

XXXII. OTDK
Biológia szekció

***RHIZOPUS STOLONIFER* EXTRACELLULÁRIS LIPÁZ
ENZIM TISZTÍTÁSA ÉS JELLEMZÉSE**

Készítette:

Sója Andrea Mónika, II. biológus MSc

Szegedi Tudományegyetem, TTIK, Mikrobiológiai Tanszék

Témavezetők:

Dr. Takó Miklós
Tudományos munkatárs

Kotogán Alexandra
PhD hallgató

2015

1. BEVEZETÉS

1.1. A járomspórás gombák

A járomspórás gombák elágazó hifákat növesztenek, melyekben általában hiányoznak a kereszt falak (azaz cönocitikusak). Ivaros szaporodásuk járomspórák (zigospórák) létrehozásával történik (Benjamin, 1979). A gombák életciklusa akkor kezdődik, amikor a spóra kicsírázik, vegetatív hifákat hoz létre, majd sporangiofórok formálódnak, amik spóra-képző sporangiumokat, sporangiolumokat vagy merosporangiumokat hordoznak, melyekben a spórák termelődnek. Egyes fajok hifafeldarabolódással, artrospóra képzésével is képesek szaporodni. Az ivartalan életciklus a leggyakoribb szaporodási mód. Ivaros szaporodásról akkor beszélünk, amikor az ellentétes párosodási típusú hifák közel kerülnek egymáshoz, és létrejön a gametangiumnak nevezett speciális hifa. A gametangiumok egymás felé nőnek, majd fuzionálnak, létrehozva a diploid zigótát. A zigóta ellenálló sejtfalat fejleszt, kialakítva egy egysejtű zigospórát, mely e csoport névadó tulajdonságát jelenti. A heterotallikus fajoknál az ivaros szaporodáshoz két párosodási típus (+ és -) kereszteződése kell a járomspórák kialakulásához, míg homotallikus gombák esetén elegendő egy kultúra. Michailides és Spotts (1990) ismertette a *Mucor piriformis* életciklusát egy gyümölcsfa ültetvény talajában és fertőzött csonthéjasokban, almatermésűekben. E gombák 12 hónapig képesek túlélni a talajban, illetve 19-20 hónapig a fertőzött gyümölcsökön. Madarak, rovarok és rágcsálók terjesztik a gomba spóráit egyik gyümölcsről a másikra. Tárolás során a fertőzött gyümölcs képes iniciálni a gomba terjedését, ha egy másik gyümölcsrel közvetlenül érintkezik.

A hagyományos morfológiai különbségeken alapuló rendszerezés molekuláris taxonómiai elemzésekkel történő felülvizsgálata során a korábban egységes járomspórás gombák (Zygomycota) egyes taxonjai felosztásra kerültek. Így a számos rendet tartalmazó Zygomycota csoport helyett a Mucoromycotina altörzs került meghatározásra. A Mucoromycotina a legújabb taxonómiai vizsgálatok alapján három rendet foglal magába: Mucorales, Mortierellales és Endogonales (Hibbett és mtsi, 2007). A Mucoromycotina tagjai, különösen a Mortierellales és a Mucorales rendekbe tartozók, gyakori összetevői a trágya és a talaj mikoflórájának. Gyors növekedés és sporuláció jellemzi őket.

A járomspórás gombák evolúciója során többféle mód is kialakult a spórák terjesztésére. Az érett sporangiumok felszabadulását megelőzi a sporangiofór falának felnyílása közvetlenül a kolumella alatt. A járomspórás gombák többsége a levegő

mozgásával terjeszti a spóráit. Ezek száraz spórás fajok, melyek elenyésző spórafalat termelnek (*Rhizopus*) és száraz, egy- vagy többspórás sporangiolumokat (*Thamnostylum*) vagy merosporangiumokat (*Syncephalastrum*).

Néhány fajuk növénypatogén, így például a *Choanephora cucurbitatum* tökfélék, bab, cékla, papaya, bors, burgonya, édes burgonya és más növények rothadását okozza. E gomba spórái rovarok és a szél által terjednek.

A járomspórás gombákat, különösen a Mortierellales és a Mucorales rend tagjait számos ipari folyamatban felhasználják. Az ipari felhasználás magában foglalja a fumársav és tejsav termelését *Rhizopus oryzae*-vel és más *Rhizopus* fajokkal, a biotin termelését *Rhizopus delemar*-ral, többszörösen telítetlen zsírsavak és arachidonsav termelését *Mortierella* fajokkal. A *Rhizopus* nemzetség számos fajt nehézfémek bioszorpciójára, azaz fémek sejtek általi eltávolítására használják fel szennyezett talajokban, szennyvizekben (Gomes és mtsi, 2014).

Munkám során a Mucoromycotina altörzs Mucorales rendjébe tartozó *Rhizopus stolonifer* SZMC 13609 törzsével foglalkoztam.

1.2. A Mucorales rend

A Mucorales a járomspórás gombák legnagyobb és legjobban tanulmányozott rendje. A rend tagjait néha tüpenészeknek hívják. A Mucorales rend tagjai jellemzően gyors növekedésűek, hifáikból hiányoznak a szeptumok, azaz a sejtek közötti válaszfalak. A hifák főleg a szubsztráton belül növekednek. Ivartalan szaporodás során sporangiofórok, függőleges (egyszerű vagy elágazó) hifák képződnek, melyek az aszexuális sporangiospórákkal telt, zsákszerű sporangiumokat támasztják. A sporangiospórák ivartalan mitospórák, melyek mitózis révén keletkeznek. Az érett spórák felszabadulása a sporangium falának felnyílása, vagy a teljes sporangiolum sporangiofórról való leválása során valósul meg. A sporangiospórák csírázásával létrejönnek az új micélium haploid hifái.

A legtöbb Mucorales rendbe tartozó gomba szaprotróf, különböző szerves szubsztrátokon nő. Leggyakrabban talajban, komposztban fordulnak elő, illetve gyümölcsök rothadását okozhatják. Számos Mucorales rendbe tartozó gomba ismert a raktári élelmiszereket károsító hatásáról, emellett komoly károkat okozhatnak konzervgyárakban is. E károsító tulajdonságuk a magas cukor- és sókoncentráció tűrő képességüknek köszönhető. Néhány fajuk állatok, növények vagy más gombák parazitája, kórokozója. Egyes fajok mukormikózist okozhatnak legyengült immunrendszerű betegekben, illetve allergiás reakciókat is kiválthatnak (El-Herte és mtsi, 2012). A Mucorales rendbe tartozó fajok ipari

felhasználása is jelentős; számos törzset alkalmaznak keményítő hidrolízisére, valamint oxálsav, fumársav, tejsav, ecetsav és citromsav előállításra (Godtfredsen és mtsi, 1990; Outtrup és Boyce, 1990). Kiemelkedő extracelluláris enzimtermelésüknek köszönhetően egyes törzseket a fermentációs ipar területein alkalmazzák (pl. amiláz, lipáz, proteáz termeltetés). Proteáz és lipáz enzimeik főleg a sajtkészítés során jelentősek (Alves és mtsi, 2002).

1.2.1. A *Rhizopus* nemzetség

A *Rhizopus* a Mucoromycotina egyik kiemelt nemzetsége; tagjai közül például számos fajt használnak egyes élelmiszerek fermentációjának elindítójaként, különösen Kelet- és Délkelet-Ázsiában (Hesseltine, 1983).

A *Rhizopus* fajok többsége lebontó, szaprotróf életmódot folytat. Sokféle szerves szubsztráton képesek növekedni (pl. gyümölcsök, zöldségek, zselék, szirupok, bőr, kenyér, földimogyoró, dohány) (Kirk és mtsi, 2008). Néhány faj parazita vagy patogén. Egyes *Rhizopus* fajok humán zigomikózisok okozói, melyek nagyon súlyos esetben halálos kimenetelűek is lehetnek. Elsősorban a *Rhizopus arrhizus* okoz égési sérülteknél, alultápláltságban szenvedő, vagy immunhiányos személyeknél (AIDS), illetve egyes rákbetegségek esetén komoly tüneteket. *Rhizopus* okozta fertőzések kialakulhatnak a cukorbetegség szövödményeként is (Chinn és Diamond, 1982).

A *Rh. stolonifer* és a *Rh. arrhizus* betakarítás utáni növényi betegségek okozói is lehetnek. Meleg körülmények között károsíthatják a betakarított gyümölcsök lágy szöveteit, így gyakran ehetetlenné téve őket. A fertőzések elkerülése érdekében betakarítás után gyakran permeteznek preventív fungicideket a termésre, a szállítás közbeni mélyhűtéssel pedig igyekeznek megelőzni, vagy lelassítani a gombák terjedését.

Néhány *Rhizopus* nemzetségbe tartozó faj, például a *Rh. arrhizus* vagy a *Rh. oryzae*, az alma rothadását is okozhatja. Emellett ipari folyamatokban felhasználható tejsav és kortizon termelésre, alkoholos fermentációra, és nehéz fémek bioszorpciójára (kémiai szennyező anyagok passzív felszívása egy organizmus által). A *Rh. delemar*-t fumársav és biotin termeltetésére is használják. A *Rhizopus artocarp*i a kenyérfa gyümölcsének hullását idézi elő, a *Rhizopus nigricans* (kenyérpenész) gyakran élelmiszerek romlását okozza. A *Rhizopus oligosporus*-t tempeh (szójababból készült fermentált étel), és egyéb távol-keleti étel fermentációjában hasznosítják. A *Rh. stolonifer* gyakran megtalálható a kenyér felszínén, emiatt fekete kenyérpenészként is nevezik. Gyümölcsrothadást idézhet elő földiepren,

paradicsomon és édesburgonyán, ezen kívül fumársav és kortizon kereskedelmi előállítására is felhasználják. Ivartalan spórái a tűfej-szerű sporangiumon belül jönnek létre, mely érést követően felnyílva engedi szabadon a spórákat. A *Rh. stolonifer* 15 és 30 °C közötti hőmérsékleten gyorsan növekszik (Schipper, 1984). A gomba heterotallikus, ami azt jelenti, hogy az ivaros szaporodás csak akkor jön létre, amikor az ellentétes párosodási típusok (+ és -) kapcsolatba kerülnek egymással. A *Rh. stolonifer* kozmopolita elterjedésű.

1.3. A lipáz enzimek jellemzői

A lipázok (triacilglicerol hidrolázok; EC 3.1.1.3) a hidroláz enzimek egyik csoportját alkotják, melyek a trigliceridek glicerinné és szabad zsírsavakká történő hidrolízisét katalizálják olaj-víz határfelületen. Ellentétben az észterázokkal, melyek normál Michaelis-Menten kinetikát mutatnak, és az oldott észtereket hidrolizálják, a lipázok a vízben nem oldódó zsírsavakat is bontják (Lotti és Alberghina, 2007). Mivel a lipázok olaj-víz határon dolgoznak, hagyományos Michaelis-Menten kinetikai meghatározás, mely a homogén fázisban végbemenő reakciókra érvényes, nem lehetséges (Aravindan és mtsi, 2006). A lipázok az olaj-víz határfelület megjelenésekor aktiválódnak. Ez a jelenség a határfelületi aktiváció. Az enzim egy felszíni fehérje hurokkal rendelkezik, mely fedi annak aktív centrumát, és elmozdul a határfelülettel érintkezve, így téve lehetővé a szubsztrát bekötődését (Brzozowski és mtsi, 1991; Derewenda és mtsi, 1992). A lipázok monomer fehérjék, molekulatömegük általában 16-67 kDa közötti (Aravindan és mtsi, 2006). A lipázok a szerin hidrolázok csoportjába tartoznak. Katalitikus helyükön a G – X1 – S – X2 – G konszenzus szekvenciát tartalmazzák, ahol G=glicin, S=szerin, X1=hisztidin és X2=glutamin- vagy aszparaginsav (Svendsen, 1994).

