldhatóságában, így annak funkcióját is meghatározhatja (Miller és mtsi., 2004).

2.4.2. A katalizált reakciók jellemzése

Hidrolitikus aktivitás

A lipáz enzimek természetben betöltött fő funkciója a zsír-, és olajalkotó triglicerid molekulák hidrolízise (**1. ábra**). Mivel az észter kötések bontása víz molekula belépése mellett zajlik, a hidrolízis víz jelenlétét igényli. Teljes hidrolízis során a reakció eredményeként szabad zsírsavak és glicerín szabadul fel, míg részleges bontás során a szabad zsírsav(ak) felszabadulása mellett mono-, és digliceridek is keletkeznek (Aravindan és mtsi., 2007).



1. ábra. A trigliceridek lipáz enzim általi hidrolízise (Stehr és mtsi., 2003).

Az észter kötés hidrolízise során acil-enzim komplex képződik. A katalitikus reakció az aktív centrumban lévő szerin aminosav hidroxil csoportjának nukleofil támadásával kezdődik az észter kötés kialakításában részt vevő szénatom karbonil csoportján. Ezt követően az acil-enzimkomplex a víz nukleofil támadásával szűnik meg, melynek eredményeként a zsírsav molekula felszabadul és az enzim regenerálódik (Schmid és mtsi., 2001).

A trigliceridek észter kötéseinek teljes hidrolízise enzim katalizálása nélkül magas hőmérsékletet és nyomást igényelne. Az enzim lehetővé teszi a reakció lejátszódását alacsonyabb aktiválási energia (E_a) és mérsékelt reakciókörülmények mellett is (Villeneuve és mtsi., 2000). Enzim által katalizált reakcióban a termék(ek) gyorsabban keletkeznek, így a reakció (milliószor) gyorsabban eléri egyensúlyi állapotát (Patel és mtsi., 2017).

Mivel a vízben oldódó lipázok szubsztrátjai vízben oldhatatlan vegyületek, a katalitikus reakció olaj-víz határfelületen játszódik le. A vizes fázis mellett kialakuló szerves fázist a vízben nem oldódó hidrofób szubsztrát alkotja (emulzió vagy micella formában) (Nagarajan, 2012). A lipázok vízben oldott inaktív állapotban vannak a határfelület (olajcsepp, szerves oldószer) megjelenéséig. A folyamat az úgynevezett határfelületi aktiváció, mely során a lipáz a hidrofób felülethez kapcsolódik, ennek eredményeként az enzim konformációs változást szenved. Az eredetileg egy vagy több flexibilis α -hélix alegységgel fedett aktív centrum így szabadabbá válik. Az α -hélix loop szerepe, hogy az enzim aktív centrumát zárva tartja, így megakadályozza a szubsztrát kötődését az enzim olaj-víz határfelülethez való kapcsolódásáig. Az α -hélixek által kialakított úgynevezett 'fedő' struktúra amfipatikus tulajdonságú, azaz poláris és apoláris jellegű részeket is tartalmaz, így vizes és szerves oldószerben is oldékonyságot mutat. Az enzim konformációs változása lehetővé teszi az aktív centrumot fedő

alegység elmozdulását, így a szubsztrátnak az enzim aktív centrumához történő kötődését (Pandey és mtsi., 1999; Rehm és mtsi., 2010; Kapoor és Gupta, 2012).

Szintetikus aktivitás

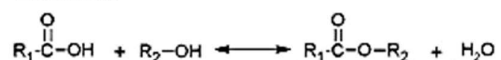
Az enzim nemcsak az észter kötések hidrolízisét, hanem a hosszú szénláncú zsírsavak szintézisét is katalizálhatja (Jaeger és Reetz, 1998; Singh és Mukopadhyay, 2012). Vízmentes vagy alacsony víztartalmú környezetben (szerves oldószerben) a lipázok szintetikus aktivitása dominál (Lortie, 1997). A szintetikus aktivitás során a víz helyett más, nukleofil molekula (pl. alkohol, amin) vesz részt a reakcióban. A lipáz képes az észter kötések kialakítására, áthelyezésére, azaz a különböző észterezési és átészterezési reakciók katalizálására (**2. ábra**).

Észterező reakció során (**2. a ábra**) az enzim az észter kötés kialakulását katalizálja szabad zsírsav molekula és alkohol között, víz kilépése mellett. Ritkább esetben az észter kötések kialakításában tiol, vagy amin vegyületek is részt vehetnek. Átészterezés során (**2. b ábra**), az észteren lévő sav molekula kicserélődik egy másikkra, esetleg molekulán belüli kötés átrendeződés történik. Az átészterezés végbemehet észter és sav (acidolízis), észter és amid (aminolízis), észter és alkohol (alkoholízis), valamint kettő észter molekula között (interészterifikáció) (Casas-Godoy és mtsi., 2012). Lipáz-katalizált alkoholízis során alkoholból és zsírsavakból alkil-észterek keletkeznek, mely ígéretes folyamat többek között a lipáz enzimek biodízel előállításban való felhasználhatósága szempontjából (Andualema és Gessesse, 2012).

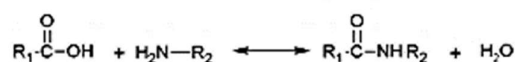
Egyes lipázok nagyfokú stabilitást mutathatnak szerves oldószerekben. A jelen lévő hidrofób oldószernek köszönhetően aktív centrumuk folyamatosan nyitott konformációban marad, így fokozott enzimaktivitás figyelhető meg (Doukyu és Ogino, 2010). Ez a jelenség valószínűleg a vizes közegben megfigyelt határfelületi aktivációhoz hasonló (Kapoor és Gupta, 2012).

a) Észterező reakciók

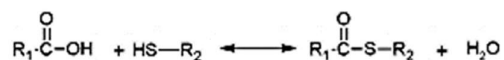
Észterezés



Amid szintézis



Tioészter szintézis

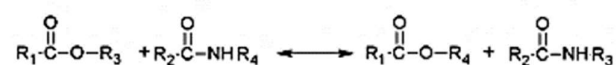


b) Átészterező reakciók

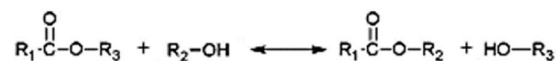
Acidolízis



Aminolízis



Alkoholízis



Interészterifikáció



2. ábra. A lipázok által katalizált szintetikus reakciók (a: észterező, b: átészterező) (Casas-Godoy és mtsi., 2012).

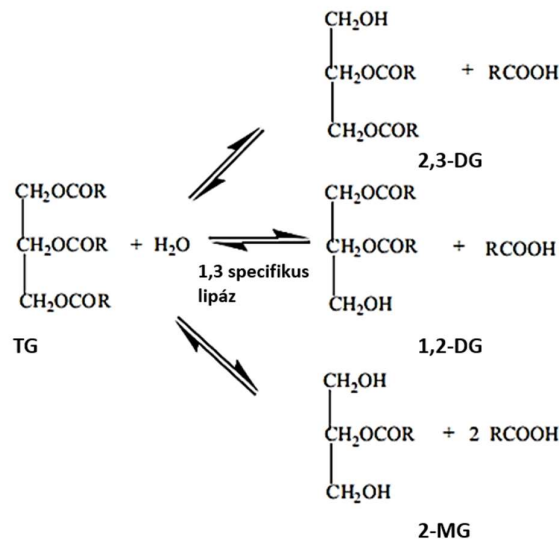
Specifitás

A különböző lipáz enzimek szubsztrátkötő helyei méretben, felépítésben és hidrofobicitásban egyaránt különböznek. Ezek az eltérések határozzák meg az egyes enzimek szubsztrát specifitását. A szubsztrát specifitás függ az enzim molekuláris jellemzőitől, a szubsztrát kémiai felépítésétől és a reakció körülményeitől (Lotti és Alberghina, 2007). A lipázok természetes szubsztrátjai a glicerín-észterek (Sharma és Kanwar, 2014), aktivitásukat így általában a glicerín észterkötésein fejtik ki. A glicerín a természetben előforduló legtöbb lipid molekuláris gerince. Egyes lipázok azonban bizonyos szerkezetű zsírsavláncok hasítását, észterezését előnyben részesítik más szerkezetű lipidekkel szemben. Ez az úgynevezett kemospecifitás, mely függ a zsírsavlánc hosszától (szénatom szám) és telítettségétől, valamint

az esetlegesen jelen lévő kettős kötések helyzetétől és számától (Sharma és mtsi., 2001). Egyazon faj által termelt enzim izoformái is különbözhetnek preferenciában; a *C. rugosa* által termelt lipáz izoformái különbséget mutatnak szénláncosz specifitásban. A Lip3 a rövid, a Lip1 a közepes, míg a Lip2 izoenzim a hosszú szénláncú trigliceridek hidrolízisét részesítik előnyben (Lopez és mtsi., 2004).

A katalizált reakció specifikusságában szintén meghatározó tényező, hogy a szubsztrát mono-, di-, vagy triglicerid, illetve fontos az észter kötés helye is a szubsztrát molekulán. Ez utóbbi tulajdonság hatása a reakció specifikusságára az úgynevezett regioszelektivitás. A lipázok bizonyos pozícióban lévő észter kötések hasítását vagy létrehozását előnyben részesítik más pozícióban lévő kötésekkel szemben. A triglicerid molekulán belül a zsírsavak sn-1, sn-2 és sn-3 pozícióban fordulhatnak elő. Ez alapján megkülönböztethetünk sn-1,3- és sn-2-specifikus, valamint nonspecifikus lipázokat (Yan és mtsi., 2016). A nonspecifikus lipázok képesek a triglicerid bármelyik pozíciójában lévő zsírsav eltávolítására, így a molekula teljes bontására (pl: *C. rugosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. cepacia* lipázok) (Ranganathan és mtsi., 2008). A reakció köztitermékei a mono-, és diglicerid molekulák is gyorsan lebomlanak, nem halmozódnak fel. Az 1,3-specifikus lipázok csupán a triglicerid 1-es és 3-as pozíciójában lévő hidroxil csoporton képesek hatni, így az ezekben a pozíciókban lévő zsírsavakat felszabadítani, vagy észter kötést létrehozni. Ezen enzimek hidrolízisének következtében szabad zsírsavak mellett 1,2 és 2,3 di-, és 2 monogliceridek is keletkeznek (**3. ábra**). A mikrobiális lipázok többsége az sn-1,3 pozícióra mutat szelektivitást (pl: *Aspergillus niger*, *Rh. delemar*, *M. javanicus* és *Yarrowia lipolytica* lipázok) (Contesini és mtsi., 2010).

A lipáz enzimek nem csak specifikus szerkezetű lipideket képesek felismerni, hanem sztereoszelektív/enantioszelektív átalakulásokat is katalizálhatnak (Palomo és mtsi., 2007). A lehetséges két enantiomer forma kémiai tulajdonságaiban (olvadáspont, oldékonyság stb.) nem különbözik, azonban gyakran eltérő biológiai hatással rendelkezik (Casas-Godoy és mtsi., 2012). A lipáz enzimek enantioszelektivitása azt jelenti, hogy a lipázok által katalizált reakció során a lehetséges optikai izomerek (R és S enantiomer) közül csak az egyik termék keletkezik (Sharma és mtsi., 2001). Ennek köszönhetően felhasználhatóak mind enantiomerek szelektív elkülönítésére racém keverékből, mind egyes királis vegyületek specifikus szintézisére (Patel és mtsi., 2017). Ezen tulajdonságuk hasznosíthatóvá teszi őket különböző finom vegyületek előállításában történő felhasználásra (Rodrigues és Fernandez-Lafuente, 2010).



3. ábra. Az 1,3-specifikus lipázok által katalizált általános reakciók. TG: triglicerid, DG: diglicerid, MG: monoglicerid (Kapoor és Gupta, 2012).

2.4.3. Lipázok forrása, azonosítása, ipari termeltetése

Lipáztermelő organizmusok

Köszönhetően széleskörű előfordulásuknak az élőlényekben, a lipáz enzimek változatos forrásból nyerhetők ki. Származhatnak növényből, állatból vagy mikroorganizmusból egyaránt (Gilham és Lehner, 2005). Növényekben a lipáz elsősorban a magok tápanyag raktározó szövetében fordul elő (Mukherjee, 1994). Azonban még viszonylag nagy mennyiségű növényből is csak kevés lipáz nyerhető ki, emiatt a növények nem a legmegfelelőbb enzimforrások (Nagarajan, 2012). Állati eredetű lipázokat izolálhatnak emlősök tejéből, hasnyálmirigyéből, gyomrából, kérődzők szájüregéből. Ezek közül a gyógyszeriparban jelenleg is nagy mennyiségben használják a sertés hasnyálmirigy lipázát (Hasan és mtsi., 2006). Más emlős lipázok lehetséges terápiás célpontként egyes metabolikus betegségek kezelésében, vagy gyógyszerek közvetlen fejlesztésében jelentősek (Müller és Petry, 2004). A kinyerhető lipáz mennyisége azonban állatok esetében is korlátozott, módosításuk és tisztításuk is nehézkes. Gyakran előfordul, hogy állati vírussal és hormonnal szennyezettek, így élelmiszeripari felhasználásuk korlátozott (Sharma és Kanwar, 2014).

Napjainkban a kereskedelmi forgalomban kapható lipázok túlnyomó többsége mikrobiális eredetű. Az iparban alkalmazott enzimek 88%-a mikrobiális, 8%-a állati és 4%-a növényi forrásból származik (Martínez-Martínez és mtsi., 2017). Az utóbbi évtizedekben a

mikrobiális eredetű lipázok ipari felhasználása iránti igény tovább nőtt. Ennek okai az egyre csökkenő előállítási ár, a genetikai módosíthatóság, és a nagy mennyiségben, olcsó szubsztráton történő termeltethetőség (Jaeger és Reetz, 1998; Joseph és mtsi., 2007; Andualema és Gessesse, 2012). Emellett a növényi vagy állati forrásból származó enzimekkel szemben a mikrobiális eredetű enzimek sokkal nagyobb stabilitást mutatnak (Singh és Mukhopadhyay, 2012; Madeira és mtsi., 2017). Különböző fajokkal eltérő szubsztrátspecifitását, hőmérsékleti és pH optimumú enzimeket termeltethetünk (Hasan és mtsi., 2006). A különböző élőhelyekről származó, nagyfokú biokémiai változatosságot mutató enzimek lehetséges forrásai a biotechnológiai folyamatoknak (Lotti és Alberghina, 2007).

A gomba lipázok nagyfokú stabilitása, szelektivitása és széles szubsztrátspecifitása miatt az ipar ezen enzimek irányába fokozott érdeklődést mutat (Yu és mtsi., 2016). Ezeknek a tulajdonságoknak köszönhető, hogy a gomba lipázok a legfontosabb kereskedelmi forgalomban lévő enzimek közé tartoznak (Koblitz és Pastore, 2006). Mivel a fonalas gombák által termelt lipázok főleg extracellulárisak, kinyerésük és további feldolgozásuk könnyebb, így azok enzimforrásként történő hasznosítása preferált az ipar részéről (Ülker és Karaoğlu, 2012; Patel és mtsi., 2017).

Lipázok azonosítása, aktivitásuk meghatározása

Mikrobiális lipáz enzimek azonosítására számos technika áll rendelkezésre (Hasan és mtsi., 2009). Legkönnyebben magas zsír-, és/vagy olajtartalmú élőhelyekről izolálhatunk lipáztermelő fajokat (pl. sajtok felszínéről, szennyvíziszapból, olajpréselő üzemek melléktermékeiről, komposztból) (Andualema és Gessesse, 2012). Alacsony hőmérsékleten is aktív lipázokat tartósan hideg élőhelyekről, elősorban sarkvidéki környezetből (talaj, jég), mélytengerekből, fagyasztott élelmiszerek felületéről származó mikrobákból lehetséges izolálni (pl. *C. antarctica*, *A. nidulans*) (Joseph és mtsi., 2007).

A lipáztermelő képesség vizsgálatának egyik fő meghatározója, hogy ezen fajok képesek az olaj/zsír szubsztrátok egyedüli szénforrásként történő hasznosítására. Nagyszámú izolátum lipáztermelésének egyidejű tesztelésére gyors és egyszerű módszer a Tween 80 vagy tributirin szubsztrát tartalmú agar lemezeken történő tenyésztés. A szubsztrát lipáz általi lipolízisének hatására a telepek körül keletkező feltisztulási zónák jelenlétéből és méretéből következtethetünk a lipáztermelés mértékére. A módszer hátránya, hogy ezen szubsztrátokat nem kizárólag a lipáz enzimek, hanem az észterázok is képesek hidrolizálni, emiatt valódi lipázok azonosítására további célzott aktivitás-meghatározó, megerősítő mérések elvégzése

szükséges (Gupta és mtsi., 2003). Szintén gyakran alkalmazott kvalitatív módszer az olívaolaj tartalmú táptalaj és Rhodamine B fluoreszcens festék használata lipolitikus fajok azonosítására. A Rhodamine festék fluorszcens komplexet képez a szabad zsírsavakkal, így UV fény hatására a lipáztermelő törzsek telepei körül fluoreszcens zóna figyelhető meg (Hasan és mtsi., 2009).

Számos módszer létezik a lipázaktivitás kvantitatív meghatározására, melyek a szubsztrát fogyasztását, vagy a termék felszabadulását monitorozzák. Gyakran használt mérési módszer a titrimetria, leggyakrabban trioleát, vagy olívaolaj hidrolízise során felszabaduló zsírsavak meghatározására (Yu és mtsi., 2016). A módszer megbízható, pontos, de rendkívül időigényes eljárás. A leggyakrabban alkalmazott hidrolitikus aktivitás meghatározó módszerek közé tartozik a kromogén szubsztrátokkal történő kolorimetriás aktivitás meghatározás (pl. *p*-nitrofenil-észterek vagy naftil-észterek alkalmazásával). A *p*-nitrofenil-észterek (*p*NF-észterek) esetében a lipázaktivitásnak köszönhetően *p*-nitrofenol, míg naftil-észterek esetében naftol szabadul fel, melyek színes termékek. Előnyei, hogy a keletkező színes termék könnyen detektálható fotométerrel (410 és 560 nm hullámhosszon). A módszer gyors és viszonylag olcsó, valamint változatos szénlánc-hosszúságú szubsztrátok állnak rendelkezésünkre a kereskedelmi forgalomban (Gupta és mtsi., 2003). A fluoreszcencián alapuló mérések lényege, hogy az enzimatis reakció során a keletkező termék fluoreszcens jelet bocsájt ki, mely UV fényben mérhető, pl. pirén tartalmú triglicerid analógok, metilumbelliferil szubsztrátok segítségével (Gilham és Lehner, 2005). A különböző kromatográfiai eljárásokkal történő aktivitás meghatározás időigényes és költséges módszer (drága műszerek és sztenderdek szükségesek); ilyenek a HPLC (high performance liquid chromatography) és GC (gas chromatography) analitikai mérési módszerek (Fu és mtsi., 2014). A szintetikus aktivitás meghatározására ugyanakkor e technikák alkalmazása terjedt el leginkább (Teng és Xu, 2007; Yu és mtsi., 2016).

Az utóbbi néhány évben újfajta megközelítés vált népszerűvé enzimek azonosítására. A metagenom analízis során egész mikrobiális közösség térképezhető fel ismert enzimeket kódoló génszekvenciák hasonlósági keresésével. A környezeti mintából létrehozott génkönyvtár fő előnye, hogy a laboratóriumban nem, vagy nehezen tenyészthető fajokból is azonosíthatók új enzimek (Simon és Daniel, 2011; Sahoo és mtsi., 2016).

Tenyésztési és termelési körülmények

A lipáz enzimek jellegzetes metabolikus folyamat részei, így génjeik kifejeződése erősen szabályozott. Habár a legtöbb bakteriális lipáz konstitutívan termelődik (Sharma és

mtsi., 2011), gombák esetében gyakran induktor jelenléte szükséges (Falony és mtsi., 2006). Jelentős lipáz expresszióhoz lipid induktor jelenléte mellett megfelelő fiziológiai paraméterek (pH, hőmérséklet és oxigénszint) is szükségesek (Gupta és mtsi., 2004). Ezen kívül a szén- és nitrogénforrás típusa és koncentrációja, valamint a tápközegben jelen lévő ásványi sók, fémionok is hatással vannak az enzimtermelésre (Sharma és mtsi., 2001).

A mikrobiális lipázok ipari termeltetésére elsősorban a süllyesztett, folyadék tenyészet (SmF: Submerged Fermentation) alkalmazása az elterjedt, azonban a szilárd tápközegen történő előállítás is előfordul (Aravindan és mtsi., 2007). A folyadék fázisú fermentáció főbb előnyei: i) szabad víz jelenléte a tenyésztőközegben, ii) könnyű kezelhetőség nagy mennyiségben történő termelés esetében is, iii) valamint a tenyésztési körülmények (hőmérséklet, pH, oxigén szint) egyszerűbb kontrollálása (Patel és mtsi., 2017). Azonban a szilárd fázisú fermentáció (SSF: Solid State Fermentation) alkalmazása is számos előnnyel rendelkezik: egyszerűbb és olcsóbb tenyésztőközeg, nagyobb mennyiségű, koncentráltabb termék képződése jellemzi, valamint a szilárd szubsztrát nemcsak tápanyagot szolgáltat, hanem vázként is funkcionál a sejtek növekedéséhez (Pandey és mtsi., 1999; Rajan és Nair, 2011). Ez utóbbi tényező elsősorban a fonalas gombák növekedésének kedvez. Emellett a mezőgazdasági maradványok szubsztrátként történő hasznosítása környezetbarát eljárás, ugyanis ezen növényi maradványok a mezőgazdasági tevékenységek során minden évben nagy mennyiségben keletkeznek, megújulóak, így újrafelhasználásuk csökkenti felhalmozódásukat (Ray és Behera, 2017; Madeira és mtsi., 2017). A szilárd szubsztrát megválasztásánál fontos szempont a szemcseméret. A túl kicsi partikulum méret a szubsztrát összetapadását okozhatja, ezáltal a levegő áramlása akadályozott, míg a túl nagyméretű szemcsék limitált növekedési felületet eredményeznek. Emellett az SSF esetében kritikus a megfelelő vízakaktivitás (a_w) beállítása és kontrollálása, ugyanis annak szintje befolyásolhatja a mikrobiális aktivitást (Patel és mtsi., 2017).

A lipázok ipari folyamatokban biokatalizátorként történő alkalmazását övező növekvő érdeklődés ellenére felhasználásukat gyakran a magas termelési költségek korlátozzák. Ennek érdekében szükséges a megfelelő tenyésztési körülmények, szubsztrátok enzimtermelésre gyakorolt hatásának vizsgálata, mely lehetővé teszi az enzim előállítási költségeinek mérséklését (Salihu és mtsi., 2012).

2.4.4. A lipázok jelenlegi és lehetséges felhasználása

A lipázokat az általuk katalizált reakciók változatosságának (hidrolízis, észterezés, alkoholízis stb.) és specificitásának (szubsztrát-, regio-, és enantioszelektivitás; lásd 2.4.2.

fejezet) köszönhetően számos ipari folyamatban alkalmazzák (Kapoor és Gupta, 2012). A lipázok használata lehetőséget teremt a kívánt zsírsav megfelelő pozícióba helyezésére, valamint szelektív eltávolítására a glicerín molekulán, így bizonyos típusú lipidek célzott előállítására (Speranza és Macedo, 2012). A lipázok ipari jelentőségében szintén fontos szerepet játszik a szerves oldószerben történő stabilitás, illetve az enzim egyszerű és nagy mennyiségben történő előállíthatósága. Mindezen tulajdonságoknak köszönhetően a proteáz és a szénhidrát bontó enzimek után a lipáz a harmadik legjelentősebb ipari enzim (Ray, 2012; Yu és mtsi., 2016). Az ipari enzimek (75%-a hidrolitikus enzim) világpiacát 2004-ben 2, míg 2009-ben 2,5 milliárd dollárra becsülték, mely fokozatos növekedést mutat, így egyes tanulmányok szerint 2017-re a 6,9 milliárd dollárt is elérheti (Meilleur és mtsi., 2009; Sharma és mtsi., 2011; Sanchez és Demain, 2017). Ezen belül a lipáz enzimek ipari felhasználásra előállított mennyisége a következő években várhatóan eléri a leggyakrabban alkalmazott proteáz enzimekét (Li és mtsi., 2012). Biotechnológiai felhasználásuk mellett a lipázok kutatásával kapcsolatban megjelenő publikációk száma is fokozatosan növekszik (Singh és Mukhopadhyay, 2012), mely mutatja e területben rejlő széles kutatási potenciált.

A lipázok ipari folyamatok biokatalizátoraként történő felhasználásának főbb előnyei az általuk igényelt enyhe reakciókörülmények, a specifikus termékképződés minimális melléktermék képződése mellett, melynek köszönhetően további termékkinyerési és fejlesztési lépések kevésbé szükségesek (Houde és mtsi., 2004). A szerves szintézisek katalizálásában főként az enyhe reakciókörülmények, valamint a hagyományos kémiai módszerekkel nehezen végbemenő átalakulások véghezvitele teszi ígéretes biokatalizátorrá a lipázokat (Gotor-Fernández és Gotor, 2007). A folyamatok az enzim-katalizált reakciókkal gazdaságossá és környezetbaráttá tehetők. Ennek köszönhetően a lipáz enzimek a leggyakrabban használt biokatalizátorok a szerves szintetikus folyamatokban (Brahmachari, 2017).

A kémiai módszerekhez viszonyítva ezen reakciók fő hátrányai az alacsony hatásfokú átalakítás, valamint az enzim visszanyerésének nehézsége (Aravindan és mtsi., 2007). Utóbbi az enzimek immobilizálásával, hordozó molekulához történő rögzítésével kiküszöbölhető (Ribeiro és mtsi., 2011). A lipázok főbb felhasználási területei a detergens-, élelmiszer-, gyógyszer-, kozmetikai-, és a papíripar.

Detergensek előállítása

A lipázok hidrolitikus aktivitásának legnagyobb felhasználási területe a mosó- és tisztítószerek gyártása. A jelenleg forgalomban lévő mosóporok/mosógélek többsége mikrobiális eredetű proteáz, lipáz, amiláz és celluláz enzimeket tartalmaz (Andualema és

Gessesse, 2012). A lipázok a ruhaszövetben lévő olajos, zsíros foltok eltávolítását, vízdékonyabb formába történő átalakítását végzik. Az enzimekkel a mosás alacsonyabb hőmérsékleten végezhető, valamint egyéb más, a környezetre káros vegyi anyag hozzáadása nélkül is elérhető a kívánt tisztító hatás (Singh és Mukhopadhyay, 2012). Emellett biológiailag lebontható, a vízi életre nem káros, így az enzimek mosószerekben történő alkalmazása környezetbarát eljárás. Széleskörű felhasználásuk bizonyítéka, hogy évente kb. 1000 tonna lipázt használnak fel a különböző mosószerek állóállítása során (Sanchez és Demain, 2017). A mosószerekbe adagolt lipázoknak széles szubsztrát specificitással kell rendelkezniük, a mosási körülmények (pH 10 – 11 és 30 – 90 °C) szélsőségessége ellenére aktívnak és stabilnak kell maradniuk, valamint a proteázok általi lebontással szemben is ellenállónak kell lenniük (Jaeger és Reetz, 1998). Az első kereskedelmi forgalomban kapható rekombináns lipáz a Novo Nordisk által kifejlesztett 'Lipolase' 1994-ben jelent meg. A termofil *Thermomyces lanuginosus* lipázt *Aspergillus oryzae*-vel termeltették, mivel túl alacsony mennyiségben szintetizálódott a gazdaszervezetben (Aravindan és mtsi., 2007). Detergenszerekben felhasznált lipázokat *Pseudomonas*, *Candida*, *Chromobacterium* és *Aspergillus* fajokból nyernek ki. A lipázokat emellett lefolyótisztítóknak és kontaktlencse folyadékokban is alkalmazzák a lipid lerakódások eltávolítására (Hasan és mtsi., 2006).

Élelmiszeripar

A lipáz enzimek a modern élelmiszeripar szerves részét képezik. Jelentős szerepet játszanak a sajtok íz-, és illatanyagainak előállításában. Az íz kialakulása a sajtban az erjesztést végző mikrobák általi proteolízisnek és lipolízisnek köszönhető, mely kialakítja a sajt karakterisztikus ízét (pl. metil-keetonok, mint íz molekulák kialakítása kék sajtokban) (Aravindan és mtsi., 2007). A tejben található zsírok hidrolízisének köszönhetően szabad zsírsavak szabadulnak fel, melyek hozzájárulnak a sajt aromájához, illetve egyéb íz és illatvegyületek előanyagaiként is szolgálnak. Lipáz és egyéb enzimek hozzáadása fokozza az érési folyamatokat (Houde és mtsi., 2004). A Novozymes által előállított *Palatase M* enzimekészítmény többféle enzimet (lipáz, proteáz) tartalmaz, alkalmazása a sajt gyors érését eredményezi (Kheadr és mtsi., 2003). Egyéb tejtermékek (pl. vaj, vajkrémek) előállítása mellett margarinokban, húskészítményekben és a kolbász érése során is nagy jelentőséggel bírnak a lipázok (Pandey és mtsi., 1999). Az eltérő szubsztrát specificitású lipázok eltérő hosszúságú zsírsavakat szabadítanak fel, így alkalmazásukkal más-más ízhatás érhető el. Specifikus reakciót katalizáló lipázzal kontrollálhatók az észterezési, átészterezési reakciók, így a szabad

zsírsavak mennyisége is, mely jelentősen befolyásolja a termék ízét (Sharma és mtsi., 2011; Fernandes és Carvalho, 2017).

A lipázok kereskedelmi forgalomban lévő íz és aroma észterek, elsősorban rövid láncosszúságú észterek, mesterséges előállításában is fontos szerepet játszanak (Aravindan és mtsi., 2007; Lortie, 1997). Ilyen a citronellil-acetát/butirát/valerát (Melo és mtsi., 2005) és az etil-hexanoát/laurát gyümölcsös illatészterek (Talon és mtsi., 1996), valamint izoamil/metil/etil/geranil-propionát/butirát/kaproát ízészterek előállítása (Abbas és Comeau, 2003).

A lipázok emulgeáló szerként is használatosak. Az enzimek lehetővé teszik a pékáruk (pl. kenyér és tészták) hosszabb eltarthatóságát, szabályozzák a nem enzimátikus barnulásukat, növelik térfogatukat, valamint javítják szerkezetüket. Sütőipari termékek minőségének javítására elsősorban *A. niger*, *Rh. oryzae* és *C. cylindracea* fajok lipáz enzimeit alkalmazzák (Hasan és mtsi., 2006).

Lehetőség van az olcsó, kevésbé kívánatos lipidek valamilyen értékesebb terméké történő módosítására is (Ray, 2012). A kakaóvajban található triglicerid molekulák elsősorban sztearinsavat tartalmaznak, mely a száj hőmérsékletén, így 37 °C-on olvad. Az olcsóbb pálmaolaj ezzel szemben főként palmitinsavat tartalmaz, 23 °C-on folyékony halmazállapotú, így egy kevésbé értékes növényi olaj. A pálmaolaj *R. miehei* immobilizált lipáz által katalizált átészterezése eredményeként kakaóvaj helyettesítő termék állítható elő (Bloomer és mtsi., 1990; Singh és Mukhopadhyay, 2012). A növényi olajokat módosíthatjuk olyan zsírokká, amelyek az anyatejben előforduló zsírokhhoz hasonlóak, így azok csecsemő tápszerekben is alkalmazhatók (Tecalão és mtsi., 2010).

Az egészséges termékek iránt megnövekedett igény szükségessé teszi az élelmiszeripar ilyen irányú fejlesztéseit. Az élelmiszerek triglicerid összetételének célzott megváltoztatásával csökkenthető annak kalóriatartalma. Elsősorban a közepes (C6 – C12) szénláncosszúságú zsírsavakat tartalmazó trigliceridek raktározódnak kevésbé a zsírszövetben (Speranza és Macedo, 2012). Emellett lipáz által katalizált észterezéssel, vagy hidrolízissel digliceridek is előállíthatók. A magas diglicerid tartalmú olajok és egyéb élelmiszerek fogyasztása csökkenti a zsírszövet felhalmozódását (Duan és mtsi., 2010). A kereskedelmi forgalomban kapható, 80% digliceridet tartalmazó *Econa* elnevezésű olajat (*Kao Corp.*, Tokió) enzimátikus folyamatokkal állítják elő. Az olajat alkotó digliceridek a trigliceridekkel szemben nem alakulnak át raktározott zsírrá a testben. Japánban az *Econa* olaj és az abból származó termékek éves eladása 2002-ben meghaladta a 150 millió dollárt (Houde és mtsi., 2004).

A lipáz biokatalizátorként történő alkalmazásával megnövelhetjük a zsírok, olajok többszörösen telítetlen zsírsav (PUFA, pl. Ω -3 zsírsav: eikozapentaénsav (EPA), dokozaheptaénsav (DHA), α -linolénsav (ALA)) tartalmát (Fajardo és mtsi., 2003), így alkalmas a napraforgó- vagy a pálmaolaj minőségének javítására. Ezen kívül fenol vegyületek (flavonoidok, fenolsavak, tanninok) észterezésével antioxidáns vegyületek dúsíthatók fel, melyek fokozzák a PUFA gazdag olajok oxidatív stabilitását, valamint egészségügyi hatásai szintén jótékonyak (Speranza és Macedo, 2012). A természetes antioxidáns vegyületek acilezése fokozza azok oxidatív-, és hőstabilitását, mely lipáz által katalizált reakcióban a klasszikus kémiai átalakítással szemben jóval gazdaságosabb, környezetbarátabb és specifikusabb eljárás (Torres és mtsi., 2012). Lipáz enzimekkel a tápanyagtartalom szempontjából fontos struktúrált trigliceridek hozhatók létre, ami egészségesebb élelmiszerek előállítását teszi lehetővé (Jaeger és Reetz, 1998).

Gyógyszeripar és gyógyászat

A lipázok enantiospecifikus tulajdonságainak köszönhetően speciális szerves szintézisek katalizálására is alkalmazhatók, így királis vegyületek szelektív előállítására, valamint különböző enantiomerek racém elegyből történő szelektív felszabadítására (pl. prosztaglandinok, cefalosporinok, nem szteroid gyulladásgátlók, penicillinek) (Casas-Godoy és mtsi., 2012). A nem-szteroid gyulladásgátlók közé tartozó vegyületek (pl. flurbiprofén, ketoprofén, naproxén, ibuprofén) esetében gyakran csak az egyik (S és R forma) enantiomer fejti ki a kívánt biológiai hatást (Sharma és mtsi., 2011). A flurbiprofén (2-fluoro- α -metil-(1,1'-bifenil)-4-ecetsav) esetében a gyulladásgátló (ciklooxygenáz enzim gátló) hatással csak az S forma rendelkezik, ezzel szemben az R forma emésztőrendszeri problémákat okozhat. Emiatt kiemelkedően fontos az optikailag aktív forma szelektív felszabadítása, mely lipáz által katalizált észterező reakcióval megvalósítható (Bae és mtsi., 2006; Arroyo és mtsi., 2017). Emellett számos további gyógyszerkészítmény, így emésztést segítő (Mohamed és mtsi., 2011) és magas koleszterinszint csökkentő szerek előállításánál alkalmazzák a lipáz enzimet (Gill és Valivety, 1997). A *C. rugosa* által termelt lipáz enzim szerepet játszhat a lovasztatin szintézisében, mely a vér koleszterinszintjét csökkentő vegyület (Hasan és mtsi., 2006). Továbbá egyes nagy biológiai aktivitású vegyületek, neuroszteroidok, hormonok és glükokortikoidok hatékonyan szintetizálhatók lipáz által katalizált acilezés és alkoholízis során. Lipáz által katalizált reakciókban néhány olyan szteroid és nukleozid vegyület is termeltethető,

melyek a hagyományos szintetikus eljárásokkal nem, vagy csak nehezen előállíthatók (Nagarajan, 2012).

A lipázok jelentősek a diagnosztika területén is, ugyanis jelenlétük vagy hiányuk bizonyos fertőzésre vagy betegségre utalhat (Casas-Godoy és mtsi., 2012). A *Mycobacterium tuberculosis* baktérium például a nyugalmi fázisból való kilépés során lipáz enzimet szekretál, mely biomarkerként szolgálhat aktív tuberkulózis fertőzés kimutatására a lappangó fázist követően (Brust és mtsi., 2011). Az akut hasnyálmirigy-gyulladás kimutatásában jelentős szerepe van a vérben lévő amiláz és lipáz enzimszint vizsgálatának. Ezen kívül a vér triglicerid szintje kolorimetriás módszerrel meghatározható, a glicerinnel lipáz általi felszabadításával (Hasan és mtsi., 2006).

Kozmetikai ipar

A lipázok által előállított mono-, és diglicerideket a kozmetikai iparban felületaktív anyagokként hasznosítják (Sharma és mtsi., 2011). Emellett bőrpuhító készítmények (testápolók, naptejek, fürdőolajok) előállítása során izopropil-palmitát, izopropil-mirisztát és 2-etilhexil-palmitát vegyületek szintézisét végezhetik lipázokkal (Andualema és Gessesse, 2012). Bizonyos hajgondórtó készítmények lipáz tartalma hozzájárul a hatóanyag könnyebb bejutásához a hajba (Singh és Mukhopadhyay, 2012).

Cellulóz- és papíripar

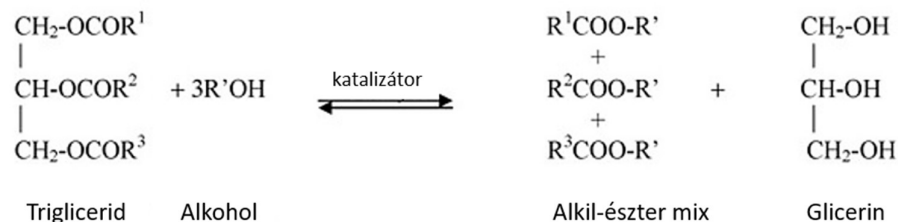
A lipáz enzimek papírgyártásban történő használata a 90-es években kezdődött (Sharma és mtsi., 2011). Az enzimkezeléssel a faanyag hidrofób komponenseinek (trigliceridek és viasz) eltávolítása oldható meg (Bajpai, 1999). Emellett a lipázok jelenléte növeli a papír fehérségét, valamint csökkenti a gyártás során keletkező szennyvíz szennyezettségének mértékét (Casas-Godoy és mtsi., 2012). A papíriparban az *Aspergillus* fajok lipázai mellett *C. rugosa* és *C. cylindracea* eredetű lipáz enzimeket használnak (Singh és Mukhopadhyay, 2012).

Környezetvédelem

Számos ipari folyamat során keletkezhet magas zsír és olajtartalmú szennyvíz és szennyvíziszap. Kezelésükben a cellulázok, proteázok és pektinázok mellett a lipáz enzimeknek is fontos szerepe van (Cammarota és Freire, 2006). Továbbá egyéb lipid tartalmú hulladékok, poliészterek lebontásában, olajszennyezett talajok bioremediációjában is ígéretesek a lipázok (Sharma és mtsi., 2011; Karigar és Rao, 2011).

Biodízel előállítás

A biodízel megújuló energiaforrásból származó üzemanyag, iparban a növényi olajok (repce-, napraforgó-, pálma-, vagy szójaolaj), illetve állati zsírok átészterezésével állítják elő (Jaeger és Eggert, 2002) katalizátor (pl. H_2SO_4 vagy $NaOH$) jelenlétében (**4. ábra**). A reakció termékei az alkil-észterek, melyek lehetnek zsírsav-metil-, vagy etilészterek attól függően, hogy az alkoholízis metanol vagy etanol jelenlétében történik (da Silva és mtsi., 2017).



4. ábra. A trigliceridek átészterezése (Bajaj és mtsi., 2010).

A metanol és etanol viszonylag olcsó alkoholok, azonban a reakció magas hőmérsékletet igényel ($60 - 70 \text{ }^\circ\text{C}$), illetve számos melléktermék és szennyvíz is keletkezik, így az eljárás nem gazdaságos, valamint környezetbarátnak sem tekinthető. A figyelem emiatt a mikrobiális forrásból származó lipázokkal történő biodízel előállítás felé fordítódik. Lipáz enzimekkel történő átészterezés alacsonyabb hőmérsékletet igényel, és a reakció során kevesebb melléktermék keletkezik (Salis és mtsi., 2007; Yan és mtsi., 2016; Madeira és mtsi., 2017). Az enzimek immobilizálásával fokozható azok stabilitása, valamint többszöri felhasználásuk is lehetséges, így a folyamat gazdaságossá tehető (Tan és mtsi., 2010). Ehhez szerves oldószerekben is aktív lipáz enzimekre van szükség (Nagarajan, 2012). Biodízel előállításra jelenleg egyes kereskedelmi forgalomban lévő immobilizált lipáz enzimeket használnak; *Novozym 435* (*C. antarctica* lipáz B), *Lipozyme RM IM* (*R. miehei* lipáz) és *Lipozyme TL IM* (*T. lanuginosus* lipáz) enzimpreparátumokat (da Silva és mtsi., 2017). Biodízel előállításához alternatív alapanyagul szolgálhatnak a használt főzőolajok, nyers vagy nem ehető növényi olajok, valamint a növényi olajok feldolgozása során keletkező magas, szabad zsírsav tartalmú melléktermékek egyaránt. Ezen nyersanyagok használatával tovább növelhető a biodízel versenyképessége a hagyományos, kőolaj alapú üzemanyagokkal szemben.

2014-ben, az amerikai *Blue Sun Energy Company* nevű cég létrehozta enzimmkatalízis alapú biodízel üzemét, melynek termelési kapacitása 135.500 m^3 biodízel évente. Az enzim-

alapú technológiát a *Novozymes* fejlesztette ki (<http://energy.agwired.com/2014/01/20/blue-sun-opens-most-advanced-biodiesel-plant/>).

További felhasználás

A lipázok különböző kenőanyagok, biológiailag lebontható biopolimerek (polifenolok, poliszacharidok és poliészterek) szerves oldószer tartalmú közegben történő szintézisét is katalizálhatják (Jaeger és Eggert, 2002; Singh és Mukhopadhyay, 2012). Lipázokkal lipid bioszenzorok előállítására is lehetséges, a triglicerid és koleszterin mennyiségi meghatározására a klinikai diagnózisban, valamint az élelmiszeriparban (Setzu és mtsi., 2007; Ray, 2012). A textiliparban a lipáz általi enzimátikus mosás a ruhaanyag rostjainak textúráját javítja (Hasan és mtsi., 2006). Az állati bőrök feldolgozása során a bőr zsírtalanítása kritikus lépés, melyet jelenleg elsősorban oldószerek használatával végeznek, azonban lipázok alkalmazásával a folyamat környezetbaráttá tehető (Saran és mtsi., 2013). Ezen kívül növényvédő szerek gyártásában is szerepet játszhat a lipáz enzim: *C. cylindracea* lipázzal 2-bromopropionsav és 2-kloropropionsav herbicid előanyagok állíthatók elő (Sharma és mtsi., 2011).

3. CÉLKITÚZÉSEK

A járomspórás gombák jó extracelluláris enzimtermelőként ismertek, számos faj biotechnológiai alkalmazására találunk példát. Azonban csak néhány, a csoportba tartozó faj által termelt lipázt izoláltak eddig, illetve használnak fel egyes ipari folyamatokban. Az enzimek termelésére, hidrolitikus és szintetikus aktivitására, valamint biokémiai jellemzőire vonatkozó ismeretek is viszonylag korlátozottak. Ugyanakkor a biotechnológiai és ipari fejlesztések új, hidrolitikus és/vagy szintetikus reakciók katalizálása szempontjából előnyös tulajdonságokkal rendelkező lipázok azonosítását és jellemzését teszik szükségessé. A mezőgazdasági- és élelmiszeripari folyamatok során nagy mennyiségben keletkező melléktermékek (növénymaradványok, olajos mag préselvények) szubsztrátként való alkalmazása környezetbarát és olcsó biotechnológiai eljárás ipari jelentőségű lipáz enzimek termeltetésére.

Doktori kutatómunkám célja az alap kutatásokban és potenciálisan biotechnológiai fejlesztésekben felhasználható lipáztermelő járomspórás gombák és extracelluláris lipáz enzimek azonosítása volt. Emellett célunk volt a lipázaktivitást mutató izolátumok enzimtermelésének vizsgálata különböző fermentációs körülményeket, és különféle mezőgazdasági és élelmiszeripari növénymaradvány szubsztrátokat felhasználva. Céljaink közé tartozott a termelt enzimek izolálása és lipáz-katalizált hidrolitikus és szintetikus reakciók biokémiai jellemzése is. Egyes vizsgált jellemzők információt nyújthatnak az enzimek működéséről és stabilitásáról különféle környezetben, így az ipari folyamatokban történő alkalmazhatóság szempontjából is jelentős információkkal bővíthetnek ismereteink.

