

БИОТЕХНОЛОГИЯ И ПРОМЫШЛЕННАЯ ЭКОЛОГИЯ

DOI: 10.15593/2224-9400/2021.3.01

УДК 579.66

К.Л. Шнайдер, М.Е. Зиновьева, В.С. Гамаюрова

Казанский национальный исследовательский
технологический университет, Казань, Россия

ВЛИЯНИЕ КОМПОНЕНТОВ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА БИОСИНТЕЗ ЛИПАЗЫ ДРОЖЖАМИ *YARROWIA* (*CANDIDA*) *LIPOLYTICA* Y-3153 (ATCC 34088)

Уникальные свойства полиэкстремофильных дрожжей Yarrowia lipolytica делают этот вид микроорганизмов перспективным объектом биотехнологии. Дрожжи этого вида способны активно развиваться на средах с необычайно широким набором источников углерода и азота, синтезировать разнообразные ферменты и органические кислоты, накапливать большое количество жиров и белка в клетках. Липаза является одним из наиболее привлекательных и перспективных ферментов. Дрожжи Yarrowia lipolytica являются многообещающими продуцентами липаз.

Целью исследовательской работы является изучение влияния состава питательной среды на рост и липолитическую активность дрожжей Yarrowia lipolytica.

Показано, что растительные масла оказывают индуцирующее действие на биосинтез липазы. Установлено, что высокая липолитическая активность и хороший рост культуры наблюдаются при выращивании дрожжей на среде, содержащей глюкозу в концентрации 5 г/л и оливковое масло в концентрации 1 % об.

Органические источники азота используются культурой для роста и способствуют повышению липолитической активности культуры. Наиболее высокая липолитическая активность наблюдается при введении в состав питательной среды обезжиренной соевой муки в концентрации 40 г/л.

Обнаружено активирующее действие поверхностно-активных веществ на выработку липазы. Наибольший прирост липолитической активности наблюдается при добавлении твин-20 в концентрации 0,001 мг/мл.

Показано, что осаждение липазы из осветленной культуральной жидкости сульфатом аммония позволяет повысить степень очистки липазы в 1,9 раза.

Таким образом, разработан состав питательной среды, позволяющий повысить липолитическую активность дрожжей Yarrowia lipolytica Y-3153 в 8 раз. Наиболее высокая липолитическая активность и рост дрожжей Yarrowia lipolytica наблюдаются при культивировании в среде следующего состава: глюкоза – 5 г/л, дрожжевой автолизат – 5 мл/л, обезжиренная соевая мука – 40 г/л, твин 20 – 0,001 мг/мл, оливковое масло – 1 % об.

Ключевые слова: штамм, продуцирование липолитического фермента, индуктор, активатор.

K.L. Shnaider, M.E. Zinov'eva, V.S. Gamayurova

Kazan National Research Technological University,
Kazan, Russian Federation

**EFFECT OF GROWTH MEDIUM COMPONENTS
ON THE BIOSYNTHESIS OF YEAST LIPASE YARROWIA
(CANDIDA) LIPOLYTICA Y-3153 (ATCC 34088)**

The unique properties of the polyextremophilic yeast Yarrowia lipolytica make this microorganism a promising object of biotechnology. These yeasts are able actively to develop on a wide range of carbon and nitrogen sources, synthesize a variety of enzymes and organic acids, and accumulate a large amount of fat and protein in cells. Lipase is one of the most attractive and promising enzymes. The yeast Yarrowia lipolytica is a promising lipase producer.

The aim of the research work is to study the influence of glucose concentration, vegetable oils, nitrogen sources and surfactant on the growth and lipolytic activity of the yeast Yarrowia lipolytica.

It has been shown that vegetable oils have an inducing effect on lipase biosynthesis. It was found that high lipolytic activity and good growth of the culture are observed on a medium containing glucose at a concentration of 5 g/l and olive oil at a concentration of 1%vol.

Organic nitrogen sources are used by the culture for growth and increase the lipolytic activity of the culture. The highest lipolytic activity is observed with defatted soy flour as a nutrient at a concentration of 40 g/l.

An activating effect of surfactants on lipase production was found. The largest increase of lipolytic activity is observed with the addition of Tween-20 at a concentration of 0,001 mg/ml.

It was shown that the precipitation of lipase from the clarified culture liquid with ammonium sulfate allow to increase the degree of lipase purification up to 1,9 times.

Thus, it has been developed the composition of the nutrient medium that increased the lipolytic activity of the yeast Yarrowia lipolytica Y-3153 by 8 times. The highest lipolytic activity and growth of Yarrowia lipolytica yeast are observed when it was cultivated in a medium of the following composition: glucose - 5 g/l, yeast extract - 5 ml/l, defatted soy flour - 40 g/l, Tween-20 – 0,001 mg/ml, olive oil – 1 vol%.

Keywords: strain; lipolytic enzyme production; enzyme inducer; enzyme activator.