Ezen túlmenően a lipázok katalizálhatják az észter vegyületek észter kötéseinek áthelyezését, azaz transzészterifikációját, valamint észterek szintézisét is alacsony vízakaktivitás mellett (Jaeger és Reetz, 1998). A hidrolízis és az észterifikáció egyszerre is előfordulhat, a reakció egyensúlyát a jelenlévő szabad víz mennyisége határozza meg. Szubsztrátoktól függően zsírsav és alkohol közötti észter kötés kialakítást is katalizálhatnak (észterifikáció), illetve képesek a már meglévő észter kötések áthelyezésére molekulán belül (interészterifikáció), vagy molekulák között (transzészterifikáció). A kiindulási molekulától függően történhet például acidolízis (ahol egy szabad zsírsav az acil-donor) vagy alkoholízis (ahol egy nukleofil alkohol az acil-akceptor) (Villeneuve és mtsi, 2000; Balcaõ és mtsi, 1996).

Az eukariota szervezetekben a lipázok részt vesznek a lipid metabolizmus számos lépésében, beleértve a zsírok emésztését, felszívását és a lipoprotein anyagcserét. Állatok, növények és mikroorganizmusok is termelnek lipázokat. Növényekben a lipázok az energiaraktározó szövetekben találhatóak (Balashev és mtsi, 2001).

A lipázok azon képessége, hogy rendkívül specifikus kémiai transzformációkat hajtanak végre, egyre népszerűbbé teszi őket az élelmiszer-, detergens-, kozmetikai-, szerves szintézis- és gyógyszer iparágak számára (Park és mtsi, 2005; Gupta és mtsi, 2007; Grbavcic és mtsi, 2007; Franken és mtsi, 2009). A mikrobiális lipázok különleges figyelmet kapnak az iparban stabilitásuknak, szelektivitásuknak és széles szubsztrát specifikitásuknak köszönhetően (Dutra és mtsi, 2008; Griebeler és mtsi, 2011). Számos mikroorganizmus ismert, mint potenciális extracelluláris lipáz termelő, beleértve a baktériumokat, élesztőket és a gombákat (Abada, 2008). A gombákkal történő termeltetést gyakran szilárd-fázisú fermentáció útján végzik, míg a baktériumoknál és az élesztőknél általában folyadék tenyésztés történik (Dutra és mtsi, 2008).

Számos környezeti paraméter, úgymint a hőmérséklet, a pH, a szén-, lipid- és nitrogénforrás, oldott oxigén koncentráció jelentősen befolyásolják a lipáz termelést (Omar és mtsi, 1987; Suzuki és Takahiro, 1988; Nahas és De Assis, 1988). A triglicerideken kívül a szabad zsírsavak, egyéb hidrolizálható észterek, epesavas sók és a glicerol is stimulálhatják a lipáz termelést. A gomba lipázok pH optimum tartománya általában 4,0-8,0 közötti (Arai és mtsi, 1997; Ota és mtsi, 1982). A legtöbb gomba lipáz aktivitásának hőmérséklet optimuma 25-30 °C-on található, ami termofil gombák esetén 45-75 °C közöttire tehető (Dharmsthiti és Ammaranond, 1997; Kakugawa és mtsi, 2002; Vakhlu és Kour, 2006). A termofil *Rhizomucor pusillus* jól ismert termotabil extracelluláris lipáz termeléséről. A gomba lipázok gyakran extracellulárisak, azaz sejten kívüli enzimek, ami jelentősen megkönnyíti tápközegből való kinyerhetőségüket. Az extracelluláris és a sejthez kötött enzimek megoszlása erősen függ a tenyésztési közeg szén és nitrogén összetételétől (Vakhlu és Kour, 2006).

A lipázok további előnyös tulajdonsága, hogy szerves oldószerekben is aktívak és stabilak maradhatnak. Változatos reakciókat katalizáló képességüknek köszönhetően ipari felhasználásuk, valamint az ilyen célra történő alkalmazhatóság tanulmányozása egyre jelentősebb napjainkban (Singh és Mukhopadhyay, 2012), melyet jól mutat a témában megjelenő publikációk számának ugrásszerű növekedése is.

1.4. A lipázok gyakorlati jelentősége

A lipázok gyakorlati alkalmazásának legfőbb korlátja az enzim előállítási költsége. Ugyanakkor a mikrobák általi termeltetés költséghatékonyabb, mivel nagy mennyiségben és olcsó szubsztrátokon valósítható meg előállításuk (Salihu és mtsi, 2012). Az enzimek legnagyobb felhasználási területe a detergensipar és a gyógyszeripar, ahol emésztést elősegítő gyógyszerek előállítására használják elsősorban. A lipázok további felhasználására számos új lehetőség került napirendre, néhány ezek közül intenzív fejlesztés alatt áll. Ennek következtében a lipázok ipari felhasználása gyorsan növekszik majd a jövőben (Singh és Mukhopadhyay, 2012). Az ipari felhasználásra előállított lipázok mennyisége várhatóan eléri a leggyakrabban alkalmazott proteáz enzimekét is (Li és mtsi, 2012).

A lipázokat széles körben alkalmazzák zsírok és olajok ipari feldolgozására, valamint az élelmiszer-feldolgozásban, finomvegyszerek szintézisében, a papírgyártásban és kozmetikumok, zsírtalanító készítmények és gyógyszerek előállításában is (Rubin és Dennis, 1997a; Kazlauskas és Bornscheuer, 1998). A lipázok felhasználhatóak a zsíros szennyeződések (Masse és mtsi, 2001) és a poliuretán (Takamoto és mtsi, 2001) degradációjának gyorsítására. Az ipari mikrobiális lipázok többsége gomba és baktérium eredetű.

Detergensipar

A lipázok hidrolitikus aktivitásának legjelentősebb felhasználási területe. Az enzimek detergenszekhez való hozzáadása lehetővé teszi a zsíros foltok, lerakódások eltávolítását. Kereskedelmi szempontból kiemelkedő a háztartási és ipari mosodákban és mosogatógépekben való alkalmazásuk mosóporokba, mosószerekbe adagolva (Pandey és mtsi, 1999). Körülbelül 1000 tonna lipázt használnak fel megközelítőleg 13 milliárd tonna detergenshez évente (Sharma és mtsi, 2001). A mosószerekben felhasznált lipázoknak számos nehézséggel kell megbirkóznuk: (1) a zsíros szennyeződések eltérő összetétele miatt széles szubsztrátspecifitású lipázokra van szükség; (2) a viszonylag durva mosási körülmények (pH 10-11 és 30-60 °C) pH- és hőstabil enzimeket igényelnek; és (3) a kémiai denaturáció és/vagy proteolitikus degradáció hatásaival szemben ellenállónak kell lenniük (Malcata, 1996).

Élelmiszeripar

A zsírok és olajok fontos összetevői az élelmiszereknek. Az élelmiszerek tápértékét, élvezeti értékét és fizikai tulajdonságait a különböző trigliceridek szerkezeti jellemzői

nagyban befolyásolják: a zsírsav helyzete a glicerin gerincben, a zsírsavlánc hosszúsága, és a zsírsavlánc telítettségének mértéke (Sharma és mtsi, 2001). A lipázok lehetővé teszik, hogy módosítsuk a lipidek tulajdonságait a zsírsavláncok helyzetének megváltoztatásával vagy a zsírsavak cseréjével. Ily módon egy viszonylag olcsó és kevésbé kívánatos lipid értékesebb terméké alakítható (Colman és Macrae, 1980; Pabai és mtsi, 1995a, 1995b; Undurraga és mtsi, 2001). A lipázokat pékáruk és gyümölcsös italok előállításához, valamint sajterlelés során a sajt állagának és ízének javítására is felhasználják (Kazlauskas és Bornscheuer, 1998). Fontos kiemelni a tejtermékek (sajt, vaj, margarin), alkoholos italok, csokoládé és cukorkák ízének javítását, a trigliceridek szelektív hidrolízisével megvalósítva (Hasan és mtsi, 2006). A felszabadult zsírsavak aroma komponensként, vagy aroma elővegyületként is működhetnek (Sharma és mtsi, 2011). A lipázokat hús- és halkészítmények felesleges zsírtartalmának eltávolítására is használják (Aravindan és mtsi, 2006).

Cellulóz-és papíripar

A lipázok egy másik fontos alkalmazási területe a fa hidrofób komponenseinek, zsíroknak és viaszoknak az eltávolítása a papírgyártás során (Farrell és mtsi, 1997; Alves és mtsi, 2002). A Nippon Paper Industries japán cég által kifejlesztett, *Candida rugosa* lipázon alapuló módszerrel a felesleges trigliceridek több mint 90%-át eltávolítják a gyártási folyamatban.

Lipázok a szerves szintézisek katalizálásában

Az élő szervezetekben a lipázok főként trigliceridek hasítását végzik, azonban ezek az enzimek észter szintézisre is képesek lehetnek vízmentes, vagy alacsony víztartalmú közegben. A lipázok használata a kémiai folyamatokban jelentősen lecsökkenti a reakcióhoz szükséges energiát, mely így a termék alacsonyabb előállítási költségét eredményezi (Bornscheuer, 2000). A szerves kémiában katalizátorként használt lipázok többsége mikrobiális eredetű. Az enzimek hidrofil-lipofil határfelületen működnek és tolerálják a reakcióelegyekben lévő szerves oldószereket. A reakciókban főként kemo-, regio- és sztereoszelektív transzformációkat katalizálnak (Rubin és Dennis, 1997b; Kazlauskas és Bornscheuer, 1998; Drauz és Waldmann, 1995; Faber, 1997; Boland és mtsi, 1991). A lipázok e tulajdonságait jórészt a gyógyszeriparban és a biodízel előállításnál használják ki. Gyógyszervegyületek szintézisének kiemelkedően fontos az összetevő vegyületek szelektív előállítása, mely a lipázok enantioszelektív tulajdonságainak köszönhetően megvalósítható (Pandey és mtsi, 1999). Elsősorban különféle emésztést elősegítő készítmények,

gyulladáscsökkentő szerek, antibiotikumok és vérnyomás csökkentő szerek szintézisében játszanak szerepet (Domsch és mtsi, 1995; Sharma és mtsi, 2001).

További alkalmazások

Fokozott figyelem fordítódik a lipázok hulladékkezelésben történő alkalmazhatóságának lehetősége felé. Szennyvizek, olajszennyezések, illetve olajos hulladékok kezelésében, emellett eldugult lefolyók tisztításában lehetnek ígéretesek (Hasan és mtsi, 2006; Singh és Mukhopadhyay, 2012).

1.5. Tisztított fonalas gomba lipázok

Elsősorban tömlősgombáknál vizsgálták részletesen a gombák által termelt lipáz enzimeket, ahol főleg *Aspergillus* és *Penicillium* fajok lipázait tisztították és jellemezték. A járomspórás gombák lipáztermelése és ezzel együtt a termelt enzimek tulajdonságainak vizsgálata kevésbé kutatott terület. Ugyanakkor néhány jó lipáztermelő izolátumot azonosítottak e gombacsoportnál. Az alábbi fajok esetében vannak bővebb ismereteink: *Rhizomucor miehei*, *Mucor hiemalis* f. *hiemalis*, *Mucor hiemalis* f. *corticola*, *Mucor javanicus* (jelenleg *M. circinelloides*), *Mucor racemosus*, *Rhizopus chinensis*, *Rhizopus niveus*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus homothallicus*.