Mindezek alapján a kutatás konkrét célkitűzései a következők voltak:

1. Különböző nemzetségekbe (*Mucor*, *Rhizomucor*, *Rhizopus*, *Gilbertella*, *Dissophora*, *Gamsiella*, *Mortierella* és *Umbelopsis*) tartozó járomspórás gombatörzsek extracelluláris lipáztermelésének tesztelése tributirin tartalmú szilárd tápközegen.
2. A kiválasztott izolátumok lipáztermelésének vizsgálata különböző tenyésztési körülmények között (pl. lipid induktorok, magas lipidtartalmú növényi szubsztrátok enzimtermelésre gyakorolt hatásának vizsgálata).

3. Átészterező és észterező reakciók katalizálásának vizsgálata kiválasztott enzimkivonatokkal. A reakció körülményeinek változtatásával az enzimek szintetikus aktivitásának biokémiai jellemzése.
4. Az ígéretes tulajdonságokkal (pl. magas szintetikus és hidrolitikus aktivitással) rendelkező lipázok tisztítása, azonosítása.
5. A tisztított enzimek hidrolitikus aktivitásának biokémiai jellemzése (pl. hőmérséklet és pH optimum, stabilitás, enzimkinetika, szubsztrát specificitás meghatározása, lehetséges gátlók vizsgálata).

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Alkalmazott törzsek

A kutatásba bevont 204 járomspórás gombatörzs a Szegedi Mikrobiológiai Törzsgyűjteményből (<http://szmc.hu>) származott. Az extracelluláris lipáztermelés során a vizsgált törzsek a *Dissophora* (2), *Gamsiella* (1), *Gilbertella* (16), *Mortierella* (60), *Mucor* (32), *Rhizomucor* (27), *Rhizopus* (59) és *Umbelopsis* (7) nemzetségekre tartoztak (zárójelben a vizsgált törzsek darabszámát tüntettem fel).

A felhasznált törzsek jellemzőit, valamint törzsgyűjteményi azonosító számukat az **1. sz. melléklet** tartalmazza. A törzsek tárolása malátás táptalajon 4 °C hőmérsékleten történt.

4.2. Alkalmazott táptalajok és tápoldatok

Malátás táptalaj (% m/v): 0,5% élesztőkivonat, 0,5% malátakivonat, 1% D-glükóz, 2% agar

Táptalaj a lipáztermelés teszteléséhez (% m/v): 0,5% pepton, 0,3% élesztőkivonat, 0,1% tributirin, 1% agar

Indukciós minimál tápoldat (% m/v): 0,15% (NH₄)₂SO₄, 0,15% Na-L-glutamát, 0,05% yeast nitrogen base (YNB) és 1% D-glükóz, kísérlettől függően a D-glükóz helyett 1% (v/v) Tween 80, pálma-, szója-, gyapotmag-, napraforgó-, olíva-, extra szűz olíva-, tökmag-, kukoricacsíra-, búzacsíra-, illetve szezámagolaj

Ásványi sós tápoldattal dúsított folyadék fázisú fermentációs (SmF) tápközeg (% m/v): 1,2% NaH₂PO₄, 0,2% KH₂PO₄, 0,03% MgSO₄, 0,025% CaCl₂, 1% (NH₄)₂SO₄, 2% búzakorpa, 2% (v/v) olívaolaj

Sztenderd szilárd-fázisú fermentációs (SSF1) tápközeg: 5 g búzakorpa vagy kender-, len-, tökmag, és vörös szőlőmag préselési maradékának őrleménye, mákliszt, zabkorpa és 5 ml desztillált víz

Ásványi sós tápoldattal dúsított szilárd fázisú fermentációs tápközeg (SSF2) (g/g szilárd szubsztrátra vonatkoztatva): 1,5% glükóz, 0,75% (NH₄)₂SO₄, 0,34% NH₂CONH₂, 1,5%

olívaolaj, 1,8% NaH₂PO₄, 0,3% KH₂PO₄, 0,045% MgSO₄ x 7 H₂O, 0,0375% CaCl₂, 5 g búzakorpa (enzimtisztítás során 130 g búzakorpa) vagy kender-, len-, tökmag, és vörös szőlőmag préselési maradékának őrlménye, mákliszt, zabkorpa. A tápközeg nedvességtartalmát Falony és mtsi. (2006) publikációja alapján 65%-ra állítottuk be.

4.3. Alkalmazott oldatok

Az enzimek tisztítása és jellemzése során alkalmazott oldatok

Foszfát puffer (100 mM, pH 6,8) 53,7% NaH₂PO₄ (100 mM) és 46,3% Na₂HPO₄ (100 mM)

Acetát puffer (100 mM/50 mM pH 6) 100 mM vagy 50 mM nátrium-acetát, a pH beállítása 96%-os ecetsavval

Trisz puffer (50 mM, pH 8,5) 4,36 g/l trisz-(hidroxi-metil)-amino-metán és 2,21 g/l trisz-hidroklorid

Poliakrilamid gél festéséhez használt oldatok

Coomassie-kék festés:

Festő oldat: 0,0025% (m/v) *Coomassie Brilliant Blue R-250*, 40% (v/v) metanol, 7% (v/v) ecetsav

Festékmentesítő oldat 1: 40% (v/v) metanol, 7% (v/v) ecetsav

Festékmentesítő oldat 2: 5% (v/v) metanol, 3,5% (v/v) ecetsav

Ezüstfestés:

Fixáló oldat: 50% (v/v) metanol, 12% (v/v) ecetsav, 0,05% (v/v) formaldehid

Mosó oldat: 20% (v/v) etanol

Érzékenyítő oldat: 0,02% (m/v) Na₂S₂O₃

Festő oldat: 0,2% (v/v) AgNO₃

Előhívó oldat: 0,0004% (m/v) Na₂S₂O₃, 6% (m/v) NaCO₃, 0,05% (v/v) formaldehid

Lipázaktivitás natív gélen történő kimutatására használt oldatok

Fluoreszcens kimutatás: 200 μM metil-umbelliferil-nonanoát (Sigma-Aldrich) foszfát pufferben (50 mM, pH 6,8)

Kolorimetriás kimutatás: 1 mM α -naftil-acetát (Sigma-Aldrich) és 25 mg *Fast Red* foszfát pufferben (50 mM, pH 6,8)

4.4. Tenyésztési körülmények

A lipáztermelés vizsgálata szilárd táptalajon:

Az enzimaktivitás vizsgálatokhoz 0,1% tributirin tartalmú 20 ml tápközeget tartalmazó Petri-csészéket 20 μl 10^6 ml^{-1} koncentrációjú spóraszuszpenzióval, egy pontban oltottunk be. A csészék beszáritása után a tenyészeteket az egyes izolátumoknak megfelelő növekedési hőmérsékleten (15, 20, 25 vagy 37 °C) hét napon keresztül inkubáltuk. A telep-, és a feltisztulási zóna átmérőket naponta mértük. A feltisztulási zóna értékek 3 párhuzamos tenyésztés átlagolt adatai.

A lipáztermelés indukciója folyadék fázisban

A törzseket indukciós, minimál tápoldatban neveltük, amely egyedüli szénforrásként 1% (v/v) Tween 80, pálma-, szója-, gyapotmag-, napraforgó-, olíva-, extra szűz olíva-, tökmag-, kukoricacsíra-, búzacsíra-, vagy szezámogolaj feltételezett induktort tartalmazott. Kontrollként az induktor olaj helyett 1% (m/v) glükózt alkalmaztunk. Az egyenként 20 ml tápoldatot tartalmazó 100 ml-es Erlenmeyer-lombikokat 10^6 mennyiségű spórával oltottuk be, majd a tenyészeteket 7 napig rázattuk (200 rpm) az adott törzs optimális növekedési hőmérsékletén (20, 25 vagy 37 °C). A tenyészetből 24 óránként 500 μl fermentlevet gyűjtöttünk Eppendorf-csövekbe. A minták centrifugálása (15 perc, $16200 \times g$) után a felülúszót az enzimaktivitás mérésig -20 °C-on tároltuk.

Búzakorpa alapú folyadék fermentáció (Smf)

A búzakorpa alapú folyadék fermentáció induktorként olívaolajat (2%) és búzakorpát (2%) tartalmazott. Az elkészített tápoldatot (20 ml) tartalmazó 100 ml-es Erlenmeyer-lombikokat sterilizálást követően 10^6 mennyiségű spórával oltottuk be. A tenyészeteket 7 napig rázattuk (200 rpm) az izolátumoknak megfelelő növekedési hőmérsékleten (20, 25 vagy 37 °C).

A fermentlevekből 24 óránként mintát vettünk. A minták centrifugálása (15 perc, $16200 \times g$) után a felülúszót az enzimaktivitás mérésig $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. A tenyésztést 3 független párhuzamosban végeztük.

Lipáztermelés szilárd-fázisú fermentációban (SSF)

A szilárd fázisú fermentációs teszteknel kétféle fermentációs közeget teszteltünk. Az egyik rendszerben 5 g búzakupát 5 ml desztillált vízzel (SSF1), míg a másikban 5 g búzakupát 9,5 ml ásványi sókat tartalmazó tápoldattal nedvesítettünk (SSF2), majd 1,5% induktor olajat adtunk a rendszerhez Falony és mtsi. (2006) optimalizálása alapján. Egyéb mezőgazdasági- és élelmiszeripari melléktermékek tesztelésénél búzakupá helyett 5 g kender-, len-, tökmag, és vörös szőlőmag préselési maradékának őrleményét, máklisztet, vagy zabkupát alkalmaztunk. A fermentációs tápközeget sterilizálást követően 10^6 mennyiségű spórával oltottuk be 250 ml-es Erlenmeyer-lombikokban. Az egyes tenyészeteket az izolátumoknak megfelelő növekedési hőmérsékleten (20, 25 vagy $37\text{ }^{\circ}\text{C}$) inkubáltuk 7 napig. Az inkubációs idő letelte után 30 ml 0,1 M-os acetát puffert (pH 6,0) adtunk a tenyészetekhez, majd a fermentációs táptalajt pufferrel homogenizáltuk. A lombikokat 24 órán át $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tartottuk, majd kivonáshoz durvaszűrést végeztünk gézlap segítségével. Az így nyert extraktumot centrifugáltuk (15 perc, $16200 \times g$), majd a felülúszót az enzimaktivitás mérésig $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. A tenyésztést 3 független párhuzamosban végeztük.

4.5. A hidrolitikus aktivitás meghatározása

A lipáz enzim aktivitásának meghatározása spektrofotometriás módszerrel történt, melyhez *para*-nitrofenil-palmitátot (*p*NFP, Sigma-Aldrich) használtunk szubsztrátként. A reakcióhoz 3 mM koncentrációjú szubsztrát törzsoldatot készítettünk dimetil-szulfoxidban (DMSO), melyhez 1:1 arányban foszfát puffert (pH 6,8) adtunk. A mintákból 50 μl mennyiséget 96 lyukú mikrotiter lemezre vittünk fel, ehhez 50 μl pufferelt szubsztrátot adtunk. A tesztelt törzs/enzim optimális hőmérsékletén 30 percig tartó inkubálást követően a reakciót 25 μl 0,1 M-os nátrium-karbonáttal leállítottuk, majd a felszabadult *para*-nitrofenol (*p*NF) mennyiségét SPECTROstar^{Nano} (BMG Labtech) mikrotiter lemezolvasó segítségével 405 nm hullámhosszon mértük. A *p*NF moláris abszorpciós koefficiens értékét ($\epsilon=1,2475 \times 10^4\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) *p*NF sztenderd oldat segítségével határoztuk meg. Egy U az az enzimmennyiség, amely percenként

1 μmol *p*-nitrofenolt szabadít fel adott reakciókörülmények között. A specifikus aktivitás (U/mg) meghatározásához a minta összfehérje-tartalmát vettük figyelembe.

4.6. A fehérjekoncentráció meghatározása

A fehérjekoncentráció meghatározásához az 1 mg/ml-es BSA (Sigma-Aldrich) törzsoldatból felező hígításokat készítettünk. A kalibrációs sor egyes tagjaiból, valamint a mintákból 5-5 μl -t a 96-lyukú mikrotiterlap mintahelyeibe pipettáztunk, melyekhez 200 μl steril desztillált víz és Bradford reagens (Sigma-Aldrich) 1:1 arányú keverékét adtuk. Tizenöt perces, szobahőmérsékleten, sötétben történő inkubáció után mértük a minta fényelnyelését 595 nm hullámhosszon SPECTROstar^{Nano} (BMG Labtech) mikrotiter lemezolvasóval.

4.7. Az átészterező aktivitás vizsgálata

Az átészterező aktivitás sztenderd meghatározása

A lipáz enzimek átészterező aktivitásának tesztelését búzakorpa alapú fermentációból származó nyers enzimkivonatokkal végeztük. A módszer a Teng és Xu (2007) által kidolgozott eljárás alapján, néhány módosítással kiegészítve. Az oldószerek párolgásának elkerülése érdekében a reakcióelegyet teflon szeptummal zárható 1,5 ml-es üvegfiolákban mértük össze. A nyers lipázkivonatból 300 μl -t 12 órán keresztül liofilizáltunk, majd hozzámértünk 450 μl 10 mM *p*NFP szubsztrátot tartalmazó *n*-heptán oldatot. 50 μl abszolút etanol (1,7 M) hozzáadása után pipettával felfuszpendáltuk a reakcióelegyet, amiket folyamatos rázatás mellett 30 percen át, 40 °C hőmérsékleten inkubáltunk. Az inkubáció után egy percig hagytuk leülepedni a fel nem oldott anyagokat. A felszabadult *p*-nitrofenol kicsapásához és a reakció leállításához 200 μl tiszta felülúszóhoz 2 ml 0,1 M nátrium-karbonátot adtunk. A felszabadult *p*NF-t 405 nm hullámhosszon (SPECTROstar^{Nano}, BMG Labtech) mértük. A nem kívánt hidrolízis elkerülése érdekében a felhasznált reagensekből és oldószerekből a maradék vizet eltávolítottuk nátrium-szulfát segítségével. A mérések során abszolút etanol nélküli kontroll reakcióelegyet is készítettünk. A felszabaduló *p*NF mennyiség meghatározásához kalibrációs görbét készítettünk. Terc-butil-metil-éterben meghatározott koncentrációjú *p*NF törzsoldatot mértünk össze, melyből *n*-heptán felhasználásával hígítási sorozatot készítettünk. A kapott kalibrációs egyenesből meghatároztuk a *p*NF moláris abszorpciós koefficiensét ($\epsilon=1,84 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) adott reakciókörülmények között. Egy U az az enzimmennyiség, amely percenként 1 μmol *p*-

nitrofenolt szabadít fel adott reakciókörülmények között. A specifikus aktivitás (U/mg) meghatározásához a minta összfehérje-tartalmát vettük figyelembe

Az átészterező aktivitás jellemzése

Az nyers enzimkivonatok átészterező képességét a sztenderd átészterező reakció körülményeinek változtatásával teszteltük. A *p*-nitrofenol kivonását és detektálását ezekben az esetekben is a fent említett eljárással végeztük el. A nyert eredményeinket konverzióban adtuk meg: $c = (c_1/c_0) \times 100\%$, ahol c_0 a kiindulási *p*NFP és c_1 a felszabaduló *p*NF koncentrációja.

A reakció közegként alkalmazott oldószer átészterezésre gyakorolt hatását különböző szénlánc-hosszúságú és $\text{Log } P_{ov} > 3$ (P_{ov} : *n*-oktanol/víz megoszlási hányados) értékkel rendelkező alkánokkal teszteltük: ($\text{Log } P_{ov}$: hexán 3,5, ciklohexán 3,2, *n*-heptán 4,4, izooktán 4,5). A reakcióelegyeket 40 °C-on 6 órán át inkubáltuk.

Az inkubációs hőmérséklet és idő hatását 20, 30, 40 és 50 °C-on teszteltük *n*-heptánban 30 perc, 2 óra, 4 óra és 6 óra inkubációt követően. Hosszabb inkubációs idő hatását 120 óráig tartó inkubációval vizsgáltuk 40 °C-on.

Etanol mellett más akceptor-alkoholt (metanol, *n*-butanol, izopropanol és *n*-hexanol) is vizsgáltunk az átészterezés hatékonyságának meghatározására (40 °C, 6 óra, *n*-heptán), az alkoholokat azonos (1 M) koncentrációban alkalmazva. Az etanol esetében 0,85 – 5,1 M (5 – 30%, v/v) koncentrációk átészterezésre gyakorolt hatását is teszteltük (40 °C, 6 óra, *n*-heptán).

Különböző szénlánc-hosszúságú acil-donor molekulák hatását *p*NF-propionát (C3), *p*NF-kaproát (C6), *p*NF-kaprilát (C8) és *p*NF-laurát (C12) aril-észterekkel vizsgáltuk, a *p*NF-palmitáttal (C16) megegyező koncentrációban alkalmazva (40 °C, 6 óra, *n*-heptán).

Kísérleteinket minden esetben 3 biológiai párhuzamosban végeztük.

4.8. Az észterező aktivitás vizsgálata

Az enzimek észterező képességét etil-palmitát észter keletkezése során teszteltük. Ebben az esetben is 300 µl liofilizált enzimkivonattal dolgoztunk. A reakcióelegy 10 mM palmitinsavat és 50 µl etanolt tartalmazott, reakcióközegként *n*-heptánt alkalmaztunk. A mintákat folyamatos rázatás mellett 6, 24 és 48 órán át inkubáltuk 40 °C hőmérsékleten. A keletkező etil-palmitát mennyiségének meghatározását gázkromatográfiai analízissel végeztük. Egy U az az enzimmennyiség, amely percenként 1 µM etil-palmitát keletkezését eredményezi

1 perc alatt adott reakciókörülmények között. A specifikus aktivitás (U/mg) meghatározásához a nyers kivonatok összfehérje-tartalmát vettük figyelembe.

A nyers lipázkivonatok zsírsavpreferenciáját metanol és vajsav-C4, kapronsav-C6, kaprilsav-C8, kaprinsav-C10, laurinsav-C12, mirisztinsav-C14, palmitinsav-C16 és sztearinsav-C18 közötti észterezés során teszteltük 72 órás inkubációt követően (40 °C, *n*-heptán). A keletkező metil-észterek mennyiségének meghatározását gázkromatográfias analízissel végeztük. Kísérleteinket 3 biológiai párhuzamosban végeztük.

4.9. GC-FID analízis az alkil-észterek mennyiségének meghatározására

A gázkromatográfias (GC) mérésekhez az átészterező és észterező reakciókból származó mintákat centrifugáltuk (1500 × *g*, 4 °C, 15 perc). Ezt követően az átészterező reakciókból származó minták esetében a felülúszóból 350 µl-t kimértünk, melyhez 5 ml 100 mM NaOH oldatot adtunk a reakcióelegyben jelen lévő *p*NF eltávolítása céljából. Újabb centrifugálást követően (1500 × *g*, 4 °C, 15 perc) a felülúszóból 400 µl-t nitrogén gáz alatt beszárítottunk. Az észterező reakciók mintáinak esetében a centrifugálás után keletkező felülúszót közvetlenül összegyűjtöttük és nitrogén gáz alatt beszárítottuk. A beszárított mintákat minden esetben 0,1 mg/ml metil-heptadekanoát belső sztenderdet tartalmazó 100 µl *n*-heptán oldatban oldottuk vissza.

A gázkromatográfias analízis során a 2 µl belső sztenderdet (metil-hexadekanoát) is tartalmazó minták kerültek injektálásra split módban (split arány 20:1) lángionizációs detektorral (FID: Flame ionization detector) szerelt Agilent 6890N (Agilent Technologies) típusú gázkromatográfra. Az elválasztás HP-INNOWax oszlopon (60 m × 0,25 mm × 0,5 µm; Agilent Technologies), konstans nyomáson (32 psi) történt. A futás alatt a hőmérsékletprogram kezdetben 230 °C volt 20 percig, majd 240 °C hőmérsékletre emeltük 2 °C/perc felfűtési sebességgel, mely hőmérsékletet 25 percig tartottunk. Mind az injektor, mind a detektor hőmérsékletét 250 °C-ra állítottuk. A minták alkil-észter tartalmát a belső sztenderdként alkalmazott metil-heptadekanoát valamint kalibrációs egyenes segítségével határoztuk meg. A keletkezett észterek mennyiségét mg/l koncentrációkban adtuk meg.

4.10. A lipáz enzimek tisztítása

A *Rh. oryzae* NRRL 1526 és a *R. miehei* NRRL 5282 lipáz enzimek nagy mennyiségben történő termeléséhez 3 literes Erlenmeyer lombikokban ásványi sós tápoldattal és 1,5%

olívaolajjal átnedvesített búzakorpa (130 g) alapú szilárd fázisú fermentációt (SSF) alkalmaztunk. Az egyes lombikokat 3 ml 10^6 ml⁻¹ koncentrációjú spóraszuszpenzióval oltottuk be. A tenyészeteket az izolátumoknak megfelelő növekedési hőmérsékleten (37 °C) 6 napon keresztül inkubáltuk. Az inkubációs idő letelte után 800 ml 0,1 M-os acetát puffert (pH 6,0) adtunk a tenyészetekhez, majd a pufferrel homogenizáltuk a fermentációs táptalajt. 24 órán át tartó, 4 °C-on történő inkubálás után durvaszűrést végeztünk gézlap segítségével. Ezután a szűrletet két egymást követő lépésben centrifugáltuk (5040 × g, 15 perc; SORVALL-RC-5B, GSA rotor). A felülúszót, azaz a micélium és búzakorpa mentes nyers extraktumot használtuk tovább az enzimek tisztításához.

Rhizopus stolonifer SZMC 13609, *M. corticolus* SZMC 12031 és *Mo. echinosphaera* CBS 575.75 izolátumok esetében a lipáz tisztításhoz sülyesztett fermentációt (SmF) végeztünk búzakorpa alapú ásványi sós tápoldatban (800 ml tápoldat) 1,5 literes Erlenmeyer lombikokban. Az egyes lombikokat 3 ml 10^6 ml⁻¹ koncentrációjú spóraszuszpenzióval oltottuk be. A tenyészeteket az izolátumoknak megfelelő növekedési hőmérsékleten (25 °C) 4 napon keresztül inkubáltuk. Az inkubációs idő letelte után gézlap segítségével durvaszűrést végeztünk, majd a szűrletet két egymást követő lépésben centrifugáltuk (5040 × g, 15 perc; SORVALL-RC-5B, GSA rotor). Ebben az esetben is a felülúszót, azaz a nyers extraktumot használtuk tovább.

A nyers kivonatokban ammónium-szulfáttal történő frakcionált kisózást végeztünk (50, 65, 75, 85%), végig jeges vízfürdőben tartva az oldatot (100%-os telítettségűnek a 4 °C-on 594 g/l ammónium-szulfátot tartalmazó oldatot tekintettük). Minden lépés után a teljes feloldást követően 4 °C-on, 24 órán át állni hagytuk. Az oldat centrifugálása (5040 × g, 15 perc; SORVALL-RC-5B, GSA rotor) után a keletkezett csapadékot a lehető legkisebb térfogatú acetát pufferben (0,1 M, pH 6,0) vettük fel. A további tisztítást a legmagasabb enzimaktivitást mutató frakciókkal végeztük tovább.

A kisozási lépések utáni tömény enzimkivonatok további tisztítását Sephadex G-75 (Sigma-Aldrich; 3-80 kDa; 16 × 325 mm) illetve *Rh. stolonifer* lipáz esetében Sephadex G-25 (GE Healthcare; 1-5 kDa; 10 × 200 mm) töltetű oszlopokon végeztük. Az oszlopokat előzetesen (ötszörös oszloptérfogatú) 50 mM-os acetát pufferrel (pH 6,0) ekvilibráltuk a *R. miehei* és *Rh. oryzae* lipázok tisztítása esetében, míg *Rh. stolonifer*, *M. corticolus* és *Mo. echinosphaera* lipázok tisztításánál 50 mM-os Trisz-puffert (pH 8,5) alkalmaztunk, majd ugyanezen pufferekkel 0,5 ml/perc áramlási sebesség mellett eluáltunk.

Az enzimek további tisztítását *DuoFlow* folyadékromatográfiás készülék segítségével (*Duoflow Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) System*, Bio-Rad) végeztük. A legmagasabb enzimaktivitást mutató frakciókat egyesítettük, majd a *R. miehei* izolátumnál

Macro-Prep HQ anioncserélő oszlopra (Bio-Rad; 12,6 × 40 mm), míg a *Rh. oryzae* törzsnél Uno Q-1 anioncserélő oszlopra (Bio-Rad; 7 × 35 mm) vittük fel. Mindkét oszlopot előzőleg 50 mM-os acetát pufferrel (pH 6,0) ekvibráltuk. *Rh. stolonifer*, *M. corticolus* és *Mo. echinosphaera* lipázok további tisztítását szintén Macro-Prep HQ anioncserélő oszlopon végeztük, ahol az oszlopokat 50 mM Trisz-pufferrel (pH 8,5) mostuk. Az enzimeket 1 ml/perc átfolyási sebességgel, 0 – 1 M NaCl lineáris gradiensben történő változtatásával eluáltuk. A *R. miehei*, *Rh. stolonifer*, *M. corticolus* és *Mo. echinosphaera* lipázok esetén a tisztítás egy további lépést igényelt, melyet Sephacryl S-200HR oszlopon (GE Healthcare; 5-250 kDa; 16 × 60 mm) végeztünk. Az oszlopot 150 mM NaCl-ot tartalmazó 50 mM-os acetát vagy foszfát pufferrel (pH 6,0/pH 6,8) ekvibráltuk, majd ugyanezzel a pufferrel 0,5 ml/perc áramlási sebesség mellett eluáltunk.

A tisztítási folyamat minden lépése után *p*NFP kromogén szubsztrát alkalmazásával mértük az egyes frakciókban a lipáz hidrolitikus aktivitását. A fehérjekoncentráció meghatározását Qubit™ Fluorométer és Quant-iT Protein Assay Kit (Life Technologies) segítségével végeztük a gyártó utasításainak megfelelően. A műszer kalibrálását 0 ng/μl, 200 ng/μl és 400 ng/μl koncentrációjú fehérje standard oldatok felhasználásával végeztük.

4.11. Poliakrilamid gélelektroforézis

A fehérjék denaturáló gélelektroforézisét (SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) vertikális futtató kádban (XCell SureLock Mini-Cell, Novex®) elhelyezett 4 – 12% NuPage® Bis-Tris gélen (Life Technologies), NuPage 2-N-morfolin-etánszulfonsav (MES) SDS futtató puffer (Life Technologies) felhasználásával, a gyártó utasításainak megfelelően végeztük. A gél fehérjemintázatának láthatóvá tételéhez 0,0025% Coomassie Brilliant Blue R-250 festéket tartalmazó festőoldatban (40% metanol, 7% ecetsav) egy éjszakán át rázattuk. A gél a háttér festődés eltávolítása céljából festékmentesítő oldatokban kétszer 30 perc (1-es oldat), valamint egyszer 30 perc (2-es oldat) ideig mostuk.

Az enzimek tisztulásának nyomonkövetésére ezüstfestés módszert alkalmaztunk. A gél 2 órán át fixáltuk fixáló oldatban, majd háromszor 20 percig 20%-os etanollal öblítettük a fixáló oldat eltávolítása céljából. Ezután két percig érzékenyítő oldatban (0,02% nátrium-tioszulfát) inkubáltuk, amit desztillált vízzel történő többszöri mosás követett. A gél ezután 20 percig ezüst-nitrát oldatban (0,2% AgNO₃) festettük, majd ismét desztillált vízzel mostuk. Végül előhívó oldattal mostuk a megfelelő festődés eléréséig. Az előhívás leállítását 96%-os ecetsavval végeztük.

A lipázaktivitás elektroforetikus elválasztást követő kimutatását, azaz a zimográfiai analízist, 3 – 12% natív poliakrilamid gélen végeztük (natív-PAGE, Bio-Rad Mini Protean Tetra Cell futtatókád). Elválasztást követően a gélt 50 ml 4 °C-os foszfát pufferben (50 mM, pH 6,8) 30 percig mostuk. A lipázaktivitás kimutatásához 100 mM metilumbelliferil-nonanoát (Sigma-Aldrich) szubsztrátot DMSO-ban oldottunk, amit 10 ml foszfát pufferben 0,2 mM-ra hígítottunk. A gélt az így készült oldattal fedtük be, majd a fluoreszcenciát mutató sávokat alulról megvilágító UV lámpával vizsgáltuk. A lipázaktivitás kolorimetriás kimutatására 20 mM α -naftil-acetát (Sigma-Aldrich) szubsztrátot oldottunk fel 2,5 ml DMSO-ban, amit 25 ml foszfát pufferben 0,2 mM-ra hígítottunk. Az így nyert oldatot 1:1 arányban kevertük 25 ml, 25 mg *Fast Red*-et tartalmazó foszfát pufferrel, melyben a gélt 12 órán át inkubáltuk.

4.12. A hidrolitikus aktivitás biokémiai jellemzéséhez használt reakcióelegyek

A vizsgálatok során a *R. miehei* NRRL 5282, *Rh. oryzae* NRRL 1526, *Rh. stolonifer* SZMC 13609, *M. coticolus* SZMC 12031 és *Mo. echinosphaera* CBS 575.75 izolátumok által, búzakarpa alapú szilárd vagy süllyesztett fermentációban termelt, tisztított extracelluláris lipáz enzimekkel dolgoztunk. Amennyiben külön nem jelöltük, az enzimaktivitás meghatározására *p*NFP szubsztrátot használtunk. Az inkubálási idő letelte után a reakciót Na-karbonáttal állítottuk le, majd a felszabadult *p*-nitrofenol mennyiségét 405 nm hullámhosszon mértük mikrotiter lemezolvasó segítségével. A kísérletekben meghatározott értékek minden esetben 3 biológiai párhuzamos mérés eredményei.

A hőmérséklet optimum vizsgálata

16 U/ml enzim (OD=1)
0,75 mM *p*NFP
100 mM foszfát puffer (pH 6,8)

Az elegyeket 5 – 80 °C között az izolátumok optimális hőmérsékletén inkubáltuk 30 percig.

A hőstabilitás vizsgálata

16 U/ml enzim (OD=1)
100 mM foszfát puffer (pH 6,8)

A reakcióelegyeket 5 – 80 °C hőmérsékleteken inkubáltuk 4 órán át. Ezt követően 0,75 mM *p*NFP szubsztrátot adtunk az elegyekhez, majd az adott enzim aktivitásának optimális hőmérsékletén 30 percig inkubáltuk.

A pH optimum vizsgálata

16 U/ml enzim (OD=1)

0,75 mM *p*NFP

50 mM McIlvaine pufferoldat (pH 2,2 – 8,0; McIlvaine, 1921).

A reakcióelegyeket a megfelelő pH-jú pufferoldattal (pH 2,2 – 8,0) 30 percig inkubáltuk az adott enzim aktivitásának optimális hőmérsékletén.

A pH stabilitás vizsgálata

16 U/ml enzim (OD=1)

50 mM McIlvaine pufferoldat (pH 2,2 – 8,0)

Az elegyeket a megfelelő pH-jú pufferoldatban 24 órán át 4 °C-on tartottuk. Ezt követően 0,75 mM *p*NFP szubsztrátot adtunk az elegyekhez, majd az adott enzim aktivitásának optimális hőmérsékletén 30 percig inkubáltuk.

Szubsztrátspecifitás vizsgálata

16 U/ml enzim (OD=1)

100 mM foszfát puffer (pH 6,8)

0,75 mM *p*NF-acetát (C2), *p*NF-propionát (C3), *p*NF-butirát (C4), *p*NF-valerát (C5), *p*NF-kaproát (C6), *p*NF-kaprilát (C8), *p*NF-dekanoát (C10), *p*NF-dodekanoát (C12) illetve *p*NF-palmitát (C16).

A szubsztrátok elkészítése a sztenderd hidrolitikus aktivitás meghatározó módszernél leírtakkal megegyezik. A reakcióelegyeket az adott enzim aktivitásának optimális hőmérsékletén 30 percig inkubáltuk.

Kinetika vizsgálata

16 U/ml enzim (OD=1)

100 mM foszfát puffer (pH 6,8)

0,05 – 3,2 mM *p*NF-palmitát

A telítési görbe felvételéhez a szubsztrátot 0,05 – 3,2 mM koncentráció tartományban alkalmaztuk. A reakcióelegyet az adott enzim aktivitásának optimális hőmérsékletén 30 percig inkubáltuk. Az enzimek Michaelis-Menten állandói (K_m) és V_{max} értékei a telítési görbe logaritmikus szakaszának Lineweaver-Burk-féle linearizálásával (Lineweaver és Burk, 1934) és kettősreciprok ábrázolásával kerültek meghatározásra.

Fém ionok és reagensek vizsgálata

16 U/ml enzim (OD=1)

0,75 mM *p*NFP

100 mM foszfát puffer (pH 6,8)

5 mM HgCl₂, CuSO₄, ZnSO₄, MnCl₂, CaCl₂, MgSO₄, NaCl, KCl, CoCl₂
vagy 10 mM N-brómszukcinimid (NBS), etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA) és Na-lauril-szulfát (SDS)

A reakcióelegyet az adott enzim aktivitásának optimális hőmérsékletén 30 percig inkubáltuk.

Alkoholok és alkánok enzimaktivításra gyakorolt hatásának vizsgálata

16 U/ml enzim (OD=1)

0,75 mM *p*NF-palmitát

100 mM foszfát puffer (pH 6,8)

5 – 20% (v/v%) metanol, etanol, propanol, izopropanol, butanol, izoamil-alkohol, hexanol vagy hexán, ciklohexán, heptán, izooktán.

A reakcióelegyet a megfelelő alkohol vagy alkán koncentrációval 30 percig inkubáltuk az adott enzim optimális hőmérsékletén.

4.13. Regioszelektivitás meghatározása vékonyréteg kromatográfias módszerrel

A lipázok pozicionális szelektivitását a trioleát (Sigma-Aldrich) hidrolízise során felszabaduló termékek vékonyréteg kromatográfias (TLC = Thin layer chromatography) vizsgálatával analizáltuk. A reakcióelegy 5 mg/ml trioleátot, 795 µl foszfát puffert (100 mM, pH 6,8) és 200 µl tisztított enzimkivonatot (16 U/ml enzim (OD = 1)) tartalmazott, melyet 2 órán át rázattunk (200 rpm) az enzimek optimális hőmérsékletén. Kontrollként az enzimet nem tartalmazó reakcióelegyet állítottunk össze. A hidrolízis termékeit dietil-éterrel extraháltuk (1:1

térfogat arányú extrakció). Ezt követően a felső, szerves fázisból 30 μl -t mértünk ki, az elválasztást szilikagélen (TLC silica gel 60 plate, Merck) *n*-hexán/dietil-éter/ecetsav (59:40:1, v/v) mobil fázist alkalmazva végeztük. Referenciaként trioleát, olajsav, 1,3-diolein, (\pm)-1,2-diolein és monoolein (Sigma-Aldrich) sztenderdeket használtunk. A mintákat és a sztenderdeket automata mintafelvívővel (Linomat 5, Camag) vittük fel. A sztenderdek és az enzimreakció termékeinek láthatóvá tételét jódkristályokat tartalmazó zárt üvegedényben végeztük.

5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

5.1. Járomspórás gombák extracelluláris lipáztermelésének tesztelése

A járomspórás gombák fontos szerepet töltenek be az elpusztult növényi és egyéb szerves anyagok lebontásában extracelluláris enzimeiknek köszönhetően. Számos fajt alkalmaznak a biotechnológiában ipari enzimek nagy mennyiségben történő termeltetésére. Azonban csupán néhány publikáció foglalkozik a Mucoromycota törzsbe tartozó, különösen a *Mortierella* és *Umbelopsis* nemzetség fajainak lipáztermelő képességével (Treichel és mtsi., 2010; Sharma és mtsi., 2011; Gaspar és mtsi., 1999; Jermuntiea és mtsi., 2011).

Kutatómunkánk során 204 *Gilbertella*, *Rhizomucor*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Dissophora*, *Gamsiella*, *Mortierella* és *Umbelopsis* nemzetségbe tartozó törzs lipáztermelését teszteltük tributirin tartalmú szilárd tápközegen (a tesztelt fajok listáját az **1. számú melléklet** tartalmazza). A kísérletbe bevont izolátumok változatos élőhelyekről: talajból, gyümölcs felszínéről, komposztból, valamint mukormikózisból származtak. A telepek körül keletkező feltisztulási zóna a termelt extracelluláris lipáz hidrolitikus aktivitásának köszönhető, mely a közegben lévő tributirint bontja. Ennek eredményeként az opálos megjelenésű táptalaj feltisztul. A feltisztulási zóna kiterjedése összefüggésbe hozható a lipáztermelés mértékével (Sharma és mtsi., 2001).

Kísérleteinkben a tesztelt járomspórás gombatörzsek változatos lipolitikus aktivitást mutattak. A megfigyelt feltisztulási zónák és telepátmérők figyelembe vételével számos ígéretes lipáztermelő törzset azonosítottunk. A legnagyobb tributirin hidrolízist mutató 21 izolátum feltisztulási zóna méreteit az **1. táblázat** tartalmazza. Fontos megemlíteni, hogy néhány törzs rendkívül intenzív növekedést mutatott, így a tributirin hidrolíziséből keletkező feltisztulási zónák a növekedő micélium által fedésbe kerültek. A módszer ezen hátránya egyes esetekben megnehezítette a zóna méretének pontos megállapíthatóságát, valamint az adatok összehasonlíthatóságát. Különösen a *Gilbertella* és *Rhizopus* nemzetségbe tartozó izolátumok növekedése bizonyult nagyon intenzívnek, ennek köszönhetően a csésze teljes felszínét már a 6. napra benőtték. Emiatt ezen izolátumok esetében az 5. napon mért értékeket vettük figyelembe. Ezzel ellentétben néhány *Mortierella* és *Umbelopsis* törzs esetében lassú növekedést tapasztaltunk, azonban ennek ellenére is széles feltisztulási zónákat detektáltunk a telepek körül. A legnagyobb feltisztulást a *Rhizomucor* és *Rhizopus* izolátumok esetében tapasztaltuk; a *Rhizomucor miehei* CBS 370.71 és *Rhizopus oryzae* NRRL 1472 törzsek 10,2 és 10,8 mm feltisztulási zóna méreteket mutattak 5 nap inkubációt követően.

1. táblázat. A legnagyobb lipolitikus aktivitást mutató járomspórás gombatörzsek tributirin tartamú táptalajon.

Izolátum	Törzsgyűjtemény azonosító	Lipolitikus aktivitás* (feltisztulási zóna átmérő, mm)			Tenyésztési hőmérséklet (°C)
		Inkubációs idő (nap)			
		3	5	7	
<i>Gilbertella persicaria</i>	SZMC 11091	1,9 ± 0,08	5,1 ± 0,17	n. a.	25
<i>Mortierella echinosphaera</i>	CBS 575.75	1,5 ± 0,11	4,1 ± 0,15	6,1 ± 0,13	20
<i>Mo. alpina</i>	CBS 210.30	1,1 ± 0,2	3,4 ± 0,14	5,6 ± 0,31	20
<i>Mucor piriformis</i>	SZMC 12077	2,1 ± 0,08	5 ± 0,11	9 ± 0,17	25
<i>M. corticolus</i>	SZMC 12031	2,6 ± 0,09	5,5 ± 0,2	9,2 ± 0,18	25
<i>Rhizomucor miehei</i>	NRRL 5282	5,1 ± 0,15	9,2 ± 0,11	12 ± 0,11	37
<i>R. miehei</i>	NRRL 5901	5 ± 0,17	7,2 ± 0,18	13,9 ± 0,13	37
<i>R. miehei</i>	ETH M4918	2,7 ± 0,17	7,8 ± 0,17	12,9 ± 0,09	37
<i>R. miehei</i>	CBS 370.71	5,1 ± 0,13	10,2 ± 0,18	18,4 ± 0,26	37
<i>R. miehei</i>	CBS 360.92	2,3 ± 0,18	10,1 ± 0,22	16,3 ± 0,22	37
<i>R. pusillus</i>	NRRL A-23448	2,8 ± 0,23	5,2 ± 0,17	8,2 ± 0,22	37
<i>R. pusillus</i>	ETH M4920	2,9 ± 0,18	6,1 ± 0,08	8,1 ± 0,13	37
<i>Rhizopus niveus</i>	CBS 403.51	1,6 ± 0,13	6,9 ± 0,17	n. a.	37
<i>Rh. oryzae</i>	NRRL 1526	5,3 ± 0,22	10,2 ± 0,18	n. a.	37
<i>Rh. oryzae</i>	NRRL 1472	4,3 ± 0,22	10,8 ± 0,22	n. a.	25
<i>Rh. stolonifer</i>	SZMC 13609	2,2 ± 0,22	6,1 ± 0,08	n. a.	25
<i>Rh. stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>	SZMC 13601	2,1 ± 0,13	8,3 ± 0,17	n. a.	25
<i>Umbelopsis autotrophica</i>	CBS 310.93	4,2 ± 0,22	8,1 ± 0,26	12 ± 0,28	20
<i>U. isabellina</i>	NRRL 1757	3,9 ± 0,08	5,2 ± 0,17	9,2 ± 0,22	25
<i>U. ramanniana</i> var. <i>angulispora</i>	CBS 222.29	5,2 ± 0,2	6,8 ± 0,22	8,1 ± 0,13	25
<i>U. versiformis</i>	CBS 473.74	4,6 ± 0,22	7,3 ± 0,18	12,3 ± 0,2	20

n. a.: nincs adat

* Rövidítések: CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures; ETH, Swiss Federal Institute of Technology Culture Collection; NRRL, Agricultural Research Service Culture Collection; SZMC, Szeged Microbiological Collection

A *Rhizopus* törzsek esetén megfigyelt feltisztulási zónák a Rapp és Backhaus (1992) által ugyancsak tributirines táptalajon tanulmányozott 12 *Rhizopus* törzs mért értékeinél nagyobbak bizonyultak. Vizsgálatainkban a legmagasabb aktivitást mutató *Rhizopus circinans* CBS 14722 és *Rhizopus microsporus* CBS 26128 izolátumok 6 nap inkubációt követően csupán 4, illetve 3 mm feltisztulási zónát eredményeztek.

Néhány humán mikózisból izolált törzs, így a legnagyobb feltisztulási zónát eredményező *R. miehei* CBS 370.71, valamint CBS 360.92 izolátumok és a *R. pusillus* ETH

M4920 esetén is magas lipolitikus aktivitást tapasztaltunk. Feltételezhető, hogy a szekretált lipázok virulencia faktorként szerepet játszhatnak egyes oportinista patogén gombák növekedésében és megtapadásában (Stehr és mtsi., 2003). Patogenitásuk miatt potenciális ipari felhasználásuk korlátozott, így ezen törzseket a további fermentációs kísérletbe magas lipáztermelésük ellenére sem vontuk be.

A *Gilbertella* és *Mucor* nemzetségek izolátumai közül a *G. persicaria* SZMC 11091, *M. piriformis* SZMC 12077 és *M. corticolus* SZMC 12031 feltisztulási zóna értékei (sorban 5,1; 5 és 5,5 mm) bizonyultak a legmagasabbnak összehasonlítva az inkubációs idő 5. napján mért adatokat. Alves és munkatársai (2002) számos *Mucor* törzs lipáztermelését tesztelték Tween 20 tartalmú táptalajon, ahol a *M. genevensis* izolátumok mutatták a legnagyobb aktivitást. Vizsgálatainkban a *M. genevensis* szintén ígéretes lipolitikus aktivitást mutatott, a 7. napon 4-5 mm-es feltisztulási zóna értékkel (az adatok nincsenek feltüntetve). A *Mucor* törzsek a Vágvölgyi és mtsi. (1996) által meghatározott eredményekhez hasonlóan változatos lipáztermelő képességet mutattak. Ebben a tanulmányban 27 *Mucor* törzs enzimtermelését vizsgálták API-ZYM teszt segítségével.

A *Mortierella* izolátumok közül kettőt, a *Mo. echinosphaera* CBS 575.75 és a *Mo. alpina* CBS 210.30 törzseket, míg az *Umbelopsis* izolátumok közül négyet tüntettünk fel a legígéretesebb lipolitikus aktivitású törzseket összefoglaló **1. táblázatban**. Annak ellenére, hogy ezen nemzetségek törzsei különböző olaj komponensek (telített és telítetlen zsírsavak) ipari termelésében jelentősek (Dyal és Narine, 2005), lipolitikus aktivitásuk vizsgálatával csak néhány tanulmány foglalkozott. Az általunk tesztelt, többségében talajból izolált *Mortierella* és *Umbelopsis* törzsek egy részénél a telepek körül határozott, 6,1 - 12,3 mm nagyságú feltisztulási zónákat mértünk a 7. napon. Tekintetbe véve kis telepátmérőiket is, ezen izolátumok lipáztermelése szintén jelentős.