Липаза (КФ 3.1.1.3) является одним из наиболее привлекательных ферментов, имеющих большие перспективы в промышленности [1]. Липазы уже нашли широкое применение в масложировой промышленности для реализации процессов переэтерификации триацилглицеридов и в органическом синтезе при синтезе сложных органических соединений [2–4]. Липазы вырабатывают микроорганизмы различных таксономических групп: бактерии, актинобактерии, дрожжи и микроскопические грибы. Грибы и дрожжи синтезируют в основном внекле-

точные ферменты, бактерии образуют преимущественно эндоферменты, хотя у некоторых истинных бактерий обнаружены и экзоферменты [5–7]. В настоящее время основными промышленными продуцентами липаз являются грибы и дрожжи. Диморфные аскомицетные дрожжи *Y. lipolytica* являются перспективным объектом для получения промышленно ценной липазы. Из литературных данных известно [8], что дрожжи *Y. lipolytica* имеют более высокую устойчивость к высоким концентрациям субстрата, чем грибы и более толерантны к ионам металлов, что позволяет использовать менее очищенные субстраты для культивирования.

Цель работы – изучение влияния состава питательной среды на рост и липолитическую активность дрожжей *Y. lipolytica*.

Экспериментальная часть. Штамм *Yarrowia (Candida) lipolytica* с регистрационным номером Y-3153 (ATCC 34088) получен из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов. Посевной материал выращивали на сусле-агаре с содержанием сахаров 5,5–6,0 % в течение 24 ч при температуре 30 °С, после чего суспендировали в физиологическом растворе и вносили в жидкие питательные среды в количестве 10 % от объема. Оптическая плотность посевного материала составляла 0,15–0,16 ($\lambda = 490$ нм). Культуру выращивали на шейкере-инкубаторе «Innova 3100» (США) со скоростью перемешивания 250 об./мин при 30 °С. В качестве жидкой среды при культивировании дрожжей использовали среды следующего состава: глюкоза – концентрация изменялась в диапазоне 0–20 г/л; дрожжевой экстракт – 0–5 мл/л; источник азота – 5–50 г/л. В качестве индукторов при культивировании использовали растительные масла в концентрации 1 % об., в качестве ПАВ – твин-20 и твин-80 в концентрации 0,00001–50 г/л.

По окончании инкубации содержимое колб тщательно перемешивали, биомассу отделяли от культуральной жидкости центрифугированием (3000 об./мин, 10 мин). В надосадочной жидкости (осветленной культуральной жидкости) определяли содержание белка биуретовым методом и липолитическую активность стандартным методом Ота–Ямада [9] в динамике через 12, 18, 24, 36, 48 ч культивирования.

Отделенную биомассу дважды промывали дистиллированной водой и высушивали до постоянной массы (определение абсолютно сухой биомассы (АСБ)).

Выделение липазы из осветленной культуральной жидкости осуществляли методом осаждения сульфатом аммония [9].

Результаты обрабатывали с помощью пакета статистических программ Statistica 6.0. Достоверность отличий контрольных и экспериментальных результатов оценивали при помощи *t*-критерия Стьюдента. Погрешность измерений не превышала 7 %.

Результаты и их обсуждение. Состав питательной среды оказывает большое влияние на уровень биосинтеза липаз микроорганизмами. На первом этапе работы рассмотрено влияние концентрации глюкозы и времени культивирования на рост и липолитическую активность культуры *Y. lipolytica*, при использовании стандартных сред. Как показали исследования, максимальный прирост биомассы и наибольшая липолитическая активность наблюдается при концентрации глюкозы в среде 20 г/л [10].

Липазы микроорганизмов являются индуцируемыми ферментами. Эффективность действия индукторов зависит от вида и штамма микроорганизма и от природы самого индуктора. Индукторами обычно являются субстраты, на которые действует данный фермент или продукты их гидролиза, а также некоторые аналоги этих соединений. При биосинтезе липаз в качестве индукторов используют природные жиры растительного или животного происхождения, а также некоторые поверхностно-активные вещества, причем как индивидуально, так и в сочетании с липидными индукторами [11–15].

Дальнейшие исследования посвящены подбору индукторов, усиливающих биосинтез липазы. В качестве индукторов синтеза липазы дрожжами *Y. lipolytica* изучены следующие виды масел: оливковое, льняное и касторовое. Выбор этих масел обусловлен их жирнокислотным составом. Оливковое и касторовое масла выбраны как масла, в которых преобладает определенная жирная кислота (82 % олеиновой и до 85 % рицинолевой кислот соответственно). Льняное масло характеризуется высоким содержанием полиненасыщенных ω -3 и ω -6 жирных кислот, около 18 % линолевой и до 50 % α -линоленовой кислот. Влияние выбранных индукторов биосинтеза липазы исследовалось при использовании питательных сред с различным содержанием глюкозы 5, 10 и 20 г/л. Состав питательной среды: глюкоза 5–20 г/л, пептон 10 г/л, дрожжевой автолизат 5 мл/л, индуктор – растительное масло в концентрации 1 % об. Полученные данные представлены в табл. 1.

Таблица 1

Влияние индуктора на липолитическую активность и рост культуры *Yarrowia lipolytica*

