

Sipiczki Gizella, Eszterbauer Edina, Nagy Edina Szandra, Kiss Zsuzsanna, Bujna Erika

## Yarrowia törzsek pigmenttermelésének vizsgálata

### A szerzők elérhetősége

Sipiczki Gizella | PhD-hallgató | levelező szerző  
sipiczki.gizella@phd.uni-mate.hu

Eszterbauer Edina | hallgató  
edina@eszterbauer.hu

Nagy Edina Szandra | egyetemi adjunktus  
nagyedinaszandra@gmail.hu | <https://orcid.org/0000-0002-0527-1702>

Kiss Zsuzsanna | egyetemi adjunktus  
kiss.zsuzsanna@uni-mate.hu

Bujna Erika | egyetemi docens  
bujna.erika@uni-mate.hu | <https://orcid.org/0000-0002-5289-5235>

### A szerzők munkahelye

MATE ÉTTI Biomérnök és Erjedéssipari Tehológia Tanszék  
Munkahely címe: 1118 Budapest, Villányi út 29-45.



## Összefoglalás

A *Y. lipolytica* élesztőgomba számos anyagcseretermék mellett képes színanyagok termelésére is, amelyek természetes eredetüknél fogva különböző iparágakban alkalmazhatók szintetikus pigmentek alternatívájaként. Kutatásaink során a *Y. lipolytica* mellett más *Yarrowia* fajokhoz tartozó izolátumokat is vizsgáltunk pigmenttermelés szempontjából, és tápközeg optimalizációs kísérleteket végeztünk a színanyag termelés fokozására. A legjobb pigmenttermelő törzsnek a *Y. lipolytica* t 6/3 bizonyult, a leghatékonyabb tápközeg pedig a tirozinon felül további aminosavakat (glicin, L-glutamin, L-aszparagin) is tartalmazott. A pH hatásának vizsgálata során megállapítottuk, hogy a semlegestől távolodva, akár savas, akár lúgos tartományban, a pigmenttermelés mértéke csökkent. A pH=7 kémhatású pufferelt tápközegben, a desztillált vízzel készíthetőhöz hasonló eredményeket kaptunk, s pigmenttermelés a fermentáció hetedik napján érte el a maximumát. A mangán jelentősen befolyásolja a barna színanyag termelődését, 5 mM alkalmazásával a pigmenttermelés közel ötszörösére emelkedett.

**Kulcsszavak:** *Yarrowia lipolytica*, pigmenttermelés, tápközeg optimalizálás

## Bevezetés

A pigmentek minden élő anyagban megtalálhatók, vonzó színeket biztosítanak, és alapvető szerepet játszanak az organizmusok fejlődésében. Fellelhetőek levelekben, gyümölcsökben, zöldegekben és virágokban egyaránt, valamint a bőrben és a szemben is (Delgado-Vargas et al., 2010). Számos mikroorganizmus, például baktériumok, penészgombák és élesztők is képesek nagyszámú pigmentet

szintetizálni, s manapság egyre szélesebb körben terjed el alkalmazásuk a különféle iparágakban, ideértve az élelmiszeripart, a gyógyszeripart, a textilipart és a kozmetikai ipart (Kumar et al., 2015).

Az élelmiszeriparban számos mikroba eredetű pigment játszik szerepet az étel színezésében, mely kifejezetten fontos szerepet tölt be a táplálkozásunk során, hiszen jelzi az élelmiszer frissességét, minőségét, de utalhat akár a beltartalmi értékére is, ezért nagyban befolyásolja a piac alakulását és a fogyasztók döntéseit (Dufossé, 2006; Sen et al., 2019).

A mikroorganizmusok által termelt színyanyagok alkalmazása mind gazdasági, mind egészségügyi szempontokat tekintve is kedvezőbb, mint a szintetikus pigmenteké. A növényekből történő kinyeréshez képest is vannak előnyei, egyszerűen termelhetők, nem okoz problémát a nyersanyaghiány és az idényszerűség, továbbá a növényekből származó pigmentek instabilak, hőre és fényre érzékenyek, alacsony a vízdoldhatóságuk (Nigam és Luke, 2016). A színyanyagot termelő mikroorganizmusok nem toxikusak és nem patogének, így emberi fogyasztásra alkalmasak (Nigam és Luke, 2016).