A tributirin tartalmú táptalajon végzett tesztek alapján 11, több nemzetségből származó nagy lipáztermelő képességgel rendelkező törzset választottunk ki a további vizsgálatokhoz.

5.2. Lipid induktorok lipáztermelésre gyakorolt hatása

A fonalas gombák lipáztermelését számos tényező befolyásolhatja. Néhány tanulmányban kimutatták, hogy a különféle olajok hatással vannak egyes gombák lipáztermelésére (Salleh és mtsi., 1993; Wang és mtsi., 2008). Ezért az enzim-hozam növelése érdekében lehetséges induktorokat teszteltünk.

Különböző növényi olajok, valamint szintetikus lipid származékok enzimtermelésre gyakorolt hatását indukciós minimál tápoldatban teszteltük a 11 kiválasztott izolátumra: *Mo. echinospaera* CBS 575.75, *Mo. alpina* CBS 210.32, *M. corticolus* SZMC 12031, *R. miehei* NRRL 5282, *Rh. oryzae* NRRL 1526, *Rh. oryzae* NRRL 1472, *Rhizopus stolonifer* SZMC 13609, *Umbelopsis isabellina* NRRL 1757, *U. ramanniana* var. *angulispora* CBS 222.29, *U. autotrophica* CBS 310.93 és *U. versiformis* CBS 473.74. A minimál tápközeg egyedüli szénforrásként csak az adott induktort tartalmazta. A minimál tápközegben vizsgáltuk a különböző lipid induktorok (Tween 80, pálma-, szója-, gyapotmag-, napraforgó-, olíva-, extra szűz olíva-, tökmag-, kukoricacsíra-, búzacsíra-, szezámagolaj) enzimtermelésre gyakorolt hatását. Kontrollként induktort nem, de megegyező mennyiségű glükózt tartalmazó tenyésztési közeget alkalmaztunk. A kontrollok esetében nem, vagy csak nagyon alacsony *p*NFP hidrolízist mutattunk ki (0 – 1,9 U/ml). Eszerint, ahogy más fonalas gombák, úgy az általunk vizsgált törzsek esetében is, induktor jelenléte szükséges lehet a magas lipázhozam eléréséhez (Falony és mtsi., 2006; Lima és mtsi., 2003).

Az egyes izolátumok esetén a legnagyobb enzimaktivitást eredményező induktorokat a **2. táblázat** tartalmazza. A Tween 80 jelentősen megnövelte a legtöbb tesztelt törzs lipáztermelését, így hatásos induktornak bizonyult. A különböző Tween szubsztrátok eltérő hatással vannak a lipáz termelésre (Liu és mtsi., 2000; Iftikhar és Hussain 2002), ugyanakkor jelenlétük általában a termelés növekedését eredményezi. A Tween 80 például jelentősen fokozta a *Mo. vinacea* extracelluláris lipáztermelését (Gaspar és mtsi., 1999). Tween szubsztrátokat gyakran alkalmaznak lipázok hidrolitikus aktivitásának méréséhez is (Hasan és mtsi., 2009).

A tesztelt növényi olajok közül az olíva-, extra szűz olíva-, szója-, szezámag-, valamint gyapotmagolajok szintén fokozták az enzimtermelést. A legmagasabb térfogati aktivitást a *R. miehei* NRRL 5282 izolátum esetében figyeltük meg (1336 U/ml), extra szűz olívaolaj jelenlétében (**2. táblázat**). Az olívaolaj lipáztermelést fokozó hatását *Penicillium aurantiogriseum* (Lima és mtsi., 2003), *Aspergillus niger* (Colin és mtsi., 2010) valamint *Rh. chinensis* (Wang és mtsi., 2008) gombák esetében is megfigyelték.

Az *Umbelopsis* izolátumok a tributirines tesztek során ugyan nagy feltisztulási zónákat mutattak, azonban a folyadék tenyészetben viszonylag alacsony enzimaktivitást eredményeztek (1,8 – 8 U/ml). A tesztelt *Mo. alpina* izolátumnál ugyanakkor tributirines táptalajon mérsékelt enzimtermelést mértünk, míg minimál tápoldatban jelentős térfogati aktivitást mutatott szójaolaj jelenlétében (26,7 U/ml).

2. táblázat. A vizsgált izolátumok lipázaktivitása süllyesztett fermentációban különböző induktor olajok jelenlétében.

Izolátum	Induktor olaj	Lipáz aktivitás* (U/ml)
<i>Mortierella alpina</i> CBS 210.32	szójaolaj	26,7
	extra szűz olívaolaj	19,2
<i>Mo. echinosphaera</i> CBS 575.75	Tween 80	4,7
	olívaolaj	1,8
<i>Mucor corticolus</i> SZMC 12031	Tween 80	118,7
	olívaolaj	9,6
<i>Rhizomucor miehei</i> NRRL 5282	extra szűz olívaolaj	1336,0
	szezámog olaj	1169,1
<i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 1526	Tween 80	918,5
	olívaolaj	668,0
<i>Rh. oryzae</i> NRRL 1472	Tween 80	1003,1
	pálmaolaj	106,2
<i>Rh. stolonifer</i> SZMC 13609	Tween 80	16,1
	pálmaolaj	12,0
<i>Umbelopsis autotrophica</i> CBS 310.93	olívaolaj	2,8
	Tween 80	2,7
<i>U. isabellina</i> NRRL 1757	olívaolaj	8,0
	Tween 80	7,1
<i>U. ramanniana</i> var. <i>angulispora</i> CBS 222.29	extra szűz olívaolaj	3,1
	gyapotmag olaj	1,8
<i>U. versiformis</i> CBS 473.74	Tween 80	4,5
	szójaolaj	2,3

* *Rh. oryzae* NRRL 1526 és *R. miehei* izolátumoknál a 3. napon, *Mo. echinosphaera* és *U. autotrophica* a 4. napon, míg a többi izolátum esetében a 7. napon mért enzimaktivitás értékek. Izolátumonként a legmagasabb aktivitást eredményező két induktort tüntettük fel.

Kiemelkedő lipázaktivitást a *R. miehei* NRRL 5282, a *Rh. oryzae* NRRL 1472 és NRRL 1526 izolátumok esetén mértünk Tween 80 vagy extra szűz olívaolaj jelenlétében, így 1336; 1003,1 és 918,5 U/ml térfogati aktivitást eredményezett. Ezen aktivitás értékek más, korábban leírt fonális gomba lipázok adataival összehasonlítva is kiemelkedők (*Rh. homothallicus* 50 U/ml, *Asp. carneus* 13 U/ml, *P. restrictum* 12 U/ml) (Treichel és mtsi., 2010). Míg a *R. miehei* NRRL 5282 és *Rh. oryzae* NRRL 1526 izolátumok már a tenyésztés 3. napján, addig a *Rh. oryzae* NRRL 1472 izolátum csak a tenyésztés 7. napján érte el a maximális enzimtermelést.

Mateos Diaz és munkatársai (2006) *Rhizopus homothallicus* szilárd és süllyesztett tápközegben történő tenyésztésekor a maximális lipázaktivitást az exponenciális növekedési fázis végén detektálták, ezt követően csökkenést figyeltek meg. Az aktivitás csökkenését a gomba által termelt proteázok proteolitikus hatásának tulajdonították, mely a lipáz enzimet bontja, inaktiválja.

A lipid induktorok tesztelése során a legtöbb törzs esetében a Tween 80 és az olívaolaj jelenléte fokozta leginkább az enzimtermelést. További vizsgálatainkhoz az olívaolaj, mint természetes szubsztrát alkalmazását választottuk a lipáztermelés indukálására.

5.3. Lipáztermelés búzakorpa alapú fermentációkban

A lipáz enzimek lehetséges biokatalizátorként történő alkalmazásának egyik fontos akadálya az enzimek költségigényes előállítása. Az olcsó, nagy mennyiségben keletkező, magas lipidtartalmú mezőgazdasági és élelmiszeripari melléktermékek, növénymaradványok (búzakorpa, szójabab héj, cukornád préselvény, rizs korpa, olíva-olajpogácsa) szubsztrátként történő alkalmazása környezetbarát és gazdaságos eljárás lipáz enzim termeltetésére (Salihu és mtsi., 2012). Emiatt számos tanulmány foglalkozik ezen szubsztrátok enzimtermelésre gyakorolt hatásával (Gunasekaran és Das, 2005; Damaso és mtsi., 2008). A búzakorpa szubsztrátként történő alkalmazása különösen ígéretes fonalas gombák esetében, mivel megfelelő mennyiségű fehérjét, lipideket, aminosavakat és ásványi anyagokat tartalmaz, melyek esszenciálisak a gomba növekedéséhez és a megfelelő enzimtermeléshez (Javed és mtsi., 2012).

Búzakorpa alapú süllyesztett fermentáció (SmF)

A búzakorpa lipáztermelésre gyakorolt hatását elsőként süllyesztett fermentációban teszteltük. Az ásványi sós tápközeg a 2%-ban alkalmazott búzakorpa mellett további szénforrásként 2% olívaolajat is tartalmazott. A **3. táblázat** a legmagasabb térfogati és specifikus aktivitás értékeket tartalmazza a fenti tenyésztési körülmények között.

A tesztelt izolátumok közül a *Mo. echinosphaera*, *Rh. stolonifer*, *U. autotrophica*, *U. ramanniana* var. *angulispora* és *U. versiformis* magasabb térfogati aktivitást mutatott, mint a korábban alkalmazott minimál indukciós tápközegben. Ezen eredmények szerint a búzakorpa folyékony tápoldatban történő alkalmazása nem minden esetben növeli meg a járomspórás gombák extracelluláris lipáztermelését.

3. táblázat. Lipáztermelő járomspórás gomba izolátumok lipázaktivitása búzakorpa alapú folyadék fermentációs (SmF) rendszerben.

Izolátum	Lipáz aktivitás*	
	U/ml nyers kivonat	U/mg fehérje
<i>Mo. alpina</i> CBS 210.32	5,4 ± 0,6	33,8 ± 10,2
<i>Mo. echinosphaera</i> CBS 575.75	11,6 ± 2,3	248,1 ± 75,5
<i>M. corticolus</i> SZMC 12031	61,3 ± 8,4	827,4 ± 79,5
<i>R. miehei</i> NRRL 5282	371,7 ± 116,3	3682,6 ± 371,7
<i>Rh. oryzae</i> NRRL 1526	113,1 ± 9,6	1099,6 ± 102,7
<i>Rh. oryzae</i> NRRL 1472	126,6 ± 3,8	1013,8 ± 264,8
<i>Rh. stolonifer</i> SZMC 13609	84,1 ± 4,8	776,9 ± 80,3
<i>U. autotrophica</i> CBS 310.93	17,8 ± 1,1	223,2 ± 33,9
<i>U. isabellina</i> NRRL 1757	7,1 ± 0,4	101,2 ± 7,6
<i>U. ramanniana</i> var. <i>angulispora</i> CBS 222.29	13,3 ± 1,9	128,1 ± 4,3
<i>U. versiformis</i> CBS 473.74	9,6 ± 1,6	94,8 ± 16,6

* A feltüntetett értékek a *Rhizopus* izolátumok esetében az 1. napon, *M. corticolus* 2. nap, *Mo. echinosphaera* és *R. miehei* 4. nap, *U. isabellina* és *U. ramanniana* var. *angulispora* 5. nap, valamint *Mo. alpina*, *U. autotrophica* és *U. versiformis* 7. napon mért enzimaktivitás adatok.

Jelentős enzimaktivitás emelkedés volt tapasztalható a *Rh. stolonifer* izolátum esetében; az indukciós olajat egyedüli szénforrásként tartalmazó minimál tápoldatban mért 16,1 U/ml enzimaktivitás értékhez viszonyítva, a búzakorpa alapú süllyesztett fermentációban 84,1 U/ml aktivitást detektáltunk. Ezen tenyésztési körülmények között a *Rh. stolonifer* izolátum hasonló mértékű lipáztermelést mutatott, mint a másik két *Rhizopus* törzs. A legmagasabb lipázaktivitást a *R. miehei* izolátum esetében tapasztaltuk (371,7 U/ml térfogati és 3682,6 U/mg specifikus aktivitás), mely azonban jelentősen elmaradt a minimál tápoldatban mért térfogati aktivitás értéktől (1336 U/ml térfogati aktivitás). A legalacsonyabb aktivitásokat az *U. isabellina*, *U. versiformis*, illetve *Mo. alpina* törzsek mutatták, 10 U/ml alatti lipázaktivitást eredményezve. Az *Umbelopsis* izolátumok közül az *U. autotrophica* bizonyult a legjobb termelőnek a 7. napon 17,8 U/ml és 223,2 U/mg értékekkel.

Az egyes izolátumok esetében a tenyésztés különböző fázisaiban kaptuk a legmagasabb lipázaktivitást. A *Rhizopus* izolátumok és a *M. corticolus* a maximális enzimtermelést a tenyésztés első felében mutatták (1. és 2. nap), míg az *Umbelopsis* izolátumok és a *Mo. alpina* az inkubáció későbbi szakaszában (5. és 7. nap). Mateos Diaz és munkatársai (2006) a *Rh. homothallicus* törzs süllyesztett fermentációban való tesztelése során szintén a tenyésztés korai

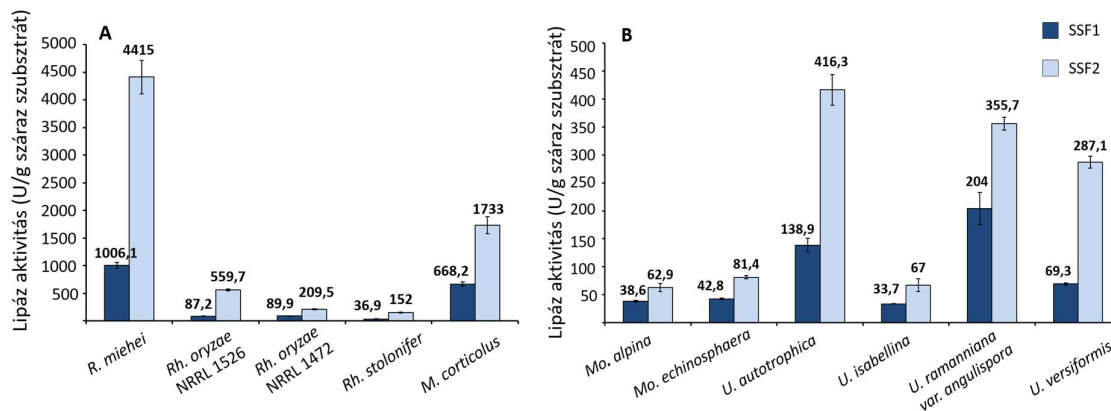
szakaszában, 22 órát követően detektálták a legmagasabb lipázaktivitást a fermentlében. Ezt követően az enzimaktivitás jelentős csökkenését figyelték meg. Az általunk végzett fermentációs kísérletekben hasonló jelenséget figyeltünk meg a tesztelt *Rhizopus* izolátumok esetében (adatok nincsenek feltüntetve).

Búzakorpa alapú szilárd fermentáció (SSF)

Az izolátumok enzimtermelését búzakorpa alapú szilárd-fázisú fermentációs rendszerekben is megvizsgáltuk egy hét inkubációt követően. A szilárd fázisú fermentáció a süllyesztett fermentációval szemben számos előnnyel rendelkezik: olcsóbb, nagyobb biomassza képződés mellett magasabb enzimtermelés, koncentráltabb végtermék jellemzi, emellett a fermentációs körülmények folyamatos kontrollálása sem szükséges (Salihu és mtsi., 2012). Falony és mtsi. (2006) kimutatták, hogy szilárd fázisú fermentációban szubsztrátként búzakorpát alkalmazva, kiemelkedő lipáztermelés érhető el *A. niger* gombánál.

A szilárd fázisú fermentációs kísérletekben kétféle tenyésztési körülményt hasonlítottunk össze: az egyik tápközeg (SSF1) esetében desztillált vízzel, míg a másik, ún. kiegészített tápközegnél (SSF2) ásványi sók oldatával, illetve 1,5% olívaolajjal nedvesítettük a szubsztrátot. Az SSF2 tápközegét Falony és munkatársai optimalizálták *A. niger* lipáz termelésére (Falony és mtsi., 2006). Az izolátumok mindkét közegen jól nőttek, a nyers kivonatban mért enzimaktivitás értékek azonban jelentős különbséget mutattak (**5. A és B ábra**). Eredményeink a szakirodalomban korábban leírtaknak megfelelnek: a fonalas gombák enzimtermelésének növekedése indukálható a búzakorpa olajjal, valamint magas olajtartalmú egyéb szubsztráttal történő dúsításával (Mala és mtsi., 2007; Sun és Xu., 2008). *R. miehei*, *Rh. oryzae* NRRL 1526, *Rh. stolonifer* és *U. versiformis* izolátumok fermentleveiben jelentős, mintegy négyszer nagyobb enzimtermelést detektáltunk a kiegészített tápközeg (SSF2) alkalmazva, mint SSF1 tápközegen. A nagyobb aktivitásokhoz feltételezhetően hozzájárulhatott a magasabb nedvességtartalom is, mely szilárd fermentáció alkalmazásakor kritikus tényező (Patel és mtsi., 2017).

A legnagyobb termelést mutató *R. miehei* izolátum lipázaktivitása (4415 U/g száraz szubsztrát) a korábbi tanulmányokban leírt más fonalas gombák által szintén búzakorpán megfigyelt aktivitás értékeknél is magasabbnak bizonyult (ul-Haq és mtsi., 2002; Mala és mtsi., 2007; Rehman és mtsi., 2011).



5. ábra. *Rhizomucor*, *Rhizopus* és *Mucor*, (A) valamint *Mortierella* és *Umbelopsis* (B) izolátumok lipázaktivitása búzakorpa alapú szilárd fermentációban 7 nap inkubációt követően, kétféle tenyésztési közeget alkalmazva.

SSF1= búzakorpa:desztillált víz 1:1 arányú keveréke;

SSF2= búzakorpa:ásványi sós tápoldat 1:1,9 arányú keveréke 1,5% olívaolajjal kiegészítve

A kiegészített közegen (SSF2) szintén ígéretes enzintermelést detektáltunk *M. corticolus*, *Rh. oryzae* NRRL 1526, *U. autotrophica*, *U. ramanniana* var. *angulispora* és *U. versiformis* (1733,4; 559,7; 416,3; 355,7 és 287,1 U/g száraz szubsztrát hidrolitikus aktivitás) törzsek esetén is.

A vizsgált törzsek kiegészített tápközegen (SSF2) mutatott térfogati és specifikus aktivitás értékeit a **4. táblázat** tartalmazza. A *R. miehei*, *M. corticolus*, *U. autotrophica*, *U. ramanniana* var. *angulispora* és *U. versiformis* izolátumok esetében jelentősen nagyobb enzimhozamot sikerült elérnünk szilárd fázisú fermentációt alkalmazva, mint süllyesztett tenyészetben. Más hidrolázoknál leírtakhoz hasonlóan előfordulhat, hogy a lipáz enzimek sejtfalkötött formában vannak jelen folyadék tenyészetben, míg szilárd fermentációnál a tápközegbe szekretálódnak (Oda és mtsi., 2006). A *Rhizopus* izolátumok szilárd tápközegen történő tenyésztése ezzel szemben kisebb térfogati aktivitást eredményezett, mint a búzakorpa alapú folyadék fermentációnál. Ennek oka valószínűleg az lehet, hogy folyadék fermentációban a tenyésztés korai szakaszában detektáltuk a legnagyobb lipáztermelést, míg a szilárd fázisú fermentáció esetében csak egy időpontban, a fermentáció végén (7. nap) határoztuk meg a lipázaktivitást, amikor feltehetően annak szintje már lecsökkent. Emellett azt is ki kell emelni, hogy a lassú növekedést mutató *Mortierella* és *Umbelopsis* izolátumok esetében akár kéthetes inkubáció is szükséges lehet a maximális enzimhozam eléréséhez.

4. táblázat. A vizsgált izolátumok lipázaktivitása búzakorpa alapú szilárd fermentációban, kiegészített tápközegen (SSF2).

Izolátum	Lipáz aktivitás*	
	U/ml nyers kivonat	U/mg fehérje
<i>Mo. alpina</i> CBS 210.32	10,5 ± 1,2	34,7 ± 2,7
<i>Mo. echinosphaera</i> CBS 575.75	13,6 ± 0,5	56,1 ± 4,8
<i>M. corticolus</i> SZMC 12031	288,9 ± 25,6	1325 ± 117,3
<i>R. miehei</i> NRRL 5282	735,8 ± 50,8	3618,6 ± 114,5
<i>Rh. oryzae</i> NRRL 1526	92,9 ± 2,9	534,12 ± 34,9
<i>Rh. oryzae</i> NRRL 1472	34,9 ± 1,2	131,2 ± 6,5
<i>Rh. stolonifer</i> SZMC 13609	25,5 ± 1,1	98,3 ± 5,9
<i>U. autotrophica</i> CBS 310.93	69,4 ± 4,6	284,8 ± 6,1
<i>U. isabellina</i> NRRL 1757	11,2 ± 1,9	41,3 ± 7,9
<i>U. ramanniana</i> var. <i>angulispora</i> CBS 222.29	59,3 ± 1,9	215,8 ± 14,9
<i>U. versiformis</i> CBS 473.74	47,8 ± 1,7	164,7 ± 1,5

* A feltüntetett értékek 7. napon mért enzimaktivitás adatok.

Vizsgálataink alapján a búzakorpa alkalmazható szubsztrát nagy hozamú lipáztermelésre járomspórás gombák esetében. Kísérleteinkben fokozott enzimtermelést értünk el a szubsztrát ásványi sós tápoldattal és induktor olajjal való átnedvesítését követően mind folyadék, mind szilárd fermentációban. Itt érdemes megemlíteni, hogy olcsó mezőgazdasági melléktermékek szubsztrátként történő alkalmazása, különösen szilárd fázisú fermentációban, előnyös a lipáz enzimek nagy mennyiségben, gazdaságosan történő előállításának érdekében (Castilho és mtsi., 2000).

5.4. Lipáztermelés vizsgálata további mezőgazdasági- és élelmiszeripari melléktermékeken

Nagy hozamú lipáztermelésre a búzakorpa mellett ígéretes szubsztrátok lehetnek más magas lipidtartalmú növényi maradványok is. Vizsgálatainkban a szubsztrátként alkalmazott zabkorpa, valamint kender-, len-, tök-, mák és vörös szőlő mag préselési maradékának örleményének lipázhozamra gyakorolt hatását is teszteltük szilárd fázisú fermentációban. Kísérleteinkbe a *R. miehei* NRRL 5282, *Rh. stolonifer* SZMC 13609, *M. corticolus* SZMC 12031, *Mo. echinosphaera* CBS 575.75 és *U. autotrophica* CBS 310.93 izolátumokat vontunk

be. Ezen szubsztrátok esetében is a búzakorpánál tesztelt SSF1 és SSF2 tenyésztési körülményeket alkalmaztuk.

A vörös szőlőmag örleményen az izolátumok nem mutattak növekedést, melynek oka a szőlőmagban található jelentős mennyiségű antimikrobiális hatással rendelkező összetevő lehet (Shrestha és mtsi., 2012). A többi szubsztrát esetében azonban jelentős lipázaktivitást detektáltunk. Az ásványi sós tápoldat azonban, mely elsősorban búzakorpára lett optimalizálva, nem minden esetben fokozta a tesztelt törzsek enzimtermelését; jelentős növekedést csak a *Mo. echinosphaera* kendermag, *Rh. stolonifer* lenmag, valamint *U. autotrophica* izolátum esetén len-, tökmag és mákliszt esetén tapasztaltunk (adatok nincsenek feltüntetve). Megállapítottuk, hogy az egyes növényi szubsztrátok esetében, azok eltérő jellege miatt, a tápközeg későbbi, egyedi optimalizálása szükséges.

A legnagyobb lipáztermelést a *R. miehei* mutatta (4990,7 U/g száraz szubsztrát) mákliszten, annak desztillált vízzel történő nedvesítését követően (5. táblázat), mely a búzakorpán mért értékeknél is magasabbnak bizonyult.

5. táblázat. Lipáztermelő járomspórás gombák legnagyobb lipázaktivitás értékei olajos mag maradványokon szilárd fázisú fermentációt (SSF) alkalmazva.

Izolátum	Lipáz aktivitás*		Szubsztrát** (préselési maradványok örleménye)
	U/ml nyers kivonat	U/g száraz szubsztrát	
<i>Mo. echinosphaera</i> CBS 575.75	6,9 ± 0,2	41,8 ± 0,9	tökmag (SSF1)
<i>M. corticolus</i> SZMC 12031	259,6 ± 11,6	1556,8 ± 156,5	tökmag (SSF1)
<i>R. miehei</i> NRRL 5282	840,2 ± 32,4	4990,7 ± 373,6	mákliszt (SSF1)
<i>Rh. stolonifer</i> SZMC 13609	13,1 ± 0,5	78,9 ± 2,6	tökmag (SSF2)
<i>U. autotrophica</i> CBS 310.93	13,2 ± 1,4	79,6 ± 3	tökmag (SSF2)

* A feltüntetett értékek 7. napon mért enzimaktivitás adatok.

** SSF1: szubsztrát:desztillált víz (1:1); SSF2: szubsztrát:ásványi sós tápoldat (1:1,9) és 1,5% olívaolaj

A mákliszt szintén ígéretes szubsztrátnak bizonyult *M. corticolus* izolátum esetében; 1482,2 U/g száraz szubsztrát aktivitást mértünk a tenyésztés 7. napját követően. Azonban a *R. miehei* izolátum kivételével a tökmag bizonyult a legjobb szubsztrátnak lipáztermelés indukálására. A mákliszt és tökmag esetén megfigyelt magas lipázaktivitások feltételezhetően ezen szubsztrátok magas, 11 – 12%-os lipidtartalmának köszönhető.

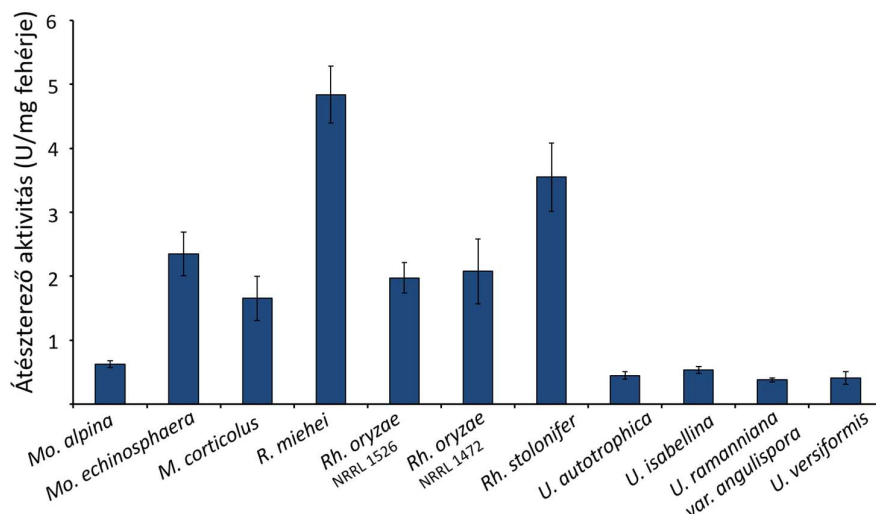
5.5. Átészterező reakciók vizsgálata

5.5.1. Az átészterezés katalizálásának tesztelése

A lipáz enzimek biotechnológiai felhasználhatóságának fontos meghatározója az enzimek szintetikus reakciókat katalizáló képessége szerves oldószerekben. Ezen reakciókban változatos szintetikus vegyületek, mint például aroma-észterek, fenil-észterek és különböző polimerek képződhetnek (Divakar és Manohar, 2007). Különösen a gomba lipázok iránt nagy az érdeklődés a szerves kémiai iparágak részéről, köszönhetően az általuk mutatott széles szubsztrátspecifitásnak, stabilitásnak és szelektivitásnak. A nyers lipáz kivonatokat és a teljes-sejt lipázokat egyaránt használják a különböző szintetikus folyamatok katalizálásában: különféle szintetikus észter termékek állíthatók elő tisztított enzimek készítmény nélkül is (Cardenas és mtsi., 2001; Soumanou és Bornscheuer, 2003; Melo és mtsi., 2005; Ferrarezi és mtsi., 2014; Aguiéiras és mtsi., 2015). Emiatt az enzimek szintetikus aktivitásának vizsgálata a hidrolitikus aktivitás vizsgálata mellett kiemelkedő jelentőséggel bír. Sőt, *Mortierella* és *Umbelopsis* gombáknál tudomásunk szerint lipázok szintetikus aktivitására irányuló vizsgálatokat eddig még nem végeztek, illetve korlátozottak az ismereteink más, szintén a Mucoromycota törzsbe tartozó fajokat illetően is.

Az előzetes tesztjeinkben kiválasztott 11 izolátum lipázának átészterező aktivitását *n*-heptán alapú vízmentes reakcióközegben tanulmányoztuk. A vízmentes közeg az észter kötések kialakításának irányába tolja el a reakciót azok hidrolízise helyett, ugyanis az észter kötések hidrolíziséhez szabad víz jelenléte szükséges. A vizsgálat során búzakorpa alapú szilárd fermentáció (SSF2) utáni nyers lipáz kivonatokkal dolgoztunk. A liofilezett enzimek kivonatok átészterező képességét *p*NFP (acil donor) és etanol (acil akceptor) molekulák között teszteltük, mely a Teng és Xu (2007) által kidolgozott kolorimetriás módszeren alapul. A *p*-nitrofenol (*p*NF) felszabadulását 30 perc inkubációt követően detektáltuk, melyből megállapítottuk a vizsgált izolátumok lipáz enzimeinek átészterezési aktivitását.

Az enzimek átészterező aktivitása a korábban közzétett szakirodalmi adatokkal (Goujard és mtsi., 2009) megegyezően jóval kisebbnek bizonyult, mint a korábban megállapított hidrolitikus aktivitásuk (6. ábra). A legnagyobb átészterező aktivitást *R. miehei* (4,8 U/mg) és *Rh. stolonifer* (3,5 U/mg) izolátumok lipázainak esetében tapasztaltuk. Szintén ígéretes átészterező aktivitást mutattak a *Mo. echinosphaera*, *Rh. oryzae* NRRL 1526 és NRRL 1472 és *M. corticolus* törzsek által termelt enzimek is.



6. ábra. Járomspórás gomba lipolitikus enzimkivonatok átészterező aktivitása 40 °C-on, 30 perc inkubációt követően.

A reakcióelegyek 500 µl térfogatban 9 mM *p*NFP-ot és 1,7 M etanolt tartalmaztak *n*-heptánban.

A *Mo. echinosphaera* és *Rh. stolonifer* enzimek viszonylag csekély hidrolitikus aktivitást mutattak a fermentációs tesztek során, mégis esetükben nagy átészterezési aktivitást tudunk detektálni. Ezen megfigyelés azzal magyarázható, hogy a lipázok hidrolitikus és szintetikus aktivitása gyakran eltérő mértékű (Wu és mtsi., 1996). Egy enzim rendelkezhet alacsony hidrolitikus aktivitással, ennek ellenére szintetikus aktivitása kiemelkedő lehet, illetve fordítva. Az *Umbelopsis* izolátumok enzimkivonatai a többi tesztelt kivonattal összehasonlítva mérsékelt átészterező képességet mutattak (0,38-tól 0,54 U/mg-ig), annak ellenére, hogy ezen enzimek hidrolitikus aktivitásai között jelentős különbségeket tapasztaltunk. Ennek háttérében a vizsgált enzimek szerves oldószerek gátló hatásaival szembeni eltérő érzékenysége állhat. Az *Umbelopsis* izolátumok lipázai esetén a relatív alacsony átészterező aktivitást feltehetően a közegként alkalmazott *n*-heptán okozza. A szerves oldószerek enzim-gátló hatását más gomba lipáz esetén is leírták már (Cardenas és mtsi., 2001).

5.5.2. Az átészterező reakciók katalizálásának jellemzése

Annak érdekében, hogy megállapítsuk számos kondíció átészterező aktivitásra gyakorolt hatását, további vizsgálatokat folytattunk a reakció körülményeinek megváltoztatásával. A reakcióközegként alkalmazott oldószer polaritása, az inkubációs

hőmérséklet, valamint a jelen lévő acil donor és akceptor molekulák típusa és koncentrációja hatással lehet az enzim aktivitására, így a reakció hatékonyságára.

Különböző alkánok és cikloalkánok reakcióközegként történő alkalmazása

A szerves oldószer, mint reakcióközeg megválasztása nagy jelentőséggel bír, ugyanis annak fizikai-kémiai tulajdonságai hatással vannak mind az enzimek stabilitására, aktivitására, mind pedig a katalizált reakció hatékonyságára. Az enzimátikus katalízis nagy mértékben függ a szerves oldószer polaritásától, hidrofobicitásától, azaz $\text{Log } P_{\text{ov}}$ értékétől (Akoh és mtsi., 1998; Cernia és mtsi., 1998). Ennek érdekében különböző $\text{Log } P_{\text{ov}}$ értékkel rendelkező oldószer (hexán, ciklohexán, *n*-heptán, izooktán) átészterezésre gyakorolt hatását hasonlítottuk össze. A **6. táblázatban** látható, hogy a vizsgált enzimek aktívnak bizonyultak mindegyik tesztelt közegben. Az eredmények bizonyítják, hogy a legtöbb lipáz képes megőrizni aktivitását, és stabil vízmentes szerves közegben, ami a fehérje molekulát körülvevő nagyon kis mennyiségű enzim-kötött víz jelenlétének is köszönhető (Sharma és Kanwar, 2014).

A legtöbb lipáz esetében az *n*-heptán bizonyult a legjobb reakcióközegnek, kivéve az *U. isabellina*, *U. versiformis*, valamint *U. autotrophica* enzimeket, melyek a leghatékonyabb konverziót hexánban (3,2 és 2,4%), illetve izooktánban (2,1%) mutatták. Azonban ezen izolátumok esetében nem volt nagy különbség az *n*-heptánban és hexánban mért eredmények között. Az *n*-heptán más, lipázkatalizált szerves reakciókban szintén megfelelő reakcióközegnek bizonyult (Xu és mtsi., 2002; Sun és mtsi., 2009; Madalozzo és mtsi., 2014). A *R. miehei* lipáz esetében hasonlóan intenzív *p*NF felszabadulást tapasztaltunk ciklohexán reakcióközegben is. Egy *Acinetobacter* nemzetségbe tartozó baktérium lipáz enzime szintén nagy stabilitással rendelkezett szerves oldószerekben, és képes volt az etil-kaprilát hatékony szintézisére ciklohexánban (Nagarajan, 2012). A *Rh. stolonifer* lipáz *p*NFP konverziójában nem tapasztaltunk jelentős különbséget hexán, ciklohexán és izooktán közegekben, de az *n*-heptánban meghatározott konverzió mintegy felét tapasztaltuk ezen oldószer alkalmazásakor.

Cernia és munkatársai (1998) *Pseudomonas cepacia* lipáz vizsgálatakor azt találták, hogy az enzim észterező és átészterező aktivitása jelentősen megemelkedett a reakcióközegként alkalmazott oldószer hidrofobicitásának ($\text{Log } P_{\text{ov}}$ értékének) emelkedésével. Kísérleteinkben a legmagasabb konverziókat eredményező *n*-heptán szintén magas, 4,4-es $\text{Log } P_{\text{ov}}$ értékkel rendelkezik.

6. táblázat. Szerves oldószerek hatása *Rhizomucor*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Mortierella* és *Umbelopsis* törzsek nyers lipáz kivonatai által katalizált *p*NFP átészterezésre.

A nyers enzim forrása	Konverzió (%)*			
	hexán	ciklohexán	<i>n</i> -heptán	izooktán
<i>R. miehei</i> NRRL 5282	13,9 ± 1,1	23,8 ± 2,1	30,5 ± 2,7	13,2 ± 1,3
<i>Rh. oryzae</i> NRRL 1526	10,7 ± 0,8	12,7 ± 0,7	24,8 ± 1,6	17,1 ± 1,1
<i>Rh. oryzae</i> NRRL 1472	10,3 ± 0,7	12,5 ± 1,1	16,7 ± 1,3	12,8 ± 0,4
<i>Rh. stolonifer</i> SZMC 13609	18,5 ± 1,8	16,8 ± 1,2	35,7 ± 3,1	17,3 ± 0,6
<i>M. corticolus</i> SZMC 12031	8,6 ± 0,5	13,9 ± 0,8	22,1 ± 2,8	12,2 ± 0,3
<i>Mo. echinosphaera</i> CBS 575.75	14,1 ± 0,9	13,4 ± 0,9	22,4 ± 1,7	9,4 ± 0,7
<i>Mo. alpina</i> CBS 210.32	3,5 ± 0,4	0,7 ± 0,1	4,6 ± 0,3	2,2 ± 0,3
<i>U. isabellina</i> NRRL 1757	3,2 ± 0,2	2,6 ± 0,3	2,4 ± 0,2	1,4 ± 0,2
<i>U. autotrophica</i> CBS 310.93	1,4 ± 0,1	0,6 ± 0,1	1,6 ± 0,1	2,1 ± 0,3
<i>U. ramanniana</i> var. <i>angulispora</i> CBS 222.29	1,3 ± 0,1	1,4 ± 0,2	1,8 ± 0,3	1,1 ± 0,1
<i>U. versiformis</i> CBS 473.74	2,4 ± 0,2	1,1 ± 0,1	2,0 ± 0,1	1,8 ± 0,2

* Az 500 µl térfogatú reakcióelegyek 9 mM *p*NFP-ot és 1,7 M etanolt tartalmaztak megfelelő oldószerben. A feltüntetett konverziós értékek a 40 °C-on, 6 órás inkubációt követően detektált átészterezés adatai. Konverzió=(c_1/c_0) × 100%, ahol c_0 a kiindulási *p*NFP és c_1 a felszabaduló *p*NF koncentrációja.

A lipáz enzimek szerves közegben is működő katalitikus képessége azzal magyarázható, hogy a vízzel nem elegyedő oldószerek megváltoztatják az enzim szerkezetét, így hatással vannak azok stabilitására és aktivitására. Mindez annak köszönhető, hogy az oldószer kölcsönhatásba képes lépni az aktív centrumnál jelen lévő hidrofób aminosavakkal, így fenntartják az enzim aktív konformációját (Doukyu és Ogino, 2010). Emellett, az enzimet körülvevő vízréteget csapdában tartják, mely szintén hozzájárul az enzimek aktív konformációban tartásához (Tran és mtsi., 2013). Mivel a tesztelt enzimek többsége jól katalizálta a *p*NFP átészterezést *n*-heptánban, további vizsgálatok elvégzéséhez ezen oldószert választottuk reakcióközegnek.

Hőmérséklet hatása az átészterező reakciókra

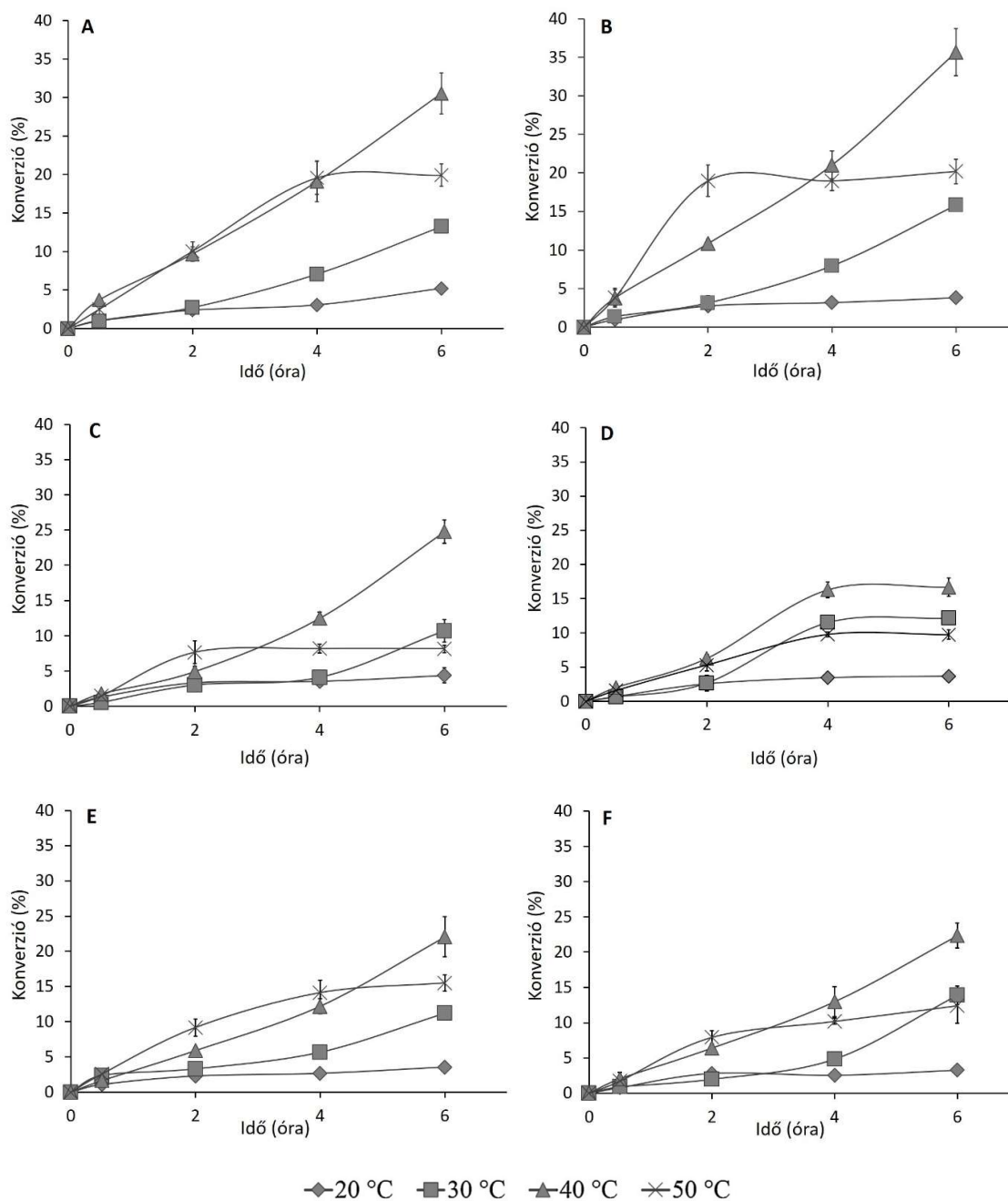
A reakció hőmérséklete hatással van mind az enzim aktivitására, mind a stabilitására, így jelentősen hozzájárul a katalízis hatékonyságához. Ezért a *p*NFP átészterezését 0,5 – 6 óra inkubációt követően 20 – 50 °C közötti hőmérsékleteken is megvizsgáltuk. Általánosságban elmondható, hogy a 30 °C-nál magasabb hőmérséklet növelte a reakció rátáját, ennek következtében nagyobb *p*NF felszabadulást detektáltunk. A vizsgált enzimek esetében a legjelentősebb átészterezést 40 °C-on tapasztaltuk (7. ábra és 2. melléklet). Ezen

hőmérsékleten történő inkubáció más Mucoromycota lipázok esetén is hatékonyak bizonyult különböző alkil-észterek szintézise során (Xu és mtsi., 2002; Sun és mtsi., 2009; Madalozzo és mtsi., 2014). Egy *Rhizopus* nemzetségbe tartozó lipáz vizsgálata esetén szintén a 40 °C inkubációs hőmérséklet bizonyult a leghatékonyabbnak citronellil aroma észter szintézisekor (Melo és mtsi., 2005).

A *p*NFP konverziós ráta lineárisan növekedett a 6 órás inkubáció alatt 40 °C-on (**7. A, B, C, E, F ábra**), kivéve a *Rh. oryzae* NRRL 1472, *U. autotrophica* és *U. versiformis* enzimek esetében, melyek már 4 óra inkubációt követően elérték a maximális konverziót (**7. D ábra és 2. melléklet C és E ábra**). Az átészterezés leállása a közegben jelen lévő etanol gátló hatásával magyarázható, ugyanis alacsonyabb hőmérsékleteken is ugyanezt a jelenséget tapasztaltuk ezen izolátumok esetében.