Время культивирования, ч	Вид индуктора	Липолитическая активность (ед/мл к.ж.) в зависимости от концентрации глюкозы в среде			Удельная липолитическая активность (ед/мг белка к.ж.) в зависимости от концентрации глюкозы в среде			Относительная активность (ед/мг АСБ) в зависимости от концентрации глюкозы в среде			Концентрация АСБ (г/л) в зависимости от концентрации глюкозы в среде		
		Концентрация глюкозы, г/л											
		5	10	20	5	10	20	5	10	20	5	10	20
18	Контроль	42±1	62±2	65±2	6,35	9,74	10,79	12,42	12,58	13,63	3,36	4,92	4,79
		78±1	48±1	53±1	10,84	7,37	8,71	13,31	7,73	8,31	5,88	6,25	6,41
		60±1	42±1	18±0	7,55	6,21	3,22	8,77	5,88	2,27	6,85	7,11	8,06
24	Касторовое масло	55±1	53±1	32±1	7,85	8,22	5,05	12,05	11,60	7,13	4,59	4,60	4,48
		15±0	32±1	47±1	3,57	5,57	9,04	3,96	5,55	5,80	3,79	5,70	8,05
		77±1	53±1	43±1	11,82	7,63	6,86	10,81	6,35	4,38	6,96	8,42	9,89
48	Касторовое масло	62±1	57±1	17±0	11,77	8,26	2,75	9,22	6,67	1,58	6,70	8,50	10,62
		43±1	73±1	83±2	9,17	11,06	12,88	9,29	12,42	12,26	4,66	5,91	6,79
		13±0	13±0	43±1	2,61	2,42	7,94	3,87	2,31	5,67	3,43	5,73	7,64
48	Касторовое масло	102±1	35±0	12±0	17,89	4,90	1,44	13,33	3,37	0,98	7,64	10,39	11,85
		103±1	38±1	7±0	18,39	4,87	0,90	14,58	3,53	0,58	7,07	10,84	11,65
		37±0	42±1	118±3	8,04	7,43	16,75	10,40	7,61	16,90	3,53	5,47	7,00

Представленные в табл. 1 данные показывают, что влияние индукторов на продукцию липазы и ее активность зависят не только от природы индуктора, но и от концентрации глюкозы в питательной среде и времени культивирования.

Как видно из представленных данных, при высоком содержании глюкозы в питательной среде (20 г/л) введение оливкового и льняного масел в состав питательной среды, несмотря на увеличение накопления биомассы культурой, приводит к снижению липолитической активности. Однако при снижении концентрации глюкозы в питательной среде до 10 и 5 г/л липолитическая активность дрожжей в присутствии этих индукторов увеличивается. Это объясняется тем, что в ходе культивирования культура, после исчерпания глюкозы в среде, начинает использовать масла в качестве источников питания, а для эффективной утилизации масел необходима выработка липазы. Наибольший прирост биомассы на ранних этапах культивирования наблюдается при применении льняного масла. Поскольку используется нерафинированное льняное масло, оно содержит кроме полиненасыщенных жирных кислот большое количество витаминов (А, Е, D, К), микроэлементов и других биологически активных веществ, что и приводит к ростостимулирующему эффекту. Однако через 48 ч культивирования ростостимулирующие эффекты льняного и оливкового масел выравниваются.

Иные результаты показывает введение касторового масла. При использовании в качестве индуктора касторового масла включается другой механизм индуцирующего воздействия. В течение первых 18 ч культивирования касторовое масло приводит преимущественно к снижению липолитической активности культуры. При увеличении времени культивирования наблюдается нарастающий эффект повышения липолитической активности, но рост культуры дрожжей замедляется. Касторовое масло не является пищевым, обладает бактерицидными свойствами и высокой вязкостью. Поэтому введение касторового масла в среду культивирования приводит к ингибированию роста дрожжей за счет токсического эффекта и ухудшения снабжения культуры кислородом. Пытаясь избавиться от ингибитора, культура повышает выработку липазы раньше, чем при использовании других индукторов.

Таким образом, механизм индуцирующего эффекта льняного и оливкового масел на липолитическую активность и рост дрожжей *Y. lipolytica* определяется их потенциальными пищевыми свойствами. Для эффективной утилизации пищевых свойств этих растительных ма-

сел на бедных средах культура резко увеличивает продукцию липазы, что и позволяет ей эффективно использовать продукты деструкции масел в качестве источников питания, в результате чего достигается двойной эффект – повышение липолитической активности и увеличение роста биомассы дрожжей. Механизм индуцирующего действия касторового масла на липолитическую активность дрожжей *Y. lipolytica* имеет другую природу. Увеличение выработки липазы при применении этого масла объясняется стремлением культуры к детоксикации индуктора, а не его питательными свойствами.

В дальнейших исследованиях решено в качестве индуктора использовать оливковое масло в концентрации 1 % об. Выращивание культуры при этом проводили на среде следующего состава: пептон – 10 г/л, дрожжевой автолизат – 5 мл/л, глюкоза, 5 г/л. Как показывают данные, представленные на рис. 1, изменение концентрации оливкового масла в среде нецелесообразно. Уменьшение концентрации масла до 0,5 % снижает его индуцирующий эффект, а повышение концентрации масла в среде до 2 % приводит к снижению липолитической активности культуры, вероятно, из-за ухудшения снабжения культуры кислородом.