A *R. miehei* lipáza a legszélesebb körben tanulmányozott, és alkalmazott enzim a járomspórás gomba enzimek közül. Liofilizált por, oldat és immobilizált formában is forgalmazzák az enzimet, mely változatos körülmények mellett (pl. vízmentes szerves oldószerek) is rendkívül nagy aktivitással és jó stabilitással rendelkezik. Eglyláncú α/β típusú fehérje, molekulatömege megközelítőleg 31,6 kDa, 269 aminosavból áll (Stobiecka, 2005). Széles szubsztrátspecifitása miatt a *R. miehei* lipázát elterjedten alkalmazzák észter hidrolízisre, észter szintézisre és átészterezésre egyaránt. Strukturált lipidek létrehozása (Palla és mtsi, 2012), butil-butirát szintézise (ananász ízű) (De Diego és mtsi, 2009), és monogliceril-észterek királis és prokirális metil-észterekből való szintézise során ugyancsak felhasználják (Acosta és mtsi, 2011).

A *Rhizopus* nemzetség tagjai közül néhány faj esetén azonosítottak, tisztítottak és jellemezték extracelluláris lipáz enzimeket (1. táblázat). Hiol és mtsi. (2000) pálmatermésről izolált *Rh. oryzae* törzs extracelluláris lipázát tisztították és jellemezték. A tisztított enzim monomer fehérje, melynek molekulatömege 32 kDa-nak bizonyult az SDS-poliakrilamid-gélelektroforézissel történő meghatározást követően. A tisztított enzim hőmérsékleti

optimumát 35 °C-ban határozták meg, mely 45 °C felett is megőrizte aktivitásának 65%-át. Azonban magasabb, 50 °C-os hőmérsékleten már a teljes aktivitását elvesztette. Az enzim széles pH tartományon (pH 4,5 és 7,5 között) megőrizte stabilitását, legintenzívebb hidrolízisre a pH 7,5-os értéken volt képes. Az enzim stabilnak bizonyult alkánokban és hosszú láncú alkoholokban, azonban rövid láncú alkoholokban veszített aktivitásából.

A *Rh. niveus* esetén kétféle extracelluláris lipázt azonosítottak, melyek mind molekulatömegükben, mind hőmérséklet és pH optimumukban eltérőek (Kohno és mtsi, 1994). A *Rhizopus* nemzetség egy újonnan azonosított törzséből tisztított extracelluláris enzim molekulatömegét 37,5 kDa-nak határozták meg. Hőmérsékleti optimuma 50 °C körülinek bizonyult, de magasabb hőmérsékleten is mutatott aktivitást. A tisztított lipáz két különböző pH optimumot mutat: 5,5 és 7,0. Az izoelektromos fókuszálás két aktív fehérje jelenlétére utalt, melyek valószínűsíthetően lipáz izoformák lehetnek (Koblitz és Pastore, 2006).

Kereskedelmi forgalomban jelenleg, tudomásunk szerint, *R. miehei*, *Rh. oryzae*, *Rh. niveus*, *M. javanicus* járomspórás gomba lipázok érhetőek el.

1. táblázat. Néhány extracelluláris *Rhizopus* lipáz és főbb tulajdonságai

Fajnév	Molekulatömeg (kDa)	Hőmérséklet optimum (°C)	pH optimum	Hivatkozás
<i>Rhizopus chinensis</i>	28,4	37	5,5	Yasuda és mtsi, 2000
<i>Rhizopus homothallicus</i>	29,5	30 és 40	7,5	Mateos Diaz és mtsi, 2006
<i>Rhizopus niveus</i>	34 és 30	35 és 40	6-6,5 és 6,0	Kohno és mtsi, 1994
<i>Rhizopus sp.</i>	37,5	50	5,5 és 7,0	Koblitz és Pastore, 2006
<i>Rhizopus oryzae</i>	32	35	7,5	Hiol és mtsi, 2000
<i>Rhizopus arrhizus</i> (= <i>Rh. oryzae</i>)	39	35	9,0	Dobrev és mtsi, 2011
<i>Rhizopus delemar</i> (= <i>Rh. oryzae</i>)	30,3	30	8,0	Haas és mtsi, 1992
<i>Rhizopus japonicus</i> (= <i>Rh. oryzae</i>)	30	n.a.	5,0	Suzuki és mtsi, 1986

n.a.: nincs adat

2. CÉLKITŰZÉSEK

A járomspórás gombák jó lipáztermelőként ismertek, azonban eddig csak néhány törzs esetében áll rendelkezésünkre információ az extracelluláris lipáz enzimeket illetően. Emellett az ipari folyamatokban történő felhasználásuk is korlátozott. Ugyanakkor, a biotechnológiai és ipari fejlesztések költséghatékonyabb és környezetkímékőbb folyamatainak eléréséhez egyre nagyobb igény van új enzimek izolálására és jellemzésére is.

Jelen kutatás fő céljai közé tartozik az előzetes munkáinkban ígért lipáz termelőnek bizonyult *Rhizopus stolonifer* SZMC 13609 járomspórás gombatörzs lipázhozamának javítása, a fermentációs körülmények optimalizálása és a megfelelő induktív körülmények kiválasztása, illetve az enzim izolálásának és biokémiai jellemzésének megkezdése.

Ennek érdekében a következő konkrét célokat fogalmaztuk meg:

- a *Rh. stolonifer* SZMC 13609 izolátum extracelluláris lipázhozamának javítása, ezzel együtt fermentációs körülmények optimalizálása és megfelelő induktív körülmények kiválasztása (pl. optimális inkubációs hőmérséklet, megfelelő induktor olaj koncentráció).
- a termelt extracelluláris enzim tisztításának megkezdése méretkizárásos és anioncserélő kromatográfiás technikák alkalmazásával.
- a tisztított lipáz enzim részletes biokémiai jellemzése: hőmérséklet és pH optimum és stabilitás meghatározása, szubsztrátspecifitás vizsgálata, különféle alkoholok (pl. metanol, etanol, propanol) és alkánok (pl. hexán, ciklohexán), illetve fémsók és reagensek enzimaktivitásra gyakorolt hatásának vizsgálata.
- az enzim által katalizált átészterező reakció hőmérséklet és idő függésének vizsgálata, valamint többféle zsírsav akceptor alkohol és szerves oldószer közeg alkalmazásával a reakció jellemzése.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Alkalmazott törzs

Munkánkat a Mucorales rendbe tartozó *Rhizopus stolonifer* SZMC 13609 (SZMC: Szeged Mikrobiológiai Törzsgyűjtemény) járomspórás gombatörzsszel végeztük. A törzs fenntartása malátás táptalajon történt.

3.2. Táptalajok és tápoldatok

Malátás táptalaj

- 0,5% malátakivonat
- 0,5% élesztőkivonat
- 1% glükóz
- 2% agar

Ásványi sós tápoldattal dúsított szilárd fázisú fermentációs tápközeg (g/g szilárd szubsztrátra vonatkoztatva)

- 1,5% glükóz
- 0,75% $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$
- 0,34% NH_2CONH_2
- 1,5% olíva olaj
- 1,8% NaH_2PO_4
- 0,3% KH_2PO_4
- 0,045% $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
- 0,0375% CaCl_2
- 5 g búzakorpa

A tápközeg nedvességtartalmát, Falony és mtsi. (2006) alapján, 65%-ra állítottuk be.

Ásványi sós tápoldattal dúsított folyadék fázisú fermentációs tápközeg

- 1,2% NaH_2PO_4
- 0,2% KH_2PO_4
- 0,03% MgSO_4
- 0,025% CaCl_2

1% $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$

2% búzakorpa

2% olaj

Az enzimek tisztításánál és jellemzésénél alkalmazott oldatok

Foszfát puffer (pH 6,8)

0,5% KH_2PO_4

0,5% Na_2HPO_4

Acetát puffer (pH 6)

0,1 M nátrium-acetát, 96%-os ecetsav a megfelelő pH eléréséig

Trisz puffer (pH 8,5)

tris-(hidroxi-metil)-amino-metán és trisz-hidroklorid 18:7 arányú keveréke

3.3. Tenyésztési körülmények

Lipáztermelés szilárd fázisú fermentációban

A szilárd fázisú fermentációs teszteknel 5 g búzakorpát mértünk 100 ml-es Erlenmeyer lombikokba, majd 9,5 ml ásványi sós tápoldattal átnedvesítettük, végül hozzámértük az indukciós olajat (Tween-80 vagy olívaolaj különböző mennyiségekben). A fermentációs tápközeget sterilizálás után 10^6 mennyiségű spórával oltottuk be. A fermentációkhoz 20 °C, 25 °C, 30 °C vagy 35 °C inkubációs hőmérsékleteket alkalmaztunk. Az inkubációs idő letelte után 30 ml 0,1 M-os acetát puffert (pH 6,0) adtunk a tenyészetekhez, majd homogenizáltuk a fermentációs táptalajt a pufferrel. A lombikokat 24 órán át 4 °C-on hagytuk, majd kivonáshoz durvaszűrést végeztünk gézlap segítségével. Az így kapott extraktumot centrifugáltuk (15 perc, 12000 rpm), majd a felülúszót az enzimaktivitás mérésig -20 °C-on tároltuk.

A lipáztermelés indukciója folyadék fázison

A törzset búzakorpa alapú folyadék fermentációban is teszteltük, mely induktorként olívaolajat és búzakorpát tartalmazott. A tápközegben vizsgáltuk az olívaolaj (0%-6%) és búzakorpa (1%-4%) mennyiség változtatásának hatását a lipáztermelésre. Az elkészített tápoldatot sterilizálást követően 10^6 mennyiségű spórával oltottuk be. A tenyészeteket 7 napig

rázattuk (200 rpm), a fermentlevekből 24 óránként 500 µl mennyiségű mintát vettünk Eppendorf-csövekbe. A minták centrifugálása (15 perc, 12000 rpm) után a felülúszót az enzimaktivitás mérésig -20 °C-on tároltuk.

3.4. Az enzimaktivitás meghatározása

3.4.1. A hidrolitikus aktivitás meghatározása

A lipáz enzim aktivitásának méréséhez *p*-nitrofenil-palmitátot (*p*NFP, Sigma) használtunk szubsztrátként. A reakcióhoz 3 mM koncentrációjú szubsztrát törzsoldatot készítettünk dimetil-szulfoxidban, melyhez 1:1 arányban foszfát puffert (pH 6,8) adtunk. A mintákból 50 µl mennyiséget mikrotiter lemezre vittünk fel, ehhez 50 µl pufferelt szubsztrátot adtunk. A tesztelt törzs optimális növekedési hőmérsékletén (25 °C), 30 percig tartó inkubálást követően 25 µl 0,1 M-os nátrium-karbonáttal leállítottuk a reakciót, majd a felszabadult *p*-nitrofenol mennyiségét Asys Jupiter HD (Asys Hitech) mikrotiter lemezolvasó segítségével mértük meg 405 nm hullámhosszon. Egy U az az enzimmennyiség, amely percenként 1 µmol *p*-nitrofenolt szabadít fel adott reakció körülmények között.

A fehérjetisztítás egyes lépéseit követően az enzimaktivitás meghatározásához *p*-nitrofenil-kaprilátot (*p*NFK, Sigma) is alkalmaztunk. A módszer további lépései a fent leírtakkal megegyeznek.

3.4.2. A szintetikus aktivitás meghatározása

Az átészterezés vizsgálata *p*-nitrofenil-palmitát szubsztráttal

A lipáz enzim átészterező aktivitásának tesztelését búzakorpa alapú fermentációból származó nyers enzimkivonatokkal végeztük. A módszer a Teng és Xu (2007) által kidolgozott eljárás alapján, néhány módosítással kiegészítve. A nyers extraktumokból 300 µl-t kivettünk, azokat 12 órán keresztül liofilizáltuk, majd hozzámértünk 450 µl 10 mM *p*NFP szubsztrátot tartalmazó *n*-heptán oldatot. 50 µl abszolút etanol hozzáadása után pipettával felszuszpendáltuk a reakcióelegyeket, melyeket 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*-nitrofenolt 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*-nitrofenol mennyiség meghatározásához kalibrációs görbét készítettünk. Terc-butil-metil-éterben meghatározott koncentrációjú *p*-nitrofenol törzsoldatot készítettünk, melyből *n*-heptán felhasználásával hígítási sorozatot készítettünk.