A melaninok is a széles felhasználási potenciállal rendelkező színyanyagok közé tartoznak, amelyek védelmet nyújtanak a szervezetnek a káros környezeti hatásokkal – köztük a magas UV sugárzással – szemben, megkötik a szabadgyököket, antioxidáns hatásúak és a nehézfémek toxikus hatásaitól is képesek megvédeni a szervezetet (Hearing, 2005). Fenolos és/vagy indolos vegyületek oxidatív polimerizációja révén keletkeznek, negatívan töltött, hidrofób pigmentek, amelyek nagy molekulásúllyal rendelkeznek (Nosanchuk, 2015; El-Ahmady et al., 2017). Bioszintézis útjuk alapján a melaninok három csoportba sorolhatók: eumelaninok, feomelaninok és allomelaninok. Ez utóbbiak közé tartoznak a piomelaninok, mely termelésére a *Yarrowia lipolytica* élesztő is képes (Tahar et al., 2019). A piomelaninok szintézise tirozinnal homogentizinsav intermedieren keresztül történik (El-Ahmady et al., 2017; Tahar et al., 2019). Mindezek alapján kutatásaink során célul tűztük ki tirozin tartalmú tápközegekben különböző *Yarrowia* fajok pigment termelésének vizsgálatát és fokozását tápközeg optimálási kísérleteken keresztül.

## Anyagok és módszerek

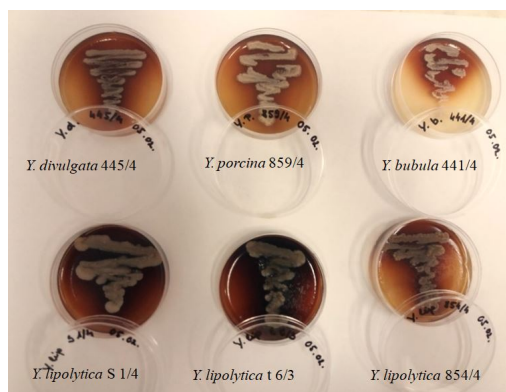
Kutató munkánk során a következő 6 *Yarrowia* nemzetségből származó törzset használtuk, melyet Nagy (2015) élelmiszerekből izolált: *Y. bubula* 441/4, *Y. divulgata* 445/4, *Y. porcina* 859/4, *Y. lipolytica* 854/4, *Y. lipolytica* s 1/4, *Y. lipolytica* t 6/3. A törzseket maláta tartalmú ferdeagaron tartottuk fent. A pigment fermentációhoz használt alap tápközeg összetétele:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (4 g/l),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (2,5 g/l),  $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0,106 g/l), melyet a kísérleti tervnek megfelelően egészítettünk ki tirozinnal, tejsavval és további aminosavakkal. A pigment termelés vizsgálata során 160–160 ml fermentációs tápközeget oltottunk be 5% inokulum tenyésztettel és 28 °C-on 130 rpm-en legalább 10 napon keresztül inkubáltuk. A fermentáció során meghatározott időközönként mintát vettünk. Megfelelő hígítást követően 600 nm-es hullámhosszon mértük a minták optikai denzitását a szaporodás követe

mért abszorbancia értékek meghatározása alapján végeztük Unicam Helios Alfa spektrofotométerrel. A tápközeg kémhatásának alakulását is nyomon követtük a fermentáció során. A pufferelt tápközegeknél a kívánt pH értéket (pH=5 – pH=8,0) Sørensen puffer segítségével állítottuk be.

## Eredmények és értékelésük

Hat darab *Yarrowia* törzset screeneltünk pigment termelésre Carreira és Loureiro (1998) által *Y. lipolytica* elkülönítéséhez alkalmazott tirozin tartalmú tápagaron. Az agaron kinőtt telepek körül látható barna elszíneződés utalt a törzsek pigment termelő képességére, melyet a leoltást követően 1 hét múlva értékeltünk.