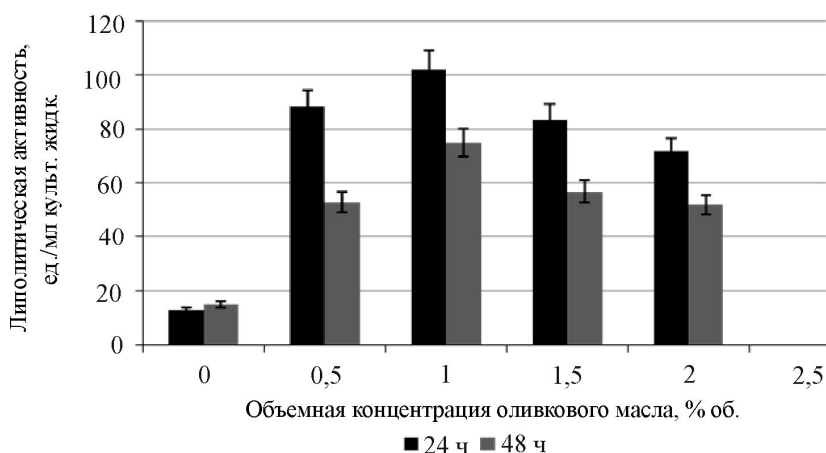


Рис. 1. Влияние концентрации оливкового масла на липолитическую активность дрожжей

Для дальнейших исследований выбрана среда следующего состава: 5 г/л глюкозы, 10 г/л пептон, 5 мл/л дрожжевого автолизата, 1 % об. оливкового масла.

Важным фактором, определяющим интенсивность накопления липаз микроорганизмами, является источник азота в среде выращива-

ния. Известно, что большинство продуцентов липаз используют для построения клеток и образования ферментов самые разнообразные источники азота, как органические, так и минеральные. Однако уровень липолитической активности на этих источниках различен и определяется индивидуальными особенностями культуры [10, 16].

Рекомендуемая в паспорте культуры дрожжей *Y. lipolytica* среда культивирования в качестве источника азота содержит пептон. Но данный источник азота является дорогостоящим. Поэтому предприняты попытки заменить пептон на более дешевые источники азота.

Исследовано влияние на биосинтез липазы культурой дрожжей *Y. lipolytica* следующих соединений: сульфата аммония, мочевины, пептона, необезжиренной и обезжиренной соевой муки. Выращивание культуры проводили на среде следующего состава: оливковое масло – 1 % об., глюкоза – 5 г/л, дрожжевой автолизат – 5 мл/л, источник азота – 5–20 г/л. Продолжительность культивирования – 24 ч.

Как показывают данные, представленные в табл. 2, введение минеральных солей в среду культивирования приводит к существенному замедлению роста культуры (концентрация биомассы снижается в 3–3,5 раза), причем с повышением концентрации этих соединений, угнетение роста усиливается. Липолитическая активность при использовании неорганических соединений азота отсутствует.

Таблица 2

Зависимость липолитической активности и роста культуры дрожжей *Yarrowia lipolytica* от концентрации сульфата аммония и мочевины

Источник азота	Время культивирования, ч	Концентрация источника азота, г/л	Липолитическая активность, ед/мл к.ж.	АСБ, г/л
Сульфат аммония	24	5	Отсутствует	2,19
		10	Отсутствует	1,93
		20	Отсутствует	1,91
Мочевина	24	5	Отсутствует	2,67
		10	Отсутствует	0,47
		20	Отсутствует	0,40
Пептон	24	10	80,0 ± 1,6	6,5
		20	107,0 ± 2,4	8,5
		30	70,0 ± 1,4	10,2
	48	10	102,0 ± 2,4	7,4
		20	85,0 ± 1,6	10,3
		30	53,0 ± 1,2	11,9

Поскольку минеральные источники азота оказались неэффективны, то исследовалось влияние концентрации пептона на рост и липолитическую активность дрожжей *Y. lipolytica*.

Как видно из представленных данных, увеличение концентрации пептона до 20 г/л приводит к возрастанию липолитической активности примерно на 30 % по сравнению с исходной. Дальнейшее же повышение концентрации пептона хотя и приводит к увеличению концентрации биомассы, но не оказывает положительного влияния на липолитическую активность культуры.

Высокая липолитическая активность при культивировании различных видов микроорганизмов, согласно литературным данным [18], наблюдается на средах, богатых сложными органическими соединениями, такими как соевая мука, кукурузная мука и др. В ряде работ показано [16, 17], что хорошим индуктором, стимулирующим образование липазы микроорганизмов, является соевая мука. Кроме того, соевая мука является более дешевым субстратом, чем пептон.

В работе [18] имеются сведения о применении необезжиренной соевой муки, так как авторы связывают повышение липолитической активности культуры не только влиянием азотистых компонентов соевой муки, но и с влиянием липидов соевой муки на рост и липолитическую активность микроорганизмов. Но по другим данным [16] интенсивный синтез липаз наблюдается при использовании обезжиренной соевой муки (измельченного соевого шрота). В связи с этим в работе исследовалось влияние как необезжиренной, так и обезжиренной соевой муки на липолитическую активность дрожжей *Y. lipolytica* (рис. 2).

Как свидетельствуют представленные данные, введение в состав среды соевой муки в качестве источника азота стимулирует выработку липазы. Наиболее высокая липолитическая активность наблюдается на среде, содержащей в качестве источника азота обезжиренную соевую муку в концентрации – 40 г/л. При этом наблюдается максимальная липолитическая активность культуры – 153 ед./мл к.ж. По-видимому, для данной культуры соевая мука выступает только в качестве источника азота, а ее липидные фракции мало используются культурой.

Таким образом, исследование влияния различных источников азота на липолитическую активность дрожжей *Y. lipolytica* показало, культура предпочитает органические источники азота, а неорганические

ские источники азота плохо усваиваются данной культурой. Наиболее высокая липолитическая активность 153 ед./мл к.ж. наблюдается при введении обезжиренной соевой муки в концентрации 40 г/л.

