

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-85

**ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА ЛИПАЗЫ ДРОЖЖЕЙ *YARROWIA SPECIES*
ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В СЫРОДЕЛИИ**

**ISOLATION AND PURIFICATION OF LIPASE FROM YEAST OF *YARROWIA SPECIES*
TO BE USED IN CHEESE-MAKING TECHNOLOGY**

О. Д. Левчук, Л. И. Сапунова

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск

O. D. Leuchuk, L. I. Sapunova

Institute of Microbiology NAS of Belarus, Minsk

✉ demeshkoo@mail.ru

Аннотация

В результате проведенных исследований получен препарат гомогенной внеклеточной липазы *Yarrowia* sp. Показана возможность ее использования в сыроделии как импортозамещающего аналога липолитического фермента животного происхождения.

Abstract

The conducted investigations resulted in preparation of homogeneous extracellular lipase of *Yarrowia* sp. Possibility was demonstrated to apply it in cheese-making process as an import-substituting analog of lipolytic enzyme of animal origin.

Липаза (Е.С.3.1.1.3) — фермент класса гидролаз, катализирующий гидролиз триацилглицеридов с образованием жирных кислот и глицерина. Она находит применение в косметике, медицине, бытовой химии и пищевой промышленности [1, 2]. Липаза используется в производстве сыров, катализируя гидролиз триглицеридов молочного жира. Благодаря действию фермента сыр приобретает характерный вкус и аромат. Для ускорения созревания сыра в молоко или сырную массу вносят липазу, которая активизирует липолитические процессы [3].

В качестве наиболее перспективных продуцентов липазы рассматривают дрожжи рода *Yarrowia*. Липазы дрожжей субстрат-специфичны и стабильны в широком диапазоне физико-химических условий катализа. Преимущественно внеклеточная локализация липолитических ферментов позволяет легко выделять и очищать их, что снижает производственные затраты и делает эти микроорганизмы предпочтительными продуцентами ферментных белков [4].

Объект исследования — штамм *Yarrowia* sp., отобранный в качестве продуцента внеклеточной липазы.

Дрожжи выращивали глубинным способом в среде, содержащей: глюкозу — 0,5 %; пептон — 2; дрожжевой экстракт — 0,5 %. Условия культивирования — температура 30 °С, перемешивание — 220 об/мин, длительность — 24 ч.

После культивирования отделяли биомассу *Yarrowia* sp. от культуральной жидкости центрифугированием (10 000 об/мин, 15 мин, 4 °С). Выделение, очистку и концентрирование ферментного белка проводили методом ионообменной хроматографии с использованием в качестве сорбента Whatman® anion exchange cellulose DE-32 (Германия). Белок элюировали 100 мМ NaCl.

Для выявления культур, синтезирующих липазу, и фракций, содержащих ферментный белок, применяли модифицированную дифференциально-диагностическую среду с феноловым красным [5].

Полученный в результате хроматографической очистки препарат липазы анализировали в денатурирующем 15%-м полиакриламидном геле согласно [6]. В качестве маркера молекулярных масс (кДа) стандартных белков использовали BlueEye Prestained Protein Marker (Jena Bioscience, Германия).

Метод определения липолитической активности основан на гидролизе 1,2,3-трибутирилглицерола. За единицу липолитической активности принимали количество фермента, катализирующего гидролиз 1,2,3-трибутирилглицерола с образованием 1 мкмоль масляной кислоты при 37 °С в течение 1 мин [7].

В результате скрининга на дифференциально-диагностической среде выбран штамм *Yarrowia* sp., продуцирующий внеклеточную липазу в количестве 3 ед/мл. Выход фермента по активности после хроматографической очистки составил 83 %.

Электрофоретический анализ очищенной липазы *Yarrowia* sp. показал ее гомогенность и соответствие молекулярной массе ферментных белков дрожжей рода *Yarrowia*, представленных в базах данных (рис. 1) [8].

Свойство липазы *Yarrowia* sp. гидролизовать жиры молока проверяли в лабораторных условиях в соответствии с технологией, применяемой в сыроделии. Анализ продуктов ферментативного гидролиза жиров молока проводили методом тонкослойной хроматографии на силикагелевых пластинах (Merck KGaA, Германия) в системе растворителей гексан : диэтиловый эфир : ледяная уксусная кислота (78 : 25 : 2). Продукты реакции проявляли 10%-м спиртовым раствором фосфолибденовой кислоты при 180 °С в течение 10 мин.

Результат хроматографического разделения продуктов гидролиза показал сходный профиль насыщенных и ненасыщенных жирных кислот при гидролизе молока липазой *Yarrowia* sp. (5 и 10 ед. активности) и прегастральными липазами телят и козлят (рис. 2). Полученные данные свидетельствуют о потенциальной возможности использования микробного фермента в качестве альтернативы липазы животного происхождения.



Рис. 1. SDS-электрофореграмма белков, содержащихся в препарате липазы *Yarrowia* sp.:
1 — липаза *Yarrowia* sp.;
2 — маркер молекулярных масс стандартных белков

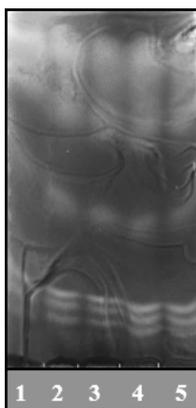


Рис. 2. Хроматограмма продуктов ферментативного гидролиза жиров молока (в негативном изображении): 1 — контроль (молоко); 2, 3 — 5 и 10 ед. липазы соответственно; 4, 5 — прегастральные липазы козлят и телят соответственно

На заключительном этапе исследований в РУП «Институт мясо-молочной промышленности» анализировали жирнокислотный состав образцов сыра, изготовленных с применением дрожжевой липазы и коммерческих препаратов прегастральных липаз телят и козлят, используемых в Республике Беларусь в сыроделии. Результаты анализа показали практически полное соответствие массовых долей насыщенных и ненасыщенных жирных кислот в сырах, приготовленных с использованием липаз животного и микробного происхождения.

Литература

1. Treichel H. et al. A review on microbial lipases production // Food Bioprocess Technol. 2010. Vol. 3. P. 182–196.
2. Franken L.P.G. Effect of treatment with compressed propane on lipases hydrolytic activity // Food Bioprocess Technol. 2010. Vol. 3, No. 4. P. 511–520.
3. Andualema B., Gessesse A. Microbial lipases and their industrial applications: re-view // Biotechnol. 2012. Vol. 11, No. 3. P. 100–118.
4. Bharathi D., Rajalakshmi G. Microbial lipases: An overview of screening, production and purification // Biocatal. Agric. Biotechnol. 2019. Vol. 22. P. 101368.
5. Мамедова Л. В., Пучкова Л. И., Лебедев Л. Р. Методика скрининга штаммов-продуцентов липолитических ферментов // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. 2016. № 10–1. С. 32–35.
6. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. 1970. Vol. 227, No. 5259. P. 680–685.
7. Самойлова Ю. В., Сорокина К. Н., Нуриддинов М. А., Розанов А. С. Разработка биокатализатора для переэтерификации пищевых жиров с использованием иммобилизованных ферментов липаз // Высокие технологии в современной науке и технике: сб. науч. тр. ТПУ. 2013. С. 119–123.
8. Brenda // The comprehensive enzyme information system. URL: <https://www.brenda-enzymes.org/literature.php?e=3.1.1.3&r=678397> (accessed 01.10.2023).