Az inkubációs idő átészterezésre gyakorolt hatását 2, 4, 6, 12 és 24 óra után vizsgáltuk. A hőmérséklet hatásának tesztelésekor 20, 30, 40 és 50 °C beállításokat alkalmaztunk. Emellett más reakcióközegeket (hexán, izooktán, ciklohexán) és akceptor alkoholt is alkalmaztunk (metanol, izopropanol és butanol) az átészterezés hatékonyságának meghatározásához. A *p*-nitrofenol kivonását és detektálását ezekben az esetekben is a fent említett eljárással végeztük el.

Az észterezés vizsgálata gázkromatográfiával

Az enzim észterező képességét etil-palmitát észter keletkezése során teszteltük. Az átészterezés vizsgálatánál leírtakhoz hasonlóan 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 mennyiségét HP-INNOWax oszlopon (60 m*0,25 mm*0,5 µm; Agilent Technologies) lángionizációs detektorral szerelt Agilent 6890N (Agilent Technologies) típusú gázkromatográfval határoztuk meg.

3.5. A lipáz enzim tisztításának folyamata

A *Rh. stolonifer* SZMC 13609 lipáz enzim nagy mennyiségben történő tisztításához 1,5 literes Erlenmeyer lombikokban süllyesztett fermentációt végeztünk búzakorpa alapú ásványi sós tápoldatban (800 ml tápoldat). A lombikokat 3 ml 10⁶/ml koncentrációjú spóraszuszpenzióval oltottuk be. A tenyészeteket az izolátumnak megfelelő növekedési hőmérsékleten (25 °C) 4 napon keresztül inkubáltuk.

Az inkubációs idő letelte után gézlap segítségével durvaszűrést végeztünk. A szűrletet ezután két egymást követő lépésben lecentrifugáltuk (8000 rpm, 20 perc, SORVALL-RC-5B GSA rotor). A kapott felülúszót (micélium és búzakorpa mentes nyers extraktum) használtuk tovább. A nyers kivonatban 50%, majd 85% telítettségig ammónium-szulfáttal történő frakcionált kisózást végeztünk. A só teljes feloldását követően az oldatot 4 °C-on, 24 órán át

állni hagytuk. Az oldat centrifugálása (10000 rpm, 15 perc, SORVALL-RC-5B SS34 rotor) után a keletkezett csapadékot a lehető legkisebb térfogatú foszfát pufferben (0,1 M; pH 6,8) vettük fel. További munkánk során a 85% telítettségű frakció csapadékában lévő koncentrált enzimkivonatokkal dolgoztunk tovább.

A kisózási lépések utáni tömény enzimkivonat további tisztítását Sephadex G-25 töltetű oszlopon végeztük (GE Healthcare; 1 - 5 kDa; 10 x 200 mm). Az oszlopot előzetesen 50 mM-os Trisz-pufferrel (pH 8,5) mostuk, majd ugyanezzel a pufferrel eluáltunk. A legmagasabb enzimaktivitást mutató frakciókat egyesítettük, majd Macro-Prep HQ (BioRad; 12,6 x 40 mm) anioncserélő oszlopra vittük fel. Az oszlopot előzőleg szintén 50 mM-os Trisz-pufferrel (pH 8,5) mostuk. Az enzimet 1 ml/perc átfolyási sebességgel, 0-1 M NaCl lineáris gradiensben történő változtatásával eluáltuk. A tisztítási folyamat minden lépése után *p*NFP és *p*NFK kromogén szubsztrátok alkalmazásával mértük az egyes frakciókban az enzim hidrolitikus aktivitását.

3.6. A lipáz biokémiai jellemzéséhez alkalmazott reakcióelegyek

A vizsgálatokban a részlegesen tisztított *Rh. stolonifer* extracelluláris lipáz enzimmel dolgoztunk. Az enzimaktivitás meghatározására *p*NFP szubsztrátot használtunk. A reakcióelegyeket minden esetben 500 µl végtérfogatra állítottuk össze. Az inkubálási idő letelte után 50 µl Na-karbonáttal állítottuk le a reakciót, a felszabadult *p*-nitrofenol intenzitását 405 nm-en mértük.

A hőmérséklet optimum vizsgálata

200 µl enzimkivonat (kb. 0,1 U/ml)

0,75 mM *p*NFP foszfát pufferben (pH 6,8) oldva

Az elegyeket 5, 10, 20, 25, 30, 40, 50, 60 és 70 °C hőmérsékleten, 40 percen át inkubáltuk.

A hőstabilitás vizsgálata

200 µl enzimkivonat

0,75 mM *p*NFP foszfát pufferben (pH 6,8) oldva

Az enzimkivonatot 5, 10, 20, 25, 30, 40, 50, 60 és 70 °C hőmérsékleten inkubáltuk 4 órán keresztül. Ezután 0,75 mM pNFP-t adtunk az elegyekhez, majd az enzim aktivitásának optimális hőmérsékletén 40 percig inkubáltuk.

A pH optimum vizsgálata

200 µl enzimkivonat

0,75 mM pNFP

McIlvaine pufferoldat (2. táblázat)

Az enzimkivonatot a megfelelő pH-jú pufferoldattal 40 percig inkubáltuk az enzim aktivitásának optimális hőmérsékletén.

2. táblázat. Az alkalmazott McIlvaine-féle pufferoldat összetétele.

pH	200 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	100 mM citromsav x H ₂ O
2,2	2%	98%
2,6	11%	89%
3,0	21%	79%
3,4	29%	71%
3,8	36%	64%
4,2	41%	59%
4,6	47%	53%
5,0	52%	48%
5,4	56%	44%
5,8	61%	39%
6,2	66%	34%
6,6	73%	27%
7,0	82%	18%
7,4	91%	9%
7,8	96%	4%
8,0	97%	3%

A pH stabilitás vizsgálata

200 µl enzim

McIlvaine pufferoldat

Az enzimkivonatot a megfelelő pH-jú pufferoldatban 24 órán át 4 °C-on tartottuk, majd 0,75 mM *p*NFP szubsztrát hozzáadását követően a reakcióelegyet az enzim optimális hőmérsékletén 40 percig inkubáltuk.

Lehetséges gátlók vizsgálat

200 µl enzimkivonat

0,75 mM *p*NFP foszfát pufferben (pH 6,8) oldva

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

A reakcióelegyet az enzim aktivitásának optimális hőmérsékletén 40 percig inkubáltuk.

Szubsztrátspecifitás vizsgálata

50 µl enzimkivonat

0,75 mM *p*NF-acetát, *p*NF-propionát, *p*NF-butirát, *p*NF-valerát, *p*NF-kaproát, *p*NF-kaprilát, *p*NF-dekanoát, *p*NF-dodekanoát vagy *p*NF-palmitát foszfát pufferben (pH 6,8) oldva

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

Alkoholok és alkánok enzimaktivitásra gyakorolt hatásának vizsgálata

200 µl enzimkivonat

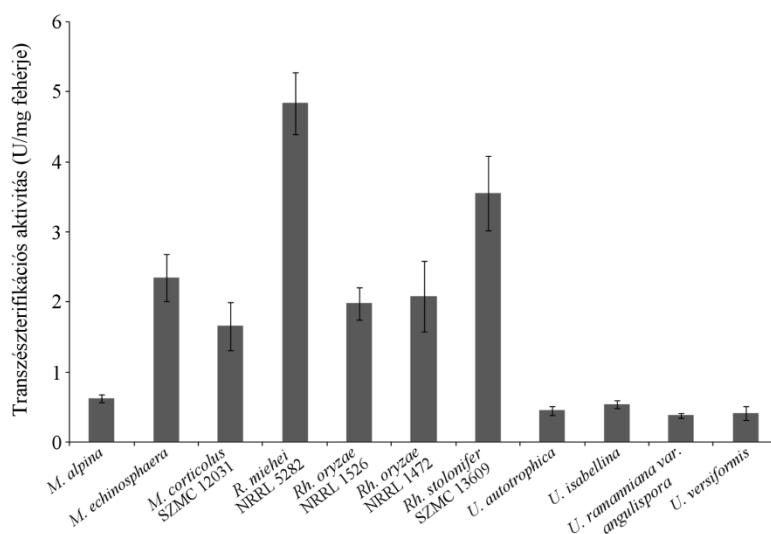
0,75 mM *p*NFP foszfát pufferben (pH 6,8) oldva

5%, 10%, 15%, 20% (v/v%) metanol, etanol, propanol, izopropanol, butanol, izoamil-alkohol, hexanol vagy hexán, ciklohexán, heptán, izooktán

A reakcióelegyet a megfelelő alkohol, vagy alkán koncentrációval 40 percig inkubáltuk az enzim aktivitásának optimális hőmérsékletén.

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELESÜK

Előzetes vizsgálataink alapján a *Rhizopus stolonifer* SZMC 13609 tributirin tartalmú szilárd táptalajon és folyadék tenyészetben is ígéretes extracelluláris lipáz termelőnek bizonyult. Folyadék tenyészetben különböző lipid induktorok (Tween-80, pálma-, szója-, gyapot-, napraforgó-, olíva-, extra szűz olíva-, tökmag-, kukoricacsíra-, búzacsíra-, szezámolaj) enzimtermelésre gyakorolt hatását is megvizsgáltuk. A tesztekkel Tween-80 és olívaolaj jelenlétében tapasztaltuk a legjelentősebb lipáz aktivitást. Búzakorpa alapú szilárd fermentációban a búzakorpa ásványi sós tápoldattal történő dúsítása az izolátum lipáztermelését tovább fokozta. Emellett az enzim szintetikus aktivitásának tesztelésére elvégzett vizsgálatokban kiemelkedő átészterező, azaz transzészterifikációs aktivitást (3,5 U/mg) mutatott *p*-nitrofenil-palmitát és etanol között (1. ábra; Kotogán és mtsi, 2014). A 40 °C-on, 30 percig történő inkubációt követően az enzim átészterező aktivitásának eredményeként felszabadult *p*-nitrofenolt spektrofotométer segítségével határoztuk meg.



1. ábra. A lipáztermelő törzsek transzészterifikációs aktivitása 40 °C-on, 30 perc inkubációt követően

4.1. Búzakorpa alapú szilárd fermentáció

Mezőgazdasági melléktermékek lipáztermelésre történő fermentációs alkalmazása kevésbé vizsgált terület járomspórás gombáknál. Ezen szubsztrátok felhasználása extracelluláris enzimek termeltetése céljából nemcsak gazdaságos, de környezetbarát eljárás is egyben (Treichel és mtsi, 2010). Vizsgálataink ismereteket szolgáltatnak az alkalmazott

búzakorpa - mely nagy mennyiségben keletkező mezőgazdasági maradvány - további hasznosíthatóságának lehetőségeiről. A búzakorpa ideális szubsztrátként való alkalmazhatóságát mutatja, hogy tartalmaz minden olyan fehérjét, zsírokat és aminosavakat, melyek a gomba megfelelő növekedéséhez és az enzimtermeléshez szükségesek (Salihu és mtsi, 2012). További kiegészítése ásványi sókkal és induktorokkal tovább fokozhatja az enzimprodukción. A lipáztermelés fokozására irányuló szilárd fermentációs kísérleteinkben az inkubációs hőmérséklet és induktor olajok hatását vizsgáltuk.