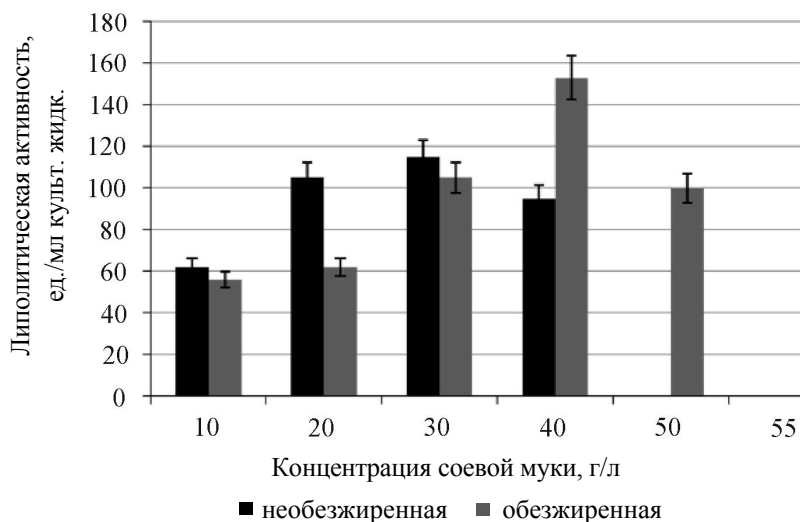


Рис. 2. Зависимость липолитической активности культуры дрожжей *Yarrowia lipolytica* от концентрации соевой муки (продолжительность культивирования – 24 ч)

На биосинтез липазы микроорганизмами также оказывают влияние ПАВ: твины-20, -40, -60, -80, желчные кислоты и их соли [19, 20].

Однако эти сведения противоречивы. Например, даже у одного и того же продуцента *Asinetobacter calcoaceticus*, ПАВ из одной поли-этоксилатной группы или вызывали повышение активности до 15 раз или приводили к полному подавлению роста культуры [21].

В данной работе исследовалось влияние твин-20 при использовании различных источников азота (пептон, необезжиренная и обезжиренная соевая мука) и твин-80 (в сочетании с обезжиренной мукой) на биосинтез липазы дрожжами *Y. lipolytica*. Выращивание культуры проводили на среде следующего состава: оливковое масло – 1 % об., глюкоза – 5 г/л, дрожжевой автолизат – 5 мл/л, источник азота, твин-20 или твин-80. Время культивирования 24 ч. Данные исследования представлены в табл. 3.

Полученные результаты показывают, что высокие концентрации твин-20 оказывает ингибирующее воздействие на липолитическую активность культуры.

Таблица 3

Зависимость биосинтеза липазы культуры дрожжей
Yarrowia lipolytica от концентрации ПАВ в присутствии
различных источников азота

Источники азота и вид ПАВ	Концентрация твина, мг/мл	Липолитическая активность, ед/мл к.ж.
Пептон в концентрации 20 г/л в сочетании с твин-20	0 (контроль)	107
	1,0	35
	0,1	67
	0,01	115
	0,001	125
	0,0001	103
	0,00001	100
Необезжиренная соевая мука в концентрации 30 г/л в сочетании с твин-20	0 (контроль)	110
	1,0	60
	0,1	75
	0,01	120
	0,001	187
	0,0001	165
	0,00001	110
Обезжиренная соевая мука в концентрации 40 г/л в сочетании с твин-20	0 (контроль)	153
	1,0	121
	0,1	190
	0,01	200
	0,001	210
	0,0001	155
Обезжиренная соевая мука в концентрации 40 г/л в сочетании с твин-80	0 (контроль)	153
	50	121,6
	20	198,1
	2	90,1
	0,2	88,5
	0,02	90,8
	0,002	86,1
	0,0002	78,3
	0,00002	79,8

При использовании в качестве источника азота пептона повыше-
ние липолитической активности культуры наблюдалось в более узком
диапазоне концентраций, чем в случае использования соевой муки.
Вероятно, в присутствии соевой муки в среде культивирования реали-
зуются множественные механизмы действия твин-20. Наблюдаются не
только эффекты, связанные с эмульгированием масла и более актив-

ным выходом фермента в культуральную жидкость, но и увеличивается доступность соевой муки для действия ферментов культуры. Также ПАВ улучшает распределение частиц соевой муки по объему среды культивирования и/или способствует выделению отдельных компонентов из соевой муки и увеличению их доступности для культуры. Установлено, что стимулирующий эффект на биосинтез липазы при использовании сред различного состава оказывает добавление твин-20, в концентрации 0,001 мг/мл.

Иной эффект получен при использовании твин-80, стимулирующий эффект данной добавки проявляется только при достаточно высокой концентрации 20 мг/мл. Можно предположить, что твин-80 оказывает индуцирующий эффект именно на биосинтез липазы дрожжами и в меньшей степени на распределение частиц соевой муки в питательной среде.

После выращивания культуры в оптимальных условиях культуральную жидкость отделяли от биомассы центрифугированием (3000 об./мин, 10 мин). Из фильтрата культуральной жидкости проводили высаливание липазы сульфатом аммония в интервале 25–100 % от насыщения. Данные представлены в табл. 4.