A *Rh. stolonifer*, *Rh. oryzae* NRRL 1526, *M. corticolus*, *Mo. echinosphaera* és *Mo. alpina* lipázok kezdeti *p*NFP konverziója 50 °C-on hatékonyabbnak bizonyult mint 40 °C-on történő inkubáció esetén. A szintetikus aktivitás szempontjából korábban még nem tanulmányozott *Rh. stolonifer* lipáz kiemelkedően magas reakció sebességet mutatott 50 °C-on, 20% konverziót eredményezve mindössze 2 óra inkubációt követően (**7. B ábra**). A *R. miehei*, *U. isabellina* és *U. ramanniana* var. *angulispora* lipázok szintén figyelemre méltó átészterező aktivitást eredményeztek 50 °C-on, hasonlóan néhány kereskedelmi forgalomban kapható enzimpreparátumhoz (pl. *Novozym 435*, *Lipozyme RM-IM*, *Lipozyme TL-IM*) (Fu és mtsi., 2014; Martins és mtsi., 2014). A magas hőmérséklet katalízis-fokozó hatása a viszkozitás csökkenésével, valamint a szubsztrátok diffúziós képességének növekedésével magyarázható (Ebrahimpour és mtsi., 2011). Feltételezhető, hogy alacsony hőmérsékleten a zsírsavlánc migrációja lassabb, emiatt kevésbé hatékony az átészterezés. A magas hőmérséklet azonban az enzimek gyorsabb inaktiválódását, denaturálódását eredményezheti, így a hatékony inkubációs hőmérséklet, valamint ígéretes hőstabilitással rendelkező enzimpreparátum megválasztása kiemelkedő jelentőségű (Duan és mtsi., 2010).

A leghatékonyabb konverziót *Rh. stolonifer* és *R. miehei* lipáza esetén tapasztaltuk (30,5% és 35,7%) 40 °C-on, 6 órás inkubációt követően (**7. A és B ábra**). A *M. corticolus* lipáz mérsékelt alkoholízist mutatott (**7. E ábra**) két órát követően 40 °C-on inkubálva, azonban az inkubáció hatodik órájára 22,1%, *Mo. echinosphaera* esetében 22,4% átalakulást detektáltunk (**7. F ábra**). További kísérleteinkhez a leghatékonyabb *p*NFP konverziót eredményező *R. miehei*, *Rh. oryzae* NRRL 1526, *Rh. stolonifer*, *M. corticolus* és *Mo. echinosphaera* izolátumok nyers enzimkivonatait választottuk. Az enzimkivonatok stabilnak és hatékonyak bizonyultak 40 °C-on, ezért vizsgálatainkat ezen a hőmérsékleten végeztük.

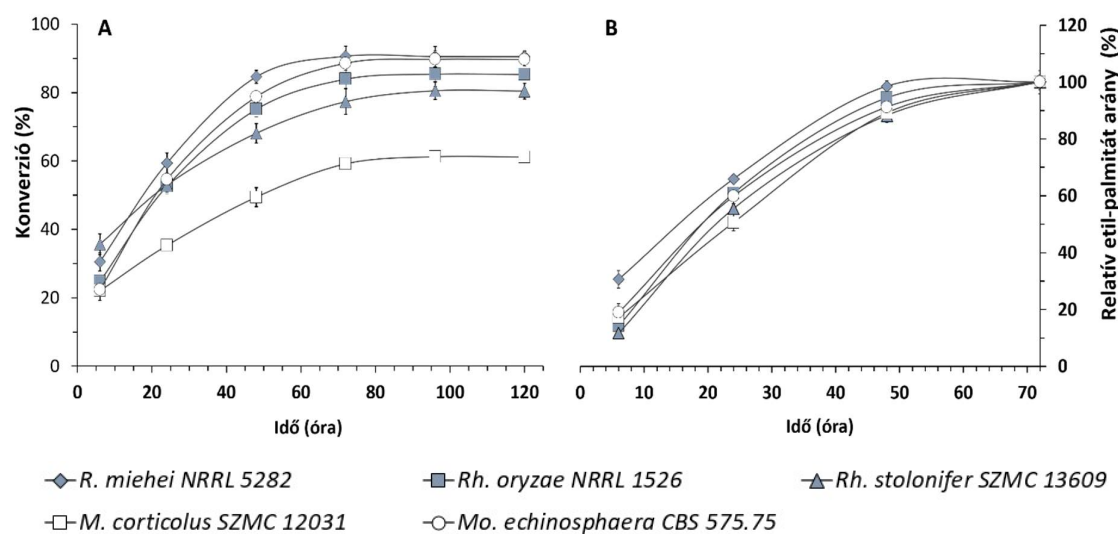


7. ábra. A hőmérséklet hatása a *R. miehei* NRRL 5282 (A), *Rh. stolonifer* SZMC 13609 (B), *Rh. oryzae* NRRL 1526 (C), *Rh. oryzae* NRRL 1472 (D), *M. corticolus* SZMC 12031 (E) és *Mo. echinosphaera* CBS 575.75 (F) törzsek nyers lipázkivonatai által katalizált pNFP átészterezésre.

Az 500 µl térfogatú reakcióelegyek 9 mM pNFP-ot és 1,7 M etanolt tartalmaztak *n*-heptánban. Konverzió=(c1/c0) × 100%, ahol c0 a kiindulási pNFP és c1 a felszabaduló pNF koncentrációja.

Az inkubációs idő növelésének hatása az átészterező reakciókra

Az etanol és a *p*NFP közötti átészterezés katalizálását a reakció inkubációs idejének 120 órára történő megnövelésével tovább vizsgáltuk. A reakció ráta lineáris emelkedését tapasztaltuk az első 48 órában, majd ezt követően a *p*NFP konverzió elérte maximumát, további *p*NF felszabadulást 96 órát követően nem detektáltunk (**8. A ábra**). Korábbi tanulmányok szintén a hosszú inkubációs idő szükségességét mutatják nyers lipázkivonatok alkil-észter szintézise során (Soumanou és Bornscheuer, 2003). Feltételezhető továbbá, hogy tisztított és immobilizált enzim alkalmazása jelentősen csökkenti az átalakításhoz szükséges időt. A *Rh. chinensis* teljes sejt lipáz etil-hexanoát szintézisének vizsgálatakor szintén 72 órát követően volt tapasztalható a legnagyobb termelés (Xu és mtsi., 2002). Wu és munkatársai (1996) a legnagyobb reakciós rátát 5 – 10 óra inkubációs idő között tapasztalták *Rhizopus* és *Rhizomucor* kereskedelmi forgalomban kapható lipáza esetében repcemagolaj és 2-etil-1-hexanol közötti átészterezés során.



8. ábra. Járomspórás gomba nyers lipázkivonatok által katalizált *p*NFP átészterezés időfüggése a keletkezett termékek UV spektrofotometriás (A) és GC-FID (B) analizisét követően.

A 40 °C-on inkubált 500 µl térfogatú reakcióelegyek 9 mM *p*NFP-ot és 1,7 M etanolt tartalmaztak *n*-heptánban.

B ábra: Az egyes enzimek által szintetizált etil-palmitát mennyiséget tekintettük 100%-nak..

A leghatékonyabb *p*NFP konverziókat (90,5 és 88,5%) a *R. miehei* és a *Mo. echinosphaera* enzimmikivonatai mutatták, annak ellenére, hogy 6 órát követően még a *Rh. stolonifer* lipáza esetében detektáltuk a leghatékonyabb átalakító képességet. Ezen lipáz vizsgálatakor 6 órát követően a reakció sebességének mérséklődését tapasztaltuk. A legkisebb

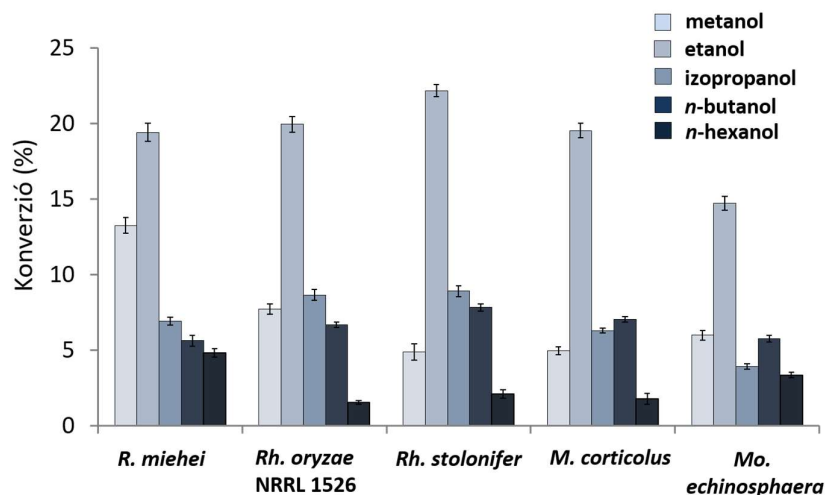
hatékonyságú konverziót a *M. corticolus* (59%) lipáza esetében állapítottuk meg. Ennek egyik lehetséges magyarázata az enzim strukturális stabilitásának elvesztése a hosszú inkubációs idő alatt *n*-heptán, illetve 10% etanol tartalmú reakció közegben, valamint közrejátszhat az alkalmazott hőmérséklet inaktíváló hatása is (Duan és mtsi., 2010).

Fu és munkatársai (2014) szintén 90% körüli *p*NF hozamot mértek az 1000 U aktivitást mutató *Thermomyces lanuginosus* (*Lipozyme TL IM*) kereskedelmi lipázzal a *p*NFP és *n*-butanol közötti átészterezés katalizálása során. Habár esetükben a kezdeti reakciósebesség 24-szer gyorsabbnak bizonyult, mint a mi kísérleteinkben, fontos kiemelni, hogy az általunk tesztelt reakciókban jóval kevesebb enzimet alkalmaztunk (*R. miehei* 98,8 U és *Mo. echinosphaera* 1,8 U). Szintén ebben a tanulmányban a *M. miehei* (*Lipozyme RM IM*, 20 U) és a *Rh. niveus* (1,5 U) kereskedelmi enzimek 10 perc inkubációt követően 15 illetve 3% konverziót eredményeztek. Összehasonlításképpen, az etil-palmitát észter termelést gázkromatográfiás módszerrel is meghatároztuk, mely során a reakció idejének növelésével arányosan növekvő termékképződést tapasztaltunk (**8. B ábra**).

Különböző acil akceptorok alkalmazásának hatása az átészterező reakciókra

A vizsgált izolátumok nyers lipázainak átészterező képességét különböző szénlánc-hosszúságú acil akceptor molekulaként szolgáló alkoholok (elsődrendű alkoholok: metanol, etanol, *n*-butanol és *n*-hexanol; másodrendű alkohol: izopropanol) jelenlétében is teszteltük. A reakció során keletkező alkil-palmitát észterek iránt az élelmiszer-, detergens-, kozmetikai-, és gyógyszeripar egyaránt nagy érdeklődést mutat. A **9. ábrán** látható, hogy a *p*NFP átészterezése végbement az összes vizsgált alkohol jelenlétében, azonban az enzimek a leghatékonyabb *p*NFP konverziót etanol alkalmazásakor eredményezték.

A *R. miehei* lipáz esetén metanol és etanol (13,3% és 19,4% konverzió) jelenlétében is jelentős *p*NF felszabadulást tapasztaltunk. A kereskedelmi forgalomban kapható *Lipozyme IM 60* és *Lipozyme RM IM* enzimpreparátumok szintén hatékony átészterező képességet mutattak etanollal és metanollal (Nelson és mtsi., 1996; Demirkol és mtsi., 2006). A trigliceridek hatékony átészterezése a *R. miehei* lipázt értékes biokatalizátorrá teszi a biodízel-előállítás területén (Rodrigues és Fernandez-Lafuente, 2010).



9. ábra. Járomspórás gomba nyers lipáz kivonatok által katalizált átészterezés *p*NFP és különböző acil akceptor alkoholok között.

Az 500 µl térfogatú reakcióelegyek 9 mM *p*NFP-ot és 1,7 M etanolt tartalmaztak *n*-heptánban. A feltüntetett konverziós értékek 40 °C-on, 6 órás inkubációt követően mért adatok. A reakcióelegyek az alkoholt 1 M koncentrációban tartalmazták.

Az akceptor-alkohol szénlánc hosszának növekedésével az átészterezés hatékonysága csökkent, így a zsírsavlánc áthelyezése kevésbé bizonyult intenzívnek az elágazó (izopropanol), valamint a hosszabb szénláncú alkoholok esetében (butanol C5, hexanol C6). Egy *Mucor* fajból izolált lipáz szintén a rövid szénláncú alkoholokra mutatott preferenciát, emellett a szénlánc elágazásának lipáz katalizált észterezésre gyakorolt negatív hatását is megfigyelték (Abbas és Comeau, 2003). Ezen kívül a *Rh. chinensis* lipáz esetében írták le a hosszú szénláncú alkoholok hasonló hatását a konverzióra (Sun és mtsi., 2009). Azonban a *Lipozyme TL IM* enzimkészítmény C3 és C4 alkoholokkal hatékonyabb átészterezést mutatott, mint a rövidebb C1 és C2 formákkal (Fu és mtsi., 2014).

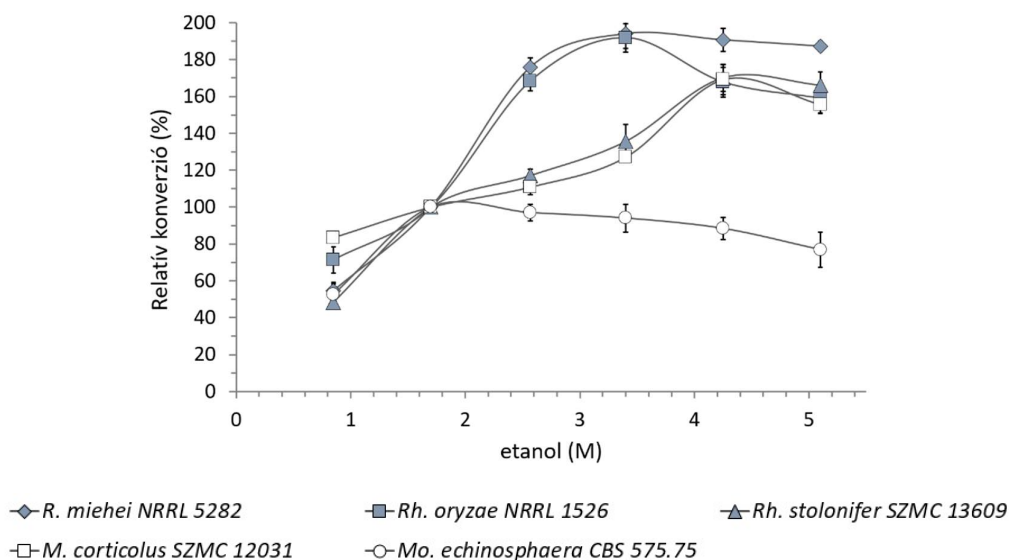
A különböző alkoholokkal szembeni eltérő konverziós hatékonyság több tényezőnek tulajdonítható, úgymint az alkohol molekula mérete, az alkohol oldékonysága az alkalmazott reakció közegben, valamint az enzim alkohollal szembeni affinitása (Varma és Madras, 2010). Ezen kívül az alkohol enzimaktivitásra gyakorolt hatása függhet az acil donor szubsztrát típusától is (Abbas és Comeau, 2003).

Az etanol koncentráció hatása az átészterező reakciókra

A kezdeti alkohol koncentráció reakciótípustól és az enzim alkohol toleranciájától függően befolyásolhatja az átészterezést. A magas alkohol koncentráció destabilizálhatja az

enzimet, így csökkentheti a szintézis hatékonyságát, ugyanakkor az acil akceptor hiány leállíthatja a reakciót (Sun és mtsi., 2012). A tesztelt lipázok etanol toleranciájának vizsgálata céljából változtattuk a reakcióelegyben jelen lévő etanol koncentrációját 0,85 – 5,1 M (5 – 30%, v/v) tartományban. Az eredmények értékelésekor az eredeti reakcióban lévő, 1,7 M (10%, v/v) etanol koncentráció mellett mért konverziós értékeket vettük 100%-nak.

A *p*NFP konverziók jelentős növekedését tapasztaltuk 0,85-től 1,7 M etanol koncentrációnál (**10. ábra**). Azonban az 1,7 M-nál nagyobb koncentrációk mellett az egyes enzimek katalízis rátája eltérő volt: a *R. miehei* és *Rh. oryzae* lipázok esetében a konverzió meredek emelkedését mértük 3,4 M, míg *Rh. stolonifer* és *M. corticolus* enzimek esetében 4,2 M etanol koncentrációig. A magasabb etanol:*p*NFP mólárány a *R. miehei* és *Rh. oryzae* lipázoknál 94,1 és 91,8%-os, a *Rh. stolonifer* és *M. corticolus* lipázok esetében 70,2 és 69,2%-os növekedést eredményezett a konverzióban. A konverziókban bekövetkező jelentős növekedés annak köszönhető, hogy a magas alkohol és acil donor arány minimalizálja a termék diffúziójának korlátjait az oldószerben, valamint biztosítja a nagy reakciósebességet (Rodrigues és mtsi., 2008). Az etanol koncentráció további emelésével azonban nem értünk el további konverzió emelkedést, sőt kis mértékű gátló hatást tapasztaltunk 5,1 M etanol jelenlétében.



10. ábra Az akceptor etanol koncentráció változtatásának hatása járomspórás gomba nyers lipázkivonatok által katalizált *p*NFP átszterezésre.

Az 500 µl térfogatú reakcióelegyek 9 mM *p*NFP-ot és 0,85 – 5,1 M (5 – 30 v/v%) etanolt tartalmaztak *n*-heptánban; a reakcióelegyeket 40 °C-on, 6 órán át inkubáltuk. Az átsztereézést a *p*NFP relatív konverziójához viszonyítottuk; 100%-nak az 1,7 M etanol koncentrációnál mért aktivitást tekintettük.

A *Mo. echinosphaera* lipáza esetében a konverzió csökkenését figyeltük meg 1,7 M etanol koncentráció felett. Feltételezhető, hogy ezen enzim érzékeny a magas etanol koncentrációra a vizsgált reakciókörülményen. A vízzel elegyedő alkoholok nagy koncentrációban növelik a reakcióközeg polaritását, mely gyakran a biokatalizátorok inaktiválódását eredményezi (Salis és mtsi., 2005).

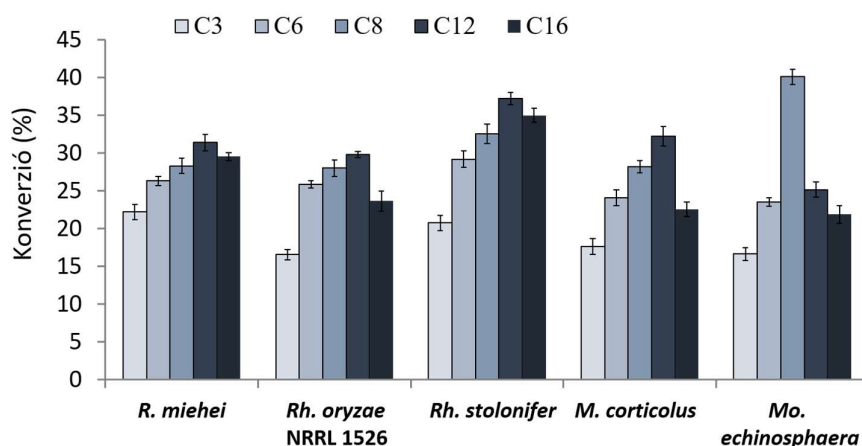
Az optimális alkohol koncentráció nagyon változatosnak bizonyul az egyes észterező és átészterező reakciókban a szakirodalom alapján, mely feltehetően az alkalmazott acil donor szénlánc hosszúságától, valamint koncentrációjától is nagymértékben függ. A *Rh. chinensis* lipáz hatékony katalizist mutatott 5 és 2,6 M etanol koncentráció jelenlétében, ahol megegyező moláris arányban kapril-, vagy olajsav volt jelen a reakcióközegben (Teng és mtsi., 2009). Madalozzo és munkatársai (2014) a *Rh. oryzae* lipáz által katalizált olajsav és etanol közötti észterezést vizsgálták, ahol az optimális etanol koncentráció 1,54 M-nak bizonyult 0,56 M olajsav jelenlétében. Jelentős változást nem tudtunk megfigyelni a *pNFP* konverzióban az acil donor szubsztrát (*pNFP*) koncentrációjának 0,9 – 10 mM tartományon belüli változtatásával, miközben az etanolt konstans, 1,7 M koncentrációban alkalmaztuk (adatok nincsenek feltüntetve).

Különböző aril-észterek és etanol közötti átészterezés

A lipáz enzimek a láncosszótól függően bizonyos zsírsav szubsztrátok átészterezését előnyben részesíthetik, így a keletkező etil-észterek hozamát az alkalmazott aril-észter típusa is befolyásolja. Jelen vizsgálatunkban *p*-nitrofenil-propionát (C3), kaproát (C6), kaprilát (C8), laurát (C12) és palmitát (C16) acil donorok átészterezését hasonlítottuk össze konstans etanol koncentráció (1,7 M) mellett. A rövid, illetve közepes szénlánc hosszúságú zsírsavak és alkoholok észterszármazékai kiemelkedő jelentőségűek az élelmiszeriparban, mint íz és aroma összetevők (Aravindan és mtsi., 2007).

A tesztelt lipázok eltérő átészterező aktivitást mutattak a különböző szénlánc hosszúságú zsírsavat tartalmazó észterek szubsztrátként történő alkalmazásakor. A konverziós értékek a **11. ábrán** láthatók. Megállapítható, hogy a tesztelt öt enzim mindegyik vizsgált aril-észter átészterezését képes volt katalizálni. Általánosságban a közepes szénlánc hosszúságú (C8 – C12) aril-észterek alkalmazásakor nagyobb konverziót állapítottunk meg, mint a rövid vagy hosszú zsírsavláncot tartalmazó észterek esetében. A *Mo. echinosphaera* a leghatékonyabb átészterező aktivitást a 8 szénatomszámú kaprilsav esetében mutatta, a meghatározott konverzió ebben az esetben majdnem duplája volt a *pNF*-palmitátnál mérttel összehasonlítva. A *pNF*-

propionát (C3) átészterezése a legkisebb konverziós értékeket eredményezte a vizsgált lipázok mindegyikénél. Az általunk tesztelt járomspórás gomba nyers lipázkivonatok elsősorban a közepes szénlánc-hosszúságú zsírsavak átészterezésére mutattak affinitást. A Sun és Xu (2008), valamint Sun és munkatársai (2009) által tesztelt *Rh. chinensis* lipázok szintén közepes hosszúságú zsírsavláncokkal szemben mutattak preferenciát. A Lip1 és Lip2 lipázok által katalizált észterező reakciókban a tesztelt zsírsavak közül a kaprilsav (C8) alkalmazásakor képződött a legtöbb etil-észter termék.



11. ábra. Járomspórás gomba nyers lipázkivonatok által katalizált átészterezés különböző aril donor szubsztrátok és etanol között.

A 500 µl térfogatú reakcióelegyek 9 mM megfelelő aril-észtert és 1,7 M etanolt tartalmaztak. A feltüntetett konverziós értékek 40 °C-on, 6 órás inkubációt követően mért mérés eredményei.

5.6. Észterező reakciók vizsgálata

5.6.1. Az észterezés katalizálásának tesztelése

Figyelembe véve, hogy a *R. miehei*, *Rh. stolonifer* és *Mo. echinosphaera* nyers lipázkivonatok gyors kezdeti reakciós rátát és magas aktivitásokat mutattak az átészterezés katalizálása során, a szintetikus aktivitások összehasonlítását ezen enzimek esetében vizsgáltuk. Az enzimek észterező képességét palmitinsav és etanol között 6, 24 és 48 óra inkubációt követően teszteltük. A keletkező etil-palmitát észter meghatározását gázkromatográffal végeztük, melyből az enzimek kivonatok specifikus aktivitás értékeit határoztuk meg.

A vizsgált enzimek eltérő észterező képességet mutattak. Emellett megállapítottuk, hogy az észterezés jelentősen lassabban megy végbe, mint az átészterezési reakció, valamint

alacsonyabb mennyiségű észter termékképződést eredményez. A *Mo. echinosphaera* és a *R. miehei* lipáznál 48 óra, míg a *Rh. stolonifer* enzimnél 24 óra után sorrendben 9,77, 9,98 és 10,54 mg/l etil-palmitát koncentrációkat állapítottunk meg. *Rh. stolonifer* esetében 24 órát követően további termékképződést nem tapasztaltunk. A *Mo. echinosphaera* lipáz az inkubáció kezdetén alacsony észterezési rátát mutatott, azonban 48 órát követően hasonló mennyiségű etil-palmitát képződése volt detektálható, mint a másik két lipáz esetében. A korábban meghatározott átészterező aktivitásokkal összehasonlítva az észterező specifikus aktivitás értékek alacsonyabbnak bizonyultak (7. táblázat).

7. táblázat. Járomspórás gomba nyers lipázkivonatok szintetikus aktivitásai.

A nyers enzim forrása	Átészterező aktivitás* (U/mg fehérje)	Észterező aktivitás (U/mg fehérje)
<i>R. miehei</i> NRRL 5282	4,84 ± 0,44	0,078 ± 0,006
<i>Rh. stolonifer</i> SZMC 13609	3,55 ± 0,53	0,065 ± 0,005
<i>Mo. echinosphaera</i> CBS 575.75	2,35 ± 0,34	0,061 ± 0,002

*A feltüntetett adatok az 5.5.1. fejezetben meghatározott értékek.

Korábbi tanulmányokban szintén leírták, hogy a lipázok a közvetlen észterezés során alacsonyabb katalitikus aktivitással rendelkeznek, mint az átészterező reakciókban (Wu és mtsi., 1996; Pirozzi és Greco, 2006). Ezen jelenség többféle tényezőnek is tulajdonítható. Egyik lehetséges magyarázat, hogy az észterezés során felszabaduló víz határozott fázist képezhet, mely elválaszthatja az enzimet a szubsztráttól, így megakadályozza annak átalakítását (Plou és mtsi., 2003). Az aktivitások különbözőségének másik magyarázata lehet az enzimek eltérő hőmérséklet optimuma, stabilitása átészterezés és észterezés alatt. Pirozzi és Greco (2006) kimutatták, hogy a *C. antarctica* (Novozyme 435) lipáz a magas hőmérséklettel szemben nagyobb stabilitást és magasabb hőmérsékleti optimumot mutatott átészterező reakcióban alkalmazva (etil-laktát átészterezése), mint észterezőben (tejsav észterezése).

Tudomásunk szerint a *Rh. stolonifer* és *Mo. echinosphaera* extracelluláris lipázoknál korábban nem mutattak ki észterező aktivitást. A *Rh. oryzae* és *M. corticolus* enzimek által katalizált észterező reakció során keletkező etil-palmitát mennyiségének, valamint észterező aktivitásainak meghatározása folyamatban van.

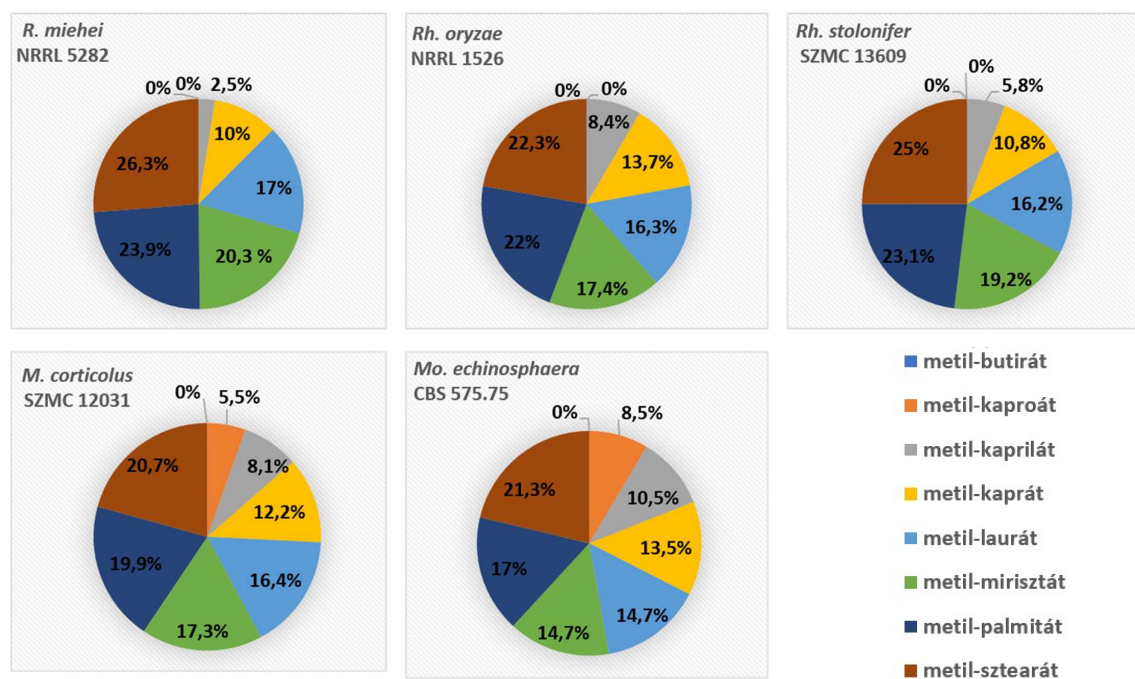
5.6.2. Zsírsvpreferencia meghatározása észterező reakciókban

Az átészterezés során a vizsgált enzimek kivonatok eltérő preferenciát mutattak a különböző szénlánc-hosszúságú zsírsavak áthelyezésére (5.5.2. fejezet). Ezen preferenciát észterező reakciókban is tanulmányoztuk *R. miehei* NRRL 5282, *Rh. oryzae* NRRL 1526, *Rh. stolonifer* SZMC 13609, *M. corticolus* SZMC 12031 és *Mo. echinosphaera* CBS 575.75 nyers enzimek kivonataival. Ennek érdekében különböző szénlánc-hosszúságú zsírsavak (vajsvav-C4, kapronsav-C6, kaprilsav-C8, kaprinsav-C10, laurinsav-C12, mirisztinsav-C14, palmitinsav-C16 és sztearinsav-C18) és metanol között végbemenő észterezési reakciókat teszteltünk. Az észterezés az előzetes vizsgálatok alapján lassabb folyamatnak bizonyult, mint az átészterezés, ezért 72 órás inkubációs időt követően végeztük a keletkező metil-észterek gázkromatográffal történő analitikai meghatározását.

A **12. ábrán** látható, hogy a keletkező metil észterek %-os aránya az alkalmazott zsírsav szénlánc-hosszának növekedésével emelkedik, mindegyik tesztelt enzim esetében a metil-sztearát észter keletkezését detektáltuk a legnagyobb mennyiségben. Metil-észter képződést a rövid szénlánc-hosszúságú vajsvav (C4) alkalmazásakor nem tapasztaltunk. A kapronsav (C6) észterezését mindössze *M. corticolus* és *Mo. echinosphaera* enzimek katalizálták, mely ezen lipázok széles szubsztrátspecifitását mutatja.

Abbas és Comeau (2003) egy *Mucor* fajból izolált lipáz észterező képességének tanulmányozásakor kimutatták, hogy az észterezés reakciós rátája gyorsan növekszik az alkalmazott zsírsav szénlánc-hosszúságának növekedésekor. A legnagyobb észter termék képződést kapronsav (C6) zsírsavnál tapasztalták, azonban vizsgálataikba hosszabb szénláncú acil donort nem vettek be. Az immobilizált *Mucor javanicus* lipáz észterező kapacitásának vizsgálatakor a tesztelt zsírsavak közül a leghosszabb, laurinsav alkalmazásakor detektálták a legnagyobb észter képződést (Silva és Jesus, 2003). *Rh. chinensis* tisztított lipázok észterező aktivitásának vizsgálatakor elsősorban a C8 – C14 közötti zsírsavak bizonyultak hatékonyak etil-észterek keletkezése során. Tesztjeikben a hosszú szénlánc-hosszúságú palmitinsav esetén alacsonyabb termékképződést tapasztaltak, mint a közepes szénlánc-hosszúságúak esetén. A legalacsonyabb észter képződést a rövid szénláncú vajsvav jelenlétében figyelték meg (Sun és Xu, 2008; Sun és Xu, 2009; Sun és mtsi., 2009). Hasonlóan a mi megfigyeléseinkhez, megállapították, hogy a rövid szénláncú zsírsavak a közepes és hosszú zsírsavakhoz viszonyítva kevésbé bizonyulnak hatékony donornak lipáz-katalizált észterező reakciókban. Ennek oka, amellet, hogy a lipázok fő szubsztrátjai nem a rövid zsírsavak, ezen zsírsavak enzimaktivitás inaktíváló hatása lehet. A rövid zsírsavak képesek az aktív centrumban a katalitikus triádot

alkotó szerin aminosavhoz irreverzibilis módon kapcsolódni, így gátolni az enzim aktivitását (Abbas és Comeau, 2003; Khrisna és mtsi., 2001).



12. ábra. Metil-észterek százalékos aránya a járomspórás gomba nyers lipázkivonatok által katalizált észterező reakciókban.

40 °C-on, *n*-heptánban, 72 óra inkubációt követően meghatározott mennyiségek.

100% az észterezés során keletkező összes metil-észter mennyisége.

Kísérletünkben a vizsgált enzimek kivonatok számos metil-észter termék képződését katalizálták; a legnagyobb mennyiségben keletkező metil-sztearát észtert a *R. miehei*, *Rh. oryzae*, *Rh. stolonifer*, *M. corticolus* és *Mo. echinosphaera* lipázok esetében sorrendben 19, 7,9, 14,9, 14, és 15,8 mg/l koncentrációban detektáltuk. A különböző zsírsav észterek (különösen a metil- és etil-észterek) hasznosítása széles körű az ipar részéről; a biodízel és egyéb specifikus lipidek előállítására mellett íz és aroma-észterként alkalmazhatók (Haas és mtsi., 2004; Speranza és Macedo, 2012; Sun és mtsi., 2009).

5.7. A lipáz enzimek tisztítása

A lipázok kereskedelmi alkalmazásainak többsége nem igényel homogén enzimek készítményt. Ezen ipari szektorok a textil ipar, valamint a detergens-, és biodízel előállítás, ahol nyers enzimek készítmények hasznosítása is elfogadott (Patel és mtsi., 2017).

Azonban az enzimek homogenitásig történő tisztítása néhány ipari felhasználás során elengedhetetlen, ilyen a finomkémia-, gyógyszer-, és kozmetikai ipar (Saxena és mtsi., 2003). Az ipari alkalmazásuk gyors, olcsó és nagy hatékonyságú tisztítási módszereket igényelnek (Sharma és mtsi., 2011).

A végrehajtott fermentációs és szintetikus aktivitásra irányuló tesztek elvégzése után kiválasztottuk a tisztítani kívánt enzimeket. Az extracelluláris lipáz enzimek izolálását *R. miehei* NRRL 5282, *Rh. oryzae* NRRL 1526, *Rh. stolonifer* SZMC 13609, *M. corticolus* SZMC 12031, valamint *Mo. echinosphaera* CBS 575.75 izolátumokból végeztük el. Mivel a búzakorpa szubsztrát lipázhozamra gyakorolt hatása ígéretesnek bizonyult, az enzimek tisztítását az izolátumok ezen szubsztrátokon történő tenyésztését követően végeztük. A magas kihozatal mellett nagy előnye, hogy olcsó malomipari termék, így hasznosításával az enzimek termeltetése gazdaságos folyamattá tehető. A szilárd fázisú fermentálás után az enzim extrakciója is viszonylag egyszerű (Koblitz és Pastore, 2006).

A *Rh. oryzae* és *R. miehei* törzseket búzakorpa alapú szilárd fázisú fermentációban tenyésztettük, így nagy mennyiségű, magas enzimaktivitású nyers kivonatot tudunk előállítani. Ezzel ellentétben *Rh. stolonifer*, *M. corticolus* és *Mo. echinosphaera* izolátumok esetében a búzakorpa alapú süllyesztett fermentációt választottuk az enzimek nagy mennyiségben történő termeltetéséhez. Ezen lipázok tisztítása esetében a szilárd fázisú fermentálást követő enzimmtisztítás kevésbé bizonyult hatékonynak (adatok nincsenek feltüntetve).

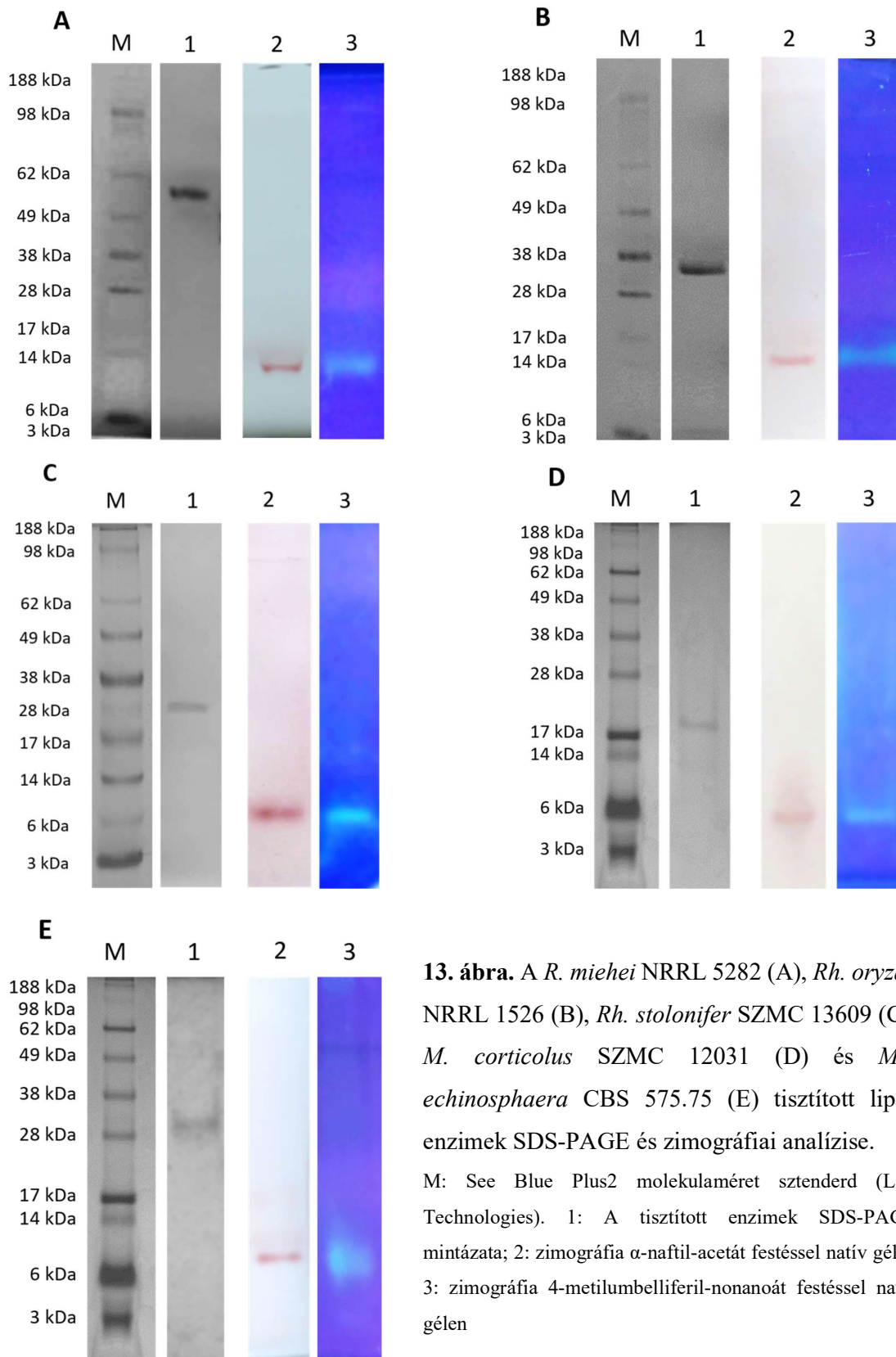
A nyers fermentlevek frakcionált kisózását követően a *Rh. oryzae* izolátumnál a 65%, a *R. miehei* törzsnél pedig a 85% telítettségű frakció csapadéka mutatta a legmagasabb *p*NFP hidrolízist, így ezekkel a koncentrált enzimm kivonatokkal dolgoztunk tovább. A többi izolátum esetében az 50 és 85% közötti frakciók hasonló aktivitást mutattak, így a frakciókat egyesítettük és az egyesített enzimm kivonatot tisztítottuk tovább. A tisztítás következő lépésében gélszűrést végeztünk Sephadex G-75 töltetű oszlopon. A *Rh. stolonifer* izolátum esetében a G-75 Sephadex szűrést követően nagyon alacsony enzimaktivitást sikerült csak detektálnunk, így ezen izolátum esetében a kisózást követő enzimm kivonatot Sephadex G-25 töltetű oszlopon sómentesítettük, és tisztítottuk tovább. Ezt követően anioncserélő kromatográfiás (*R. miehei*, *Rh. stolonifer*, *M. corticolus* és *Mo. echinosphaera*: Macro-Prep HQ; *Rh. oryzae*: Uno Q-1) elválasztással, majd *Rh. oryzae* kivételével ismételt méretkizárásos kromatográfiai lépéssel (Sephacryl S-200HR) tovább tisztítottuk az enzimeket. Az egyes tisztítási lépések után összefehérje koncentrációt, valamint a csapadékokban és felülúszókban lipáz aktivitást mértünk. Az enzimek tisztításának részletes adatait a **3. sz. mellékletben** tüntettem fel.

A *R. miehei* és *Rh. oryzae* lipázok 107,3 és 94,7-szeres tisztulását érték el, 2,3% és 0,7% visszanyerés mellett. Ezzel szemben a többi enzim tisztítását alacsonyabb kihozattal sikerült véghezvinni, *Rh. stolonifer* 5,7-szeres, *M. corticolus* 29,9-szeres, míg *Mo. echinosphaera* lipáz enzim esetében 19,5-szörös tisztulással sikerült az enzimek izolálása, sorrendben 0,13, 0,21 és 0,17% visszanyerési értékekkel. A viszonylag alacsony kihozatalhoz több tényező is hozzájárult. Egyrészt a frakcionált kisózás során az enzimek elveszítették aktivitásuk egy részét, másrészt az enzimek a tenyésztő közegben jelen lévő olívaolajjal aggregátumokat, oldhatatlan komplexeket képezhettek. A keletkező lipáz-lipid komplex negatívan befolyásolhatja a tisztítás folyamatát (Mateos Diaz és mtsi., 2006). Emellett a lipázok vizes közegben hajlamosak irreverzibilis módon kötődni hidrofób felülettel rendelkező mátrixokhoz. Jermsuntiea és munkatársai (2011) *Mo. alliacea* intracelluláris lipáz enzim tisztításánál szintén fokozott aggregátumképződést tapasztaltak ammónium-szulfát frakcionált kisózást követően, így alacsony enzimkihozatalra tudtak elérni.

Az általunk elért viszonylag alacsony kihozatok ellenére a tisztított enzimek viszonylag magas specifikus aktivitását (147,14 – 2392,6 U/mg) detektáltuk az utolsó tisztítási lépést követően, összehasonlítva néhány, a szakirodalomban korábban leírt járomspórás gomba lipáz tisztítás során meghatározott specifikus aktivitás értékekkel: *Rh. chinensis* lipáz 587,5, 305 és 48,8 U/mg (Sun és mtsi., 2009; Sun és Xu, 2009), *Rhizopus* sp. lipáz 1446 U/mg (Koblitz és Pastore, 2006), *M. hiemalis* f. *corticola* lipáz 22 U/mg (Ülker és Karaoğlu, 2012) és *Mo. alliacea* intracelluláris lipáz 179 U/mg (Jermsuntiea és mtsi., 2011).

A különböző kromatográfiás módszerek utáni, tisztított enzimek denaturáló gélelektroforézist (SDS-PAGE) követő mintázata, valamint a tisztított lipázok natív PAGE-zimográfiával mutatott aktivitása az **13. ábrán** látható. A tisztított enzimek molekulatömegei a következők voltak SDS denaturáló gélelektroforézis alapján: *R. miehei* 55 kDa (**13. A ábra**), *Rh. oryzae* 35 kDa (**13. B ábra**), *Rh. stolonifer* 28 kDa (**13. C ábra**), *M. corticolus* 20 kDa (**13. D ábra**) és *Mo. echinosphaera* 30 kDa (**13. E ábra**).

A fonalas gombák lipáz enzimeit általában 25 és 70 kDa közötti molekulamérettel rendelkeznek (Singh és Mukopadhyay, 2012). Fonalas gombák által termelt lipáz enzimeket elsősorban a tomlősgombák (Ascomycota) közé tartozó néhány izolátum esetében jellemezték részletesen. A szakirodalomban fellelhető, eddig izolált Mucoromycota extracelluláris lipázok legfontosabb biokémiai jellemzőit a **8. táblázatban** foglaltuk össze.