4.1.1. A hőmérséklet lipáztermelésre gyakorolt hatása

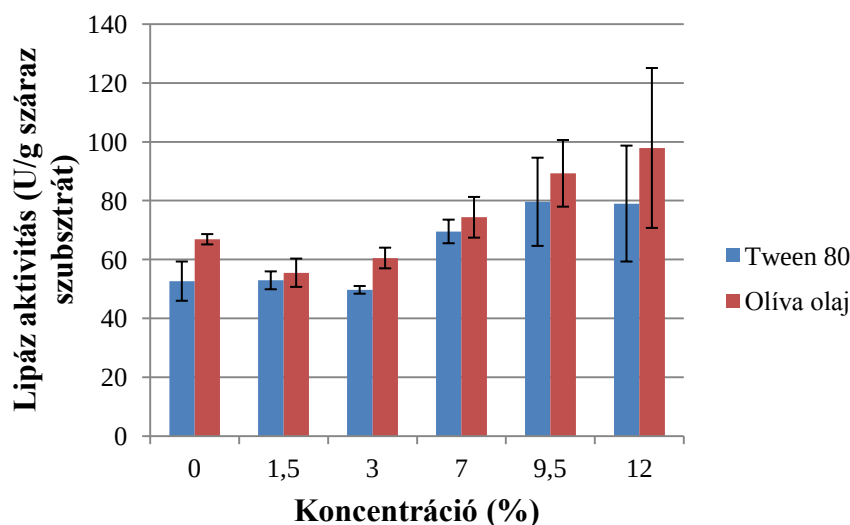
A tesztekben 20, 25, 30 és 35 °C hőmérsékleteken vizsgáltuk a *Rh. stolonifer* SZMC 13609 izolátum lipáztermelését. A törzs a legintenzívebb növekedést 25 °C-on mutatta, 20 és 30 °C-on kevésbé volt képes növekedni, míg 35 °C-on alig mutatott növekedést. Nagy lipázaktivitásokat 20 és 25 °C inkubációs hőmérsékleteket alkalmazva tapasztaltuk. Érdeemes megemlíteni, hogy a 35 °C-on inkubált tenyészet esetében is mutattunk ki lipázaktivitást (44,84 U/g száraz szubsztrát). A legnagyobb lipázhozamot 25 °C-on tapasztaltuk (52,1 U/g száraz szubsztrát); a továbbiakban ezen a hőmérsékleten végeztük az inkubációkat. Az enzimaktivitás mérés minden esetben 7 napos fermentációt követően történt.

4.1.2. Induktor olajok enzimaktivitásra gyakorolt hatása

Kísérleteinkben az olívaolaj és a Tween-80 lipáztermelés-induktorként való alkalmazhatóságát teszteltük. Ennek érdekében különböző mennyiségben hozzáadva (0%, 1,5%, 3%, 7%, 9,5% és 12%) vizsgáltuk az említett olajok hatását az enzimtermelésre. A korábbi tesztjeinkben az ásványi sós tápoldat 1,5%-ban tartalmazott induktor olajat; az olaj mennyiségének növelésével a lipáztermelés további fokozhatóságát vizsgáltuk. Az enzimaktivitást ebben az esetben is 7 napos fermentálást követően határoztuk meg (2. ábra).

A mért enzimaktivitás értékek alapján megállapítható, hogy az eredetileg 1,5%-os koncentrációban alkalmazott Tween-80 (ahol 52,8 U/g száraz szubsztrát aktivitást tapasztaltunk) mennyiségének növelésével jelentősen, mintegy 20%-al sikerült magasabb lipáztermelést elérnünk (79,7 U/g száraz szubsztrát). Olívaolaj esetén 50%-al sikerült növelnünk az enzimhozamot (97,9 U/g száraz szubsztrát). Körülbelül 10% (m/v szubsztrát) olajtartalom bizonyult optimálisnak mindkét olaj esetén. Búzakorpa alapú szilárd

fermentációs tesztjeinkben az olívaolaj ígéretesebb lipáztermelés-induktornak bizonyult, így további kísérleteinkben ezzel az induktorral dolgoztunk tovább.



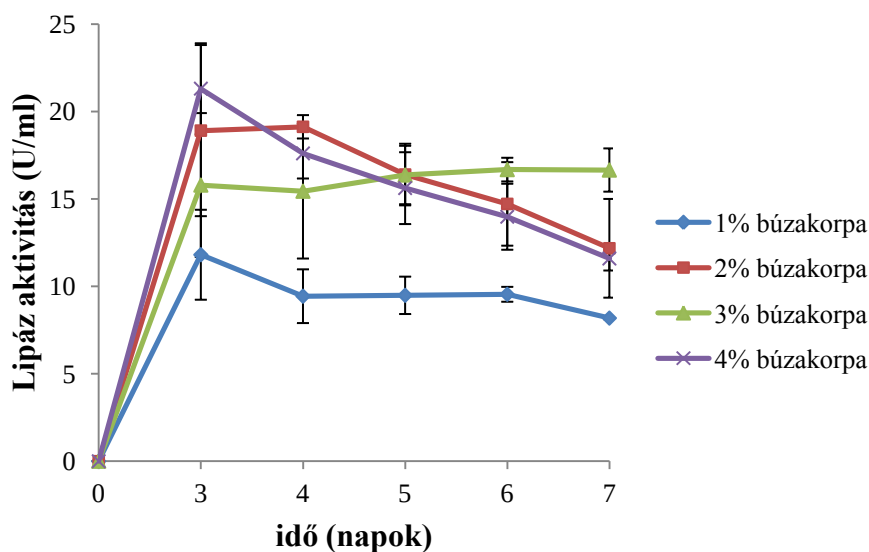
2. ábra. Olívaolaj és Tween-80 mennyiségének hatása a lipáztermelésre búzakorpa alapú szilárd fermentációban (7. napi értékek)

4.2. Búzakorpa alapú folyadék fermentáció

Mivel szilárd fázison olívaolaj hozzáadásával nagyobb lipázhozamot kaptunk, így a további folyadékos tesztekben ezt az olajat alkalmaztuk induktorként. A 2% búzakorpa tartalom mellett elvégzett folyadék fermentációban ugyanakkor az olívaolaj koncentráció fordítottan arányos volt enzimaktivitással. Az olajmentes kontrollok vizsgálatakor a 3. nap után tapasztaltuk a legnagyobb lipázaktivitást (15,1 U/ml). Folyadék tenyészetben a hozzáadott olaj valószínűleg kötött formában tartja a termelt enzimek egy részét, melyek aktív centruma így nem szabad. Az enzimaktivitás kimutatásához alkalmazott aril-észter szubsztrát bontása így feltehetően alacsonyabb hatékonyságú. Irodalmi adatok ugyanakkor arra is utalnak, hogy egyazon gombatörzs különböző tulajdonságú lipáz enzimet termelhet folyadék és szilárd fázison (Mateos Diaz és mtsi, 2006).

Ezután indukciós olaj nélküli, csak búzakorpát tartalmazó tápoldat lipáztermelésre gyakorolt hatását vizsgáltuk (3. ábra). A teszteknél a búzakorpát különböző mennyiségben alkalmaztuk a folyadékos közegben (1, 2, 3, 4%). Kísérleteinkben a búzakorpa 2% koncentráció felett alkalmazva indukálta leginkább a lipáz enzim termelődését. A fermentáció

időtartamára vonatkoztatva, 4% búzakorpa mellett, a 3. napon kaptuk a legnagyobb enzimhozamot (21,3 U/ml). Ezt követően a lipázhozam fokozatos csökkenését tapasztaltuk.



3. ábra. A búzakorpa mennyiségének hatása a lipáztermelésre búzakorpa alapú folyadék fermentációban

Érdeemes megemlíteni, hogy az izolátum nem volt képes növekedni csak olívaolajat tartalmazó ásványi sós tápközegeben. A jelenség oka egyrészt az lehet, hogy a gomba nem képes ezt az olajat egyedüli szénforrásként hasznosítani. Másrészt, az olívaolaj a gomba növekedését gátló anyagokat (pl. antioxidánsok) is tartalmazhat, melyek hatása így jobban érvényesülhet.

4.3. A *Rh. stolonifer* extracelluláris lipáz tisztítása

Előzetes munkáink alapján a *Rh. stolonifer* SZMC 13609 járomspórás gombatörzs által termelt extracelluláris lipáz enzim ígéretesnek bizonyult mind nagyfokú hidrolitikus aktivitása, mind pedig szintetikus (átészterező és észterező) aktivitása miatt. Mikroszkópikus gombák közül főleg tömlősgomba lipázok tisztítását és biokémiai jellemzését írták le a szakirodalomban (Saxena és mtsi, 2003; Namboodiri és Chattopadhyaya, 2000; Singh és Mukhopadhyay, 2012; Ferrer és mtsi, 2000). Ugyanakkor, a későbbi biotechnológiai és ipari folyamatokban történő felhasználhatóságuk szempontjából kiemelkedő fontosságú a járomspórás gomba által termelt lipáz enzimek tanulmányozása. A fenti okokból kifolyólag

érdeemesnek tartottuk a *Rh. stolonifer* által termelt extracelluláris lipáz enzim tisztítását és biokémiai jellemzését is.

A megfelelő hozam elérése érdekében búzakorpa alapú folyadék fermentációt végeztünk 4 napon keresztül. A búzakorpa olcsó malomipari termék (Koblitz és Pastore, 2006), mely szilárd tápközegként, illetve folyadék fermentációban alkalmazva is ígéretes szubsztrátnak bizonyult. Az enzim nagy mennyiségű előállításához, illetve magas enzimaktivitású nyers kivonat készítéséhez 1,5 literes lombikokban végeztük a fermentálást. A tisztítás első lépéseként ammónium-szulfát segítségével frakcionált kisózást végeztünk a nyers extraktumból. 50%-os és 85%-os telítettség elérése után a 85%-os frakció koncentrált enzimból dolgoztunk tovább. A folyamat következő lépéseként méret szerinti elválasztást végeztünk, ezt követően pedig anioncserélő kromatográfiás eljárást alkalmaztunk. Minden tisztítási lépés után meghatároztuk az enzimaktivitást a csapadékokban és a felülúszókban. A tisztítás adatainak kiértékelése, illetve az izolált enzimfehérje molekulatömegének meghatározása folyamatban van.

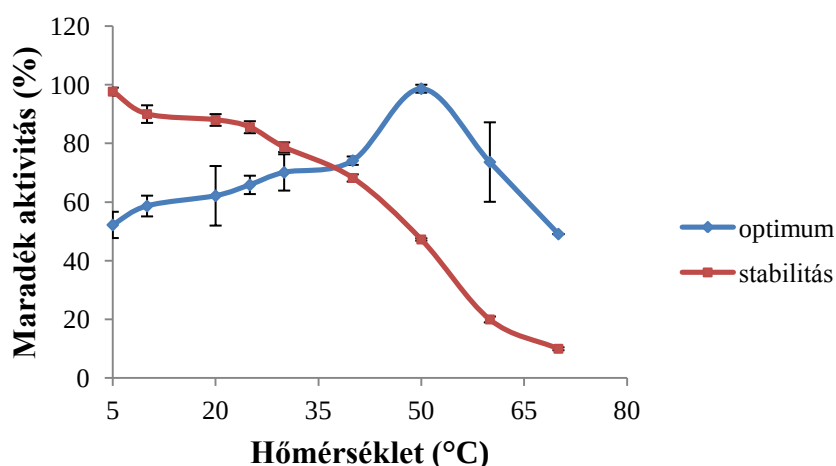
4.4. A *Rh. stolonifer* lipáz biokémiai jellemzése

A *Rh. stolonifer* izolátum által termelt extracelluláris lipáz hidrolitikus aktivitását néhány, a reakciót befolyásoló tényező változtatása mellett is megvizsgáltuk. Teszteltük a hőmérséklet, pH, fémsók, reagensek, alkoholok és alkánok enzimaktivitásra gyakorolt hatását, valamint az enzim szubsztrátspecifitását is elemeztük. A vizsgálatok megmutatják az enzim működését és stabilitását eltérő környezeti feltételek és reakció összetételek mellett, ezért az ipari folyamatokban való alkalmazhatóság szempontjából jelentős információkkal bővíthetjük ismereteinket. A jellemzés során a részlegesen tisztított enzimból dolgoztunk.