Таблица 4

Очистка липазы осаждением с помощью сульфата аммония

Степень насыщения сульфатом аммония, %	Общий белок, мг	Удельная липолитическая активность, ед./мг белка	Степень очистки
0 (культуральная жидкость)	14,9	7,4	0
100	10,3	14,3	1,9
75	9,9	12,5	1,7
50	8,5	12,6	1,7
25	6,8	10,8	1,46

Как видно из представленных в табл. 4 данных, при насыщении культуральной жидкости сульфатом аммония в высоких концентрациях высаливается примерно одинаковое количество белка, 65–66 % от исходного. При этом максимальная удельная активность липазы наблюдается в препарате, полученном при степени насыщения 100 %. Осаждение сульфатом аммония позволяет повысить степень очистки липазы в 1,9 раз.

Заключение. Таким образом, разработан состав питательной среды, позволяющий повысить липолитическую активность дрожжей *Yarrowia lipolytica* Y-3153 (АТСС 34088) до 200–210 ед./мл, что в 8 раз выше, чем при использовании питательной среды, указанной в паспорте культуры. Наиболее высокая липолитическая активность и рост дрожжей *Y. lipolytica* наблюдается при культивировании в среде следующего состава: глюкоза – 5 г/л, дрожжевой автолизат – 5 мл/л, обезжиренная соевая мука – 40 г/л, твин-20 – 0,001 мг/мл, оливковое масло – 1 % об. Показано, что осаждение сульфатом аммония позволяет получить препарат липазы с удельной активностью, в 1,9 раза превышающей исходную.

Список литературы

1. Применение бактериальных термостабильных липолитических ферментов в современных биотехнологических процессах: обзор / Ю.В. Самойлова, К.Н. Сорокина, А.В. Пилигаев, В.Н. Пармон // Катализ в промышленности. – 2018. – Т. 18, № 6. – С. 61–73. doi.org/10.18412/1816-0387-2018-6-61-73
2. Липазы в реакциях этерификации: обзор / В.С. Гамаюрова, М.Е. Зиновьева, К.Л. Шнайдер, Г.А. Давлетшина // Катализ в промышленности. – 2020. – Т. 20, № 3. – С. 216–233. doi.org/10.18412/1816-0387-2020-3-216-233
3. Online pre-purification for the continuous enzymatic interesterification of balt fat containing omega-3 oil / N.A. Ibrahim, S.T. Nielsen, V. Wigneswaran, H. Zhang, X. Xu // Journal of the American Oil Chemists Society. – 2008. – Vol. 85. – P. 95–98.
4. Скрининг продуцентов липаз / М.А. Пушкарев, Т.Б. Лисицкая, В.А. Галынкин, А.В. Гарабаджиу, Г.В. Козлов // Известия Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета). – 2014. – № 27 (53). – С. 43–46.
5. Гаскарова Е.Ф., Иванова Л.А. Дрожжи *Candida parapsilosis* M 10 – новый продуцент липазы // Перспективные биотехнологические процессы в технологиях продуктов питания и кормов: материалы VII Междунар. науч.-практ. симп. – М., 2014. – С. 44–47.
6. Скрининг нового дрожжевого штамма – продуцента липаз / Е.Ф. Гаскарова, Л.А. Иванова, Г.Л. Филатова, Ю.А. Краевская // Естественные и технические науки. – 2014. – № 2 (70). – С. 257–259.
7. Microbial lipases and their industrial applications: review / A. Berhanu, G. Amare // Biotechnology. – 2012. – Vol. 11. – P. 100–118. DOI: 10.3923/biotech.2012.100.118
8. Секова В.Ю., Исакова Е.П., Дерябина Ю.И. Применение экстремофильных дрожжей *Yarrowia lipolytica* в биотехнологии (обзор) // Прикладная

биохимия и микробиология. –2015. – Т. 51, № 3. – С. 290–304. DOI: 10.7868/S0555109915030150

9. Лабораторный практикум по технологии ферментных препаратов / И.М. Грачева, Ю.П. Грачев, М.С. Мосичев, Е.Г. Борисенко. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1982. – 240 с.

10. Зиновьева М.Е., Чан Тхи Тху Хьонг, Гамаюрова В.С. Влияние источника углерода и индукторов на рост и липолитическую активность дрожжей *Yarrowia lipolytica* // Вестник Казанского технологического университета. – 2013. – № 7. – С. 168–173. doi.org/10.24412/Fd8FcGIFSSs

11. Сравнительное изучение зависимости липолитической активности бактерий рода *Serratia* от состава питательной среды / Н.В. Паканещикова, Н.Н. Силищев, Н.Ф. Галимзянов, О.Н. Логинов // Башкирский химический журнал. – 2006. – № 4. – С. 31–34.

12. Characterization of different oil soapstocks and their application in the lipase production by *Aspergillus niger* under solid state fermentation / R.R. dos Santos, L.N.M. Muruci, L.O. Santos, R. Antoniassi, J.P.L. da Silva, M.C.T. Damaso // Journal of Food and Nutrition Research. – 2014. – Vol. 2, no. 9. – P. 561–566. DOI: 10.12691/jfnr-2-9-6

13. Prasad M.P. Production of lipase enzyme from *Pseudomonas aeruginosa* isolated from lipid rich soil // International Journal of Pure Applied Bioscience. – 2014. – Vol. 2, no. 1. – P. 77–81.

14. Kumar D.S., Ray S. Fungal lipase production by solid state fermentation-fn overview // Journal of Analytical Bioanalytical Techniques. – 2014. – Vol. 06, no. 01. DOI: 10.4172/2155-9872.1000230

15. Шеламова С.А., Тырсин Ю.А. Индукция биосинтеза липаз микромицетом // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2012. – № 1 (137). – С. 172–176.