13. ábra. A *R. miehei* NRRL 5282 (A), *Rh. oryzae* NRRL 1526 (B), *Rh. stolonifer* SZMC 13609 (C), *M. corticolus* SZMC 12031 (D) és *Mo. echinosphaera* CBS 575.75 (E) tisztított lipáz enzimek SDS-PAGE és zimográfiai analízise.

M: See Blue Plus2 molekulaméret sztenderd (Life Technologies). 1: A tisztított enzimek SDS-PAGE mintázata; 2: zimográfia α -naftil-acetát festéssel natív gélen 3: zimográfia 4-metilumbelliferil-nonanoát festéssel natív gélen

8. táblázat. Az eddig izolált Mucoromycota extracelluláris lipázok és főbb jellemzőik.

Mikroorganizmus	Molekula tömeg (kDa)	Hőmérséklet optimum (°C)	pH optimum	Hivatkozás
<i>Mucor sp.</i>	42	35	7	Abbas és mtsi., 2002
<i>M. javanicus (circinelloides)</i>	21	40	7,5	Ishihara és mtsi., 1975
<i>M. hiemalis f. corticola</i>	46	40	7	Ülker és Karaoğlu, 2012
<i>M. hiemalis f. hiemalis</i>	49	40	7	Hiol és mtsi., 1999
<i>M. racemosus</i>	20	40	5	Mohamed és mtsi., 2011
<i>Rhizopus arrhizus</i>	80	35	7	
Lip I				
Lip II	39,7	35	9	Dobrev és mtsi., 2011
Lip III	6,9	35	8	
<i>Rh. arrhizus</i>	67	n.a.	n.a.	Chattopadhyay és mtsi., 1999
<i>Rh. chinensis</i>	28,4	37	5,5	Yasuda és mtsi., 1999
<i>Rh. chinensis</i>				
Lip 1	60	n.a.	n.a.	Sun és Xu, 2008
Lip 2	33	40	8,0-8,5	Sun és mtsi., 2009
<i>Rh. chinensis</i>				
SSF lipáz	62	40	8,0	Sun és Xu, 2009
SmF lipáz	40	40	8,0	
<i>Rh. delemar</i>	30,3	30	8,0-8,5	Haas és mtsi., 1992
<i>Rh. homothallicus</i>				
SmF lipase	29,5	30	7,5	Mateos Diaz és mtsi., 2006
SSF lipase	29,5	40	7,5	
<i>Rh. japonicus (NR 400)</i>	30	n.a.	5,0	Suzuki és mtsi., 1986
<i>Rhizopus japonicus</i>	42	35-40	7-8,5	Aisaka és Terada, 1981
<i>Rhizopus niveus</i>				
Lipase I	34	35	6,0-6,5	Kohno és mtsi., 1994
Lipase II	30	40	6,0	
<i>Rh. oryzae</i>	32	35	7,5	Hiol és mtsi., 2000
<i>Rh. oryzae</i>	17	40	7,0	Kantak és Prabhune, 2012
<i>Rh. oryzae</i> WPG	29	37	8,0	Ben Salah és mtsi., 2006
<i>Rh. oryzae</i>		45	6	Razak és mtsi., 1997
<i>Rh. rhizopodiformis</i>		45	6	
<i>Rh. sp.</i>	37,5	50	5,5 és 7,0	Koblitz és Pastore, 2006
<i>Rhizomucor endophyticus (Pichia pastorisban termelve)</i>	33	40	6	Yan és mtsi., 2016
<i>R. miehei</i>	31,6	37	8,0	Wu és mtsi., 1996
<i>R. miehei</i> (UzLT-3)				
Lipase A	43	55	8,7-8,8	Gulyamova és Davranov, 1995
Lipase B	40	45	8,2-8,3	
<i>R. miehei</i> NRRL 5282	55	40	6,8-7,4	jelen dolgozat
<i>Rh. oryzae</i> NRRL 1526	35	30	5,0-5,4	jelen dolgozat
<i>Rh. stolonifer</i> SZMC 131609	28	50	4,6-5,0	jelen dolgozat
<i>M. corticolus</i> SZMC 12031	20	30	7,0-7,4	jelen dolgozat
<i>Mortierella echinosphaera</i> CBS 575.75	30	20-30	6,6-7,0	jelen dolgozat

n. a.: nincs adat

Az enzimek átészterező aktivitását a tisztított mintákban is ellenőriztük. Az izolált lipázok mindegyike képes volt a *p*NFP és etanol közötti átészterezés katalizálására. A tisztított *R. miehei* 15,7 U/mg, a *Rh. oryzae* 20,9 U/mg, a *Rh. stolonifer* 8,15 U/mg, a *M. corticolus* 13,62 U/mg, a *Mo. echinospharea* pedig 18,67 U/mg átészterező aktivitást mutatott. Az aktivitás értékek megerősítik a nyers kivonatokkal végzett vizsgálataink eredményeit, mely során az izolátumok extracelluláris lipáz enzimeinek ígéretes szintetikus kapacitását feltételeztük. Azonban fontos megemlíteni, hogy a nyers kivonatokban más lipolitikus enzimek jelenléte is hozzájárulhatott a meghatározott átészterező aktivitásokhoz. A tisztított lipáz enzimek alkalmazhatók biokatalizátorként szintetikus folyamatok katalizálására.

5.8. A tisztított enzimek hidrolitikus aktivitásának biokémiai jellemzése

A biokémiai jellemzés a tisztított *R. miehei* NRRL 5282, *Rh. oryzae* NRRL 1526, *Rh. stolonifer* SZMC 13609, *M. corticolus* SZMC 12031 és *Mo. echinosphaera* CBS 575.75 extracelluláris lipázok hidrolitikus aktivitását befolyásoló tényezők meghatározására irányult. Az enzimek ezen jellemzői meghatározhatják azok aktivitását és stabilitását különféle reakciókörnyezetben, így az elvégzett vizsgálatokkal az ipari folyamatokban történő alkalmazhatóság szempontjából jelentős információkkal bővülnek ismereteink.

5.8.1. Az enzimaktivitás hőmérsékleti optimuma és stabilitása

Az enzimaktivitás hőmérsékleti optimumának és stabilitásának megállapítását 5 és 80 °C közötti hőmérsékleti tartományban végeztük. Az eredményeket relatív aktivitásban határoztuk meg, ahol 100%-nak a 30 perc inkubációt követő legmagasabb aktivitás értéket tekintettük (**14. ábra**).

A *R. miehei* törzsből izolált lipáz enzim hőmérsékleti optimuma a 40 °C körüli tartományban található (**14. A ábra**); ezen hőmérsékletig folyamatosan nő az enzimaktivitás, azonban 50 °C-on már jelentős csökkenést tapasztaltunk. Az enzim 50 °C-ig őrizte meg stabilitását a 4 órás inkubáció alatt. Szintén magas hőmérsékleti optimummal rendelkezik a *Rh. stolonifer* izolátum lipáz enzime (**14. C ábra**), mely 50 °C-on inkubálva mutatta a legmagasabb enzimaktivitást. Hasonlóan magas optimummal rendelkező lipázt korábban szintén egy *Rhizopus* izolátumból tisztítottak (Koblitz és Pastore, 2006) (**8. táblázat**). A *Rh. stolonifer* enzim alacsony hőmérsékleten is hatékony volt: 5 °C-on inkubálva aktivitásának 52,55%-át

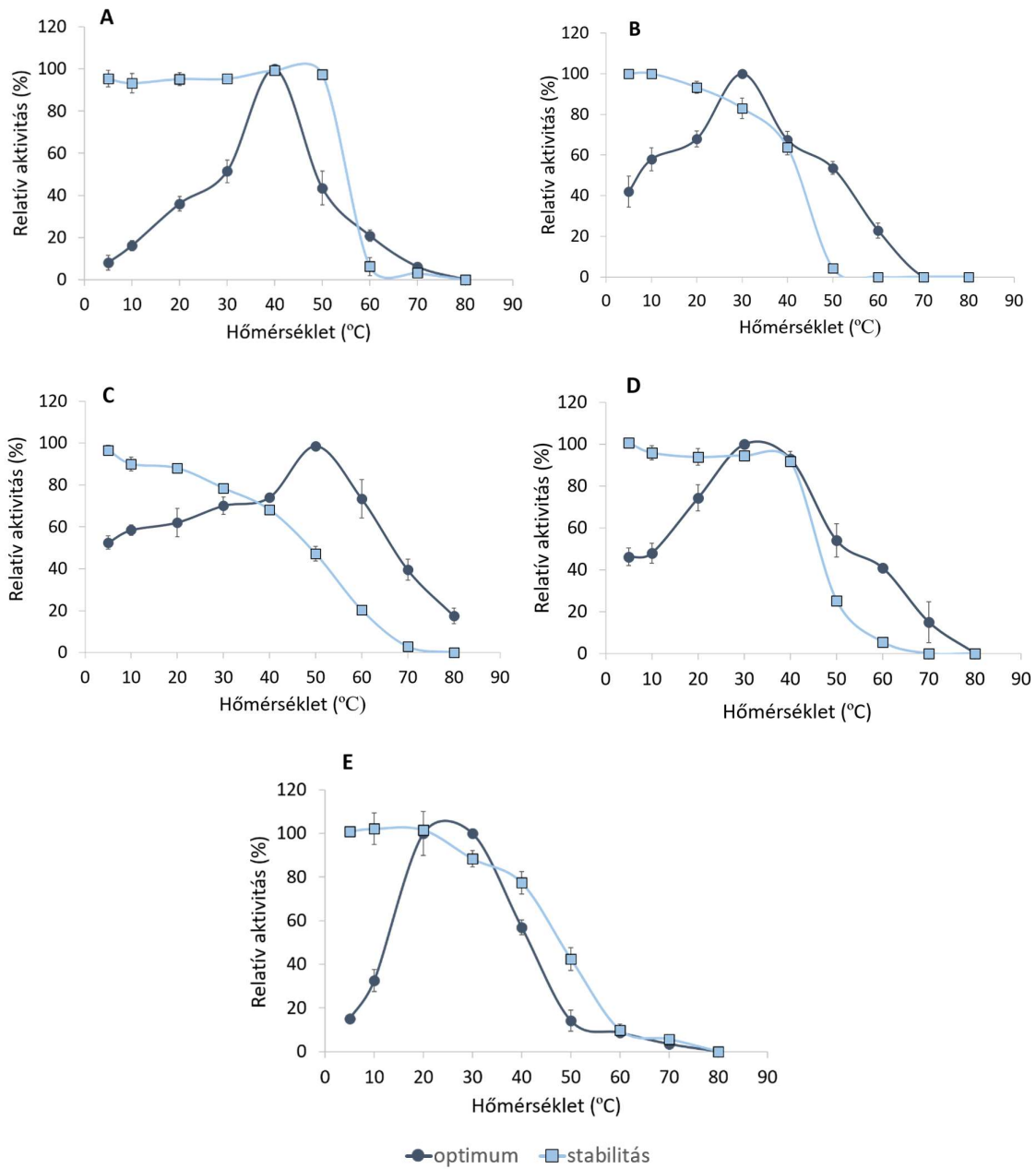
mutatta. Aktivitásának több mint a felét 50 °C-ig, 20%-át 60 °C-ig megőrizte a 4 órás inkubációt követően.

A *Rh. oryzae* izolátum által termelt enzim aktivitásának hőmérséklet optimumát 30 °C-on állapítottuk meg (**14. B ábra**), a *R. miehei* lipázzal összehasonlítva lényegesen alacsonyabb hőmérsékleti stabilitást tapasztaltunk; 30 °C-on 4 órán át történő inkubálás hatására az enzim 17%-ot veszített aktivitásából, 40 °C felett pedig már nem mutatott értékelhető aktivitást.

A *M. corticolus* lipáz aktivitásának hőmérsékleti optimuma szintén 30 °C körülinek bizonyult (**14. D ábra**). Korábbi tanulmányokban a *Mucor* nemzetségből azonosított lipázok többségénél 40 °C körüli aktivitás optimumot állapítottak meg (**8. táblázat**), esetünkben e hőmérsékleten 93,01% relatív aktivitást mértünk. Érdeemes megemlíteni, hogy az optimális tartományban mért aktivitás körülbelül 45%-át mutatta 5, illetve 10 °C-on történő inkubációt követően is. 5 – 40 °C közötti hőmérsékleti tartományban az enzim stabilnak bizonyult, 40 °C felett azonban már jelentős enzimaktivitás csökkenést tapasztaltunk. A korábbi tanulmányokban leírt *M. javanicus* lipáz enzim mindössze 30 °C-ig őrizte meg stabilitását (Ishihara és mtsi., 1975), míg a *M. hiemalis* f. *corticola* lipáza 1,5 órán át 40 °C-on történő inkubálást követően 50% relatív aktivitást mutatott (Ülker és Karaoglu, 2012).

A *Mo. echinosphaera* enzim aktivitásának hőmérsékleti optimumát 20 és 30 °C közötti értéken állapítottuk meg (**14. E ábra**). Az enzim 40 °C-ig stabilnak bizonyult, azonban 60 °C-on már elveszítette aktivitását. Az enzim aktivitásának körülbelül 32,5%-át megőrizte 10 °C hőmérsékleten.

A gomba lipázok aktivitásának optimuma általában a 25 – 30 °C közötti hőmérsékleti tartományban található (Sharma és mtsi., 2011). Az enzimek magas hőmérsékleten bekövetkező jelentős aktivitás csökkenése azok denaturálódásával, valamint fokozott aggregátum-képzésével magyarázható (Noel és Combes, 2003). Az enzimek hőstabilitása hordozókhöz történő kötéssel, vagy mátrixba zárással (immobilizálás, pl. alginát gyöngyökbe) tovább fokozható vizes és szerves közegben egyaránt (Tan és mtsi., 2010).



14. ábra. A *R. miehei* NRRL 5282 (A), *Rh. oryzae* NRRL 1526 (B), *Rh. stolonifer* SZMC 13609 (C), *M. corticolus* 12031 (D) és *Mo. echinosphaera* CBS 575.75 (E) extracelluláris lipáz enzimek hidrolitikus aktivitásának hőmérséklet optimuma és stabilitása.

A feltüntetett relatív aktivitások az optimális hőmérsékleten 30 perc inkubációt követően detektált aktivitáshoz (100%) viszonyított értékek.

Hőstabil biokatalizátorokkal egyes reakciók magasabb hőmérsékleten mehetnek végbe, mely számos előnnyel rendelkezik: a nagyobb reakciós ráta, alacsonyabb viszkozitás és fokozott diffúzió miatt fokozott termékképződés érhető el (Hasan és mtsi., 2006; Ebrahimpour

és mtsi., 2011). Ezt a jelenséget a nyers enzimmennyiség átészterező aktivitásának tesztelésénél is tapasztaltuk (5.5.2. fejezet), ahol a kezdeti reakciós ráta fokozódott a hőmérséklet emelésekor. A *R. miehei* és *Rh. stolonifer* enzimek a 40 °C-on, 6 órás inkubáció során a leghatékonyabb konverziókat eredményezték, mely feltételezhetően a hidrolitikus aktivitásnál is tapasztalt magas hőmérsékleti optimaiknak és hőstabilitásuknak is köszönhető. Hőstabil lipáz enzimeket elsősorban a mosószer ipar (Jaeger és Reetz, 1998) és a szerves szintézisek, így a lipáz-katalizált észterifikációk (pl. biodízel előállítás) igényelnek.

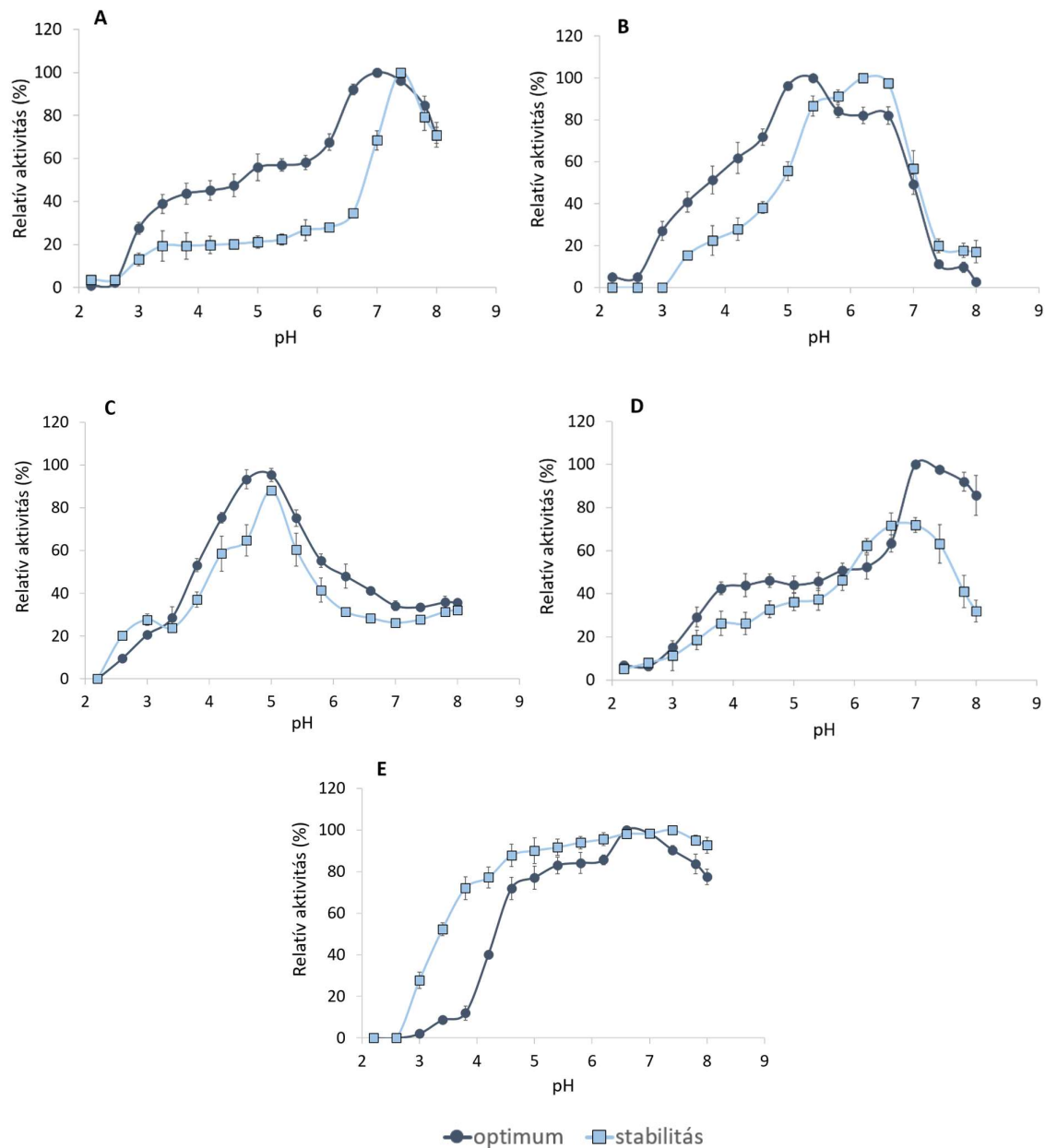
Ezzel szemben a *Rh. oryzae*, *M. corticolus* és *Mo. echinosphaera* enzimek aktivitása alacsonyabb hőmérsékleti optimummal rendelkezik. Ígéretes a *Mo. echinosphaera* lipáz 20 °C-on megfigyelt katalitikus aktivitása, valamint a *Rh. oryzae*, *Rh. stolonifer*, és *M. corticolus* 5 °C-on mutatott maradék aktivitása is. Alacsony hőmérsékleten az enzimek polipeptid láncának megnövekedett flexibilitással kell rendelkeznie, mely elősegíti a szubsztrát kötődését. Alacsony hőmérsékleten is aktív lipázok nagy jelentőségűek a mosószer-, gyógyszer- és az élelmiszeriparban (Joseph és mtsi., 2007).

5.8.2. Az enzimaktivitás pH optimumának és stabilitásának vizsgálata

Az enzimaktivitás pH optimumát és stabilitását a pH 2,2 és pH 8,0 közötti tartományban vizsgáltuk, ahol az egyes tisztított extracelluláris lipázok esetében jelentős különbségeket találtunk (**15. ábra**).

A *R. miehei* lipáz aktivitásának pH optimuma pH 6,8 – 7,4 közötti tartományra tehető (**15. A**). Az enzim pH optimuma a magasabb tartományra korlátozódik, azonban alacsony pH értéken (pH 3,0) is megőrizte aktivitásának 27,5%-át. Az enzim meglehetősen szűk tartományon belül, pH 7,0 – 8,0 között bizonyult stabilnak. A pH 8,0 értéken még aktivitásának 70,7%-át mutatta a 24 órás inkubációt követően, ami az enyhén alkalikus pH-val szembeni toleranciát feltételez. Wu és munkatársai (1996) a kereskedelmi forgalomban kapható *R. miehei* lipáz esetében hasonló pH stabilitási profilt állapítottak meg.

A *Rh. oryzae* lipáznál a pH 5,0 – 5,4 közötti tartományra tehetjük az enzim aktivitásának optimumát (**15. B ábra**). Az enzim széles tartományban, pH 4,6-tól 6,6-ig, 70% feletti relatív aktivitással rendelkezik. A stabilitása pH 5,4 és 6,8 között a legnagyobb; a *Rhizomucor* lipázzal ellentétben pH 7,0 felett már csak a maximális aktivitás 20%-át őrizte meg. Egy pálma termésből izolált *Rh. oryzae* lipáz enzim szintén alacsony stabilitását figyelték meg alkalikus pH-n, annak ellenére, hogy az általunk izolált enzimhez képest optimuma jóval magasabbnak, pH 7,5-nek bizonyult (Hiol és mtsi., 2000).



15. ábra. A *R. miehei* NRRL 5282 (A), *Rh. oryzae* NRRL 1526 (B), *Rh. stolonifer* SZMC 13609 (C), *M. corticolus* SZMC 12031 (D) és *Mo. echinosphaera* CBS 575.75 (E) extracelluláris lipáz enzimek hidrolitikus aktivitásának pH optimuma és stabilitása.

A feltüntetett relatív aktivitások az optimális hőmérsékleten és pH mellett 30 perc inkubációt követően detektált aktivitáshoz (100%) viszonyított értékek.

A *Rh. stolonifer* lipáz aktivitásának pH optimumát a 4,6 – 5,0 közötti tartományban azonosítottuk (**15. C ábra**). Az aktivitás ezen enzim esetében az erősen savas pH értékektől pH 5,0-ig fokozatosan növekedett, e felett azonban egyenletes csökkenést tapasztaltunk,

aktivitásának felét pH 6,0 felett veszítette el. Gomba lipázok közül egyes *Aspergillus*, *Penicillium* és *Rhizopus* izolátumoknál írtak le pH 5,0 körüli optimummal rendelkező enzimeket (Namboodiri és Chattopadhyaya, 2000; Sztajer és mtsi., 1992; **8. táblázat**). A *Rh. stolonifer* lipáz szűk tartományban, pH 4,2 és 5,4 között őrizte meg stabilitását.

A *M. corticolus* tisztított lipáz pH optimumát pH 7,0 – 7,4 között állapítottuk meg (**15. D ábra**). Az enzim viszonylag szűk tartományon belül bizonyult aktívnek. A pH 6,6 érték alatt aktivitásának kevesebb mint 50%-át mutatta, azonban az enyhén lúgos pH 8,0-as pufferben 85,6% relatív aktivitást detektáltunk. Aktivitásának több mint 50%-át pH 6,2 – 7,4 tartományban megőrizte. A korábban, szintén *Mucor* fajokból azonosított lipázok is pH 7,0 körüli optimumokkal rendelkeztek, kivéve *M. racemosus*, mely pH 5,0 értékkel (**8. táblázat**).

A *Mo. echinosphaera* lipáz pH optimuma 6,6 – 7,0 közöttinek bizonyult (**15. E ábra**). Az enzim rendkívül széles pH tartományban volt aktív, pH 4,6 – 8,0 között 50% feletti relatív aktivitást mutatott. Emellett stabilnak bizonyult pH 3,4 és 8,0 között, mely a tesztelt enzimek között a legszélesebb pH toleranciát eredményezte. Korábbi tanulmányban szintén nagymértékű pH toleranciát figyeltek meg a *Mo. alliacea* intracelluláris lipáz enzim tanulmányozásakor (Jermuntica és mtsi., 2011).

Az általunk vizsgált enzimek pH optimumai megegyeznek a legtöbb gomba lipáz enzimmél megfigyelt értékekkel, mely általában pH 4,0 és 8,0 között állapítható meg, ellentétben a bakteriális enzimekkel, melyek főleg a neutrális vagy lúgos pH-jú közegben mutatják a legnagyobb aktivitást (Sharma és mtsi., 2011). A *R. miehei*, *M. corticolus* lipázok a magasabb, kissé alkalikus pH tartományban, míg a két *Rhizopus* enzim az enyhén savas pH tartományban bizonyult ígéretes biokatalizátornak. Ezzel ellentétben az eddig azonosított *Rhizopus* lipázok többsége pH 6,0 – 8,5 közötti optimummal rendelkezik (Yu és mtsi., 2016). Aktivitásának jelentős részét alkalikus környezetben is megtartó, valamint termoalkalofil lipáz enzimeket elsősorban a mosószer- és a bőripar igényel (Jaeger és Reetz, 1998; Sanchez és Demain, 2017), míg savas tartományban is aktív enzimeket elsősorban az élelmiszeripari folyamatokban hasznosítanak (Pandey és mtsi., 1999). A *Mo. echinosphaera* lipázt széles pH stabilitása ígéretes biokatalizátorrá teszi, e tulajdonság számos ipari folyamatban kihasználható.

5.8.3. A szubsztrátspecifitás meghatározása

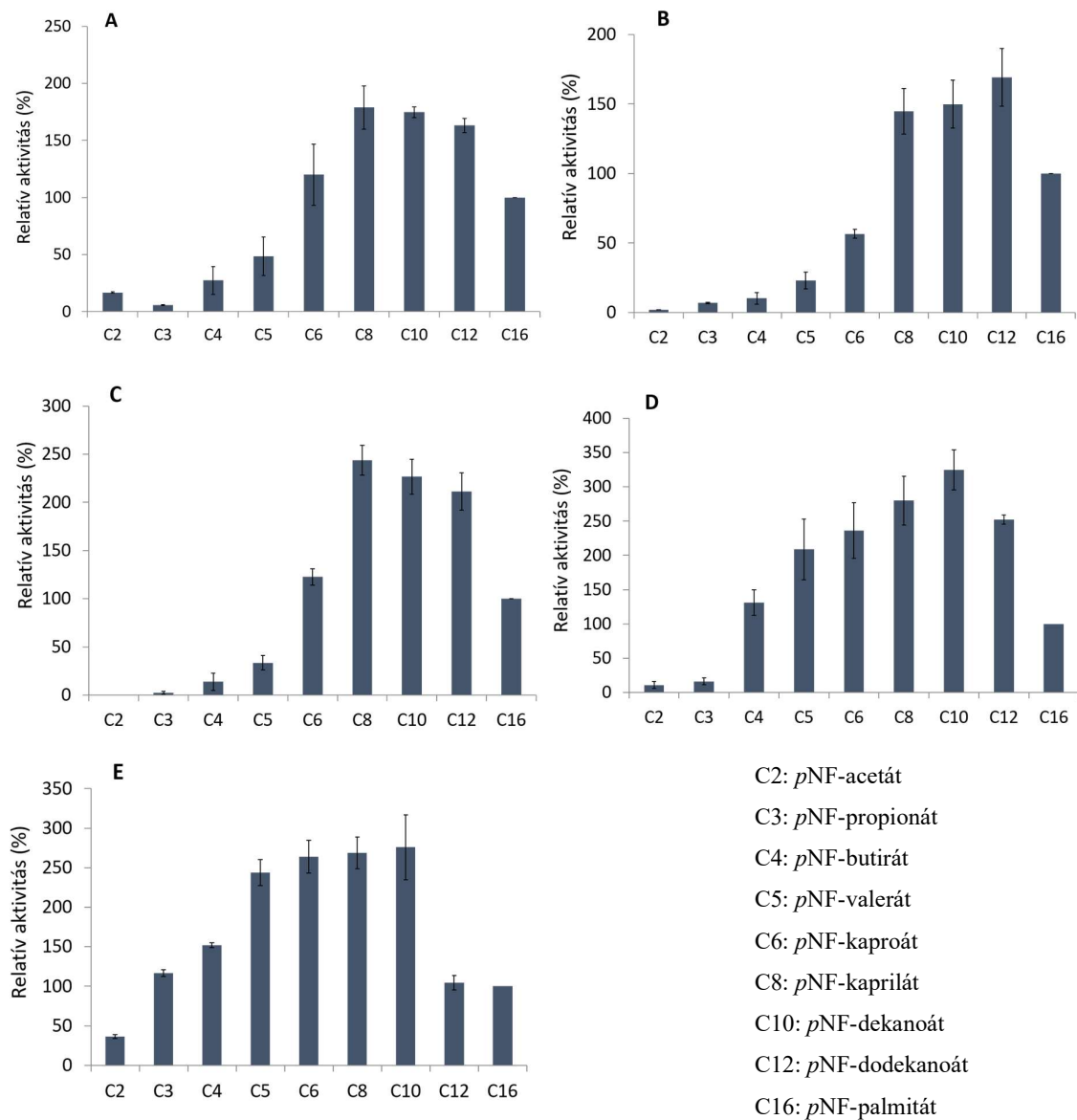
A nyers lipáz kivonatok szintetikus aktivitásának jellemzése során bizonyos szénlánc-hosszúságú zsírsavak iránti jelentős preferenciát figyelhettünk meg (5.5.2. fejezet). Ennek tanulmányozását a hidrolitikus reakciókban is elvégeztük. Az enzimek

szubsztrátspecificitásának tesztelésére eltérő hosszúságú zsírsavlánccal rendelkező *p*NF-észter hidrolízisét vizsgáltuk. A különböző kromogén szubsztrátokat 0,75 mM koncentrációban alkalmaztuk az adott reakcióelegyekben. Kontrollként a *p*NFP hidrolízisének tapasztalt optikai denzitás értékét vettük alapul (100%).

A *p*NF-palmitát (C16) szubsztrátnál megfigyelt eredményekkel összehasonlítva 1,2 – 1,8-szor magasabb enzimaktivitás értékeket mértünk *R. miehei* enzimnél *p*NF-kaproát (C6), *p*NF-kaprilát (C8), *p*NF-dekanoát (C10), valamint *p*NF-dodekanoát (C12) szubsztrátok jelenlétében (**16. A ábra**). A leghatékonyabbnak ezen enzim esetében a C6 – C12 szénlánc-hosszúságú zsírsavak hidrolízise bizonyult. Alacsony aktivitást tapasztaltunk a rövid (C2 – C3) zsírsavakat tartalmazó észtereknél, és mérsékelt aktivitást a *p*NF-butirát (C4) és *p*NF-valerát (C5) szubsztrátokkal szemben. Szűkebb szubsztrátspecificitást tapasztaltunk a két *Rhizopus* lipáz esetében (**16. B és C ábra**). Mindkét enzim a C8 – C12 szubsztrátokra mutatott preferenciát, azonban a *Rh. oryzae* főleg a *p*NF-dodekanoát (C12), míg a *Rh. stolonifer* lipáz a kissé rövidebb *p*NF-kaprilát (C8) szubsztrát hidrolízisét katalizálta a leghatékonyabban. Utóbbi esetében mintegy 2,5-szer magasabb aktivitást detektálhattunk a sztenderdként használt *p*NF-palmitáthoz viszonyítva. A rövid szénláncú szubsztrátokat (C2 – C4) csak kis mértékben, vagy egyáltalán nem hidrolizálták (0 – 10%). A *Rhizopus* fajok lipáz enzimeinek többségére a C8 – C10, közepes szénlánc-hosszúságú zsírsavak hasításának preferenciája jellemző (Dobrev és mtsi., 2011). A *Rh. stolonifer* lipázhoz hasonlóan két tisztított *Rh. homothallicus* lipáz izoenzim is a C8-as *p*NF-kaprilát szubsztrátot hasította leghatékonyabban (Mateos Diaz és mtsi., 2006). Ezzel ellentétben a *Rh. chinensis* extracelluláris lipáz az általunk izolált *Rh. oryzae* lipáz enzimhez hasonlóan a C12-es *p*NF-dodekanoát hidrolízisét katalizálta leginkább (Sun és mtsi., 2009; Sun és Xu, 2009).

A *Mo. echinosphaera* és *M. corticolus* izolátumok lipáz enzimeik széles szubsztrátpreferenciát mutattak (**16. D és E ábra**). A *M. corticolus* lipáz a C4 – C12, míg a *Mo. echinosphaera* lipáz a C3 – C10 közötti szénlánc-hosszúságú zsírsavakat tartalmazó aril-észtereket hidrolizálta hatékonyan. A *Mo. echinosphaera* enzim a rövid szénláncú *p*NF-acetát (C2), és -propionát (C3) szubsztrátokat is hasította, 36,3 és 116,8% relatív aktivitást mutatva a kontroll palmitáthoz viszonyítva.

A legtöbb gomba lipáz a közepes és hosszú (C8 – C18) szénatomszámú trigliceridekre mutat szelektivitást (Mateos Diaz és mtsi., 2006; Saxena és mtsi., 2005), azonban néhány *Geotrichum*, *Aspergillus* és *Penicillium* nemzetségbe tartozó gombafajból izolált lipáz a C4 – C8 hosszúságú zsírsavlánccal részesíti előnyben (Jermuntiea és mtsi., 2011).



16. ábra. Különböző aril-észterek hidrolízise a *R. miehei* NRRL 5282 (A), *Rh. oryzae* NRRL 1526 (B), *Rh. stolonifer* SZMC 13609 (C), *M. corticolus* SZMC 12031 (D) és *Mo. echinosphaera* CBS 575.75 (E) extracelluláris lipáz enzimekkel.

A feltüntetett relatív aktivitások 30 perc inkubációt követően pNF-palmitát szubsztráttal detektált optikai denzitáshoz (100%) viszonyított értékek.

Az eddig tisztított járomspórás gomba lipáz enzimek elsősorban a közepes lánc hosszúságú zsírsavakat preferálják, néhány enzim azonban a rövidebb, C2 – C6 zsírsavakat is képes hatékonyan hidrolizálni (Hiol és mtsi., 1999; Yu és mtsi., 2009). A szubsztrátspecifitása vizsgálat során nyert eredményeink a szakirodalmi adatokkal

megegyezőek, vagyis az általunk vizsgált tisztított lipázok szintén, elsősorban a közepes és hosszú zsírsavak hidrolízisét katalizálták (C6 – C16), valamint néhány esetben a rövidebb aril-észtereket is. Az enzimek szubsztrátspecificitását számos tényező befolyásolhatja, így például egyes fémionok jelenléte. Abbas és munkatársai (2002) megfigyelték, hogy 5 mM CaCl₂ hozzáadása a reakcióelegyhez mintegy 3,5-szeresére növelte a hosszú szénláncú zsírsavakat tartalmazó trigliceridek hidrolízisét, azonban a koncentráció növelésével a további aktivitás emelkedés már nem volt számottevő.

Az enzimek szintetikus aktivitásánál tapasztalt szubsztrátspecificitásokkal (5.5.2. és 5.6.2 fejezet) összehasonlítva megállapítottuk, hogy különbség figyelhető meg a szintetikus és hidrolitikus aktivitásoknál mutatott preferenciákban. A *R. miehei* és *Rh. stolonifer* enzimek szintetikus reakciókban főleg a 12 – 18 szénatomszámú zsírsavak áthelyezését/észterezését részesítik előnyben, míg hidrolitikus reakciókban a rövidebb, 8 szénatomszámú kaprilsavat szabadítják fel legnagyobb mértékben. A *Mo. echinosphaera* enzim az átészterezés során a C8, észterező reakcióban a C16 – C18, míg hidrolitikus reakcióban a C6 – C10 zsírsavakra mutatott szelektivitást. A *Rh. oryzae* és *M. corticolus* lipázok hidrolitikus és átészterező aktivitásaikban hasonló szubsztrátspecificitást eredményeztek, elsősorban a 8 – 12 szénlánc-hosszúságú zsírsavat tartalmazó aril-észtereket preferálták. Észterező reakcióban azonban már a hosszú, C16 – C18 zsírsavakat részesítették előnyben. A metil-észterek szintézisének tanulmányozásakor *M. corticolus* és *Mo. echinosphaera* enzimek széles szubsztrátspecificitást mutattak, amit a hidrolitikus reakciók során is tapasztaltunk.

5.8.4. Az enzimek jellemző kinetikai paraméterei

A tisztított extracelluláris lipáz enzimek kinetikai paramétereinek megállapítását *p*NF-palmitát szubsztrát különböző koncentrációban történő alkalmazásával, a Lineweaver-Burk-féle kettős reciprok ábrázolással végeztük (Lineweaver és Burk, 1934). A vizsgálat során megállapítottuk az enzimek Michaelis-Menten állandóját (K_m), amely az enzim-szubsztrát komplex bomlási sebességi állandója, valamint a maximális reakciósebességet is (V_{max}). A tisztított enzimek a Michaelis-Menten kinetikának megfelelő telítési görbét mutattak a tesztelt *p*NFP szubsztrátra, a paraméterekben azonban jelentős eltéréseket találtunk az egyes lipázok között. A számított K_m és V_{max} értékeket a **9. táblázat** tartalmazza.

A legmagasabb K_m értékeket *R. miehei* NRRL 5282 (1,13 mM) és *Rh. oryzae* tisztított lipáz (1,08 mM) esetében határoztuk meg, mely a többi vizsgált enzimhez képest alacsony szubsztráthoz való affinitást feltételez. Ennél alacsonyabbnak találtuk a többi vizsgált lipáz

enzim K_m és V_{max} értékeit (K_m : 0,26 – 0,34 mM és V_{max} : 29,67 – 33,44 $\mu\text{M}/\text{perc}$). Az alacsony Michaelis-Menten állandó (K_m) azt feltételezi, hogy az enzim-szubsztrát komplex stabilan megmarad, így ezen enzimek $p\text{NFP}$ szubsztráthoz való affinitása nagyobb. Emellett az alacsony V_{max} értékeknek köszönhetően a szubsztrát hidrolízise lassabb, mint *R. miehei* és *Rh. oryzae* enzimek esetében.

9. táblázat. A tisztított lipázok $p\text{NFP}$ szubsztrátra vonatkozó kinetikai paramétereit.

A tisztított enzim forrása	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{M}/\text{perc}$)
<i>R. miehei</i> NRRL 5282	1,13	86,2
<i>Rh. oryzae</i> NRRL 1526	1,08	98,1
<i>Rh. stolonifer</i> SZMC 13609	0,26	29,67
<i>M. corticolus</i> SZMC 12034	0,28	33,44
<i>Mo. echinosphaera</i> CBS 575.75	0,34	30,47

Korábbi tanulmányokban szintén $p\text{NFP}$ szubsztrátra határozták meg a *Mucor hiemalis* f. *corticola* lipáz kinetikai paramétereit, melyeket 1,327 mM és 91,11 $\mu\text{M}/\text{perc}$ értékeknek állapították meg (Ülker és Karaoğlu, 2012). Az általuk meghatározott V_{max} érték a mi vizsgálatunkban *R. miehei* és *Rh. oryzae* lipáz enzimeknél megállapított V_{max} értékekhez hasonló. Yu és mtsi. (2009) 0,304 mM K_m és 30,76 $\mu\text{M}/\text{perc}$ V_{max} értékeket írtak le a rekombináns *Rhizopus chinensis* (r27RCL) lipáz $p\text{NFP}$ szubsztrát hidrolízisének tanulmányozásakor. Ezen alacsony K_m érték alacsony szubsztráthoz való affinitást mutat, hasonlóan mint a mi esetünkben *Rh. stolonifer*, *M. corticolus*, *Mo. echinosphaera* lipázoknál. Koblitz és Pastore (2006) *Rhizopus* nemzetségbe tartozó törzsből tisztított extracelluláris lipáz enzim kinetikai paramétereinek meghatározását $p\text{NF}$ -laurát (dodekanoát) szubsztráttal végezték; a K_m értéket 2,4 mM-nak, míg a V_{max} értéket 277,8 U-nak találták, mely jóval magasabbak, mint a mi enzimeink esetében $p\text{NF}$ -palmitát szubsztráttal meghatározott értékek.

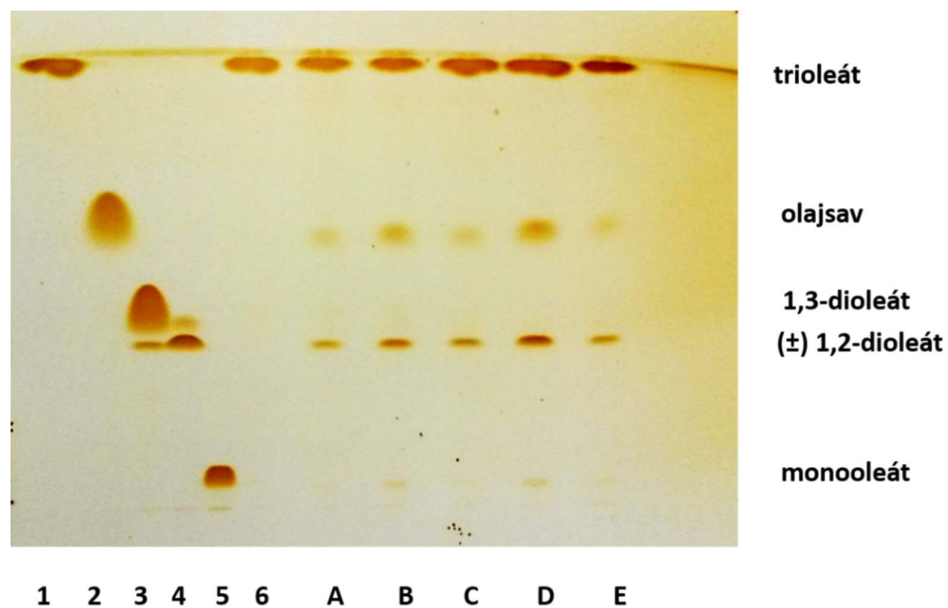
5.8.5. Az enzimek regioszelektivitásának meghatározása

A lipáz enzimek fontos tulajdonsága a triglicerid molekulák hidrolízise során mutatott helyzeti specificitás, mely meghatározza a reakció során felszabaduló di-, és mongliceridek jellegét. Emellett az enzimek felhasználhatósága szempontjából is fontos karakter. Az általunk izolált extracelluláris lipáz enzimek regioszelektivitásának

meghatározását a trioleát szubsztrát hidrolízise során keletkező termékek vékonyréteg kromatográfiás eljárással történő vizsgálatával végeztük.

A vékonyréteg kromatográfia eredménye az **17. ábrán** látható. A 2 órás inkubációt követően a vizsgált enzimek az 1-es és 3-as pozícióban lévő észter kötéseket hidrolizálták, mivel csak olajsav, (\pm) 1,2-dioleát és monooleát termékeket detektáltunk (**17. ábra A – E**). Az 1,3-dioleát hiánya mutatja, hogy az enzimek a triglicerid 2-es pozíciójában nem, vagy csak kis mértékben képesek az észter kötések bontására.

Az 1,3-as regioszelektivitás a legtöbb gomba lipázra, így például *Rhizopus oryzae* ATCC 96382, valamint *Rh. rhizopodiformis* (Razak és mtsi., 1997), *Rhizomucor endophyticus* (Yan és mtsi., 2016), *Aspergillus oryzae* és *A. niger* NCIM 1207 (Mhetras és mtsi., 2009; Toida és mtsi., 1998), ezen kívül néhány bakteriális enzimre (Bakir és Metin, 2016; Ebrahimpour és mtsi., 2011) jellemző. Az 1,3 regioszelektivitással rendelkező lipázok számos folyamatban hasznosíthatók, úgymint változatos átészterezési reakciók katalizálása, valamint strukturált lipidek előállítása (Alnoch és mtsi., 2015; Yücel és mtsi., 2012; Palla és mtsi., 2012).



17. ábra. A *R. miehei* NRRL 5282 (A), *Rh. oryzae* NRRL 1526 (B), *Rh. stolonifer* NRRL 13609 (C), *M. corticolus* SZMC 12031 (D) és *Mo. echinosphaera* CBS 575.75 (E) extracelluláris lipáz enzimek trioleát hidrolízisének termékei.

1 – 5: sztenderdek: trioleát (1), olajsav (2), 1,3 dioleát (3), (\pm) 1,2-dioleát (4), monooleát (5).