4.4.1. Hőmérséklet optimum és stabilitás

Az enzimaktivitás hőmérséklet optimumának és stabilitásának vizsgálatát 5 és 70 °C közötti tartományban végeztük. Az optimum meghatározásánál az adott hőmérsékleten történő 40 perces inkubáció után, pNFP szubsztrátot alkalmazva mértük az enzimaktivitásban bekövetkező változásokat. A stabilitás vizsgálatoknál 4 órán át inkubáltuk az enzim kivonatot az adott hőmérsékleten, ezt követően adtuk hozzá a mintákhoz a pufferezt szubsztrátot, mellyel együtt még 40 perces inkubáció következett az enzim hőmérsékleti optimumán.

A *Rh. stolonifer* extracelluláris lipáz hőmérsékleti optimumát 50 °C körül állapítottuk meg (4. ábra). Eddig a hőmérsékletig fokozatosan nő az enzimaktivitás, 50 °C után pedig csökkenni kezd, azonban még 70 °C-on is körülbelül 50%-os aktivitást mutatott. Az enzim alacsony hőmérsékleten is aktívnek bizonyult; 5 °C hőmérsékleten inkubálva is megőrizte aktivitásának 50%-át. Rendkívül ígéretesnek tekinthető széles hőmérsékleti tartományon történő alkalmazhatósága, mely számos ipari felhasználás szempontjából igen előnyös tulajdonság (pl. mosószeripar) (Sharma és mtsi, 2001).



4. ábra. A *Rh. stolonifer* SZMC 13609 lipáz aktivitásának hőmérséklet optimuma és stabilitása

A *Rh. stolonifer* lipáz 5-30 °C hőmérsékletig stabilnak bizonyult aktivitásának mintegy 80%-át megőrizve. E felett azonban nagymértékű stabilitás csökkenést tapasztaltunk. Az enzim 50 °C körül veszíti el aktivitásának felét 4 órás inkubációt követően, de még 70 °C-on is mérhető csekély (10%) aktivitás. Magas hőstabilitással rendelkező lipáz enzimeket elsősorban a mosószer ipar (Jaeger és Reetz, 1998), és a szerves szintézisek, így a lipáz katalizált észterifikációk (pl. biodízel előállítás) igényelnek. Magas hőmérsékleti optimummal és stabilitással rendelkező lipázt korábban *Aspergillus terreus* (Yadav és mtsi, 1998) és *Mucor racemosus* (Mohamed és mtsi, 2011) fajokból azonosítottak.

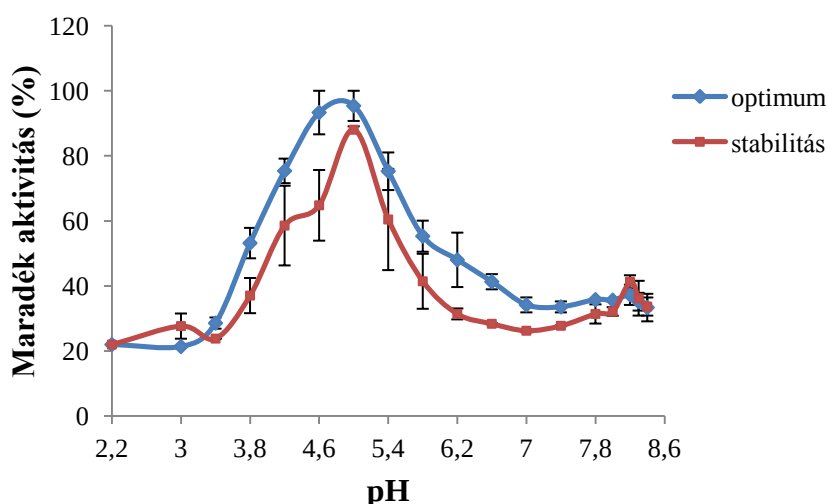
4.4.2. pH optimum és stabilitás

Az enzimaktivitás pH optimumát és stabilitását pH 2,2 és pH 8,0 közötti tartományban vizsgáltuk. A pH optimum meghatározásához 40 percig inkubáltuk az egyes reakcióelegyeket

a különböző pH értékeken, majd pNFP szubsztrát segítségével fotometriásan mértük az enzim aktivitásában bekövetkező változásokat. A pH stabilitás vizsgálatokor 24 órán át inkubáltuk az enzimet 4 °C-on az adott pH értéken, majd a szubsztrát hozzáadása után az enzim hőmérséklet optimumán, azaz 50 °C-on inkubáltuk a reakcióelegyeket 40 percig.

A vizsgált *Rh. stolonifer* lipáz acidofílnak bizonyult, ugyanis a legnagyobb enzimaktivitást a pH 5,0 körülire beállított reakcióközegben mértük. Az aktivitás az alacsony pH értékektől a pH 5,0 értékig fokozatosan növekedett, e felett azonban egyenletes csökkenést tapasztaltunk (5. ábra). Aktivitásának felét pH 6,0 felett veszítette el. Fonalas gomba lipázok közül *Aspergillus niger* (Namboodiri és Chattopadhyaya, 2000), *Aspergillus repens* (Kaminishi és mtsi, 1999) és *Penicillium simplicissimum* (Sztajer és mtsi, 1992) izolátumoknál írtak le pH 5,0 körüli optimummal rendelkező enzimeket. Az eddig tisztított *Rhizopus* lipázok közül a *Rhizopus japonicus* (Suzuki és mtsi, 1986) és a *Rhizopus chinensis* (Yasuda és mtsi, 2000) lipázai szintén pH 5,0 értéken mutattak legmagasabb aktivitást. A *Rhizopus arrhizus* és *Rhizopus delemar* izolátumok lipáz enzimeit ennél magasabb pH optimummal rendelkeznek (Dobrev és mtsi, 2011; Haas és mtsi, 1992).

Az enzim meglehetősen szűk tartományon, pH 4,5-6,0 között őrizte meg stabilitását 24 órás inkubáció után, amely pH 6,0 értéken már csak 40% maradék aktivitást mutatott. Savas tartományban is aktív enzimeket elsősorban az élelmiszeripari folyamatokban hasznosítanak (Pandey és mtsi, 1999).

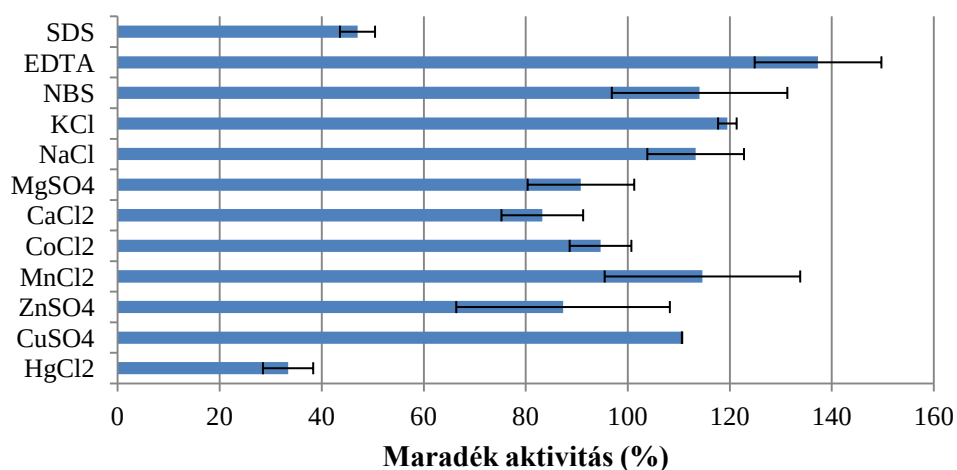


5. ábra. A *Rh. stolonifer* SZMC 13609 lipáz aktivitásának pH optimuma és stabilitása

4.4.3. Lehetséges gátlók vizsgálat

Különböző fém sók (CoCl_2 , HgCl_2 , CuSO_4 , ZnSO_4 , MnCl_2 , CaCl_2 , MgSO_4 , NaCl , KCl) és reagensek (NBS, EDTA, SDS) lipázaktivitásra kifejtett hatását is elemeztük. A kationokat 5 mM, a reagenseket pedig 10 mM koncentrációban alkalmaztuk az egyes reakcióelegyekben. A fémionok szerepe az enzimfehérjék szerkezetének és funkciójának befolyásolásában jelentős, mivel konformációs változásokat okozhatnak az enzim szerkezetében. Az enzimhez történő kötődéssel stabilizálhatják, vagy destabilizálhatják azokat, így fokozhatják vagy gátolhatják aktivitásukat (Li és mtsi, 2011).

A Hg^{2+} és az SDS jelentős mértékben csökkentette az enzim aktivitását (33,41% és 47,01% maradék aktivitás mellett) (6. ábra). Egy *Mucor* faj esetében az SDS, illetve a Triton X-100, valamint a Hg^{2+} , Fe^{2+} és Fe^{3+} fémionok szintén erős gátlást fejtettek ki az enzim aktivitására (Abbas és mtsi, 2002). A *Rh. arrhizus* lipázát vizsgálva az derült ki, hogy a nem poláros anyagok, mint a Triton X-100 nem inaktiválták az enzimet, míg a negatívan töltött anyagok, mint az SDS az enzim stabilitásának csökkenését okozták (Dobrev és mtsi, 2011). A Ca^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} és a Mg^{2+} ionok kismértékben, 80-90 %-ra csökkentették *Rh. stolonifer* lipáz aktivitását. Na^+ , K^+ NBS, Mn^{2+} és Cu^{2+} jelenlétében megközelítőleg 10-20% enzimaktivitás emelkedést tapasztaltunk, míg az EDTA ennél is nagyobb mértékben növelte az enzim aktivitását (kb. 35%). Az általunk vizsgált izolátum lipáz enzime rendkívül stabilnak bizonyult számos vizsgált fém só jelenlétében, amely egy igen ígéretes tulajdonság lehet a specifikus ipari és biotechnológiai folyamatok katalizálásában való felhasználhatóság szempontjából.

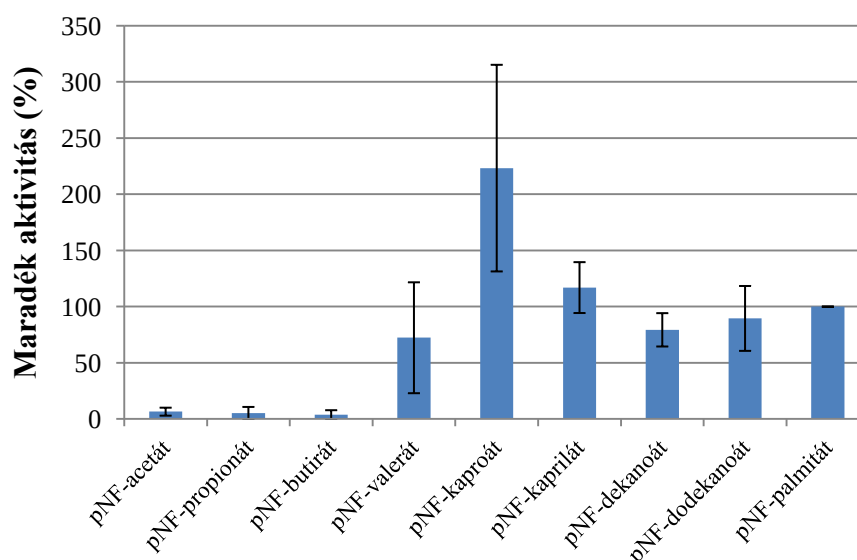


6. ábra. A különböző fém sók és reagensek hatása a *Rh. stolonifer* SZMC 13609 lipáz aktivitására

4.4.4. A szubsztrátspecifitás vizsgálata

A szubsztrátspecifitás meghatározásához különböző szénláncosszúságú aril-észtereket [*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) és *p*NF-palmitát (C16)] alkalmaztunk. A különböző kromogén szubsztrátokat 0,75 mM koncentrációban adtuk hozzá az adott reakcióelegyekhez. Kontrollként a *p*NF-palmitát hidrolízisének tapasztalt optikai denzitás értékét vettük alapul.