Mindegyik vizsgált törzs esetén megfigyelhető volt a barna színű elszíneződés (**1. ábra**), bár a különböző törzsek különböző mértékben termeltek pigmentet. A legnagyobb mértékű színváltozást a *Y. lipolytica* törzsek esetén tapasztaltuk, míg a barna szín megjelenése a *Y. bubula* esetén volt a legkevésbé intenzív. A megjelölt szín alapján a *Y. porcina* és *Y. divulgata* törzseknél hasonló mértékű pigment szintézisre következtítettünk. Eredményeink alapján a legjobb termelőnek a *Yarrowia lipolytica* t 6/3 törzs bizonyult. E törzs mellett, a pigment termelés optimalására irányuló további vizsgálatainkat a szakirodalomban kevésbé tanulmányozott *Y. divulgata* és *Y. porcina* törzsekre is kiterjesztettük.



**1. ábra:** A *Yarrowia* törzsek pigment termelésre való screenelésének eredménye

Szubmerz, rázott lombikos fermentációk során végeztünk tápközeg optimálási kísérletet, melyhez a fermentációs tápközeget az **1. táblázatnak** megfelelően egészítettük ki. Ezek alapján kívántuk meghatározni, hogy a tirozin mellett egyéb aminosavakat is tartalmazó tápközeggel, illetve tejsav kiegészítéssel fokozható-e a pigment termelés a vizsgált törzsek esetén.

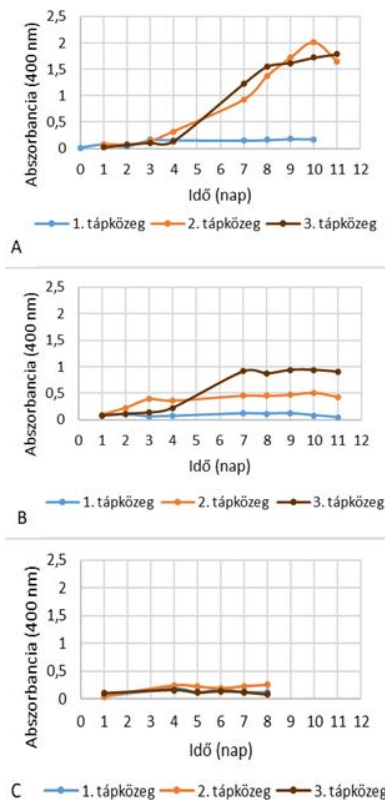
A legjobb pigment termelő törzs kiválasztása a 400 nm-en mért abszorbancia értékek alapján történt. A *Y.*

**1. táblázat:** A pigmenttermelés vizsgálatára készített tápközegek összetétele

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

*lipolytica* törzs 2,02-es értéket mutatott (**2/A ábra**) a fermentáció 10. napján, a *Y. porcina* és a *Y. divulgata* törzsek egyik tápközegben sem értek el 1,0-nál nagyobb abszorbancia értéket (**2/B és 2/C ábrák**). A három különböző tápközeg vizsgálata során a 2. tápközeg bizonyult a leghatékonyabbnak, mely a tirozin mellett glicint, L-glutamint és L-aszparagint is tartalmazott. A csak tirozin kiegészítést tartalmazó tápközeg egyik törzs esetében sem volt hatékony. A tejsav alkalmazása Joshi (2003) eredményei alapján pigmenttermelést fokozó hatással bírt, melyet a *Y. porcina* törzs esetében tapasztaltunk csak. E törzsnél a pigmenttermelés megduplázódott tejsav jelenlétében a fermentációt 7 napját követően, míg a vizsgált *Y. lipolytica* törzs esetében hasonló eredményeket kaptunk tejsav kiegészítés nélkül is.

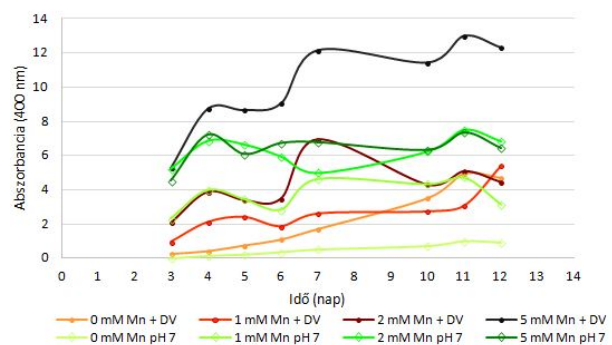
A pigmenttermelés további fokozását a szubmerz tenyésztésben is legjobb termelőnek bizonyult *Y. lipolytica* t 6/3 törzs esetén végeztük el, melyhez az aminosavakkal kiegészített tápközeg alkalmaztunk.