6: enzim nélküli kontroll

5.8.6. Fém ionok és reagensek enzimaktivitásra gyakorolt hatása

Különböző fém sók (HgCl_2 , CuSO_4 , ZnCl_2 , MnCl_2 , CaCl_2 , MgSO_4 , NaCl , KCl , CoCl_2), valamint N-brómszukcinimid (NBS), etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA) és Na-lauril-szulfát (SDS) reagensek enzimaktivitásra gyakorolt hatását is megvizsgáltuk (**10. táblázat**). A kationokat 5 mM, a reagenseket 10 mM koncentrációban alkalmaztuk az egyes reakcióelegyekben. A különböző fémionok eltérő szerepet játszanak az enzimek szerkezetének és funkciójának meghatározásában. Számos aminosav oldallánchoz képesek kapcsolódni a fehérjén, stabilizálhatják vagy destabilizálhatják az enzim szerkezetét, illetve az aktív centrum denaturálódását, vagy aktivitásának megváltozását is okozhatják (Li és mtsi., 2011; Çolak és mtsi., 2005). Emellett képesek lehetnek a zsírsavakkal komplexek képzésére, így megváltoztatva azok oldékonyságát és viselkedését a határfelületen, ahol az enzimreakció zajlik. A zsírsavak felszabadulása a reakcióközegben komoly hatással van a reakció rátájára (Ülker és Karaoğlu, 2012). Számos enzim esetében megállapították, hogy bizonyos fémionok jelenléte szükséges az aktivitás és stabilitás megőrzése, illetve fokozása érdekében (Salameh és Wiegel, 2007). Ilyenek a fém-aktivált enzimek, melyek a fémionokat lazán kötik meg, ellentétben a fémiont kofaktorként szorosan megkötő metalloenzimokkal. Előbbiket leggyakrabban az alkálifémek, és alkáliföldfémek kationjai aktiválják és stabilizálják (Rahman és mtsi., 2005).

A Hg^{2+} , az NBS és az SDS jelentősen gátolta a vizsgált enzimek aktivitását (**10. táblázat**). Mindössze a *Rh. stolonifer* lipáza bizonyult stabilnak NBS jelenlétében. A Hg^{2+} feltételezhetően a fehérje konformációjának megváltoztatásával fejti ki gátló hatását (Sharon és mtsi., 1998), emellett utalhat arra, hogy az enzim megfelelő működéséhez tiol csoport jelenléte szükséges. Az NBS általi gátlás triptofán, hisztidin, vagy tirozin aminosavak jelenlétére utal az aktív centrumban (Koblitz és Pastore, 2006). Az SDS erős detergens, mely a natív fehérjék denaturálódását, így aktivitásuk elvesztését eredményezi. Egy *Mucor* faj esetében az SDS és a Hg^{2+} szintén erős gátlást fejtett ki az izolált lipáz enzim aktivitására (Abbas és mtsi., 2002). A Dobrev és munkatársai (2011) által vizsgált *Rh. arrhizus* lipáz esetében a nem poláros vegyületek, mint a Triton X-100 nem inaktíválták az enzimet, míg a negatívan töltöttek, mint az SDS az enzim stabilitásának csökkenését okozták.

A Mg^{2+} a *R. miehei* és *Rh. oryzae* enzimeket kismértékben, *Mo. echinosphaera* lipázát jelentősen, 75%-kal fokozta. Utóbbi enzim aktivitását a Ca^{2+} is fokozta, 24%-os növekedést eredményezve. A *Mo. alliacea* intracelluláris lipáz aktivitását a CaCl_2 1 mM koncentrációban alkalmazva hasonló mértékben, 29%-kal fokozta (Jermsuntiea és mtsi., 2011). A Ca^{2+} és Mg^{2+}

jelentős enzimaktivitás-fokozó hatását írták le *Mo. vinacea* extracelluláris lipáz enzimnél is, ahol ezen fémek igen kis koncentrációban (0,2 mM) történő alkalmazása is számottevő aktivitás-növekedést eredményezett (Gaspar és mtsi., 1999). A Ca²⁺ enzimaktivitás fokozó hatását találták továbbá *Rh. delemar* (Haas és mtsi., 1992), *Mucor hiemalis* f. *hiemalis* (Hiol és mtsi., 1999) és egy pálmatermésről izolált *Mucor* törzsből származó extracelluláris lipáz (Abbas és mtsi., 2002) tanulmányozása során is.

10. táblázat. Fémek és reagensek hatása a tisztított lipáz enzimek hidrolitikus aktivitására.

Fém vagy reagens	Relatív aktivitás (%)*				
	<i>R. miehei</i> NRRL 5282	<i>Rh. oryzae</i> NRRL 1526	<i>Rh. stolonifer</i> SZMC 13609	<i>M. corticolus</i> SZMC 12031	<i>Mo. echinosphaera</i> CBS 575.75
Kontroll	100	100	100	100	100
HgCl₂	10,2 ± 0,7	12,8 ± 1,6	33,4 ± 4,9	23,7 ± 3,8	42,3 ± 4,5
CuSO₄	77 ± 6,3	91,6 ± 5,8	94,7 ± 6	48,7 ± 1,1	104,2 ± 7,4
ZnSO₄	76,6 ± 2	44 ± 4,2	110,6 ± 0,1	48,7 ± 5,9	67 ± 4
MnCl₂	60,1 ± 4,8	63,6 ± 3	87,3 ± 10,9	56,3 ± 4,7	74 ± 10,5
CoCl₂	79 ± 3,2	80 ± 5,2	114,6 ± 9,2	62 ± 0,1	81,4 ± 1
CaCl₂	84 ± 2,5	38 ± 0,7	83,2 ± 8	55,8 ± 1,5	123,6 ± 5,7
MgSO₄	110 ± 6,1	107,5 ± 7,2	90,8 ± 10,5	98 ± 5,3	175,1 ± 8,2
NaCl	137,2 ± 8,9	76 ± 4,8	113,3 ± 9,5	108,7 ± 2,4	137 ± 13,9
KCl	98,9 ± 6,4	93,3 ± 4	119,5 ± 1,8	105,6 ± 2,9	130 ± 9,8
NBS	18,5 ± 3,3	8,1 ± 4,2	114 ± 17,2	13 ± 2,9	50,4 ± 5,4
EDTA	65,3 ± 4,7	74,7 ± 5	137,3 ± 12,4	84,7 ± 3,5	142 ± 11,8
SDS	1 ± 0,3	4,8 ± 0,6	47 ± 3,44	3,7 ± 0,2	10,1 ± 1

* A feltüntetett relatív aktivitás értékek a gátlószert nem tartalmazó (kontroll) reakcióelegyben mért enzimaktivitás értékekhez (100%) viszonyított adatok. Kék színnel kiemelve a megnövekedett enzimaktivitás, narancs színnel az 50%-ot meghaladó aktivitás-csökkenés látható.

A reakcióközegben jelen lévő 5 mM Na⁺ és K⁺ a legtöbb vizsgált enzim aktivitását 5 – 37%-kal fokozta. A Na⁺ hasonló aktivitás-fokozó hatását leírták *Rh. oligosporus* var. *microsporus* (Iftikhar és mtsi., 2011) és *Geotrichum marinum* (Huang és mtsi., 2004) lipázoknál is. Az aktivitás növekedésének lehetséges magyarázata, hogy a reakcióelegyben jelen lévő só konformációs szinten stabilizálja az enzimet, mely az aktív centrum integritásának megerősítésével fokozza a lipáz enzim hidrolitikus aktivitását (Noel és Combes, 2003).

A Hg^{2+} , az NBS, az SDS és a Ca^{2+} mellett a *Rh. oryzae* lipáz esetében Zn^{2+} jelenlétében figyeltünk meg jelentősebb, 56%-os gátlást. A *M. corticolus* enzimet a Zn^{2+} mellett a Cu^{2+} ion is jelentősen gátolta, 48,7 – 48,7% relatív aktivitást eredményezve. Pálmatermésről izolált termofil *Rh. oryzae* törzs lipáz enzim jellemzésekor a Cu^{2+} erős gátló hatását tapasztalták (Hiol és mtsi., 2000). Ezzel szemben a *Rh. stolonifer* lipáz aktivitását csak kismértékben (6%) csökkentette. Ennél az enzimmél a Co^{2+} és Zn^{2+} jelenlétében megközelítőleg 10 – 14% enzimaktivitás emelkedést tapasztaltunk. A *Mo. echinosphaera* lipáz aktivitását a Cu^{2+} nem befolyásolta jelentősen, míg a Co^{2+} , a Mn^{2+} és a Zn^{2+} 19 – 33%-kal csökkentette.

Az EDTA, mint kelátoló ágens, enzimaktivásra gyakorolt hatását is megvizsgáltuk 10 mM koncentrációban alkalmazva, mely a vizsgált lipázok aktivitását 16 - 35%-kal csökkentette, míg *Rh. stolonifer* és *Mo. echinosphaera* esetében 37,3% és 42%-kal fokozta. A *M. corticolus* lipáznál mérsékelt gátlást tapasztaltunk (84,7% relatív aktivitás), hasonlóan a *M. hiemalis* f. *corticola* törzs lipáz enziméhez, melyre 0,1% koncentrációban alkalmazott EDTA nem volt jelentős hatással (Ülker és Karaoğlu, 2012).

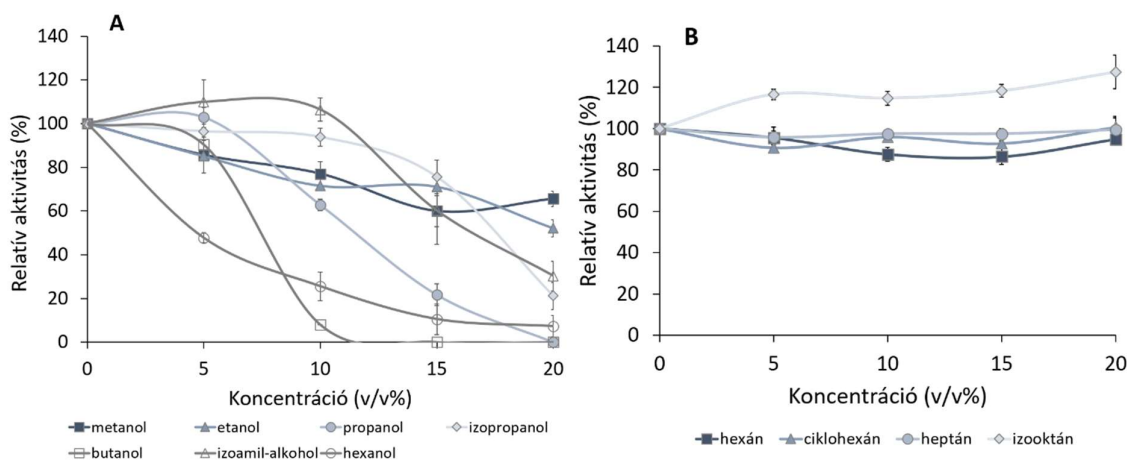
A tisztított enzimek, különösen a *Rh. stolonifer* és a *Mo. echinosphaera* lipázok rendkívül stabilnak bizonyultak számos vizsgált fémsó jelenlétében, mely ígéretes tulajdonság lehet az ipari és biotechnológiai folyamatokban való felhasználhatóság szempontjából.

5.8.7. Alkoholok és alkánok enzimaktivításra gyakorolt hatása

A lipáz enzimeket széles körben alkalmazzák szintetikus szerves reakciókban. Ezen folyamatok katalizálásához azonban szerves oldószerekben is stabil és aktív lipázokra van szükség. Az egyik legjelentősebb felhasználás a biodízel előállítása, mely elsősorban metanol jelenlétében történik, azonban más alkoholok is alkalmasak a zsírsavak átészterezésére (pl. etanol, izopropanol, izobutanol) (Salis és mtsi., 2007). A különféle szerves oldószert tartalmazó vizes közeg módosíthatja az enzim aktivitását és stabilitását (Gaspar és mtsi., 1999). A hatás függ az oldószer kémiai szerkezetétől és fizikai paramétereitől, illetve az enzim felépítésétől egyaránt (Li és mtsi., 2011). Különböző első- és másodrendű alkoholok, és alkánok hidrolitikus aktivitásra gyakorolt hatását 5 – 20% (v/v) koncentrációban vizsgáltuk. Kontrollként az oldószer nélküli mintában mért optikai denzitás értéket vettük alapul (100%).

A *R. miehei* enzim aktivitását a metanol és az etanol 5 – 10%-os koncentrációban csak kis mértékben, 15%-kal csökkentette, még 20%-os koncentrációban alkalmazva is 60% körüli relatív aktivitást detektáltunk (**18. A ábra**). Hasonlóan a propanol és izopropanol sem gátolta jelentősen az enzim aktivitását 5 – 10% koncentrációban. A butanol már 10% koncentrációban

az enzimaktivitás szinte teljes gátlását okozta, míg a hexanol esetében dózistól függő fokozatos gátló hatást tapasztaltunk, mely 20%-nál már csak 7,3% relatív aktivitást eredményezett. Izoamil-alkoholt 5 – 10%-os koncentrációban alkalmazva a kontroll aktivitáshoz viszonyítva enyhén magasabb (109,8 és 106%) értékeket detektáltunk. A tesztelt alkánokban ígéretes stabilitást figyelhettünk meg, izooktán esetében jelentős aktiváló hatást is tapasztaltunk (114,7 – 127,4% relatív aktivitás) (18. B ábra). A *R. endophyticus* lipáz aktivitását Yan és mtsi. (2016) vizsgálataiban metanol (113%), ciklohexán (154%) és heptán (169%) fokozta, butanol kis mértékben (88%), míg aceton (31%), acetonitril (1,5%) és izopropanol (0,9%) jelentősen csökkentette.



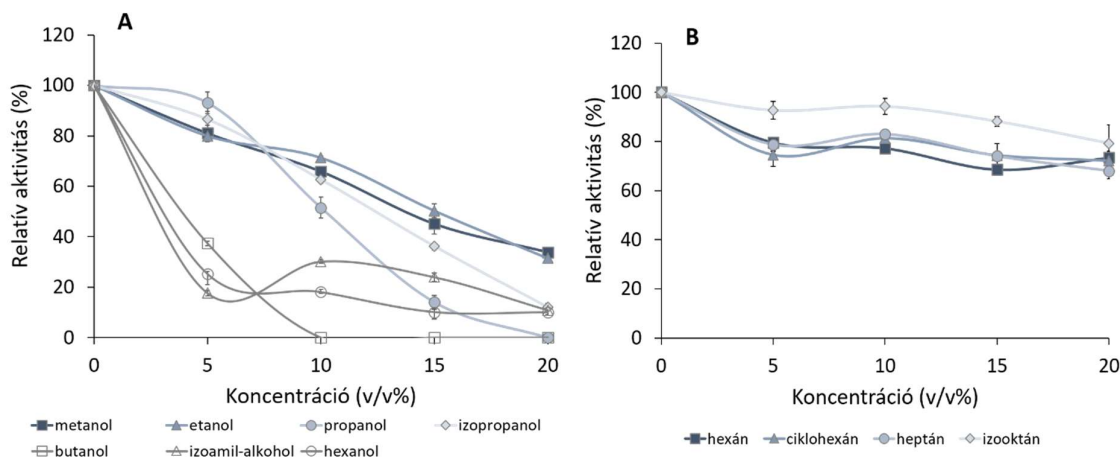
18. ábra. Különböző koncentrációjú alkoholok (A) és alkánok (B) hatása *R. miehei* NRRL 5282 lipáz aktivitására.

A feltüntetett relatív aktivitás értékek az oldószert nem tartalmazó (kontroll) reakcióelegyben mért enzimaktivitás értékekhez (100%) viszonyított adatok.

A *Rh. oryzae* izolátum lipáza stabilnak bizonyult 5% propanol és izopropanol jelenlétében, emellett 5% etanolt vagy metanolt alkalmazva mindössze 20%-kal csökkent az enzim aktivitása (19. A ábra). A hexanol, butanol és izoamil-alkohol már 5%-os koncentrációban is jelentősen csökkentette a lipázaktivitást. A *Rh. oryzae* lipáz a vizsgált alkánokban 70 – 80% relatív aktivitást mutatott (19. B ábra). A Hiol és munkatársai (2000) által izolált *Rh. oryzae* extracelluláris lipáz szintén stabilnak bizonyult alkánokban és hosszú láncú alkoholokban, de denaturálódott hidrophil oldószerekben (pl. aceton) és rövid láncú alkoholokban (metanol és etanol).

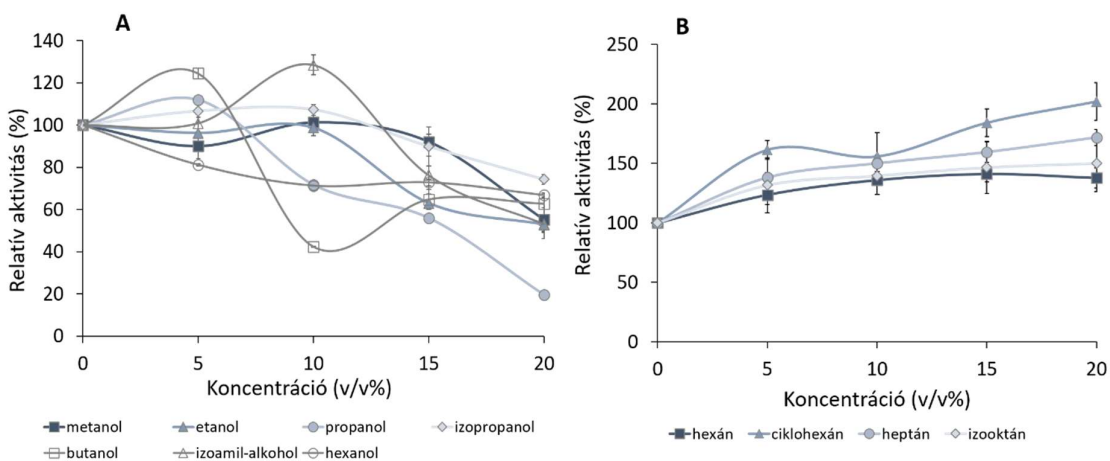
A *Rh. stolonifer* izolátum által termelt lipáz enzim ígéretes stabilitást mutatott 20% metanol, etanol és izopropanol jelenlétében, ahol 55,1, 52,8 és 74,3% relatív aktivitásokat állapítottunk meg (20. A ábra). Ezzel ellentétben egy *Rhizopus* fajból izolált lipáz esetében a

metanol jelentős denaturáló hatását írták le, alkalmazásánál alacsony relatív aktivitást figyeltek meg (Koblitz és Pastore, 2006). Az izoamil-alkohol 10%-os koncentrációban 28,5%-kal fokozta, míg 20%-os koncentrációban alkalmazva már jelentősen csökkentette a *p*NF felszabadulását. Az enzim aktivitását 5% propanol és butanol szintén fokozta 11,8 és 24,4%-kal, míg 10 és 15%-os koncentrációban jelentős mértékben csökkentette. Az enzimaktivitás jelentős emelkedését tapasztaltuk alkánok jelenlétében (20. B ábra); mintegy másfél-kétszeres aktivitás növekedést figyelhettünk meg 20% ciklohexán és heptán esetében.



19. ábra. Különböző koncentrációjú alkoholok (A) és alkánok (B) hatása *Rh. oryzae* NRRL 1526 lipáz aktivitására.

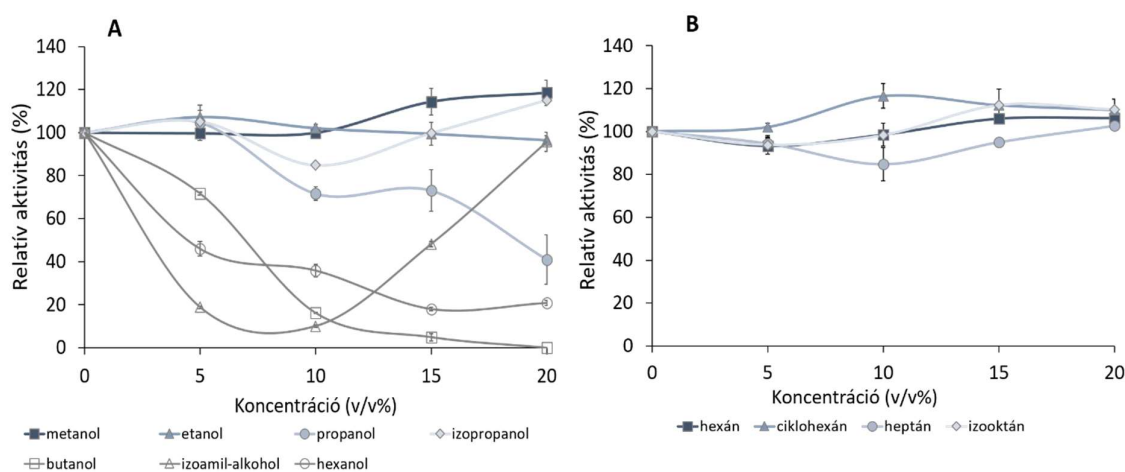
A feltüntetett relatív aktivitás értékek az oldószert nem tartalmazó (kontroll) reakcióelegyben mért enzimaktivitás értékekhez (100%) viszonyított adatok.



20. ábra. Különböző koncentrációjú alkoholok (A) és alkánok (B) hatása *Rh. stolonifer* SZMC 13609 lipáz aktivitására.

A feltüntetett relatív aktivitás értékek az oldószert nem tartalmazó (kontroll) reakcióelegyben mért enzimaktivitás értékekhez (100%) viszonyított adatok.

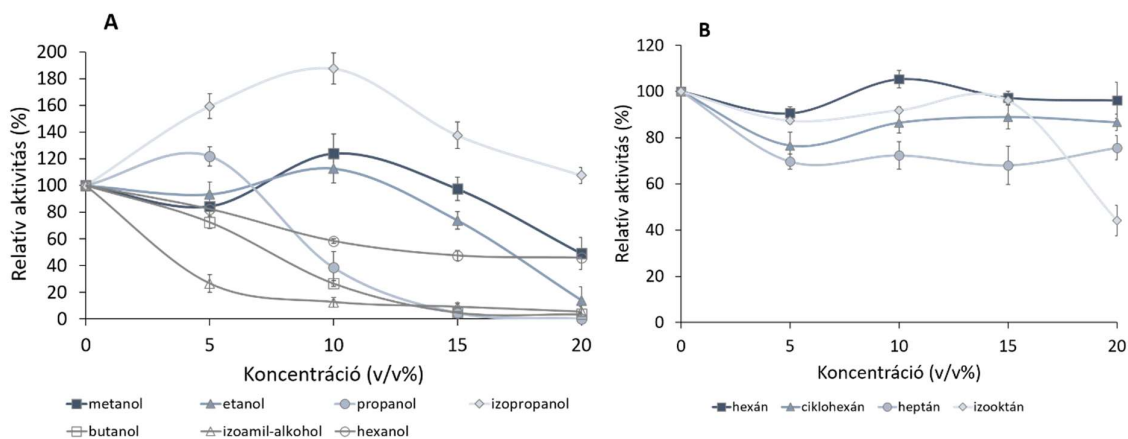
A *M. corticolus* lipáz enzim aktivitását metanol, etanol és izopropanol még 20%-os koncentrációban alkalmazva sem gátolta (**21. A ábra**). A *Mucor hiemalis f. hiemalis* törzsből izolált extracelluláris lipáz esetében a metanol és etanol jelentős gátló hatását állapították meg (Hiol és mtsi., 1999). Jelentős hidrolízis-gátlást a butanolt és a hexanolt 5%-os koncentráció felett alkalmazva tapasztaltunk. A kontroll reakcióhoz képest nagyobb *p*-nitrofenol felszabadulást mértünk 15 és 20% metanol, illetve 20% izopropanol jelenlétében. Izoamil-alkohol 5 – 10%-os koncentrációban jelentős gátlást eredményezett, azonban 20%-os koncentráció felé haladva emelkedő *p*NF mennyiséget tapasztaltunk. A *M. corticolus* lipáz szintén stabilnak bizonyult a vizsgált alkánok jelenlétében (**21. B ábra**). Mintegy 10 – 15% aktivitás növekedést 10 – 20% ciklohexán és 15 – 20% izooktán jelenlétében tapasztaltunk.



21. ábra. Különböző koncentrációjú alkoholok (A) és alkánok (B) hatása *M. corticolus* SZMC 12031 lipáz aktivitására.

A feltüntetett relatív aktivitás értékek az oldószert nem tartalmazó (kontroll) reakcióelegyben mért enzimaktivitás értékekhez (100%) viszonyított adatok.

A *Mo. echinosphaera* izolátum által termelt lipáz enzim ígéretes stabilitást mutatott 15 – 20% metanol, etanol és izopropanol jelenlétében (**22. A ábra**). Az enzimet az izoamil-alkohol, butanol és hexanol dóziszfüggő módon gátolta, azonban 20% hexanol jelenlétében is 45,9% relatív aktivitást figyeltünk meg. Az enzimaktivitás növekedését 5% propanol, 10% metanol és etanol, valamint 5 - 20% izopropanol jelenlétében tapasztaltuk. A *Mo. echinosphaera* lipáz aktivitását a hexán és izooktán 15%-os koncentrációig számottevően nem befolyásolta, míg a heptán és ciklohexán kismértékű aktivitás-csökkenést okozott. Az izooktán 20%-os koncentrációban alkalmazva 60%-kal csökkentette az enzimaktivitást (**22. B ábra**).



22. ábra. Különböző koncentrációjú alkohokok (A) és alkánok (B) hatása *Mo. echinosphaera* CBS 575.75 lipáz aktivitására.

A feltüntetett relatív aktivitás értékek az oldószert nem tartalmazó (kontroll) reakcióelegyben mért enzimaktivitás értékekhez (100%) viszonyított adatok.

Az egyes alkohokok esetében tapasztalt serkentő hatás többféle tényezőnek tulajdonítható. A reakcióközegben jelen lévő oldószer a szubsztrát oldékonyságának fokozódását, így a reakciós ráta növekedését eredményezheti (Gaspar és mtsi., 1999). Ezen jelenség kis koncentrációban (5 – 10%) jelen lévő, vízzel elegyedő oldószerek (alkohokok) esetében figyelhető meg. Azonban a vízzel elegyedő oldószerek legtöbbször destabilizálják az enzimet, így azok aktivitásának csökkenését eredményezik (Ebrahimpour és mtsi., 2011). Az aktivitások emelkedésének másik lehetséges oka, hogy az alkohol koncentráció növekedésével csökken a reakcióközegben a vízaktivitás, így a hidrolitikus aktivitás helyett fokozatosan az átészterező reakciók kerülnek előtérbe (Abbas és Comeau, 2003). Néhány megfigyelt aktivitásnövekedés a feltételezhetően lejátszódó átészterezés következtében végbemenő *p*NF felszabadulás, valamint a vizes közegben párhuzamosan zajló hidrolízis eredményei. Alacsony vízaktivitás mellett hidrolízis és szintézis is történhet egyidejűleg; a jelen lévő víz mennyiségének további csökkenésével fokozatosan a szintetikus folyamatok felé tolódik a reakció.

A vizsgált enzimek a telített alkánokban ígéretes stabilitást mutattak. Ezen oldószerek mennyiségének növekedése a legtöbb esetben fokozta az enzimek stabilitását, így az enzimaktivitásokban növekvő tendenciát tapasztaltunk. Az enzimek szerves alkánokban mutatott stabilitását az átészterezési reakciók tanulmányozásakor (5.5.2. fejezet) is tapasztaltuk. Hiol és munkatársai (1999) *M. hiemalis* f. *hiemalis* lipáz esetében szintén azt találták, hogy a vízzel nem elegyedő (izooktán, heptán és hexán) oldószerekben az enzim megőrizte stabilitását

(100 – 107% relatív aktivitás). Ennek egyik lehetséges oka, hogy az alkánok, mint vízzel nem elegyedő szerves oldószerek hidrofób felületet alakítanak ki, ezáltal a határfelületi aktiváció jelenségéhez hasonlóan stabilizálhatják az enzimek aktív konformációját (Garcia-Galan és mtsi., 2013), így ezen oldószerek jelenlétében fokozott enzimaktivitás figyelhető meg. Egy másik hipotézis szerint ezen oldószerek képesek interakcióba is lépni az enzimmel a szubsztrátkötő helyén, illetve annak környékén, így befolyásolják a szubsztrát átalakítását és a reakció rátáját. Ezen elmélet egy szolvens-enzim komplex létrejöttét feltételezi (Cernia és mtsi., 1998). Oldószerekben aktív és stabil enzimek elsősorban az olajkémia-, és gyógyszeripar területén, a szerves kémiai szintézisek katalizálásában játszanak fontos szerepet. Ezek alapján a tisztított lipázok felhasználhatóak ezen ipari folyamatok katalizálására, oldószerekben mutatott stabilitásuknak köszönhetően.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A lipáz enzimek a trigliceridek hidrolízisét katalizálják. Hidrolitikus aktivitásuk mellett vízmentes, vagy alacsony víztartalmú közegben észter kötések szintézisére és áthelyezésére is képesek. Biológiai jelentőségükön kívül fontos szerepet töltenek be egyes biotechnológiai és ipari alkalmazásokban, az általuk katalizált reakciók változatosságának, valamint az enzimek nagyfokú szubsztrátspecificitásának köszönhetően. Lipáz enzimeket széles körben alkalmaznak többek között az élelmiszer-, a gyógyszer-, a bőr- és a detergens iparban, valamint a szerves szintézisek során egyaránt. Napjainkban a kereskedelmi forgalomban kapható lipázok túlnyomó többsége mikrobiális eredetű, baktériumok vagy fonalas gombák által termelt. A biotechnológiai és ipari fejlesztések a hidrolitikus és/vagy szintetikus reakciók katalizálása szempontjából előnyös tulajdonságokkal rendelkező enzimek azonosítását teszik szükségessé. A járomspórás gombák közt számos jó extracelluláris enzimtermelő törzs ismert, azonban lipáztermelésükről kevés információ áll rendelkezésünkre. Az enzimek hidrolitikus és szintetikus aktivitására, és biokémiai jellemzőire vonatkozó ismeretek is korlátozottak.

Munkánk során célul tűztük ki az alap kutatásban és ipari fejlesztésekben is hasznosítható lipáztermelő járomspórás gombatörzsek azonosítását és az általuk termelt enzimek jellemzését. Ennek érdekében számos törzs lipáztermelését teszteltük tributirines közegben, vizsgáltuk az enzimtermelést különböző tenyésztési körülmények mellett, tisztítottunk termelt enzimeket, valamint lipáz-katalizált hidrolitikus és szintetikus reakciókat is jellemeztünk.

A kutatási program során az alábbi eredményeket sikerült elérnünk:

1. Azonosítottunk magas extracelluláris lipolitikus aktivitással rendelkező járomspórás gombatörzseket.

Jelen munkában a *Gilbertella*, *Rhizomucor*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Dissophora*, *Gamsiella*, *Mortierella* és *Umbelopsis* nemzetségbe tartozó 204 gombatörzs lipáztermelését teszteltük tributirin tartalmú szilárd tápközegen. A telepek körül keletkező feltisztulási zónák és telepátmérők alapján 21 nagy extracelluláris lipolitikus aktivitással rendelkező törzset azonosítottunk. Ezek közül *Mo. alpina*, *Mo. echinosphaera*, *M. corticolus*, *R. miehei*, *Rh. oryzae*, *Rh. stolonifer*, *U. autotrophica*, *U. isabellina*, *U. ramanniana* var. *angulispora* és *U. versiformis* izolátumokat választottunk ki további vizsgálatok elvégzése céljából.

2. Megvizsgáltuk a kiválasztott törzsek lipáztermelését különféle induktív körülmények között folyadék és szilárd fázisú fermentációban.

Teszteltük különböző növényi olajok, valamint szintetikus lipid származék enzimtermelésre gyakorolt hatását. A Tween 80 és az olívaolaj jelentősen megnövelte a legtöbb tesztelt törzs lipáztermelését, így hatásos induktornak bizonyult. A tesztelt növényi olajok közül elsősorban a szója-, szezám-, gyapotmagolajok fokozták még egyes izolátumok enzimtermelését.

A búzakorpa hatékony induktora a fonalas gombák lipáztermelésének, így a kiválasztott törzsek enzimtermelését búzakorpa alapú folyadék és szilárd fázisú fermentációban is teszteltük. Folyadék rendszerben (SmF) a *Mo. echinosphaera*, *Rh. stolonifer*, *U. autotrophica*, *U. ramanniana* var. *angulispora* és *U. versiformis* nagyobb térfogati aktivitást mutatott, mint a minimál indukciós tápközegen. A különböző izolátumok esetében a tenyésztés eltérő fázisaiban mértük a legmagasabb lipázaktivitást. Búzakorpa alapú szilárd fermentációban (SSF) kétféle tenyésztési körülményt hasonlítottunk össze: SSF1 esetében csak desztillált vízzel, míg SSF2 esetében ásványi sók oldatával, illetve 1,5% olívaolajjal egészítettük ki a tápközéget. Minden törzs esetében nagyobb, de különösen a *R. miehei*, *Rh. oryzae* NRRL 1526, *Rh. stolonifer* és *U. versiformis* izolátumok fermentleveiben jelentős, mintegy négyszer magasabb enzimtermelést detektáltunk SSF2 tápközegen, mint SSF1-en. Az SSF2 közegen magas enzimtermelést a *R. miehei*, *M. corticolus*, *U. autotrophica*, *U. ramanniana* var. *angulispora* és *U. versiformis* (4415; 1733,4; 416,3; 355,7 és 287,1 U/g száraz szubsztrát) törzsek esetén azonosítottunk. A búzakorpa mellett más magas lipidtartalmú növényi maradványokat is bevontunk a vizsgálatainkba, ahol a legnagyobb lipázaktivitásokat mákliszt és tökmag préselési őrlemény, mint szubsztrát alkalmazása esetén kaptuk.

3. Vizsgáltuk és jellemeztük járomspórás gombákból nyert nyers lipáz kivonatok átészterező és észterező aktivitásait.

A kísérletekben az előzetes tesztjeink alapján kiválasztott izolátumok búzakorpa alapú szilárd fermentáció utáni nyers enzimkivonataival dolgoztunk. A termelt lipázok átészterező aktivitását *p*-nitrofenil palmitát (*p*NFP) acil donor és etanol acil akceptor alkalmazásával teszteltük 30 perc inkubációt követően. A legnagyobb aktivitást (1,7 – 4,8 U/mg) a *R. miehei*, *Rh. stolonifer*, *Mo. echinosphaera*, *M. corticolus*, és *Rh. oryzae* NRRL 1526 és NRRL 1472 törzsek által termelt enzimek mutatták.

Az átészterező reakciók jellemzésénél megvizsgáltuk egyes alkán és cikloalkán reakcióközegek alkoholízisre gyakorolt hatását, ahol általában a leghatékonyabb *p*NFP

konverzió értékeket *n*-heptánban kaptuk. A hőmérséklet átészterezésre kifejtett hatását 20 – 50 °C közötti tartományon vizsgáltuk 0,5 – 6 óra inkubációt követően. A konverziós ráta lineárisan növekedett a 6 órás inkubáció alatt 40 °C-on, kivéve a *Rh. oryzae* NRRL 1472, *U. autotrophica* és *U. versiformis* enzimkivonatok esetében, melyek a maximális konverziót már 4 óra inkubációt követően elérték. A *Rh. stolonifer*, *Rh. oryzae* NRRL 1526, *M. corticolus*, *Mo. echinosphaera* és *Mo. alpina* lipázok kezdeti *p*NFP konverziója 50 °C-on hatékonyabbnak bizonyult, mint 40 °C-on történő inkubáció esetén, mely a magas hőmérséklet katalízis-fokozó hatásával magyarázható. Hosszabb inkubáció hatásának vizsgálatokor a reakciós ráta lineáris emelkedését tapasztaltuk az első 48 órában, a maximális *p*NFP konverziót 96 óra elteltével állapítottuk meg: a legmagasabb értékeket a *R. miehei* és a *Mo. echinosphaera* enzimkivonatai mutatták, 90,5 és 88,5% konverzióval. Az átészterezés hatékonyságát különböző acil akceptor molekulák jelenlétében is teszteltük, melynek során az átészterezés a vizsgált alkoholok mindegyikével végbement; a legmagasabb *p*NFP konverziót etanol esetében figyelhettük meg. Az etanol koncentráció átészterezésre gyakorolt hatását 0,85 – 5,1 M (5 – 30%, v/v) tartományban vizsgáltuk. A *p*NFP konverzió jelentős növekedését tapasztaltuk az etanol koncentráció növelésével a *R. miehei* és *Rh. oryzae* lipázoknál 3,4 M, míg a *Rh. stolonifer* és *M. corticolus* enzimkivonatok esetében 4,2 M koncentrációig. Különböző acil-donor molekula tesztelésénél a közepes szénlánc-hosszúságú (C8 – C12) aril-észterek alkalmazásakor nagyobb *p*NFP konverziót állapítottunk meg, mint a rövid vagy hosszú zsírsavláncot tartalmazó észterek esetében.

Néhány kiválasztott enzim esetében a palmitinsav és etanol közötti észterezést is megvizsgáltuk. A *Mo. echinosphaera* és *R. miehei* lipáznál 48 óra, míg a *Rh. stolonifer* enzimnél 24 óra után sorrendben 9,77, 9,98 és 10,54 mg/l etil-palmitát mennyiséget mértünk gázkromatográfias technikával. Az észterező aktivitás mindegyik vizsgált enzimnél alacsonyabbnak bizonyult, mint az átészterező. Az észterezés katalizálásának jellemzésekor kimutattuk, hogy az enzimek elsősorban a hosszú, C16 – C18 zsírsavak észterezését részesítik előnyben.

4. Tisztítottunk lipáz enzimeket nagy szintetikus és hidrolitikus aktivitással rendelkező nyers enzimkivonatokból.

Az előzetes tesztek eredményei alapján a *R. miehei* NRRL 5282, *Rh. oryzae* NRRL 1526, *Rh. stolonifer* SZMC 13609, *M. corticolus* SZMC 12031 és *Mo. echinosphaera* CBS 575.75 izolátumok extracelluláris lipáz enzimeinek tisztítását végeztük el. A *Rh. oryzae* és *R. miehei* törzsek esetében búzaborpa alapú szilárd fázisú fermántációt, míg *Rh. stolonifer*, *M.*

corticolus és *Mo. echinosphaera* izolátumoknál búzakorpa alapú süllyesztett fermentációt alkalmaztunk az enzimek nagy mennyiségben történő termeltetéséhez.

A tisztítás a nyers kivonatokból ammónium-szulfát frakcionálással, majd gélszűrést követő ioncserélő és méretkizárásos kromatográfiás elválasztással történt. A tisztított enzimfehérjék molekulatömegét SDS poliakrilamid gélelektroforézissel állapítottuk meg; a *R. miehei* enzim 55 kDa, a *Rh. oryzae* 35 kDa, a *Rh. stolonifer* 28 kDa, a *M. corticolus* 20 kDa, míg a *Mo. echinosphaera* lipáz 30 kDa méretűnek bizonyult. A tisztított lipázok zimográfiai vizsgálatát α -naftil-acetát és 4-metilumbelliferil-nonanoát szubsztrátokkal végeztük el. Az izolált lipázok képesek a *pNF*-palmitát és etanol közötti átészterezés katalizálására; a *R. miehei* 15,7 U/mg, a *Rh. oryzae* 20,9 U/mg, a *Rh. stolonifer* 8,15 U/mg, a *M. corticolus* 13,62 U/mg, míg a *Mo. echinosphaera* tisztított lipáz 18,67 U/mg átészterező aktivitást mutatott.

5. Jellemeztük a tisztított lipázok hidrolitikus aktivitását különböző reakciókörülmények között.

A lipázok biokémiai jellemzését a hidrolitikus aktivitásra ható tényezők figyelembevételével végeztük el. Az enzimaktivitás hőmérsékleti optimumát a *Mo. echinosphaera* enzim esetében 20 – 30 °C, a *M. corticolus* és a *Rh. oryzae* lipázoknál 30 °C, a *R. miehei* enzimnél 40 °C, míg a *Rh. stolonifer* lipáznál 50 °C körüli értéknek határoztuk meg. A *R. miehei* és *Rh. stolonifer* lipázok 50 °C-ig stabilnak bizonyultak, így termotoleránsnak tekinthetők. A *M. corticolus* és a *Mo. echinosphaera* lipázok 40 °C, míg a *Rh. oryzae* lipáz 30 °C hőmérsékletig bizonyultak stabilnak. Ígéretes a *Mo. echinosphaera* lipáz 20 °C-on, valamint a *Rh. oryzae*, *Rh. stolonifer* és *M. corticolus* enzimek 5 °C-on mutatott maradék aktivitása is.

A *R. miehei* és *M. corticolus* lipázok aktivitásának pH optimumát a kissé alkalikus (pH 6,8 – 7,4 és pH 7,0 – 7,4), míg a *Rh. oryzae* és *Rh. stolonifer* enzimekét az enyhén savas pH tartományban (pH 5,0 – 5,4 és pH 4,6 – 5,0) állapítottuk meg. A *R. miehei* és *M. corticolus* enzimek stabilitásukat pH 7,0 – 8,0 és 6,2 – 7,4, míg a *Rh. oryzae* és *Rh. stolonifer* az alacsonyabb pH 5,4 – 6,8 és 4,2 – 5,4 tartományban képesek megőrizni. A *Mo. echinosphaera* lipáz enzim aktivitásának pH optimuma 6,6 – 7,0 közötti volt, valamint széles pH tartományban mutatott aktivitást (pH 4,6 – 8,0) és stabilitást (pH 3,4 – 8,0).

A *R. miehei* enzim a C6 – C12, míg a *Rhizopus* izolátumok enzimeit a C8 – C12 szénlánc hosszúságú zsírsavakat tartalmazó *pNF* észtereket hidrolizálták a legnagyobb mértékben. Ezzel szemben a *Mo. echinosphaera* és a *M. corticolus* izolátumok lipázai szélesebb szubsztrátpreferenciát mutattak: a *M. corticolus* lipáz a C4 – C12, a *Mo. echinosphaera* enzim a C3 – C10 zsírsavakat tartalmazó *pNF*-észterek hidrolízisét katalizálta a legnagyobb

mértékben. A trioleát-hidrolízis termékeinek vizsgálatakor kimutattuk, hogy az izolált enzimek mindegyike 1,3 regio szelektivitással rendelkezik.

A tisztított lipázok *p*NFP szubsztrátra vonatkozó kinetikai paramétereit is megállapítottuk. A vizsgált enzimek közül a *R. miehei* és a *Rh. oryzae* lipázok gyengébb affinitást mutattak a szubsztráthoz, azonban a magas V_{max} értékek gyors hidrolízist jeleznek. A *Rh. stolonifer*, *M. corticolus* és *Mo. echinosphaera* lipázoknál a *p*NFP szubsztráthoz való affinitás és a hidrolízis sebessége megközelítőleg azonos.

Fémionok és reagensek enzimaktivásra gyakorolt hatásának vizsgálatakor jelentős enzimaktivitás gátló hatást a Hg^{2+} , NBS és SDS jelenlétében tapasztaltunk. A legtöbb enzim aktivitását a reakcióközegben jelen lévő 5 mM Na^+ és K^+ 5 – 37%-kal fokozta, mely feltételezhetően az enzimek konformációjának stabilizálásával feje ki hatását. Különösen a *Rh. stolonifer* és a *Mo. echinosphaera* lipázok bizonyultak stabilnak számos vizsgált fémsó jelenlétében.

A *R. miehei* és a *Rh. oryzae* enzimek 5 – 10% metanol, etanol, propanol és izopropanol, a *Mo. echinosphaera* lipáz 5 – 15%, míg a *Rh. stolonifer* és a *M. corticolus* lipázok 20% metanol, etanol és izopropanol jelenlétében is stabilnak bizonyultak. Általánosságban, az enzimek aktivitását a hexanol és a butanol, egyes enzimek esetében az izoamil-alkohol jelentősen csökkentette. Néhány reakcióelegyben nagyobb *p*NF felszabadulást tapasztaltunk a kontrollhoz képest, melyhez a vízáktivitás csökkenés következtében fellépő *p*NFP átészterezés is hozzájárulhatott. A vizsgált enzimek nagy stabilitást mutattak a vízzel nem elegyedő telített alkánokban (*n*-hexán, ciklohexán, *n*-heptán és izooktán).

Kutatásaink eredményeként számos ígéretes extracelluláris lipáztermelő járomspórás gombatorzset azonosítottunk. Jelentősen bővültek ismereteink az enzimek termelésével kapcsolatban különböző induktor, szubsztrát és tenyésztési körülmény alkalmazásakor. Emellett az átészterező és észterező reakciók katalizálásával kapcsolatban is fontos új elméleti és gyakorlati információkat szereztünk. Tudomásunk szerint elsőként mutattunk ki szintetikus aktivitást szerves közegben *Mortierella* és *Umbelopsis* extracelluláris lipázok esetében. Továbbá elsőként izoláltunk és jellemeztünk extracelluláris lipáz enzimet *Rh. stolonifer*, valamint a *Mortierella* nemzetségbe sorolt törzsből. Eredményeink alapján a tisztított és jellemzett enzimek az alap kutatásokban és a biotechnológiai fejlesztésekben, különösen a szerves szintézis folyamataiban felhasználhatók, azok számára értékes tulajdonságokkal rendelkeznek.