16. Microbial lipases: a prospect for biotechnological industrial catalysis for green products: a review / C.N. Igwe, K. Uzo, U.A. Ken, A. Amarachukwu // Fermentation Technology. – 2017. – Vol. 06, no. 02. DOI: 10.4172/2167-7972.1000144

17. Паканещикова Н.В., Силищев Н.Н., Логинов О.Н. Влияние компонентов питательной среды на биосинтез липазы // Башкирский химический журнал. – 2006. – № 2. – С. 16–19.

18. УФ-индуцированный дрожжевой продуцент липазы с широкой субстратной специфичностью – селекция, свойства и получение ферментного препарата / Е.Ф. Гаскарова, Л.А. Иванова, Л.А. Чурмасова, Н.Г. Машенцева, Д.Л. Клабукова // Сельскохозяйственная биология. – 2019.– Т. 54, № 6. – С. 1290–1305. DOI: 10.15389/agrobiology.2019.6.1290rus

19. Bakir Z.B., Metin K. Purification and characterization of an alkali-thermostable lipase from thermophilic *Anoxybacillus flavithermus* HBB 134 // Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2016. – No. 26. – P. 1087–1097. DOI: 10.4014/jmb.1512.12056

20. Production, optimization and purification of lipase from *Bacillus sp. MPTK 912* isolated from oil mill effluent / K. DJ Mukesh, R. Rejitha, S. Devika, M.D. Balakumaran, A.N.R. Immaculate, P.T. Kalaichelvan // *Advances in Applied Science Research*. – 2012. – Vol. 3, no. 2. – P. 930–938.

21. Haperburg D., Kleber H.P. Extracellular lipase aus *Acinetobacter calcoaceticus* // *Acta Biotechnologica*. – 1982. – Vol. 2, no. 4. – P. 337–342.

References

1. Samoilova Yu.V., Sorokina K.N., Piligaev A.V., Parmon V.N. Primenenie bakterial'nykh termostabil'nykh lipoliticheskikh fermentov v sovremennykh biotekhnologicheskikh protsessakh: obzor [Application of thermostable lipolytic bacterial enzymes for modern biotechnological processes: review]. *Kataliz v promyshlennosti*, 2018, vol. 18, no. 6, pp. 61-73. doi.org/10.18412/1816-0387-2018-6-61-73

2. Gamayurova V.S., Zinov'eva M.E., Shnaider K.L., Davletshina G.A. Lipazy v reaktsiiakh eterifikatsii [Lipases in esterification reactions: a review]. *Kataliz v promyshlennosti*, 2020, vol. 20, no. 3, pp. 216-233. doi.org/10.18412/1816-0387-2020-3-216-233

3. Ibrahim N.A., Nielsen S.T., Wigneswaran V., Zhang H., Xu X. Online pre-purification for the continuous enzymatic interesterification of balk fat containing omega-3 oil. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 2008, vol. 85, pp. 95-98.

4. Pushkarev M.A., Lisitskaya T.B., Galynkin V.A., Garabadzhiu A.V., Kozlov G.V. Skrining produktentov lipaz [Screening of lipase producers]. *Bulletin of the Saint Petersburg State Institute of Technology (Technical University)*, 2014, vol. 27, no. 53, pp. 43-46.

5. Gaskarova E.F., Ivanova L.A. Drozhzhi *Candida parapsilosis M 10* – novyy produktent lipazy. In: *Perspektivnye biotekhnologicheskie protsessy v tekhnologiyakh produktov pitaniya i kormov*. [The yeast *Candida parapsilosis M 10* is a new lipase producer. In: Promising biotechnological processes in food and feed technologies]. Materials of the VII International Scientific and Practical Symposium (Moscow, Russia, 9 April, 2014), 2014, pp. 44-47.

6. Gaskarova E.F., Ivanova L.A., Filatova G.L., Kraevskaya Yu.A. Skrining novogo drozhzhevogo shtamma – produktenta lipaz [Screening new yeast strain – producer of lipase]. *Estestvennye i tekhnicheskie nauki*, 2014, vol. 2, no. 70, pp. 257-259.

7. Berhanu A., Amare G. Microbial lipases and their industrial applications: review. *Biotechnology*, 2012, vol. 11, pp. 100-118. DOI: 10.3923/biotech.2012.100.118

8. Sekova V.Yu., Isakova E.P., Deryabina Yu.I. Primenenie ekstremofil'nykh drozhzhey *Yarrowia lipolytica* v biotekhnologii (obzor) [Biotechnological applications of the extremophilic yeast *Yarrowia lipolytica* (review)]. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2015, vol. 51, no. 3, pp. 290-304. DOI: 10.7868/S0555109915030150

9. Gracheva I.M., Grachev Yu.P., Mosichev M.S., Borisenko E.G. *Laboratornyy praktikum po tekhnologii fermentnykh preparatov* [Laboratory practicum on the technology of enzyme preparations]. Moscow, Legkaya i pishchevaya promyshlennost', 1982, 240 p.