**2. ábra:** Abszorbancia értékek alakulása különböző tápközegekben *Yarrowia* törzsekkel végzett pigmentfermentáció során (A: *Y. lipolytica* t 6/3, B: *Y. porcina* 859/4, C: *Y. divulgata* 445/4) (1. tápközeg: alap + tirozin 2. tápközeg: alap + tirozin + aminosavak, 3. tápközeg: 2. tápközeg + tejsav)

Vizsgáltuk a tápközeg kiindulási pH-jának hatását pH=5-8 tartományban mind a növekedésre, mind a pigment termelés alakulására. Az eredmények alapján megállapítható, hogy a mikroba növekedését a pH nem befolyásolja jelentősen a vizsgált tartományban. A pigment termelés a pufferelt tápközegek közül a pH=7 értékűben volt a legjobb, ettől akár savas, akár lúgos irányba való eltérés, a pigmentszintézist hasonló mértékben csökkentette. A vízzel készített kontroll tápközegben a pufferelthez (pH=7) hasonlóan nagy abszorbancia értékeket mértünk, azonban a pigment-szintézis ennél a tápközegnél lassabban indult el. Míg az 5. napon közel 1,5-szer nagyobb az abszorbancia a pufferelt tápközegben, a 7. naptól kezdődően az értékek megegyeznek, és növekvő tendenciát mutatnak. Összességében egy 7 napos fermentáció során nem szükséges a pufferelt tápközeg alkalmazása.

Szakirodalmi adatok alapján (Carreira és Loureiro, 1998) a mangán jelenléte (1 mM) befolyásolja a *Y. lipolytica* pigment termelését, azonban a különböző koncentrációk hatását nem vizsgálták a képződött színanyag tekintetében. Erre kerestük a választ a következő kísérletben, mind desztillált vízzel készített, mind pufferelt (pH=7) tápközegben 0, 1, 2 és 5 mM koncentrációban alkalmazva a mangánt. Megállapítottuk, hogy a legnagyobb mértékű pigmenttermelés 5 mM mangán jelenlétében volt, mind a pufferelt, mind a vízzel készített tápközeg esetén (**3. ábra**). Mangán jelenléte nélkül mind a szaporodás, mind a pigmenttermelés később indult be és elhúzódott. A pufferelt tápközeg esetén a mangán koncentráció növelésével arányosan nőtt a színanyag mennyisége is, de kevésbé bizonyult hatékonynak a vízzel készített tápközeghez képest. A mangán koncentráció ötszörösére való növelésével, a mért abszorbancia értékek is kb. ötszörös értéket mutattak.



**3. ábra:** Mangán koncentráció hatásának vizsgálata a *Y. lipolytica* t 6/3 pigmenttermelésére vizes és pufferelt tápközegben

## Következtetések, javaslatok

A *Yarrowia* nemzetség különböző törzseivel végzett pigmentfermentációk alapján megállapítottuk, hogy a

*Y. lipolytica* t 6/3 termeli legnagyobb mennyiségben a barna színanyagot. A tápközeg optimalizálás során vizsgált csak tirozin kiegészítést tartalmazó tápközeg egyik törzs esetében sem bizonyult hatékonynak, azonban további aminosavak alkalmazásával a pigment termelés fokozódott. A pufferelt tápközegek közül a pH=7-es beállítás volt a legeredményesebb, azonban vízzel készített tápközegben is 7 napos fermentációval azonos eredmények érhetők el. A mangán koncentráció hatásának vizsgálata során az 5 mM mangán kiegészítéssel, az 1 mM-os kontroll tápközeg abszorbancia értékéhez képest kb. ötszörös értéket sikerült elérni. A vizsgálat megerősítette továbbá, hogy szükségtelen a kiindulási tápközeg pufferelése, vízzel készített, 5 mM mangánt tartalmazó tápközegben közel kétszer akkora abszorbancia értékeket mértünk, mint a pufferelt (pH=7) közegben.