7. SUMMARY

Lipase enzymes hydrolyze triacylglycerols, which are the major constituents of fats and oils. Besides, most lipases are able to catalyze the synthesis and translocation of ester linkages, mainly under low water content or non-aqueous conditions. In addition to their biological importance, lipases have important role in different biotechnological and industrial processes due to their diverse catalytic properties and substrate specificity. Their activities are utilized in the food-, pharmaceutical-, leather- and detergent industries, as well as in the production of fine chemicals. Most of the current commercial enzymes are derived from microbial sources produced by bacteria or filamentous fungi. However, identification and characterization of novel microbial lipases with promising hydrolytic and/or synthetic properties have special importance for industrial and biotechnological process development purposes. Among zygomycetes, many strains are known as good extracellular enzyme producers, however, a limited information is available about their lipase production, and the biochemical characteristics of the produced hydrolytic and synthetic activities as well.

Therefore, the objective of our study was to identify extracellular lipase sources and enzymes from zygomycetes fungi, which can be used as a basis for further basic and applied researches. For this purpose, lipase production of several strains was tested on tributyrin supplemented medium, and the enzyme production was examined using various cultivation conditions. Purification of lipases and characterization of lipase-catalyzed hydrolytic and synthetic reactions were also among our goals.

During the research program, the following results have been achieved:

1. Several Mucoromycota strains with high extracellular lipolytic activity have been identified.

A total of 204 zygomycetes strains belonging to the genera *Gilbertella*, *Rhizomucor*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Dissophora*, *Gamsiella*, *Mortierella* and *Umbelopsis* were screened for their tributyrin hydrolyzing capacity. According to the lipolytic halo and colony diameters, 21 promising lipase producers have been identified. From these, *Mo. alpina*, *Mo. echinosphaera*, *M. corticolus*, *R. miehei*, *Rh. oryzae*, *Rh. stolonifer*, *U. autotrophica*, *U. isabellina*, *U. ramanniana* var. *angulispora* and *U. versiformis* isolates were selected for further investigations.

2. Lipase production of lipolytic strains has been studied under various inductive conditions using submerged and solid-state fermentation.

A range of different oils and oil-based materials were tested for their ability to induce the lipase production of the selected strains. In general, Tween 80 and olive oil proved to be good inducers for lipase production since most of the investigated fungi displayed high enzyme activity when the media was supplemented with these oils. Other lipid materials such as soybean, sesame- and cottonseed oils also enhanced the enzyme production of some isolates.

Wheat bran is well documented as a good inducer for lipolytic activity of various filamentous fungi. Therefore, lipase production of the selected strains was also tested in wheat bran-based submerged (SmF) and solid-state fermentation (SSF) systems. Wheat bran-based SmF resulted in higher volumetric activities for the *Mo. echinosphaera*, *Rh. stolonifer*, *U. autotrophica*, *U. ramanniana* var. *angulispora* and *U. versiformis* isolates than those obtained under minimal conditions. For each isolate, maximum lipase activities were observed at different phases of the fermentation. Two fermentation media was compared to evaluate the enzyme production on wheat bran-based SSF: a simple medium containing only distilled water to moisturize the wheat bran (SSF1) and a medium supplemented with mineral salt solution and 1.5% olive oil (SSF2). During the fermentation on SSF2, enzyme production of *R. miehei*, *Rh. oryzae* NRRL 1526, *Rh. stolonifer* and *U. versiformis* isolates improved considerably showing at least four times higher enzyme activities than on SSF1. When mineral salt solution and olive oil were used as supplements, the *R. miehei*, *M. corticolus*, *U. autotrophica*, *U. ramanniana* var. *angulispora* and *U. versiformis* also proved to be promising lipase producers on wheat bran, expressing specific activities of 4415, 1733.4, 416.3, 355.7 and 287.1 U/g of dry substrate, respectively. Besides wheat bran, other plant residues with high lipid content were also tested, wherein the highest lipase yield could be detected on poppy seed and pumpkin seed grists.

3. Transesterification and esterification activities of crude zygomycetes lipases have been studied and characterized.

In these experiments, crude lipase extracts obtained after wheat bran-based SSF of selected isolates were used. Transesterification activity was determined after 30 min incubation using *p*NP-palmitate (*p*NPP) as acyl donor and ethanol as acyl acceptor. The crude enzymes from *R. miehei*, *Rh. stolonifer*, *Mo. echinosphaera*, *Rh. oryzae* NRRL 1526 and NRRL 1472 and *M. corticolus* isolates showed the highest activities (1.7 – 4.8 U/mg).

To characterize the alcoholysis reactions, various alkanes and cycloalkanes were employed as reaction medium and their effect on the efficiency of transformation were

examined. Generally, *n*-heptane was the most effective as reaction medium. Effect of temperature (20 – 50 °C) on transesterification reactions was investigated. The conversion rates increased linearly during the 6 h incubation at 40 °C, except for lipases of *Rh. oryzae* NRRL 1472, *U. autotrophica* and *U. versiformis*, which reached the maximal *p*NP conversion at the fourth hour. The *Rh. stolonifer*, *Rh. oryzae* NRRL 1526, *M. corticolus*, *Mo. echinosphaera* and *Mo. alpina* crude lipases showed faster initial conversion at 50 °C than 40 °C, which can be explained by the catalysis-stimulating effect of high temperature. Time course of the transesterification was also studied where reaction rate increased smoothly within the first 48 h, and a steady conversion was obtained after 96 h. The highest conversions, 90.5 and 88.5%, were achieved by *R. miehei* and *Mo. echinosphaera* enzymes. Transesterification of *p*NPP were also investigated using various alcohols as acyl acceptor molecules. The transesterification reaction takes place in the presence of all tested alcohols, and the highest *p*NPP conversion yields was achieved with ethanol. The effect of initial ethanol concentration on conversion was monitored by varying ethanol in the range of 0.85 – 5.1 M (5 – 30%, v/v). The conversion grew rapidly as the ethanol concentration increased up to 3.4 M by *R. miehei*, *Rh. oryzae* NRRL 1526 lipases and up to 4.2 M by *Rh. stolonifer* and *M. corticolus* enzymes. When various acyl donor molecules were tested, higher *p*NP conversion yields were generally achieved for medium-chain aryl esters with C8 and C12-long fatty acids.

Esterification reactions between palmitic acid and ethanol were also investigated with some selected crude enzymes using gas chromatography detection of the obtained ethyl palmitate product. Concentrations of 9.77, 9.98 and 10.54 mg/L ethyl palmitate were obtained after 48-hour incubation for *Mo. echinosphaera* and *R. miehei* lipases, and after 24-hour for *Rh. stolonifer* enzyme, respectively. Esterification reactions were much slower and resulted in less specific activities than transesterification. Fatty acid preference of the lipases during esterification was also investigated, where enzymes showed affinity for C16 - C18 fatty acids.

4. Lipase enzymes from crude extracts with high synthetic and hydrolytic activities have been purified.

Based on our previous experiments, purification of *R. miehei* NRRL 5282, *Rh. oryzae* NRRL 1526, *Rh. stolonifer* SZMC 13609, *M. corticolus* SZMC 12031 and *Mo. echinosphaera* CBS 575.75 extracellular lipases were performed. For high-yield enzyme production, wheat bran-based SSF and SmF systems were selected for *Rh. oryzae* and *R. miehei*, and for *Rh. stolonifer*, *M. corticolus* and *Mo. echinosphaera* isolates, respectively. To purify the enzymes, ammonium-sulfate precipitation, size-exclusion and ion-exchange separations were combined.

Molecular weight of the purified enzymes was estimated by SDS-PAGE; which was approximately 55, 35, 28, 20 and 30 kDa for *R. miehei*, *Rh. oryzae*, *Rh. stolonifer*, *M. corticolus* and *Mo. echinosphaera* lipases, respectively. Zymogram analysis of the purified enzymes showed active lipases stained with 4-methylumbelliferyl nonanoate and α -naphthyl acetate. Each purified enzyme catalyzed the transesterification between ethanol and *p*NPP. In these assays, specific activities of 15.7, 20.9, 8.15, 13.62 and 18.67 U/mg were detected for the *R. miehei*, *Rh. oryzae*, *Rh. stolonifer*, *M. corticolus* and *Mo. echinosphaera* lipases, respectively.

5. Hydrolytic activity of the purified lipases has been characterized under various reaction conditions.

Biochemical characterization of the purified enzymes was performed considering several factors that can affect the hydrolytic activity. The temperature optimum for maximal lipolytic activity was 20 – 30 °C for *Mo. echinosphaera*, 30 °C for *M. corticolus* and *Rh. oryzae*, 40 °C for *R. miehei* and 50 °C for *Rh. stolonifer* enzymes. The *R. miehei* and *Rh. stolonifer* lipases can be considered as thermotolerant because they were stable up to 50 °C. The *M. corticolus* and *Mo. echinosphaera* enzymes proved to be stable up to 40 °C, while the *Rh. oryzae* lipase were stable at temperatures below 30 °C. Remarkably residual activities could be detected for the *Mo. echinosphaera* lipase at 20 °C, and for the *Rh. oryzae*, *Rh. stolonifer* and *M. corticolus* enzymes at 5 °C.

The *R. miehei* and *M. corticolus* enzymes had a pH optimum at slightly alkaline pH values from 6.8 to 7.4 and from 7.0 to 7.4, whereas that of the *Rh. oryzae* and *Rh. stolonifer* lipases was found to be in acidic pH range from 5.0 to 5.4 and from 4.6 to 5.0, respectively. The *R. miehei* and *M. corticolus* enzymes were stable from pH 7.0 to 8.0 and pH 6.2 to 7.4, respectively. The *Rhizopus* enzymes retained most of their initial activity at lower pH ranges: the *Rh. oryzae* enzyme was stable between pH 5.4 and 6.8, while the *Rh. stolonifer* between pH 4.2 and 5.4. The purified *Mo. echinosphaera* lipase had the pH optimum between pH 6.6 and 7.0; the enzyme proved to be active and stable between pH 4.6 and 8 and pH 3.4 and 8.0.

The *R. miehei* lipase had highest specificity for *p*NP esters with C6 – C12 acids, while the *Rhizopus* enzymes showed preference for C8 – C12 aryl substrates. In contrast, the *Mo. echinosphaera* and *M. corticolus* lipases exhibited wider substrate specificity, since they could effectively hydrolyze the *p*NP ester substrates with C3 – C10 and C4 – C12 long fatty acids, respectively. Triolein hydrolysis studies showed 1,3-regioselectivity for each purified lipase.

Kinetic parameters of the purified lipases were also determined using different concentrations of *p*NPP substrate. Among the tested enzymes, the *R. miehei* and *Rh. oryzae*

lipases showed less affinity to the substrate; however, high V_{\max} values indicated rapid *p*NPP hydrolysis. The *Rh. stolonifer*, *M. corticolus* and *Mo. echinosphaera* lipases showed almost equal affinity and hydrolysis rate for the *p*NPP substrate.

The effect of various metal ions and reagents on *p*NPP hydrolysis was also investigated. Significant inactivation was observed with Hg^{2+} , NBS and SDS. However, the Na^+ and K^+ in 5 mM concentration enhanced the activity of most enzymes by 5 – 37%, which may be due to its enzyme conformation stabilizing effect. In particular, the *Rh. stolonifer* and *Mo. echinosphaera* lipases showed high stability in most of the metal salts investigated.

Methanol, ethanol, propanol and isopropanol in low concentrations (5 – 10%, v/v) had no considerable effect on the *p*NPP hydrolysis catalyzed by the *R. miehei* and *Rh. oryzae* lipases. The *Mo. echinosphaera* lipase was stable in the presence of 5 – 15% (v/v) methanol, ethanol and isopropanol, while the *Rh. stolonifer* and *M. corticolus* lipases in concentrations up to 20% (v/v). Butanol and hexanol, and for certain enzymes, the isopentanol inhibited the *p*NPP hydrolysis. Increased *p*NF yield could be observed in some reaction mixtures as compared with the control, which may be attributed to the *p*NPP transesterification occurred as a result of the reduced water activity. All enzymes tested proved to be stable at high concentrations of *n*-hexane, cyclohexane, *n*-heptane and isooctane.

In this study, a number of new extracellular lipase-producer zygomycetes fungi have been identified. New informations have been obtained on the production of zygomycetes lipases in different culture conditions using various inductors and substrates. Useful theoretical and practical informations on the transesterification and esterification reactions catalyzed by zygomycetes lipases have been also provided. As far as we know, this is the first study on the catalization of synthetic reactions in organic media with extracellular *Mortierella* and *Umbelopsis* lipases. Moreover, our study is the first, in which the isolation and characterization of extracellular lipase enzymes from *Rh. stolonifer* and *Mortierella* isolates have been described. Our results suggest that the investigated lipases possess properties that can be valuable for future basic studies and biotechnological applications, particularly for the organic synthesis processes.

8. IRODALOMJEGYZÉK

- Abbas, H., Comeau, L. (2003) Aroma synthesis by immobilized lipase from *Mucor* sp. *Enzyme Microb. Technol.* 32, 589-595.
- Abbas, H., Hiol, A., Deyris, V., Comeau, L. (2002) Isolation and characterization of an extracellular lipase from *Mucor* sp strain isolated from palm fruit. *Enzyme Microb. Technol.* 31, 968-975.
- Aguieiras, E.C., Cavalcanti-Oliveira, E.D., Freire, D.M.G. (2015) Current status and new developments of biodiesel production using fungal lipases. *Fuel* 159, 52-67.
- Aisaka, K., Terada O. (1981) Purification and properties of lipase from *Rhizopus japonicus*. *J. Biochem.* 89, 817-822.
- Akoh, C.C., Lee, K.T., Fomuso, L.B. (1998) Synthesis of positional isomers of structured lipids with lipases as biocatalysts. In: Christophe, A.B. (ed.) Structural modified food fats: synthesis, biochemistry, and use. AOCS Press, Champaign, pp. 46-72.
- Ali, Y.B., Verger, R., Abousalham, A. (2012) Lipases or esterases: Does it really matter? Toward a new bio-physico-chemical classification. In: Sandoval, G. (ed.) Lipases and phospholipases: methods and protocols, Methods in molecular biology. Humana Press, New York, pp. 31-51.
- Alnoch, R.C., Martini, V.P., Glogauer, A., dos Santos Costa, A.C., Piovan, L., Muller-Santos, M., de Souza, E.M., de Oliveira Pedrosa, F., Mitchell, D.A., Krieger, N. (2015) Immobilization and characterization of a new regioselective and enantioselective lipase obtained from a metagenomic library. *PLoS One* 10, e0114945.
- Alves, M.H., Campos-Takaki, G.M., Okada, K., Pessoa, F., Milanez, A.I. (2005) Detection of extracellular protease in *Mucor* species. *Rev. Iberoam. Micol.* 22, 114-117.
- Alves, M.H., Campos-Takaki, G.M., Porto, A.L.F., Milanez, A.I. (2002) Screening of *Mucor* spp. for the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. *Braz. J. Microbiol.* 33, 325-330.
- Andualema, B., Gessesse, A. (2012) Microbial lipases and their industrial applications: Review. *Biotechnology* 11, 100-118.
- Aravindan, R., Anbumathi, P., Viruthagiri, T. (2007) Lipase applications in food industry. *Indian J. Biotechnol.* 6, 141-158.
- Arroyo, M., de la Mata, I., Garcia, J.-L., Barredo, J.-L. (2017) Biocatalysis for industrial production of active pharmaceutical ingredients (APIs). In: Brahmachari, G. (ed.) Biotechnology of microbial enzymes. Academic Press, Oxford, pp. 451-473.

- Bae, H.-A., Lee, K.-W., Lee, Y.-H. (2006) Enantioselective properties of extracellular lipase from *Serratia marcescens* ES-2 for kinetic resolution of (S)-flurbiprofen. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 40, 24-29.
- Bai, D.M., Jia, M.Z, Zhao, X.M., Ban, R., Shen, F., Li, X.G., Xu, S.M. (2003) L(+)-Lactic acid production by pellet-form *Rhizopus oryzae* R1021 in a stirred tank fermentor. *Chem. Eng. Sci.* 58, 785-791.
- Bajaj, A., Lohan, P., Jha, P.N., Mehrotra, R. (2010) Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 62, 9-14.
- Bajpai, P. (1999) Application of enzymes in the pulp and paper industry. *Biotechnol. Prog.* 15, 147-157.
- Bakir, Z.B., Metin, K. (2016) Purification and characterization of an alkali-thermostable lipase from thermophilic *Anoxybacillus flavithermus* HBB 134. *J. Microbiol. Biotechnol.* 26, 1087-1097.
- Ben Salah, R., Mosbah, H., Fendri, A., Gargouri, A., Gargouri, Y., Mejdoub, H. (2006) Biochemical and molecular characterization of a lipase produced by *Rhizopus oryzae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 260, 241-248.
- Benny, G.L. (2007 és 2009), <http://www.zygomycetes.org>
- Bloomer, S., Adlercreutz, P., Mattiasson, B. (1990) Triglyceride interesterification by lipases. I. Cocoa butter equivalents from a fraction of palm oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 67, 519-524.
- Brady, L., Brzozowski, A.M., Derewenda, Z.S., Dodson, E., Dodson, G., Tolley, S. Turkenburg, J.P. Christiansen, L., Hüge-Jensen, B., Norskov, L., Thim, L., Menge, U. (1990) A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature* 343, 767-770.
- Brahmachari, G., (2017) Lipase-catalyzed organic transformations: A recent update. In: Brahmachari, G. (ed.) *Biotechnology of microbial enzymes*. Academic Press, Oxford, pp. 325-346.
- Brust, B., Lecoufle, M., Tuailon, E., Dedieu, L., Canaan, S., Valverde, V., Kremer, L. (2011) *Mycobacterium tuberculosis* lipolytic enzymes as potential biomarkers for the diagnosis of active tuberculosis. *PLoS One* 6, e25078.
- Brzozowski, A.M. (1993) Crystallization of a *Humicola lanuginosa* lipase-inhibitor complex with the use of polyethylene glycol monomethyl ether. *Acta Cryst.* D49, 352-354.
- Cammarota, M.C., Freire, D.M.G. (2006) A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content. *Bioresour. Technol.* 97, 2195-2210.

- Cardenas, F., de Castro, M.S., Sanchez-Montero, J.M., Sinisterra, J.V., Valmaseda, M., Elson, S.W., Alvarez, E. (2001) Novel microbial lipases: catalytic activity in reactions in organic media. *Enzyme Microb. Technol.* 28, 145-154.
- 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.
- Castilho, L.R., Polato, C.M.S., Baruque, E.A., Sant'Anna JR., G.L., Freire, D.M.G. (2000) Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. *Biochem. Eng. J.* 4, 239-247.
- Cernia, E., Palocci, C., Soro, S. (1998) The role of the reaction medium in lipase-catalyzed esterifications and transesterifications. *Chem. Phys. Lipids* 93, 157-168.
- Chang, C.T., Hsu, C.K., Chou, S.T., Chen, Y.C., Huang, F.S., Chung, Y.C. (2009) Effect of fermentation time on the antioxidant activities of tempeh prepared from fermented soybean using *Rhizopus oligosporus*. *Int. J. Food Sci. Tech.* 44, 799-806.
- Chattopadhyay, M., Banik, A.K., Raychaudhuri, S. (1999) Production and purification of lipase by a mutant strain of *Rhizopus arrhizus*. *Folia Microbiol.* 44, 37-40.
- Çolak, A., Sisik, D., Saglam, N., Güner, S., Çanakçı, S., Beldüz, A.O. (2005) Characterization of a thermoalkalophilic esterase from a novel thermophilic bacterium, *Anoxybacillus gonensis* G2. *Bioresour. Technol.* 96, 625-631.
- Colin, V.L., Baigori, M.D., Pera, L.M. (2010) Effect of environmental conditions on extracellular lipases production and fungal morphology from *Aspergillus niger* MYA 135. *J. Basic Microbiol.* 50, 52-58.
- Contesini, F.J., Lopes, D.B., Macedo, G.A., da Graca Nascimento, M., de Oliveira Carvalho, P. (2010) *Aspergillus* sp. lipase: Potential biocatalyst for industrial use. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 67, 163-171.
- Cygler, M., Schrag, J.D. (1999) Structure and conformational flexibility of *Candida rugosa* lipase. *Biochim. Biophys. Acta* 1441, 205-214.
- da Silva, A.S.A., de Sá, L.R.V., Aguiéiras, E.C.G., de Souza, M.F., Teixeira, R.S.S., Cammarota, M.C., Bon, E.P.S., Freire, D.M.G., Ferreira-Leitão, V.S. (2017) Productive chain of biofuels and industrial biocatalysis: two important opportunities for Brazilian sustainable development. In: Brahmachari, G. (ed.) Biotechnology of microbial enzymes. Academic Press, Oxford, pp. 545-581.

- Damaso, M.C.T., Passianoto, M.A., de Freitas, S.C., Freire, D.M.G., Lago, R.C.A., Couri, S. (2008) Utilization of agroindustrial residues for lipase production by solid-state fermentation. *Braz. J. Microbiol.* 39, 676-681.
- Davies, J.L., Ngeleka, M., Wobeser, G.A. (2010) Systemic infection with *Mortierella wolfii* following abortion in a cow. *Can. Vet. J.* 51, 1391-1393.
- de Hoog, G.S., Guarro, J., Gene, J., Figueras, M.J. (2000) Atlas of Clinical Fungi, 2nd ed, vol. 1. Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Utrecht, The Netherlands.
- 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* HB2. *Bioresour. Technol.* 100, 3630-3637.
- Demirkol, S., Aksoy, H.A., Tüter, M., Ustun, G., Sasmaz, D.A. (2006) Optimization of enzymatic methanolysis of soybean oil by response surface methodology. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 83, 929-932.
- 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.
- Dobrev, G., Zhekova, B., Nedelcheva, P., Chochkov, R., Krastanov, A. (2011) Characterization of crude lipase from *Rhizopus arrhizus* and purification of multiplicity forms of the enzyme. *Biotechnol. Biotech. Eq.* 25, 2995-2300.
- Dodémont, M., Hites, M., Bailly, B., Trepant, A.L., De Mendonça, R., Denis, O., Jacobs, F., Montesinos, I. (2015) When you can't see the wood for the trees. *Mucor circinelloides*: A rare case of primary cutaneous zygomycosis. *J. Mycol. Med.* 25, 151-154.
- Doukyu, N., Ogino, H. (2010) Organic solvent-tolerant enzymes. *Biochem. Eng. J.* 48, 270-282
- Duan, Z.-Q., Du, W., Liu, D.-H. (2010) Novozym 435-catalyzed 1,3-diacylglycerol preparation via esterification in t-butanol system. *Process Biochem.* 45, 1923-1927.
- Dyal, S.D., Narine, S.S. (2005) Implications for the use of *Mortierella* fungi in the industrial production of essential fatty acids. *Food Res. Int.* 38, 445-467.
- Eastmond, P.J. (2006) *SUGAR-DEPENDENT1* encodes a patatin domain triacylglycerol lipase that initiates storage oil breakdown in germinating *Arabidopsis* seeds. *Plant Cell* 18, 665-675.
- Ebrahimpour, A., Rahman, R.N., Basri, M., Salleh, A.B. (2011) High level expression and characterization of a novel thermostable, organic solvent tolerant, 1,3-regioselective lipase from *Geobacillus* sp. strain ARM. *Bioresour. Technol.* 102, 6972-6981.

- El-Herte, R.I., Baban, T.A., Kanj, S.S. (2012) Mucormycosis: a review on environmental fungal spores and seasonal variation of human disease. *Adv. Infect. Dis.* 2, 76-81.
- Fajardo, A.R., Akoh, C.C., Lai, O.M. (2003) Lipase-catalyzed incorporation of n-3 PUFA into palm oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 80, 1197-1200.
- Falony, G., Armas, J.C., Mendoza, J.C.D., Hernández, J.L.M. (2006) Production of extracellular lipase from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation. *Food Technol. Biotechnol.* 44, 235-240.
- Fernandes, P., Carvalho, F. (2017) Microbial enzymes for the food industry. In: Brahmachari, G. (ed.) *Biotechnology of microbial enzymes*. Academic Press, Oxford, pp. 513-544.
- Ferrarezi, A.L., Ohe, T.H.K., Borges, J.P., Brito, R.R., Siqueira, M.R., Vendramini, P.H., Quilles Jr. J.C., Nunes, C.D., Bonilla-Rodriguez, G.O., Boscolo, M., Da-Silva, R. (2014) Production and characterization of lipases and immobilization of whole cell of the thermophilic *Thermomucor indiciae seudaticae* N31 for transesterification reaction. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 107, 106-113.
- Ferreira, J.A., Lennartsson, P.R., Edebo, L., Taherzadeh, M.J. (2013) Zygomycetes-based biorefinery: Present status and future prospects. *Bioresour. Technol.* 135, 523-532.
- Flood, M.T., Kondo, M. (2003) Safety evaluation of lipase produced from *Rhizopus oryzae*: summary of toxicological data. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 37, 293-304.
- Fu, X., Zheng, J., Ying, X., Yan, H., Wang, Z. (2014) Investigation of Lipozyme TL IM-catalyzed transesterification using ultraviolet spectrophotometric assay. *Chin. J. Catal.* 35, 553-559.
- Garcia-Galan, C., Barbosa, O., Ortiz, C., Torres, R., Rodrigues, R.C., Fernandez-Lafuente, R. (2013) Biotechnological prospects of the lipase from *Mucor javanicus*. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 93, 34-43.
- Gaspar, M.L., Cunningham, M., Pollero, R., Cabello, M. (1999) Occurrence and properties of an extracellular lipase in *Mortierella vinacea*. *Mycologia* 91, 108-113.
- Gilham, D., Lehner, R. (2005) Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro. *Methods* 36, 139-147.
- Gill, I., Valivety, R. (1997) Polyunsaturated fatty acids: Part 1. Occurrence, biological activities and applications. *Trends Biotechnol.* 15, 401-409.
- Gotor-Fernández, V., Gotor, V. (2007) Use of lipases in organic synthesis. In: Polaina, J., MacCabe A.P. (eds.) *Industrial Enzymes. Structure, function and applications*. Springer, Dordrecht, pp. 301-315.

- Gottfredsen, S.E. (1990) Microbial lipases. In: Fogarty W.M., Kelly C.T. (eds.). *Microbial enzymes and biotechnology*. Elsevier Science Publishers Ltd, London, pp. 255-274.
- Goujard, L., Villeneuve, P., Barea, B., Lecomte, J., Pina, M., Claude, S., Le Petit, J., Ferré, E. (2009) A spectrophotometric transesterification-based assay for lipases in organic solvent. *Anal. Biochem.* 385, 161-167.
- Grantina-Ievina, L., Berzina, A., Nikolajeva, V., Mekss, P., Muiznieks, I. (2014) Production of fatty acids by *Mortierella* and *Umbelopsis* species isolated from temperate climate soils. *Environ. Exp. Biol.* 12, 15-27.
- Greenberg, A.S., Shen, W.J., Muliro, K., Patel, S., Souza, S.C., Roth, R.A., Kraemer, F.B. (2001) Stimulation of lipolysis and hormone-sensitive lipase via the extracellular signal-regulated kinase pathway. *J. Biol. Chem.* 276, 45456-45461.
- Gulyamova, K.A., Davranov, K.D. (1995) Properties of two lipases from the fungus *Mucor miehei*. *Chem. Nat. Compd.* 31, 372-375.
- Gunasekaran, V., Das, D. (2005) Lipase fermentation: Progress and prospects. *Indian J. Biotechnol.* 4, 437-445.
- Gupta, R., Gupta, N., Rathi, P. (2004) Bacterial lipases: An overview of production, purification and biochemical properties. *Appl. Microbiol. Biot.* 64, 763-781.
- Gupta, R., Rathi, P., Gupta, N., Bradoo, S. (2003) Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 37, 63-71.
- Haas, M.J., Cichowicz, D.J., Bailey, D.G. (1992) Purification and characterization of an extracellular lipase from the fungus *Rhizopus delemar*. *Lipids* 27, 571-576.
- Haas, M.J., Scott, K.M., Marmer, W.N., Foglia, T.A. (2004) *In situ* alkaline transesterification: an effective method for the production of fatty acid esters from vegetable oils. *Am. Oil Chem. Soc.* 81, (1) 83-89.
- Hachmeister, K.A., Fung, D.Y.C. (1993) Tempeh: a mold-modified indigenous fermented food made from soybeans and/or cereal grains. *Crit. Rev. Microbiol.* 19, 137-188.
- Hasan, F., Shah, A.A., Hameed, A. (2006) Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb. Technol.* 39, 235-251.
- Hasan, F., Shah, A.A., Hameed, A. (2009) Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. *Biotechnol. Adv.* 27, 782-798.
- Hibbett, D.S., Binder, M., Bischoff, J.F., Blackwell, M., Cannon, P.F., *et al.* (2007) A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol. Res.* 111, 509-547.

- Hiol, A., Jonzo, M.D., Druet, D., Comeau, L.C. (1999) Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis* f. *hiemalis*. *Enzyme. Microb. Technol.* 25, 80-87.
- Hiol, A., Jonzo, M.D., Rugani, N., Druet, D., Sarda, L., Comeau, L.C. (2000) Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. *Enzyme Microb. Technol.* 26, 421-430.
- Hoffmann, K., Pawłowska, J., Walther, G., Wrzosek, M., de Hoog, G.S., Benny, G.L., Kirk, P.M., Voigt, K. (2013) The family structure of the Mucorales: a synoptic revision based on comprehensive multigene-genealogies. *Persoonia* 30, 57-76.
- Holland, H.L. (2001) Biotransformation of organic sulfides. *Nat. Prod. Rep.* 18, 171-181.
- Houde, A., Kademi, A., Leblanc, D. (2004) Lipases and their industrial applications. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 118, 155-170.
- Huang, Y., Locy, R., Weete, J.D. 2004. Purification and characterization of an extracellular lipase from *Geotrichum marinum*. *Lipids* 39, 251-257.
- Iftikhar, T., Niaz, M., Jabeen, R., Haq, I.U. (2011) Purification and characterization of extracellular lipases. *Pak. J. Bot.* 43, 1541-1545.
- Iftikhar, T., Hussain, A. (2002) Effects of nutrients on the extracellular lipase production by mutant strain of *Rhizopus oligosporus* TUV-31. *Biotechnology* 1, 15-20.
- Ishihara, H., Okumura, H., Ikezawa, H., Tejima, S. (1975) Studies on lipase from *Mucor javanicus*. *Biochim. Biophys. Acta* 388, 413-417.
- Jaeger, K.E., Ransac, S., Koch, H.B., Ferrato, F., Dijkstra, B.W. (1993) Topological characterization and modeling of the 3D structure of lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett.* 332, 143-149.
- Jaeger, K.E., Dijkstra, B.W., Reetz, M.T. (1999) Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu. Rev. Microbiol.* 53, 315-351.
- Jaeger, K.E., Eggert, T. (2002) Lipases for biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 390-397.
- Jaeger, K.E., Reetz, M.T. (1998) Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends. Biotechnol.* 16, 396-403.
- Javed, M.M., Zahoor, S., Shafaat, S., Mehmooda, I., Gul, A., Rasheed, H., Bukhari, S.A., Aftab, M.N. (2012) Wheat bran as a brown gold: Nutritious value and its biotechnological applications. *Afr. J. Microbiol. Res.* 6, 724-733.

- Jermsuntiea, W., Aki, T., Toyoura, R., Iwashita, K., Kawamoto, S., Ono, K. (2011) Purification and characterization of intracellular lipase from the polyunsaturated fatty acid-producing fungus *Mortierella alliacea*. *New Biotechnol.* 28, 159-164.
- Ji, X.J., Zhang, A.H., Nie, Z.K., Wu, W.J., Ren, L.J., Huang, H. (2014) Efficient arachidonic acid-rich oil production by *Mortierella alpina* through a repeated fed-batch fermentation strategy. *Bioresour. Technol.* 170, 356-360.
- Joseph, B., Ramteke, P.W., Thomas, G., Shrivastava, N. (2007) Standard review cold-active microbial lipases: a versatile tool for industrial applications. *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.* 2, 39-48.
- Kantak, J.B., Prabhune, A.A. (2012) Characterization of smallest active monomeric lipase from novel *Rhizopus* strain: application in transesterification. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 166, 1769-1780.
- Kapoor, M., Gupta, M.N. (2012) Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochem.* 47, 555-569.
- Karigar, C.S., Rao, S.S. (2011) Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: A review. *Enzyme Res.* 2011, 805187.
- Karimi, K., Emtiazi, G., Taherzadeh, M.J. (2006) Ethanol production from dilute-acid pretreated rice straw by simultaneous saccharification and fermentation with *Mucor indicus*, *Rhizopus oryzae*, and *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb. Technol.* 40, 138-144.
- Kheadr, E.E., Vuillemand, J.C., El-Deeb, S.A. (2003) Impact of liposome-encapsulated enzyme cocktails on cheddar cheese ripening. *Food Res. Int.* 36, 241-252.
- Koblitz, M.G.B., Pastore, G.M. (2006) Purification and biochemical characterization of an extracellular lipase produced by a new strain of *Rhizopus* sp. *Cienc. Agrotec.* 30, 494-502.
- Kohno, M., Kugimiya, W., Hashimoto, Y., Morita, Y. (1994) Purification, characterization and crystallization of two types of lipases from *Rhizopus niveus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58, 1007-1012.
- Krishna, H., Divakar, S., Prapulla, S.G., Karanth, N.G. (2001) Enzymatic synthesis of isoamyl acetate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*. *J. Biotechnol.* 87, 193-201.
- Langarica-Fuentes, A., Handley, P.S., Houlden, A., Fox, G., Robson, G.D. (2014) An investigation of thermophilic fungi in composts. *Fungal Ecol.* 11, 132-144.

- Lee, S.C., Li, A., Calo, S., Heitman, J. (2013) Calcineurin plays key roles in the dimorphic transition and virulence of the human pathogenic zygomycete *Mucor circinelloides*. *PLoS Pathog.* 9, e1003625.
- Leite Júnior, B.R.C., Tribst, A.A.L., Cristianini, M. (2015) Influence of high pressure homogenization on commercial protease from *Rhizomucor miehei*: Effects on proteolytic and milk-clotting activities. *LWT-Food Sci. Technol.* 63, 739-744.
- Leite Júnior, B.R.C., Tribst, A.A.L., Cristianini, M. (2016) Comparative effects of high isostatic pressure and thermal processing on the inactivation of *Rhizomucor miehei* protease. *LWT-Food Sci. Technol.* 65, 1050-1053.
- Li, Z., Li, X., Wang, Y., Wang, Y., Wang, F., Jiang, J. (2011) Expression and characterization of recombinant *Rhizopus oryzae* lipase for enzymatic biodiesel production. *Bioresour. Technol.* 102, 9810-9813.
- Li, S., Yang, X., Yang, S., Zhu, M., Wang, X. (2012) Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2, e201209017.
- Lima, V.M.G., Krieger, N., Sarquis, M.I.M., Mitchell, D.A., Ramos, L.P., Fontana, J.D. (2003) Effect of nitrogen and carbon sources on lipase production by *Penicillium aurantiogriseum*. *Food Technol. Biotechnol.* 41, 105-110.
- Lineweaver, H., Burk, D. (1934) The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.* 56, 658-666.
- Liu, Y.Y., Xu, J.H., Hu, Y. (2000) Enhancing effect of Tween-80 on lipase performance in enantioselective hydrolysis of ketoprofen ester. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 10, 523-529.
- Lopez, N., Pernas, M.A., Pastrana, L.M., Sánchez, A., Valero, F., Rúa, M.L. (2004) Reactivity of pure *Candida rugosa* lipase isoenzymes (Lip1, Lip2, and Lip3) in aqueous and organic media. Influence of the isoenzymatic profile on the lipase performance in organic media. *Biotechnol. Progr.* 20, 65-73.
- Lortie, R. (1997) Enzyme catalyzed esterification. *Biotechnol. Adv.* 15, 1-15.
- 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.
- Maas, R.H.W., Bakker, R.R., Eggink, G., Weusthuis, R.A. (2006) Lactic acid production from xylose by the fungus *Rhizopus oryzae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72, 861-868.
- Madalozzo, A.D., Muniz, L.S., Baron, A.M., Piovan, L., Mitchell, D.A., Krieger, N. (2014) Characterization of an immobilized recombinant lipase from *Rhizopus oryzae*: synthesis of ethyl-oleate. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 3, 13-19.

- Madeira Jr, J.V., Contesini, F.J., Calzado, F., Rubio, M.V., Zubieta, M.P., Lopes, D.B., de Melo, R.R. (2017) Agro-industrial residues and microbial enzymes: An overview on the eco-friendly bioconversion into high value-added products. In: Brahmachari, G. (ed.) *Biotechnology of microbial enzymes*. Academic Press, Oxford, pp. 475-511.
- Mala, J.G.S., Edwinoliver, N.G., Kamini, N.R., Puvanakrishnan, R. (2007) Mixed substrate solid state fermentation for production and extraction of lipase from *Aspergillus niger* MTCC 2594. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 53, 247-253.
- 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.
- Martins, A.B., da Silva, A.M., Schein, M.F., Garcia-Galan, C., Ayub, M.A.Z., Fernandez-Lafuente, R., Rodrigues, R.C. (2014) Comparison of the performance of commercial immobilized lipases in the synthesis of different flavor esters. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 105, 18-25.
- Mateos Diaz, J.C., Rrodríguez, J.A., Roussos, S., Cordova, J., Abousalham, A., Carriere, F., Baratti, J. (2006) Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. *Enzyme Microb. Technol.* 39, 1042-1050.
- McIlvaine, T.C. (1921) A buffer solution for colorimetric comparison. *J. Biol. Chem.* 49, 183-186.
- Meilleur, C., Hupé, J.-F., Juteau, P., Shareck, F. (2009) Isolation and characterization of a new alkali-thermostable lipase cloned from a metagenomic library. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36, 853-861.
- Melo, L.L.M.M., Pastore, G.M., Macedo, G.A. (2005) Optimized synthesis of citronellyl flavour esters using free and immobilized lipase from *Rhizopus* sp. *Process Biochem.* 40, 3181-3185.
- Mhetras, N.C., Bastawde, K.B., Gokhale, D.V. (2009) Purification and characterization of acidic lipase from *Aspergillus niger* NCIM 1207. *Bioresour. Technol.* 100, 1486-1490.
- Miller, G.C., Long, C.U.J., Bojilova, E.D., Marchandier, D., Badellino, K.O., Blanchard, N., Fuki, I.V., Glick, J.M., Rader, D.J. (2004) Role of N-linked glycosylation in the secretion and activity of endothelial lipase. *J. Lipid Res.* 45, 2080-2087.
- Mohamed, S.A., Abdel-Mageed, H.M., Tayel, S.A., El-Nabrawi, M.A., Fahmy, A.S. (2011) Characterization of *Mucor racemosus* lipase with potential application for the treatment of cellulite. *Process Biochem.* 46, 642-648.

- Mohamed, S.S., El-Hadi, A.A. (2010) One step production of 11 α -hydroxy progesterone, hydrocortisone and prednisolone from progesterone by *Mucor racemosus* NRRL 3631. *Int. J. Acad. Res.* 2, 124-130.
- Mukherjee, K.D. (1994) Plant lipases and their application in lipid biotransformations. *Prog. Lipid Res.* 33, 165-174.
- Müller, G., Petry, S. (eds.) (2004) Lipases and phospholipases in drug development: from biochemistry to molecular pharmacology. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany
- Nagarajan, S. (2012) New tools for exploring “old friends-microbial lipases”. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 168, 1163-1196.
- Nakajima, N., Nozaki, N., Ishihara, K., Ishikawa, A., Tsuji, H. (2005) Analysis of isoflavone content in tempeh, a fermented soybean, and preparation of a new isoflavone-enriched tempeh. *J. Biosci. Bioeng.* 100, 685-687.
- Namoodiri, V.M., Chattopadhyaya, R. (2000) Purification and biochemical characterization of a novel thermostable lipase from *Aspergillus niger*. *Lipids* 35, 495-502.
- Nelson, L.A., Foglia, T.A., Marmer, W.N. (1996) Lipase-catalyzed production of biodiesel. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73, 1191-1195.
- Noel, M., Combes, D. (2003) *Rhizomucor miehei* lipase: differential scanning calorimetry and pressure/temperature stability studies in presence of soluble additives. *Enzyme Microb. Tech.* 33, 299-308.
- Oda, K., Kakizono, D., Yamada, O., Iefuji, H., Akita, O., Iwashita, K. (2006) Proteomic analysis of extracellular proteins from *Aspergillus oryzae* grown under submerged and solid-state culture conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 3448-3457.
- Orlowski, M. (1991) *Mucor* dimorphism. *Microbiol. Rev.* 55, 234-258.
- Outtrup, H., Boyce, C.O.L (1990) Microbial proteinases and biotechnology. In: Fogarty, W.M., Kelly, C.T. (eds.) *Microbial Enzymes and Biotechnology*. Elsevier Science Publishers Ltd, London, pp. 227-254.
- Palla, C.A., Pacheco, C., Carrín, M.E. (2012) Production of structured lipids by acidolysis with immobilized *Rhizomucor miehei* lipases: selection of suitable reaction conditions. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 76, 106-115.
- Palomo, J.M., Fernández-Lorente, G., Guisán, J.M., Fernández-Lafuente, R. (2007) Modulation of immobilized lipase enantioselectivity via chemical amination. *Adv. Synth. Catal.* 349, 1119-1127.

- Pandey, A., Sailas, B., Soccol, C.R., Nigam, P., Krieger, N., Soccol, V.T. (1999) The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 29, 119-131.
- Papp, T., Ács, K., Nyilasi, I., Nagy, E., Vágvölgyi, Cs. (2003) Phylogenetic relationship of the genus *Gilbertella* and related genera within the order Mucorales based on 5.8 S ribosomal DNA sequences. *Acta Biol. Hung.* 54, 393–402.
- Papp, T., Velayos, A., Bartók, T., Eslava, A.P., Vágvölgyi, Cs., Iturriaga, E.A. (2005) Heterologous expression of astaxanthin biosynthesis genes in *Mucor circinelloides*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69, 526-531.
- Papp, T., Nyilasi, I., Csernetics, Á., Nagy, G., Takó, M., Vágvölgyi, Cs. (2016) Improvement of industrially relevant biological activities in Mucoromycotina fungi In: Schmoll, M., Dattenböck, C. (eds.) Gene expression systems in fungi: Advancements and applications. Cham: Springer International Publishing, 97-118.
- Patel, A.K., Singhanian, Pandey, A. (2017) Production, purification, and application of microbial enzymes. In: Brahmachari, G. (ed.) Biotechnology of microbial enzymes. Academic Press, Oxford, pp. 13-41.
- Pirozzi, D., Greco, G. (2006) Lipase-catalyzed transformations for the synthesis of butyl lactate: a comparison between esterification and transesterification. *Biotechnol. Prog.* 22, 444-448.
- Pleiss, J., Fischer, M., Schmid, R.D. (1998) Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. *Chem. Phys. Lipids* 93, 67-80.
- Plou, F.J., Ferrer, M., Ballesteros, A. (2003) Transesterification-biological. In: Horváth I.T. (ed.) Encyclopedia of Catalysis. Wiley Interscience, New York, pp. 483-506.
- Pouderoyen, G., Eggert, T., Jaeger, K.-E., Dijkstra, B.W. (2001) The crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase: a minimal *a/b* hydrolase fold enzyme. *J. Mol. Biol.* 309, 215-226.
- Rahman, R.N.Z.R.A., Baharum S.N., Basri, M., Salleh, A.B. (2005) High-yield purification of an organic solvent-tolerant lipase from *Pseudomonas sp.* strain S5. *Anal. Biochem.* 341, 267-274.
- Rajan, A., Nair, J. (2011) A comparative study on alkaline lipase production by a newly isolated *Aspergillus fumigatus* MTCC 9657 in submerged and solid-state fermentation using economically and industrially feasible substrate. *Turk. J. Biol.* 35, 569-574.
- Ranganathan, S.V., Narasimhan, S.L., Muthukumar, K. (2008) An overview of enzymatic production of biodiesel. *Bioresour. Technol.* 99, 3975–3981.