A *p*NF-palmitátnál (C16) kapott eredményekkel összehasonlítva a *p*NF-kaproát (C6) és *p*NF-kaprilát (C8) szubsztrátokat hasította leghatékonyabban az enzim (7. ábra). A rövid szénláncú szubsztrátokat (C2-C4) csak igen csekély mértékben hidrolizálta a lipáz enzim (kb. 5%). A C6-C16 közötti szubsztrátokat hatékonyan bontotta a *Rh. stolonifer* SZMC 13609 lipáz, mely így a széles szubsztrátspecifitású enzimek közé sorolható. Egy *Rhizopus oryzae* izolátumból tisztított lipáz enzim a C8-C18 láncosszúságú telített zsírsavak mellett hasít nagy gyakorisággal, a többszörösen telítetlen zsírsavak mellett azonban csak kismértékű hidrolízis figyelhető meg (Hiol és mtsi, 2000). A *Rhizopus* fajok lipáz enzimeinek többségére a C8-C10 szénláncosszúságú közepes zsírsavak hasításának preferenciája jellemző (Dobrev és mtsi, 2011).

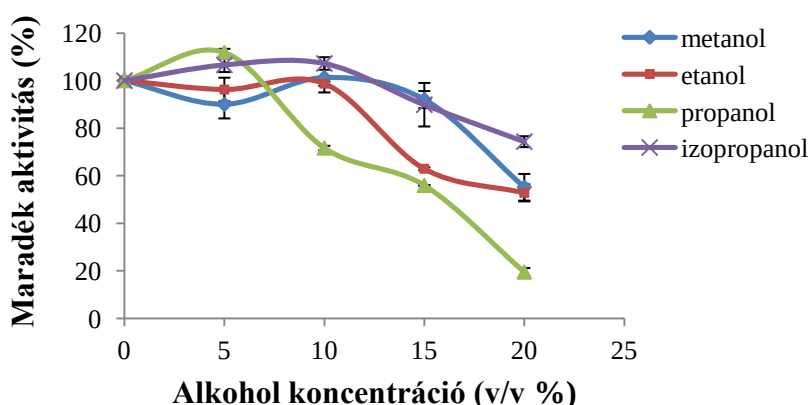


7. ábra. Különböző szénláncosszúságú aril észterek *Rh. stolonifer* SZMC 13609 lipáz általi hasításának vizsgálata

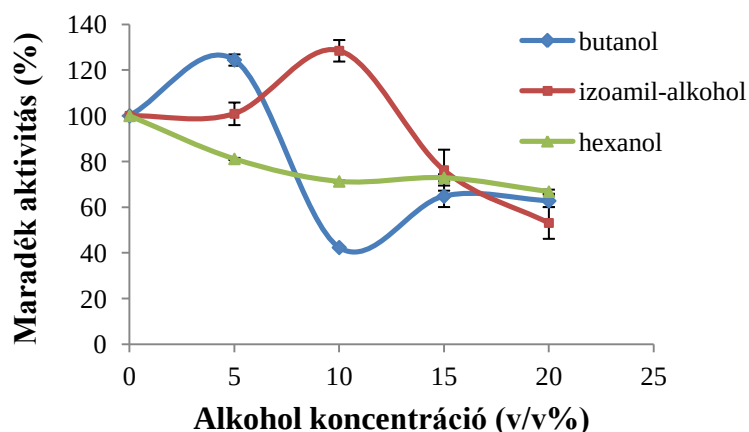
4.4.5. Alkoholok és alkánok enzimaktivitásra gyakorolt hatása

Az enzimaktivitás változását növekvő koncentrációjú (5, 10, 15, 20%) metanol, etanol, propanol, izopropanol, izoamil-alkohol és hexanol, valamint hexán, ciklohexán, heptán és izooktán jelenlétében vizsgáltuk. Kontrollnak az alkoholt, illetve alkánt nem tartalmazó mintában mért optikai denzitás értéket vettük.

A *Rh. stolonifer* enzim aktivitását az etanol, metanol, propanol és az izopropanol csak 20% koncentrációban alkalmazva gátolta jelentősebben. Ezekben az alkoholokban ígéretes stabilitást mutatott az enzim (8. ábra). Hexanol esetében dózistól függő gátlást tapasztaltunk (9. ábra). A propanol és a butanol 5% koncentrációban alkalmazva kis mértékben növelte (112 és 124%-ra) az enzim aktivitását, azonban nagyobb koncentrációban (15-20%) már csökkentette a *p*-nitrofenol felszabadulást. Izoamil-alkohol 5% koncentrációban nem volt hatással az enzim aktivitására, azonban 10% koncentrációnál serkentő hatást figyeltünk meg. A serkentő hatás a *Rh. stolonifer* lipáz jó átészterező képességével lehet összefüggésben, ugyanis csökkent vízaktivitás esetén az átészterező reakciók kerülnek előtérbe (Abbas és Comeau, 2003). A lipáz enzimek egyik előnyös tulajdonsága, hogy vízmentes közegben is képesek működni. Alacsony vízaktivitás mellett mind hidrolízis, mind szintézis is történik egyidejűleg; azonban vízmentes közegben csak szintézis megy végbe. A *Mucor hiemalis f. corticola* járomspórás gomba lipáza metanolban és etanolban is igen stabil maradt. Az iparban, különösen a lipáz enzim által katalizált biodízel előállításában, a szerves oldószer tolerancia rendkívül hasznos lehet (Ülker és Karaoglu, 2012).

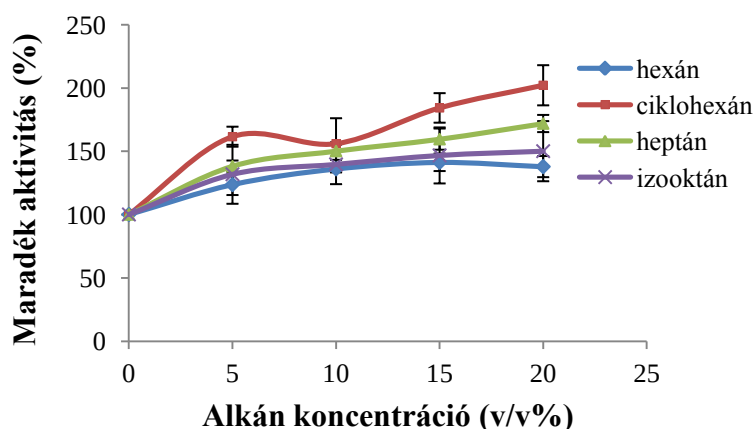


8. ábra. Különböző koncentrációjú metanol, etanol, propanol és izopropanol hatása a *Rh. stolonifer* SZMC 13609 lipáz aktivitására



9. ábra. Különböző koncentrációjú butanol, izoamil-alkohol és hexanol hatása a *Rh. stolonifer* SZMC 13609 lipáz aktivitására

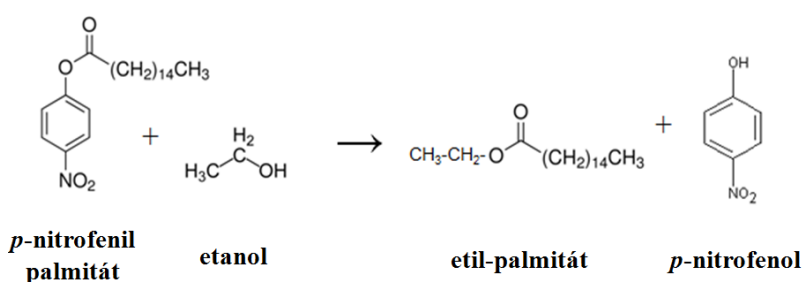
A vizsgálatba bevont alkánoknál jelentős *p*-nitrofenol felszabadulást tapasztaltunk a kontrollhoz viszonyítva (10. ábra). Az oldószerek mennyiségének növekedése feltételezhetően fokozta az enzim stabilitását, így növekvő enzimaktivitás tendenciát tapasztaltunk. Az alkánok, mint vízzel nem elegyedő szerves oldószerek stabilizálják az enzim aktív konformációját, ellentétben a vízzel elegyedő oldószerekkel, melyek sokkal inkább destabilizálhatják az enzimet (Ebrahimpour és mtsi, 2011). Oldószerekben aktív és stabil enzimek elsősorban az olajkémia-, és gyógyszeripar területén, a szerves kémiai szintézisek katalizálásában játszanak fontos szerepet.



10. ábra. Különböző koncentrációjú alkánok hatása a *Rh. stolonifer* SZMC 13609 lipáz aktivitására

4.5. A *Rh. stolonifer* lipáz szintetikus aktivitása

A lipáz enzimek hidrolitikus aktivitásuk mellett vízmentes, vagy alacsony víztartalmú közegben szintetikus aktivitással is rendelkeznek. Ilyenkor észterező-átészterező reakciók kerülnek előtérbe, melynek katalizálását a *Rh. stolonifer* SZMC 13609 lipáz esetében is tanulmányoztuk. Az enzim átészterező aktivitásának meghatározására egy kolorimetriás módszert alkalmaztunk. A reakció során a lipáz enzim a pNF-palmitát kromogén szubsztrát és etanol közötti átészterezést katalizálja. Az észterkötés áthelyeződés révén *p*-nitrofenol válik szabaddá, ami 405 nm hullámhosszon fotometriásan mérhető (11. ábra).

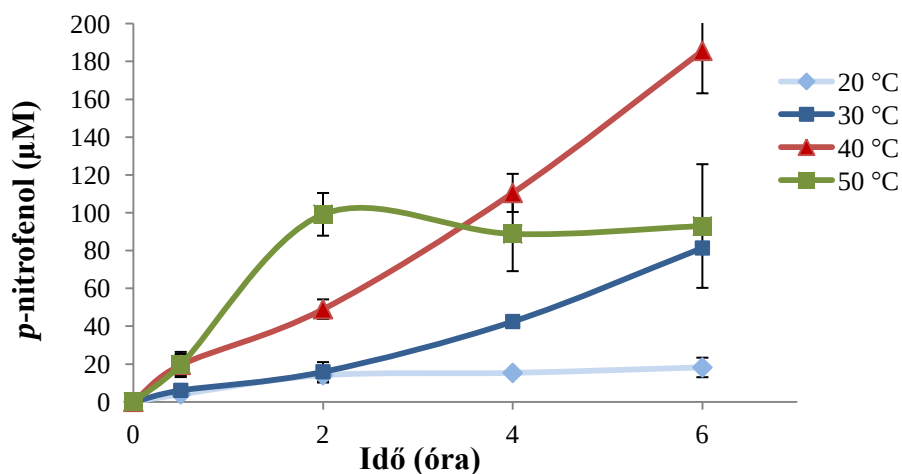


11. ábra. A pNF-palmitát és etanol közötti transzészterifikáció feltételezett modellje

A kísérletekhez búzakorpa alapú fermentáció utáni nyers enzimm kivonatokat fagyaszttva szárítottunk (liofilizálás). Előzetes vizsgálatainkban heptánt alkalmazva reakció közegként teszteltük az enzim átészterezési képességét alkohol (etanol 10%) és egy acil-donor (pNF-palmitát, 10 mM) között 40 °C-os inkubációs hőmérsékleten (lásd 1. ábra). A *p*-nitrofenol felszabadulását 30 perc után fotometriásan detektáltuk. A keletkező *p*-nitrofenol és etil-palmitát moláris mennyisége a reakció során megegyezik.