Összességében megállapítható, hogy a *Y. lipolytica* t 6/3 képes pigment előállítására, amely a különböző iparágakban alkalmazható, mint természetes eredetű színanyag. Mivel a mangán koncentrációjának változtatása nagy hatással van a barna színanyag szintézisére további vizsgálatok végzése javasolható kísérlettervezéssel. Faktorként a mangán mellett, a szintézisben fontos szerepet játszó tirozin koncentrációja, valamint ezek együttes hatásának a vizsgálata is eredményes lehet az optimalizációs folyamatok során. A *Yarrowia*-k által termelt pigment pontos meghatározását HPLC-MS analízis segítségével tervezzük elvégezni.

## Irodalomjegyzék

- Carreira, A., Loureiro, V. (1998): A differential medium to detect *Yarrowia lipolytica* within 24 hours. *J. Food Mycol.* 1:3-12.
- Dufossé, L. (2006): Food grade pigments. *Food Technol.*

- Biotechnol.*, 44(3):313-321.
- El-Naggar, N.A., El-Ewasy, S. (2017): Bioproduction, characterization, anticancer and antioxidant activities of extracellular melanin pigment produced by newly isolated microbial cell factories *Streptomyces glaucescens* NEAE-H. *Scientific Reports*, 14(7):42129. <https://doi.org/10.1038/srep42129>
- Hearing, V.J. (2005): Biogenesis of pigment granules: a sensitive way to regulate melanocyte function. *J. Dermatol. Sci.*, 37(1):3-14. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2004.08.014>
- Joshi, V.K., Attri, D., Bala, A., Bhushan, S. (2003): Microbial pigments. *Ind. J. Biotechnol.*, 2:362-369.
- Kumar, A., Vishwakarma, H.S., Singh, J., Dwivedi, S., Kumar, M. (2015): Microbial pigments: production and their applications in various industries. *Int. J. Pharm. Chem. Biol. Sci.*, 5(1):203-212.
- Nagy, E. (2015): Élelmiszeromlást okozó *Yarrowia* csoport biodiverzitása különböző élelmiszerekben. Doktori értekezés, Budapest
- Nigam, P.S., Luke, J.S. (2016): Food additives: production of microbial pigments and their antioxidant properties. *Curr. Op. Food Sci.*, 7:93-100. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.02.004>
- Nosanchuk, J.D., Stark, R.E., Casadevall, A. (2015): Fungal melanin: what do we know about structure? *Front. Microbiol.*, 6:1463. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01463>
- Sen, T., Barrow, C.J., Deshmukh, S.K. (2019): Microbial pigments in the food industry—Challenges and the way forward. *Front. Nutr.*, 6:1-36. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00007>
- Tahar, B.I., Kus-Liškiewicz, M., Lara, Y., Javaux, E., Fickers, P. (2019): Characterization of a nontoxic pyromelanin pigment produced by the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology Progress*, e2912. <https://doi.org/10.1002/btpr.2912>

## Study of pigment production of *Yarrowia* strains

Sipiczki G., Eszterbauer E., Nagy E.Sz., Kiss Zs., Bujna E

### Abstract

In addition to many metabolic products, the yeast *Y. lipolytica* is also capable of producing dyes, which, due to their natural origin, can be used in various industries as an alternative to synthetic pigments. In the course of our research, in addition to *Y. lipolytica*, isolates belonging to other *Yarrowia* species were examined in terms of pigment production, and nutrient optimization experiments were carried out to increase pigment production. *Y. lipolytica* t 6/3 proved to be the best pigment-producing strain, and the most effective medium contained additional amino acids (glycine, L- glutamine, L- asparagine) in addition to tyrosine. During the examination of the effect of pH, we found that moving away from neutral, whether in an acidic or alkaline range, the level of pigment production decreased. In the pH=7 buffered medium, similar results were obtained to those prepared with distilled water, and pigment production reached its maximum on the seventh day of fermentation. Manganese significantly affects the production of the brown pigment, with the application of 5 mM, the pigment production increased almost fivefold.

**Keywords:** *Yarrowia lipolytica*, pigment production, nutrient medium optimisation