- Rapp, P., Backhaus, S. (1992) Formation of extracellular lipases by filamentous fungi, yeasts, and bacteria. *Enzyme Microb. Technol.* 14, 938-943.
- Ray, A. (2012) Application of lipase in industry. *Asian J. Pharm. Tech.* 2, 33-37.
- Ray, R.C., Behera, S.S. (2017) Solid state fermentation for production of microbial cellulases. In: Brahmachari, G. (ed.) *Biotechnology of microbial enzymes*. Academic Press, Oxford, pp. 43-79.
- Ray, R.C., Ravi, V. (2005) Post harvest spoilage of sweetpotato in tropics and control measures. *Crit. Rev. Food Sci.* 45, 623-644.
- Razak, C.N., Salleh, A.B., Musani, R., Samad, M.Y., Basri, M. (1997) Some characteristics of lipases from thermophilic fungi isolated from palm oil mill effluent. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 3, 153-159.
- Rehm, S., Trodler, P., Pleiss, J. (2010) Solvent-induced lid opening in lipases: A molecular dynamics study. *Protein Sci.* 19, 2122-2130.
- Rehman, S., Bhatti, H.N., Bhatti, I.A., Asgher, M. (2011) Optimization of process parameters for enhanced production of lipase by *Penicillium notatum* using agricultural wastes. *Afr. J. Biotechnol.* 10, 19580-19589.
- Ribeiro, D.B., de Castro, A.M., Coelho, M.A.Z., Freire, D.M.G. (2011) Production and use of lipases in bioenergy: a review from the feedstocks to biodiesel production. *Enzyme Res.* 2011, 615803.
- Rodrigues, R.C., Fernandez-Lafuente, R. (2010) Lipase from *Rhizomucor miehei* as an industrial biocatalyst in chemical process, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 64, 1-22.
- Rodrigues, R.C., Volpato, G., Wada, K., Ayub, M.A.Z. (2008) Enzymatic synthesis of biodiesel from transesterification reactions of vegetable oils and short chain alcohols. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 85, 925-930.
- Sahoo, R.K., Kumar, M., Sukla, L.B., Subudhi, E. (2016) Bioprospecting hot spring metagenome: lipase for the production of biodiesel. *Environ. Sci. Pollut. R.* doi:10.1007/s11356-016-8118-7
- Saising, J., Singdam, S., Ongsakul, M., Voravuthikunchai, S.P. (2012) Lipase, protease, and biofilm as the major virulence factors in staphylococci isolated from acne lesions. *Biosci. Trends.* 6, 160-164.
- Saito, S., Michailides, T.J., Xiao, C.L. (2016) Mucor rot - An emerging postharvest disease of mandarin fruit caused by *Mucor piriformis* and other *Mucor* spp. in California. *Plant Dis.* 100, 1054-1063.

- Salameh, M.A., Wiegel, J. (2007) Purification and characterization of two highly thermophilic alkaline lipases from *Thermosyntropha lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 7725-7731.
- Salar, R.K., Aneja, K.R. (2007) Thermophilic fungi: taxonomy and biogeography. *J. Agr. Technol.* 3, 77-107.
- Salem, E.A., Youssef, K., Sanzani, S.M. (2016) Evaluation of alternative means to control postharvest *Rhizopus* rot of peaches. *Scientia Horticulturae.* 198, 86-90.
- Salihu, A., Alam, Z., Abdulkarim, M.I., Salleh, H.M. (2012) Lipase production: an insight in the utilization of renewable agricultural residues. *Resour. Conserv. Recy.* 58, 36-44.
- Salis, A., Monduzzi, M., Solinas, V. (2007) Use of lipases for the production of biodiesel. In: Polaina, J., Maccabe A.P. (eds.) *Industrial enzymes. Structure, function and applications*. Springer, Dordrecht, pp. 317-339.
- Salis, A., Pinna, M., Monduzzi, M., Solinas, V. (2005) Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysis. *J. Biotechnol.* 119, 291-299.
- Salleh, A.B., Musani, R., Basri, M., Ampon, K., Yunus, W.M.Z., Razak, C.N.A. (1993) Extra- and intracellular lipases from a thermophilic *Rhizopus oryzae* and factors affecting their production. *Can. J. Microbiol.* 39, 978-981.
- Sanchez, S., Demain, A.L. (2017) Useful microbial enzymes - An introduction. In: Brahmachari, G. (ed.) *Biotechnology of microbial enzymes*. Academic Press, Oxford, pp. 1-11.
- Sánchez-Blanco M.J., Ferrández, T., Morales, M.A., Morte, A., Alarcón, J.J. (2004) Variations in water status, gas exchange, and growth in *Rosmarinus officinalis* plants infected with *Glomus deserticola* under drought conditions. *J. Plant Physiol.* 161, 675-682.
- Saran, S., Mahajan, R.V., Kaushik, R., Isar, J., Saxena, R.K. (2013) Enzyme mediated beam house operations of leather industry: a needed step towards greener technology. *J. Clean. Prod.* 54, 315-322.
- Saxena, R.K., Agarwal, L., Meghwanshi, G.K. (2005) Diversity of fungal and yeast lipases: Present and future scenario for the 21st century. In: Satyanarayana, T., Johri, B.N. (eds.) *Microbial diversity: Current perspectives and potential applications*. I.K. International Publishing House Pvt Ltd, New Delhi, pp. 791-814.
- Saxena, R.K., Sheoran, A., Giri, B., Davidson, W. S. (2003) Purification strategies for microbial lipases. *J. Microbiol. Meth.* 52, 1-18.
- Schmid, A., Dordick, J.S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M., Witholt, B. (2001) Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* 409, 258-268.

- Setzu, S., Salis, S., Demontis, V., Salis, A., Monduzzi, M., Mula, G. (2007) Porous silicon-based potentiometric biosensor for triglycerides. *Phys. stat. sol. (a)* 204, 1434-1438.
- Sharma, D., Sharma, B., Shukla, A.K. (2011) Biotechnological approach of microbial lipase: A review. *Biotechnology*, 10, 23-40.
- Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U.C. (2001) Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnol. Adv.* 19, 627-662.
- Sharma, S., Kanwar, S.S. (2014) Organic solvent tolerant lipases and applications. *Sci. World J.* 2014, 625258.
- Sharon, C., Furugoh, S., Yamakido, T., Ogawa, H., Kato, Y. (1998) Purification and characterization of a lipase from *Pseudomonas aeruginosa* KKA-5 and its role in castor oil hydrolysis. *J. Ind. Microbiol. Biot.* 20, 304-307.
- Shrestha, B., Theerathavaj, M.L., Thaweboon, S., Thaweboon, B. (2012) In vitro antimicrobial effects of grape seed extract on peri-implantitis microflora in craniofacial implants. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2, 822-825.
- Silva, J.E.S., Jesus, P.C. (2003) Evaluation of the catalytic activity of lipases immobilized on chrysotile for esterification. *An. Acad. Bras. Cienc.* 75, 157-162.
- Simon, C., Daniel, R. (2011) Metagenomic analyses: past and future trends. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 1153-116.
- Singh, A.K., Mukhopadhyay, M. (2012) Overview of fungal lipase: A review. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 166, 486-520.
- Soumanou, M.M., Bornscheuer, U.T. (2003) Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil. *Enzyme Microb. Technol.* 33, 97-103.
- Spatofora, J.W., Chang, Y., Benny, G.L., Lazarus, K., Smith, M.E., Berbee, M.E., Bonito, G. et al. (2016) A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia*, 108 (5), 1028–1046.
- Speranza, P., Macedo, G.A. (2012) Lipase-mediated production of specific lipids with improved biological and physicochemical properties. *Process Biochem.* 47, 1699-1706.
- Stehr, F., Kretschmar, M., Kröger, C., Hube, B., Schäfer, W. (2003) Microbial lipases as virulence factors. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 22, 347-355.
- Sumantha, A., Larroche, C., Pandey, A. (2006) Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: A perspective. *Food Technol. Biotechnol.* 44, 211-220.
- Sun, J., Yu, B., Curran, P., Liu, S.-Q. (2012) Lipase-catalysed transesterification of coconut oil with fusel alcohols in a solvent-free system. *Food Chem.* 134, 89-94.

- Sun, S.Y., Xu, Y. (2008) Solid-state for 'whole-cell synthetic lipase' production from *Rhizopus chinensis* and identification of the functional enzyme. *Process Biochem.* 43, 219-224.
- Sun, S.Y., Xu, Y. (2009) Membrane-bound 'synthetic lipase' specifically cultured under solid-state fermentation and submerged fermentation by *Rhizopus chinensis*: A comparative investigation. *Bioresour. Technol.* 100, 1336-1342.
- Sun, S.Y., Xu, Y., Wang, D. (2009) Novel minor lipase from *Rhizopus chinensis* during solid-state fermentation: biochemical characterization and its esterification potential for ester synthesis. *Bioresour. Technol.* 100, 2607-2612.
- Suzuki, M., Yamamoto, H., Mizugaki M. (1986) Purification and general properties of a metal-insensitive lipase from *Rhizopus japonicus* NR 400. *J. Biochem.* 100, 1207-1213.
- Sztajer, H., Lunsdorf, H., Erdman, H., Menge, U., Schmid, R. (1992) Purification and properties of lipase from *Penicillium simplicissimum*. *Biochim. Biophys. Acta* 1124, 253-261.
- Talon, R., Montel, M.-C., Berdague, J.-L. (1996) Production of flavor esters by lipases of *Staphylococcus warneri* and *Staphylococcus xylosus*. *Enzyme Microb. Technol.* 19, 620-622.
- Tan, T., Lu, J., Nie, K., Deng, Li., Wang, F. (2010) Biodiesel production with immobilized lipase: A review. *Biotechnol. Adv.* 28, 628-634.
- Tecelão, C., Silva, J., Dubreucq, E., Ribeiro, M.H., Ferreira-Dias, S. (2010) Production of human milk fat substitutes enriched in omega-3 polyunsaturated fatty acids using immobilized commercial lipases and *Candida parapsilosis* lipase/acyltransferase. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 65, 122-127.
- Teng, Y., Xu, Y. (2007) A modified *para*-nitrophenyl palmitate assay for lipase synthetic activity determination in organic solvent. *Anal. Biochem.* 363, 297-299.
- Teng, Y., Xu, Y., Wang, D. (2009) Production and regulation of different lipase activities from *Rhizopus chinensis* in submerged fermentation by lipids. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 57, 292-298.
- Toida, J., Arikawa, Y., Kondou, K., Fukuzawa, M., Sekiguchi, J. (1998) Purification and characterization of triacylglycerol lipase from *Aspergillus oryzae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62, 759-763.
- Torres, P., Reyes-Duarte, D., Ballesteros, A., Plou, F.J. (2012) Lypase-catalyzed modification of phenolic antioxidants. In: Sandoval, G. (ed.) Lipases and phospholipases: methods and protocols, Methods in molecular biology. Humana Press, New York, pp. 435-443.
- Tran, D.T., Chen, C.L., Chang, J.S. (2013) Effect of solvents and oil content on direct transesterification of wet oil-bearing microalgal biomass of *Chlorella vulgaris* ESP-31

- for biodiesel synthesis using immobilized lipase as the biocatalyst. *Bioresour. Technol.* 135, 213-221.
- Treichel, H., de Oliveira, D., Mazutti, M.A., Di Luccio M., Oliveira, J.V. (2010) A review on microbial lipases production. *Food Bioprocess. Tech.* 3, 182-196.
- Trofa, D., Soghier, L., Long, C., Nosanchuk, J.D., Gacser, A., Goldman, D.L. (2011) A rat model of neonatal candidiasis demonstrates the importance of lipases as virulence factors for *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*. *Mycopathologia* 172, 169-178.
- ul-Haq, I., Idrees, S., Rajoka, M.I. (2002) Production of lipases by *Rhizopus oligosporus* by solid-state fermentation. *Process Biochem.* 37, 637-641.
- Ülker, S., Karaoğlu, S.A. (2012) Purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis* f. *corticola* isolated from soil. *J. Biosci. Bioeng.* 114, 385-390.
- Vágvölgyi, Cs., Magyar, K., Papp, T., Palágyi, Z., Ferenczy, L., Nagy, Á. (1996) Value of substrate utilization data for characterization of *Mucor* isolates. *Can. J. Microbiol.* 42, 613-616.
- Vágvölgyi, Cs., Vastag, M., Ács, K., Papp, T. (1999) *Rhizomucor tauricus*: a questionable species of the genus. *Mycol. Res.* 103, 1318-1322.
- van Heerden, I., Cronjé, C., Swart, S.H., Kotzé, J.M. (2002) Microbial, chemical and physical aspects of citrus waste composting. *Bioresour. Technol.* 81, 71-76.
- Varma, M.N., Madras, G., (2010) Effect of chain length of alcohol on the lipase-catalyzed esterification of propionic acid in supercritical carbondioxide. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 160, 2342-2354.
- Villeneuve, P., Muderhwa, J.M., Graille, J., Haas, M.J. (2000) Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 9, 113-148.
- Wagner, L., Stielow, B., Hoffmann, K., Petkovits, T., Papp, T., Vágvölgyi, Cs., de Hoog, G.S., Verkley, G., Voigt, K. (2013) A comprehensive molecular phylogeny of the Mortierellales (Mortierellomycotina) based on nuclear ribosomal DNA. *Persoonia* 30, 77-93.
- Wang, D., Xu, Y., Shan, T. (2008) Effects of oils and oil-related substrates on the synthetic activity of membrane-bound lipase from *Rhizopus chinensis* and optimization of the lipase fermentation media. *Biochem. Eng. J.* 41, 30-37.
- Wang, Y.N., Liu, X.Y., Zheng, R.Y. (2013) Four new species records of *Umbelopsis* (Mucoromycotina) from China. *J. Mycol.* 2013, 970216.

- Winkler, F.K., D'Arcy, A., Hunziker, W. (1990) Structure of human pancreatic lipase. *Nature* 343, 771-774.
- Wu, X.Y., Jaaskelainen, S., Linko, Y.Y. (1996) Purification and partial characterization of *Rhizomucor miehei* lipase for ester synthesis. *Appl. Biochem. Biotech.* 59, 145-150.
- Xu, Y., Wang, D., Mu, X.Q., Zhao, G.A., Zhang, K.C. (2002) Biosynthesis of ethyl esters of short-chain fatty acids using whole-cell lipase from *Rhizopus chinensis* CCTCCM 201021 in non-aqueous phase. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 18, 29-37.
- Yan, Q., Duan, X., Liu, Y., Jiang, Z., Yang, S. (2016) Expression and characterization of a novel 1,3-regioselective cold-adapted lipase from *Rhizomucor endophyticus* suitable for biodiesel synthesis. *Biotechnol. Biofuels* 9, 86.
- Yasuda, M., Ogino, H., Kiguchi, T., Kotani, T., Takakura, S., Ishibashi, T., Nakashima, T., Fukuda, H., Ishikawa, H. (1999) Purification and characterization of lipase from *Rhizopus chinensis* cells. *J. Biosci. Bioeng.* 88, 571-573.
- Yu, X.W., Wang, L.L., Xu, Y. (2009) *Rhizopus chinensis* lipase: Gene cloning, expression in *Pichia pastoris* and properties. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 57, 304-311.
- Yu, X.-W., Xu, Y., Xiao, R. (2016) Lipases from the genus *Rhizopus*: Characteristics, expression, protein engineering and application. *Prog. Lipid Res.* 64, 57-68.
- Yücel, S., Terzioğlu, P., Özçimen, D. (2012) Lipase applications in biodiesel production. In: Fang, Z. (ed.) Biodiesel- feedstocks, production and applications. InTech d.o.o, Rijeka, pp. 209-250.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A dolgozatban ismertetett kísérleti munka az SZTE TTIK Mikrobiológiai Tanszéken készült.

Köszönöm Prof. Dr. Vágvölgyi Csaba tanszékvezetőnek, hogy a tanszéken munkámat lehetővé tette és támogatta.

Köszönettel tartozom témavezetőimnek, Dr. Papp Tamásnak és Dr. Takó Miklósnak, hogy szakdolgozó korom óta figyelemmel kísérték és ösztönözték munkásságomat. Hálával tartozom hasznos elméleti és gyakorlati tanácsaikért, és a munkám alatt nyújtott sokrétű, önzetlen támogatásukért, valamint hozzájárulásukért szakmai fejlődésemhez.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Szekeres Andrásnak és Kecskeméti Anitának a gázkromatográfiás méréseknél, valamint a szintézis vizsgálatoknál nyújtott elméleti segítségükért, tanácsaikért.

Köszönettel tartozom szakdolgozómnak, Sója Andreának, aki a dolgozatban is ismertetett témán dolgozott.

Köszönet illeti a 312. labor minden dolgozóját, a laborban nyújtott segítségükért, baráti szavaikért, mellyel nagymértékben segítettek munkámat: Dr. Kocsubé Sándor, Kiss Noémi, Kerekes Erika Beáta, Dr. Baranyi Nikolett, Nacsá-Farkas Elvira, Dr. Homa Mónika, Szarkándi János Gergő és Vidács Anita. Külön köszönet illeti a fehérje-munkában nyújtott segítségét Dr. Virágh Máténak, Tóth Liliánának és Dr. Galgóczy Lászlónak.

Hálás vagyok Lele Máriának és Deákné Kulcsár Melindának a munkám során nyújtott technikai segítségért.

Továbbá köszönettel tartozom a SZTE Mikrobiológiai Tanszék valamennyi dolgozójának, aki bármilyen módon segítette dolgozatom elkészülését.

Hálásan köszönöm szüleimnek, testvéremnek, páromnak, barátaimnak, hogy mindvégig mellettem álltak, támogattak, biztattak, így hozzásegítettek dolgozatom elkészítéséhez.

10. MELLÉKLETEK

1. sz. melléklet. A dolgozatban vizsgált izolátumok törzsgyűjteményben szereplő azonosító számai és eredetük.

Izolátum neve	Törzsgyűjtemény azonosító ^a	Eredet	Izolátum neve	Törzsgyűjtemény azonosító ^a	Eredet
<i>Dissophora decumbens</i>	CBS 301.87	tölgy-juhar fahulladék / USA	<i>Mucor plumbeus</i>	MUFS 169	- / -
<i>Dissophora ornata</i>	CBS 348.77	erdőtálat / Kolumbia	<i>Mucor psychrophilus</i>	CBS 288.71	juh trágya / Oroszország
<i>Gamsiella multidivariata</i>	CBS 227.78	korhadat fa / Oroszország	<i>Mucor racemosus</i> f. <i>chibinensis</i>	CBS 636.67	talaj / Oroszország
<i>Gilbertella persicaria</i>	SZMC 247	őszibarack / Kalifornia, USA	<i>Mucor racemosus</i> f. <i>sphaerosporus</i>	CBS 115.08	- / Norvégia
<i>Gilbertella persicaria</i>	SZMC 11086	őszibarack / Kalifornia, USA	<i>Mucor strictus</i>	CBS 576.66	talaj / Ausztria
<i>Gilbertella persicaria</i>	SZMC 11087	őszibarack / Kalifornia, USA	<i>Mucor zonatus</i>	CBS 148.69	talaj / Németország
<i>Gilbertella persicaria</i>	SZMC 11088	őszibarack / Kalifornia, USA	<i>Rhizomucor miehei</i>	NRRL 3169	- / Kalifornia, USA
<i>Gilbertella persicaria</i>	SZMC 11089	őszibarack / Kalifornia, USA	<i>Rhizomucor miehei</i>	NRRL 5282	- / India
<i>Gilbertella persicaria</i>	SZMC 11090	őszibarack / Kalifornia, USA	<i>Rhizomucor miehei</i>	NRRL 5284	rothadó alma / USA
<i>Gilbertella persicaria</i>	SZMC 11091	őszibarack / Kalifornia, USA	<i>Rhizomucor miehei</i>	NRRL 5901	tehén placenta / Dakota, USA
<i>Gilbertella persicaria</i>	SZMC 11092	őszibarack / Kalifornia, USA	<i>Rhizomucor miehei</i>	NRRL 6303	- / -
<i>Gilbertella persicaria</i>	SZMC 11093	őszibarack / Kalifornia, USA	<i>Rhizomucor miehei</i>	ETH M4918	komposzt / Svájc
<i>Gilbertella persicaria</i>	SZMC 11094	őszibarack / Kalifornia, USA	<i>Rhizomucor miehei</i>	CBS 370.71	humán köpet / Hollandia
<i>Gilbertella persicaria</i>	SZMC 11095	őszibarack / Kalifornia, USA	<i>Rhizomucor miehei</i>	SZMC 11011	- / -
<i>Gilbertella persicaria</i>	SZMC 11096	őszibarack / Kalifornia, USA	<i>Rhizomucor miehei</i>	CBS 360.92	humán mikózis / Ausztrália

Izolátum neve	Törzsgyűjtemény azonosító ^a	Eredet	Izolátum neve	Törzsgyűjtemény azonosító ^a	Eredet
<i>Gilbertella persicaria</i>	SZMC 11097	őszibarack / Kalifornia, USA	<i>Rhizomucor pusillus</i>	NRRL 2543	állati mikózis / Anglia
<i>Gilbertella persicaria</i>	SZMC 11098	nektarin / Kalifornia, USA	<i>Rhizomucor pusillus</i>	SZMC 11001	- / -
<i>Gilbertella persicaria</i>	SZMC 11099	nektarin / Kalifornia, USA	<i>Rhizomucor pusillus</i>	SZMC 11002	- / -
<i>Gilbertella persicaria</i>	SZMC 11100	nektarin / Kalifornia, USA	<i>Rhizomucor pusillus</i>	SZMC 11010	- / -
<i>Mortierella alpina</i>	CBS 210.32	homokos talaj / Ausztrália	<i>Rhizomucor pusillus</i>	ETH M4920	trachea váladék / Svájc
<i>Mortierella amoeboides</i>	CBS 889.72	<i>Chromelosporium</i> sp. / Németország	<i>Rhizomucor pusillus</i>	WRLCN(M)231	állati mikózis / Anglia
<i>Mortierella angusta</i>	CBS 293.61	podzol talaj / Nagy-Britannia	<i>Rhizomucor pusillus</i>	FRR 2490	- / Ausztrália
<i>Mortierella antarctica</i>	CBS 609.70	sziklahasadék / Antarktisz típus	<i>Rhizomucor pusillus</i>	SZMC 11017	- / Lengyelország
<i>Mortierella armillariicola</i>	CBS 914.73	<i>Armillaria mellea</i> / Hollandia	<i>Rhizomucor pusillus</i>	FRR 1652	- / -
<i>Mortierella beljakovae</i>	CBS 123.72	talaj / Ukrajna	<i>Rhizomucor pusillus</i>	NRRL 6304	- / -
<i>Mortierella camargensis</i>	CBS 221.58	homokos talaj / Franciaország	<i>Rhizomucor pusillus</i>	NRRL 6401	- / Kalifornia, USA
<i>Mortierella chlamydospora</i>	CBS 120.34	<i>Antirrhinum majus</i> / ismeretlen	<i>Rhizomucor pusillus</i>	NRRL 3638	vízartály / Wisconsin, USA
<i>Mortierella clausenii</i>	CBS 294.59	talaj / Svájc; típus törzs	<i>Rhizomucor pusillus</i>	CBS 354.68	kukorica / Hollandia
<i>Mortierella clonocystis</i>	CBS 357.76	talaj / Spanyolország	<i>Rhizomucor pusillus</i>	CBS 184.67	lótrágya / Nevada, USA
<i>Mortierella cogitans</i>	CBS 879.97	fakéreg / Japán	<i>Rhizomucor pusillus</i>	NRRL 3469	- / Kalifornia, USA
<i>Mortierella cystojenkinii</i>	CBS 456.71	mezőgazdasági talaj / Hollandia	<i>Rhizomucor pusillus</i>	SZMC 11026	- / -
<i>Mortierella dichotoma</i>	CBS 221.35	egér ürülék / Németország	<i>Rhizomucor pusillus</i>	SZMC 11027	klinikai izolátum / Szeged, Magyarország
<i>Mortierella echinosphaera</i>	CBS 575.75	begónia / Hollandia	<i>Rhizomucor pusillus</i>	NRRL 6399	denevér ürülék / India

Izolátum neve	Törzsgyűjtemény azonosító ^a	Eredet	Izolátum neve	Törzsgyűjtemény azonosító ^a	Eredet
<i>Mortierella elongatula</i>	CBS 488.70	városi hulladék / Németország	<i>Rhizopus homotallicus</i>	NRRL 2538	talaj / Guatemala
<i>Mortierella epicladia</i>	CBS 355.76	talaj / Spanyolország	<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>oligosporus</i>	NRRL 2710	tempeh / Indonézia
<i>Mortierella epigama</i>	CBS 489.70	városi hulladék / Németország	<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>oligosporus</i>	NRRL 514	tempeh / Indonézia
<i>Mortierella exigua</i>	CBS 655.68	mezőgazdasági talaj / India	<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>rhizopodiformis</i>	CBS 220.92	humán mikózis / Hollandia
<i>Mortierella gamsii</i>	CBS 749.68	talaj / Hollandia	<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>rhizopodiformis</i>	CBS 102.277	humán mikózis / Japán
<i>Mortierella gamsii</i>	CBS 253.36	erdei talaj / Németország	<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>rhizopodiformis</i>	SZMC 13647	- / -
<i>Mortierella gamsii</i>	CBS 314.52	erdei talaj / Németország	<i>Rhizopus niveus</i>	CBS 403.51	- / Japán
<i>Mortierella gemmifera</i>	CBS 134.45	fenyőerdő talaj / Nagy-Britannia	<i>Rhizopus oryzae</i>	SZMC 13611	cukkini / Kalifornia, USA
<i>Mortierella globulifera</i>	CBS 858.70	<i>Dactylis glomerata</i> gyökér / Anglia	<i>Rhizopus oryzae</i>	SZMC 13616	füge / Kalifornia, USA
<i>Mortierella globulifera</i>	CBS 417.64	talaj / Németország	<i>Rhizopus oryzae</i>	SZMC 495	- / Szeged, Magyarország
<i>Mortierella histoplasmatoides</i>	CBS 321.78	trágya / USA	<i>Rhizopus oryzae</i>	SZMC 502	- / Szeged, Magyarország
<i>Mortierella horticola</i>	CBS 305.52	- / Németország	<i>Rhizopus oryzae</i>	MUFS R5	- / Dél-Afrika
<i>Mortierella humilis</i>	CBS 222.35	fenyőerdő talaja / Mexikó	<i>Rhizopus oryzae</i>	SZMC 497	- / Szeged, Magyarország
<i>Mortierella hyalina</i>	CBS 306.52	komposzt / Németország	<i>Rhizopus oryzae</i>	NRRL 1526	tempeh / Illinois, USA
<i>Mortierella hyalina</i>	CBS 115655	<i>Triticum aestivum</i> / London, Anglia	<i>Rhizopus oryzae</i>	NRRL 2908	kínai élesztő / Kína
<i>Mortierella hypsycladia</i>	CBS 116202	denevér ürülék / Japán	<i>Rhizopus oryzae</i>	CBS 112.07	- / Hollandia
<i>Mortierella kuhlmanii</i>	CBS 157.71	<i>Pinus palustris</i> / USA	<i>Rhizopus oryzae</i>	CBS 260.28	kínai élesztő / Kína
<i>Mortierella lignicola</i>	CBS 207.37	korhadó fa / Kolumbia	<i>Rhizopus oryzae</i>	SZMC 13635	humán mikózis / Texas, USA

Izolátum neve	Törzsgyűjtemény azonosító ^a	Eredet	Izolátum neve	Törzsgyűjtemény azonosító ^a	Eredet
<i>Mortierella lignicola</i>	CBS 313.52	talaj / Németország	<i>Rhizopus oryzae</i>	CBS 109.939	humán mikózis / Toronto, Kanada
<i>Mortierella longicollis</i>	CBS 209.32	homokos talaj / Ausztrália	<i>Rhizopus oryzae</i>	CBS 146.90	humán mikózis / Hollandia
<i>Mortierella microzygospora</i>	CBS 880.97	talaj / Japán	<i>Rhizopus oryzae</i>	NRRL 1472	- / Illinois, USA
<i>Mortierella minutissima</i> var. <i>dubia</i>	CBS 307.52	talaj / Németország	<i>Rhizopus stolonifer</i>	SZMC 13609	nektarin / Kalifornia, USA
<i>Mortierella mutabilis</i>	CBS 308.52	- / Németország	<i>Rhizopus stolonifer</i>	SZMC 13610	nektarin / Kalifornia, USA
<i>Mortierella paraensis</i>	CBS 547.89	esőerdő talaj / Brazília	<i>Rhizopus stolonifer</i>	SZMC 13614	őszibarack / Kalifornia, USA
<i>Mortierella parazychae</i>	CBS 868.71	<i>Pinus sylvestris</i> / Hollandia	<i>Rhizopus stolonifer</i>	SZMC 13607	őszibarack / Kalifornia, USA
<i>Mortierella parvispora</i>	CBS 311.52	talaj / Németország	<i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>reflexus</i>	SZMC 506	talaj / Illinois, USA
<i>Mortierella parvispora</i>	CBS 304.52	talaj / Németország	<i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>reflexus</i>	SZMC 503	- / Magyarország
<i>Mortierella polygonia</i>	CBS 685.71	talaj / Hollandia	<i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>reflexus</i>	SZMC 504	- / Magyarország
<i>Mortierella pulchella</i>	CBS 312.52	<i>Picea abies</i> gyökér / Németország	<i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>reflexus</i>	SZMC 498	- / Szeged, Magyarország
<i>Mortierella rishiksha</i>	CBS 652.68	erdő talaj / India	<i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>reflexus</i>	CBS 117.43	árpa / Hollandia
<i>Mortierella rostafinskii</i>	CBS 522.70	talaj / USA	<i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>reflexus</i>	CBS 320.35	- / -
<i>Mortierella sarnyensis</i>	CBS 122.72	fenyőerdő / Ukrajna	<i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>reflexus</i>	CBS 319.35	- / -
<i>Mortierella schmuckeri</i>	CBS 295.59	talaj / Mexikó	<i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>reflexus</i>	CBS 398.95	- / -
<i>Mortierella selenospora</i>	CBS 811.68	gombakomposzt / Hollandia	<i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>	SZMC 13600	őszibarack / Kalifornia, USA
<i>Mortierella strangulata</i>	CBS 455.67	róka ürülék / Hollandia	<i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>	SZMC 13601	őszibarack / Kalifornia, USA
<i>Mortierella stylospora</i>	CBS 211.32	homokos talaj / Ausztrália	<i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>	SZMC 13602	őszibarack / Kalifornia, USA

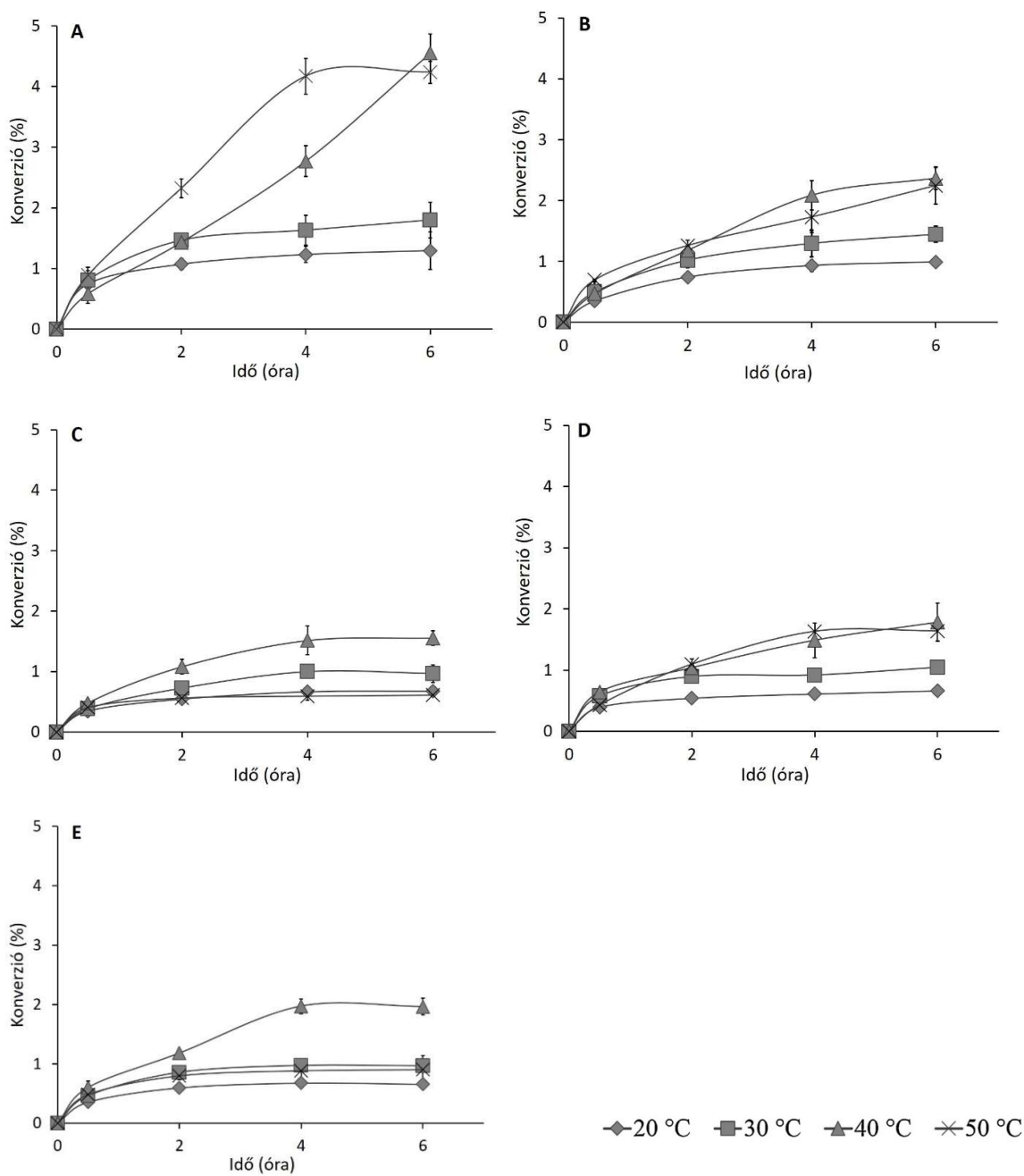
Izolátum neve	Törzsgyűjtemény azonosító ^a	Eredet	Izolátum neve	Törzsgyűjtemény azonosító ^a	Eredet
<i>Mortierella turficola</i>	CBS 432.76	<i>Sphagnum recurvum</i> / Hollandia	<i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>	SZMC 13603	őszibarack / Kalifornia, USA
<i>Mortierella verticillata</i>	CBS 225.35	- / Németország	<i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>	SZMC 13605	- / Kalifornia, USA
<i>Mortierella verticillata</i>	CBS 346.66	tundra talaj / Alaszka	<i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>	SZMC 13606	őszibarack / Kalifornia, USA
<i>Mortierella verticillata</i>	CBS 220.58	talaj / Franciaország	<i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>	SZMC 13608	őszibarack / Kalifornia, USA
<i>Mortierella verticillata</i>	CBS 374.95	erdei talaj / Kína	<i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>	SZMC 13612	- / Kalifornia, USA
<i>Mortierella verticillata</i>	CBS 315.52	erdő talaj / Németország	<i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>	SZMC 13613	őszibarack / Kalifornia, USA
<i>Mortierella wolfii</i>	CBS 611.70	szarvasmarha tüdő / Új- Zéland	<i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>	SZMC 13615	őszibarack / Kalifornia, USA
<i>Mortierella wolfii</i>	CBS 651.93	gombakomposzt / Hollandia	<i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>	CBS 609.82	ragi / -
<i>Mortierella zonata</i>	CBS 228.35	<i>Gomphidius glutinosus</i> / Németország	<i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>	CBS 389.95	- / -
<i>Mortierella zychae</i>	CBS 316.52	<i>Populus tremula</i> / Németország	<i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>	CBS 347.49	tempeh / Indonézia
<i>Mucor amphibiorum</i>	CBS 763.74	béka / Németország	<i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>	CBS 109.76	kenyér / Svájc
<i>Mucor bainieri</i>	NRRL A-11496	talaj / India	<i>Rhizopus</i> sp.	SZMC 2001R	paradicsom/ Magyarország
<i>Mucor bainieri</i>	ATCC 42642	ismeretlen	<i>Rhizopus</i> sp.	SZMC 2002R	őszibarack/ Magyarország
<i>Mucor circinelloides</i> f. <i>janssenii</i>	CBS 243.67	mukormikózis / Dél- Afrika	<i>Rhizopus</i> sp.	SZMC 2003R	- / Magyarország
<i>Mucor corticolus</i>	SZMC 12031	gyümölcs / Magyarország	<i>Rhizopus</i> sp.	SZMC 2004R	dió / Magyarország
<i>Mucor corticolus</i>	NRRL 3617	talaj / Ausztria	<i>Rhizopus</i> sp.	SZMC 2005R	rizs / Magyarország
<i>Mucor corticolus</i>	NRRL 3616	talaj / Ausztria	<i>Rhizopus</i> sp.	SZMC 2006R	rizs / Magyarország
<i>Mucor flavus</i>	CBS 234.35	- / Németország	<i>Rhizopus</i> sp.	SZMC 2007R	őszibarack/ Magyarország

Izolátum neve	Törzsgyűjtemény azonosító ^a	Eredet	Izolátum neve	Törzsgyűjtemény azonosító ^a	Eredet
<i>Mucor fragilis</i>	CBS 236.35	Németország	<i>Rhizopus sp.</i>	SZMC 13636	kenyér / Magyarország
<i>Mucor fuscus</i>	SZMC 12042	- / -	<i>Rhizopus sp.</i>	SZMC 13637	- / Magyarország
<i>Mucor fuscus</i>	SZMC 12043	- / -	<i>Rhizopus sp.</i>	SZMC 13638	- / -
<i>Mucor fuscus</i>	NRRL A-16057	- / -	<i>Rhizopus sp.</i>	SZMC 13639	- / -
<i>Mucor genevensis</i>	NRRL 1756	- / -	<i>Rhizopus sp.</i>	SZMC 13640	- / -
<i>Mucor genevensis</i>	NRRL 1758	- / -	<i>Umbelopsis angularis</i>	CBS 603.68	talaj / Hollandia
<i>Mucor genevensis</i>	SZMC 12072	- / -	<i>Umbelopsis autotrophica</i>	CBS 310.93	talaj / UK
<i>Mucor guillermondii</i>	CBS 174.27	<i>Periplaneta americana</i> ürülék / Oroszország	<i>Umbelopsis isabellina</i>	NRRL 1757	talaj / USA
<i>Mucor indicus</i>	CBS 226.29	- / Svájc	<i>Umbelopsis ramanniana</i>	SZMC 11078	ismeretlen
<i>Mucor microsporus</i>	CBS 204.28	- / Franciaország	<i>Umbelopsis ramanniana</i>	NRRL 1296	- / -
<i>Mucor minutus</i>	CBS 586.67	- / India	<i>Umbelopsis ramanniana</i> var. <i>angulispora</i>	CBS 222.29	- / Oroszország
<i>Mucor nederlandicus</i>	CBS 735.70	- / -	<i>Umbelopsis versiformis</i>	CBS 473.74	talaj / Ausztrália
<i>Mucor piriformis</i>	SZMC 12075	nektarin / Kalifornia, USA	^a Rövidítések: ATCC, American Type Culture Collection; CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures; ETH, Swiss Federal Institute of Technology Culture Collection; FRR, CSIRO Food Research Culture Collection, North Ride, Australia; MUFS, Culture Collection of the Department of Microbiology and Biochemistry, The University of the Orange Free State, South-Africa; NRRL, Agricultural Research Service Culture Collection; SZMC, Szeged Microbiological Collection; WRL-CN, Welcome Bacterial Collection, Beckham, Great Britain		
<i>Mucor piriformis</i>	SZMC 12076	nektarin / Kalifornia, USA			
<i>Mucor piriformis</i>	SZMC 12077	nektarin / Kalifornia, USA			
<i>Mucor piriformis</i>	SZMC 12078	nektarin / Kalifornia, USA			
<i>Mucor plasmaticus</i>	CBS 275.49	egér ürülék / Hollandia			
<i>Mucor plumbeus</i>	SZMC 1001	- / -			

2. sz. melléklet. A hőmérséklet hatása a *Mo. alpina* (A), *U. isabellina* (B), *U. autotrophica* (C), *U. ramanniana* var. *angulispóra* (D) és *U. versiformis* (E) törzsek nyers lipáz kivonatai által katalizált pNFP átészterezésre.

Az 500 µl térfogatú reakcióelegyek 9 mM pNFP-ot és 1,7 M etanolt tartalmaztak *n*-heptánban.

Konverzió=(c1/c0) × 100%, ahol c0 a kiindulási pNFP és c1 a felszabaduló pNF koncentrációja. A feltüntetett értékek 3 párhuzamos mérés eredményei.



3. sz. melléklet. Az enzimitisztítási lépések paraméterei *R. miehei* NRRL 5282 (A), *Rh. oryzae* NRRL 1526 (B), *Rh. stolonifer* SZMC 13609 (C), *M. corticolus* SZMC 12031 (D) és *Mo. echinosphaera* CBS 575.75 (E) izolátumokból.

A

	Térfogat (ml)	Fehérje (mg/ml)	Összfehérje (mg)	Térfogati aktivitás (μmol/ml/perc)	Összaktivitás (μmol/perc)	Specifikus aktivitás (U/ mg)	Tisztulás	Kihozatal (%)
Nyers kivonat	760	4,24	3222,4	86,17	65489,2	20,3	1	100
Ammónium-szulfát (75-85%)	3,5	28,2	98,7	7247	25364,5	257	12,7	38,7
Sephadex G-75	50	0,88	44	464,26	23213	527,6	25,9	35,4
Macro-Prep HQ	6	0,68	4,1	659,65	3957,9	970	47,7	6
Sephacryl S200HR	6	0,12	0,7	252,2	1513	2181,4	107,3	2,3

B

	Térfogat (ml)	Fehérje (mg/ml)	Összfehérje (mg)	Térfogati aktivitás (μmol/ml/perc)	Összaktivitás (μmol/perc)	Specifikus aktivitás (U/ mg)	Tisztulás	Kihozatal (%)
Nyers kivonat	780	7,26	5662,8	183,37	143028,6	25,26	1	100
Ammónium-szulfát (50-65%)	3,5	29,2	102,2	16533	57865,5	566,2	22,2	40,5
Sephadex G-75	41	0,29	11,7	198,73	8147,9	694,9	27,5	5,7
Uno Q-1	6	0,07	0,42	167	1002	2392,6	94,7	0,7

C

	Térfogat (ml)	Fehérje (mg/ml)	Összfehérje (mg)	Térfogati aktivitás (μmol/ml/perc)	Összaktivitás (μmol/perc)	Specifikus aktivitás (U/ mg)	Tisztulás	Kihozatal (%)
Nyers kivonat	700	2,58	1806	66,8	46760	25,89	1	100
Ammónium-szulfát (50-85%)	6	23,4	140,4	1309,3	7855,7	55,95	2,16	16,8
Sephadex G-25	48	0,24	11,47	20,22	970,56	84,6	3,26	2,08
Macro-Prep HQ	8	0,1	0,8	12,11	96,88	121,2	4,68	0,21
Sephacryl S200HR	6	0,07	0,42	10,3	61,8	147,14	5,68	0,13

D

	Térfogat (ml)	Fehérje (mg/ml)	Összfehérje (mg)	Térfogati aktivitás (μmol/ml/perc)	Összaktivitás (μmol/perc)	Specifikus aktivitás (U/ mg)	Tisztulás	Kihozatal (%)
Nyers kivonat	710	3,6	2556	84,84	60233,8	23,57	1	100
Ammónium-szulfát (50-85%)	4	23,84	95,36	2254,5	9018	94,56	4,01	14,9
Sephadex G-75	32	0,92	29,44	183,7	5878,4	199,7	8,47	9,76
Macro-Prep HQ	12	0,41	4,92	116,9	1402,8	285,1	12,1	2,3
Sephacryl S200HR	6	0,03	0,18	21,2	127,2	706,76	29,98	0,21

E

	Térfogat (ml)	Fehérje (mg/ml)	Összfehérje (mg)	Térfogati aktivitás (μmol/ml/perc)	Összaktivitás (μmol/perc)	Specifikus aktivitás (U/ mg)	Tisztulás	Kihozatal (%)
Nyers kivonat	710	3,5	2485	67	47570	19,14	1	100
Ammónium-szulfát (50-85%)	8	33,2	265,6	1818,6	14548,8	54,77	2,86	30,6
Sephadex G-75	40	0,3	12	66,8	2672	222,67	11,6	5,6
Macro-Prep HQ	6	0,18	1,1	48,6	291,6	264,13	13,79	0,61
Sephacryl S200HR	6	0,04	0,21	13,25	79,5	378,57	19,5	0,17