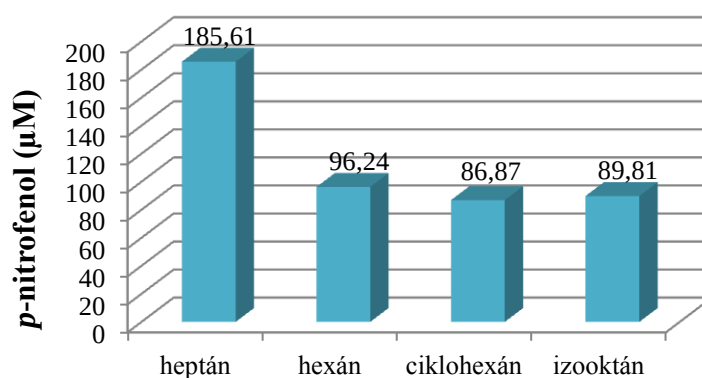
Az előzetes tesztjeinket folytatva az átészterezési reakció körülményeinek (pl. hőmérséklet, inkubációs idő, reakcióközegként alkalmazott szerves oldószer, akceptor alkohol) változtatásával vizsgáltuk a felszabaduló *p*-nitrofenol mennyiségét. Hosszabb inkubációs időt alkalmazva (2, 4 és 6 óra) növekedett a felszabadult *p*-nitrofenol mennyisége (12. ábra). Az inkubációs idő növelésével nem, vagy csak kis mértékben tapasztaltunk további *p*-nitrofenol felszabadulást. Az inkubációs hőmérséklet változtatásakor 20 és 30 °C-on a reakció sebessége alacsonyabbnak bizonyult, így a felszabaduló *p*-nitrofenol mennyisége is elmaradt a 40 °C alkalmazásához viszonyítva. 50 °C-os inkubációnál gyorsabban ment végbe a reakció, ami azonban az enzimek gyorsabb inaktiválódása miatt idővel alacsonyabb *p*-

nitrofenol felszabadulást eredményez. A legmagasabb *p*-nitrofenol felszabadulást 40 °C-on, 6 órás inkubációt követően tapasztaltuk (185,6 µM).



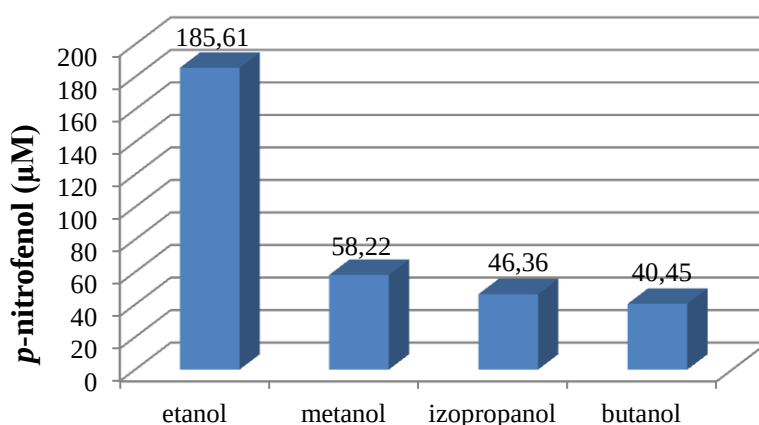
12. ábra. A *Rh. stolonifer* SZMC 13609 lipáz által katalizált átészterezés hőmérséklet és idő függésének vizsgálata

A transzészterifikációt egyéb oldószer közegek (hexán, ciklohexán, izooktán) alkalmazásakor is teszteltük (13. ábra). Ebben az esetben a 40 °C-on végzett 6 órás inkubáció utáni értékeket hasonlítottuk össze. Ezekben az alkánokban is végbement a reakció, azonban az *n*-heptános közegnél mért mennyiségekkel összehasonlítva nem tapasztaltunk nagyobb *p*-nitrofenol felszabadulást.



13. ábra. Különböző szerves oldószer közegek hatása a *Rh. stolonifer* SZMC 13609 lipáz aktivitására

Metanol, izopropanol és butanol észter akceptorok jelenlétében is megvizsgáltuk az átészterezési reakciót (14. ábra). Ebben az esetben is a 40 °C-on történő 6 órás inkubáció adatait hasonlítottuk össze. Az átészterezési reakció ezen alkoholok alkalmazásakor is végbemegy, de lényegesen kisebb mennyiségű *p*-nitrofenol felszabadulást mértünk, mint etanol esetében.



14. ábra. Különböző zsírsav akceptor alkoholok hatása a *Rh. stolonifer* SZMC 13609 lipáz aktivitására

A reakciók eredményeként metanol akceptornál metil-palmitát, izopropanolnál izopropil-palmitát, butanolnál pedig butil-palmitát észter termékek keletkeznek. A nagy átészterező potenciállal rendelkező mikrobiális enzimek speciális észter molekulák vegyipari előállítására alkalmazhatók (Aravindan és mtsi, 2006; Jaeger és Eggert, 2002).

A *p*NF-palmitát és etanol közötti átészterezés eredményeként keletkező etil-palmitátot lángionizációs detektorral szerelt gázkromatográffal (GC-FID) is azonosítottuk. A keletkező etil-palmitát mennyiségét is meghatároztuk. A reakciót ezekben a vizsgálatokban 30 perc és 1 óra után állítottuk le. A 30 perces 40 °C-on történő inkubációt követően 9,7 μM, míg 1 óra után 21,6 μM etil-palmitát mennyiséget detektáltunk. Az analitikai módszerrel meghatározott etil-palmitát mennyisége összevethetőnek bizonyult a spektrofotometriás mérést követően számolt koncentráció értékekkel.

Az enzim észterező képességének vizsgálatát az említett GC-FID mérési módszer alkalmazásával kezdtük meg. Az enzim észterező képességét etil-palmitát észter keletkezése során teszteltük. Az átészterezés vizsgálatokhoz hasonlóan ebben az esetben is liofilizált enzimkivonattal dolgoztunk. A reakcióelegy 10 mM palmitinsavat és 50 μl etanolt tartalmazott, reakcióközegként *n*-heptánt használtunk. A mintákat folyamatos rázatás mellett

6, 24 és 48 órán át inkubáltuk 40 °C hőmérsékleten. Hat óra inkubáció után még nem keletkezett kimutatható mennyiségű etil-palmitát, azonban 24 órát követően 10,54 µg/ml (37,1 µM), míg 48 órás inkubációt követően 7,96 µg/ml (27,9 µM) termék észtert azonosítottunk. További kísérleteinkben a metanol különböző szénláncosságú zsírsavakkal (vajsav: C4, hexánsav: C6, oktánsav: C8, dekánsav: C10, dodekánsav: C12, palitinsav: C16, sztearinsav: C18, arachidonsav: C20 és néhány telítetlen zsírsav) történő észterezésének (6, 24 és 48 órás inkubációt követően) vizsgálatát is tervezzük.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

A lipázok a trigliceridek glicerinné és szabad zsírsavakká történő hidrolízisét katalizálják. Alacsony vízáktivitású vagy vízmentes közegben észter kötések kialakítására és áthelyezésére is képesek, mellyel új vegyületek szintézisét katalizálhatják. A lipázok egyik jellemzője a nagyfokú szubsztrátspecifitás és diverzitás, valamint sajátos enantioszelektív tulajdonságokkal is rendelkeznek. Előnyös tulajdonságaik számos biotechnológiai folyamatban kiaknázhatók. A legtöbb ipari folyamatnál mikrobiális forrásból származó lipázt alkalmaznak, mivel előállítása költségkímélőbb és kinyerése általában magasabb hozamú.

Előzetes munkáinkban a *Rhizopus stolonifer* SZMC 13609 járomspórás gombatörzs ígéretes lipáztermelőnek bizonyult. Ezzel együtt a termelt enzim a szintetikus képesség tesztelésére irányuló vizsgálataink során jelentős átészterező aktivitást is mutatott. A járomspórás gomba lipázok közül eddig csak néhány enzimet izoláltak, illetve használnak fel egyes ipari folyamatokban. További törzseket ebből a szempontból kevésbé jellemeztek, valamint az enzimek aktivitására és termelésére vonatkozó ismeretek is korlátozottak. Vizsgálataink egyrészt a *Rh. stolonifer* SZMC 13609 izolátum extracelluláris lipázhozamának javítására, ezzel együtt fermentációs körülmények optimalizálására és megfelelő induktív körülmények kiválasztására, másrészt a termelt enzim izolálásának és biokémiai jellemzésének megkezdésére terjedtek ki.

Búzakorpa alapú szilárd fermentációs tesztjeinkben az inkubációs hőmérséklet, az olívaolaj és a Tween-80 lipáztermelésre gyakorolt hatását elemeztük. Kiemelkedő enzimhozamot 20-25 °C hőmérsékleten inkubálva, 10% olajkoncentráció mellett tapasztaltunk. Az olívaolaj és a búzakorpa lipáztermelésre gyakorolt hatását sült kenyérszeletekben is megvizsgáltuk. Az olívaolaj koncentráció fordítottan arányos volt enzimaktivitással, azonban a búzakorpa 2% koncentráció felett alkalmazva indukálta leginkább a lipáztermelést. Megkezdjük a *Rh. stolonifer* SZMC 13609 extracelluláris lipáz tisztítását is. Az enzim biokémiai jellemzéséhez teszteltük a hőmérséklet, pH, fémionok, reagensok, alkoholok és alkánok hidrolitikus aktivitásra gyakorolt hatását, valamint az enzim szubsztrátspecifitását is elemeztük. A *Rh. stolonifer* lipáz hőmérsékleti optimumát 50 °C, míg pH optimumát 5,0 körül állapítottuk meg. A C6-C16 szénlánc hosszúságú szubsztrátokat hatékonyan bontotta az enzim, mely így a széles szubsztrátspecifitású lipázok közé sorolható. Az etanol, metanol, propanol és az izopropanol 10% koncentrációig nem gátolta az enzim aktivitását, sőt az etanolnál és a propanolnál jelentősebb serkentő hatást tapasztaltunk.

A *Rh. stolonifer* SZMC 13609 lipáz észterező-átészterező képességét is tanulmányoztuk. Jelen munkát megelőző kutatásainkat folytatva a hőmérséklet és az inkubációs idő függvényében vizsgáltuk az átészterezést, valamint többféle reakcióközeget és zsírsav akceptor alkoholt is teszteltünk. A *p*NF-palmitát és etanol közötti átészterezés eredményeként keletkező etil-palmitát lángionizációs detektorral szerelt gázkromatográffal (GC-FID) is azonosítottuk. Etanol és palmitinsav felhasználásával megkezdjük az enzim észterező kapacitásának vizsgálatát is. Észterezés eredményeként is tapasztaltunk etil-palmitát keletkezést, azonban az átészterezési reakcióktól eltérően itt lényegesen hosszabb inkubációs idő alkalmazására volt szükség.

Az ipari fejlesztések korszerű, biokatalizátorokon alapuló technikák iránti megnövekedett igénye új enzimek azonosítását, és az általuk katalizált folyamatok részletes elemzését teszi szükségessé. A járomspórás gombák kitűnő lipázforrások, így e gombacsoport lipázainak vizsgálata nagymértékben hozzájárul az ipar ilyen igényeinek kielégítéséhez. Eredményeink új ismereteket szolgáltatnak a *Rh. stolonifer* SZMC 13609 lipáz tulajdonságairól, valamint az enzim szintetikus folyamatokban történő hasznosíthatóságának lehetőségeiről is.