10. Zinov'eva M.E., Chan T.T.K., Gamayurova V.S. Vliyanie istochnika ugleroda i induktorov na rost i lipoli-ticheskuyu aktivnost' drozhzhey *Yarrowia lipolytica* [Effect of carbon source and inducers on the growth and lipolytic activity of the yeast *Yarrowia lipolytica*]. *Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta*, 2013, no. 7, pp. 168-173. <https://doi.org/10.24412/Fd8FcGIFSSs>

11. Pakaneshchikova N.V., Silishchev N.N., Galimzyanov N.F., Loginov O.N. Sravnitel'noe izuchenie zavisimosti lipoli-ticheskoy aktivnosti bakteriy roda *Serratia* ot sostava pitatel'noy sredy [Comparative study of the dependence of the lipolytic activity of bacteria *Serratia* on the composition of the nutrient medium]. *Bashkirskiy khimicheskiy zhurnal*, 2006, no. 4, pp. 31-34.

12. dos Santos R.R., Muruci L.N.M., Santos L.O., Antoniassi R., da Silva J.P.L., Damaso M.C.T. Characterization of different oil soapstocks and their application in the lipase production by *Aspergillus niger* under solid state fermentation. *Journal of Food and Nutrition Research*, 2014, vol. 2, no. 9, pp. 561-566. DOI: 10.12691/jfnr-2-9-6

13. Prasad M.P. Production of lipase enzyme from *Pseudomonas aeruginosa* isolated from lipid rich soil. *International Journal of Pure Applied Bioscience*, 2014, vol. 2, no. 1, pp. 77-81.

14. Kumar D.S., Ray S. Fungal lipase production by solid state fermentation- an overview. *Journal of Analytical Bioanalytical Techniques*, 2014, vol. 06, no. 01. DOI: 10.4172/2155-9872.1000230

15. Shelamova S.A., Tyrsin Yu.A. Induktsiya biosinteza lipaz mikromites-tom [Induction of biosynthesis of lipases by micromycetes]. *Orenburgskii Gosudarstvennyi Universitet. Vestnik*, 2012, vol. 1, no. 137, pp 172-176.

16. Igwe C.N., Uzo K., Ken U.A., Amarachukwu A. Microbial lipases: a prospect for biotechnological industrial catalysis for green products: a review. *Fermentation Technology*, 2017, vol. 06, no. 02. DOI: 10.4172/2167-7972.1000144

17. Pakaneshchikova N.V., Silishchev N.N., Loginov O.N. Vliyanie komponentov pitatel'noy sredy na biosintez lipazy [Influence of nutrient medium components on lipase biosynthesis]. *Bashkirskiy khimicheskiy zhurnal*, 2006, no. 2, pp. 16-19.

18. Gaskarova E.F., Ivanova L.A., Churmasova L.A., Mashchentseva N.G., Klabukova D.L. UF-indutsirovanny drozhzhevoy produktent lipazy s shirokoy substratnoy spetsifichnost'yu – selektsiya, svoystva i poluchenie fermentnogo preparata [UV-inducer yeast lipase producer with a wide substrate specificity – selection, characterization and production of the enzyme] *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya*, 2019, vol. 54, no. 6, pp. 1290-1305. doi: 10.15389/agrobiology.2019.6.1290rus.

19. Bakir Z.B., Metin K. Purification and characterization of an alkali-thermostable lipase from thermophilic *Anoxybacillus flavithermus* HBB 134. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2016, vol. 26, pp. 1087-1097. DOI: 10.4014/jmb.1512.12056

20. Mukesh K.D.J., Rejitha R., Devika S., Balakumaran M.D., Immaculate A.N.R., Kalaichelvan P.T. Production, optimization and purification of lipase from *Bacillus sp. MPTK 912* isolated from oil mill effluent. *Advances in Applied Science Research*, 2012, vol. 3, no. 2, pp. 930-938

21. Haperburg D., Kleber H.P. Extracellulare lipase aus *Acinetobacter calcoaceticus*. *Acta Biotechnologica*, 1982, vol. 2, no. 4, pp. 337–342

Получено 08.05.2021

Об авторах

Шнайдер Ксения Леонидовна (Казань, Россия) – кандидат химических наук, доцент кафедры «Пищевая биотехнология», Казанский национальный исследовательский технологический университет (420015, г. Казань, ул. Толстого, 8/31; e-mail: 0202-84@mail.ru).

Зиновьева Мария Евгеньевна – кандидат технических наук, доцент кафедры «Пищевая биотехнология», Казанский национальный исследовательский технологический университет (420015, г. Казань, ул. Толстого, 8/31; e-mail: zino-mari@yandex.ru).

Гамаюрова Валентина Семеновна (Казань, Россия) – доктор химических наук, профессор кафедры «Пищевая биотехнология», Казанский национальный исследовательский технологический университет (420015, г. Казань, ул. Толстого, 8/31; e-mail: gamaur@kstu.ru).

About the authors

Ksenia L. Shnaider (Kazan, Russian Federation) – Ph.D. in Chemical Sciences, Associate Professor of the Food Biotechnology Department, Kazan National Research Technological University (8/31, Tolstoy str., Kazan, 420015; e-mail: 0202-84@mail.ru).

Maria E. Zinov'eva (Kazan, Russian Federation) – Ph.D. in Technical Sciences, Associate Professor of the Food Biotechnology Department, Kazan National Research Technological University (8/31, Tolstoy str., Kazan, 420015; e-mail: zino-mari@yandex.ru).

Valentina S. Gamayurova (Kazan, Russian Federation) – Doctor of Chemical Sciences, Professor of the Food Biotechnology Department, Kazan National Research Technological University (8/31, Tolstoy str., Kazan, 420015; e-mail: gamaur@kstu.ru).