

Продукция липолитических ферментов ксилотрофными грибами отдела *Basidiomycetes*

*Н. Р. АЛЪМЯШЕВА^{1,2}, А. В. ГОЛЫШКИН^{1,2}, М. Ю. ЗИАНГИРОВА¹, Д. А. ПЕТРОВА², Л. М. КРАСНОПОЛЬСКАЯ¹

¹ НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе, Москва

² Российский государственный университет нефти и газа им. И. М. Губкина, Москва

Production of Lipolytic Enzymes by Xylotrophic *Basidiomycetes*

N. R. ALMYASHEVA^{1,2}, A. V. GOLYSHKIN^{1,2}, M. Y. ZIANGIROVA¹, D. A. PETROVA², L. M. KRASNOPOLSKAYA¹

¹ Gause Institute of New Antibiotics, Moscow

² Gubkin Russian State University of Oil and Gas, Moscow

В результате изучения 20 штаммов ксилотрофных базидиальных грибов отобраны 2 штамма — *Trametes versicolor* 1 и *Hericium erinaceus* 0912, способные продуцировать липолитические ферменты на плотных питательных средах и в погруженной культуре. Наибольшая липолитическая активность штамма *T.versicolor* была отмечена на среде, содержащей олеиновую кислоту и дрожжевой экстракт, штамма *H.erinaceus* 0912 — на среде с олеиновой кислотой, соевой мукой и кукурузным экстрактом. При погруженном культивировании *H.erinaceus* накапливал максимальное количество липолитических ферментов в культуральной жидкости через 120 ч, *T.versicolor* — через 36 ч. Белковые компоненты культуральной жидкости базидиомицетов были осаждены сульфатом аммония и диализованы, после чего ферментные препараты липаз были выделены методом гель-фильтрации. Масса препарата липолитических ферментов, выделенных из культуральной жидкости *H.erinaceus* 0912, в 5,5 раз превышала массу препарата из культуральной жидкости *T.versicolor* 1, однако по величине липолитической активности ферментного препарата штамм *H.erinaceus* 0912 (204,55 мУ/мг белка) уступал штамму *T.versicolor* 1 (792,6 мУ/мг белка).

Ключевые слова: ксилотрофные базидиальные грибы, липолитические ферменты, активность.

Twenty strains of basidiomycetes were screened for lipolytic activity. Two strains — *Trametes versicolor* 1 and *Hericium erinaceus* 0912 — were able to produce lipolytic enzymes during solid medium and submerged cultivation. Oleic acid and yeast extract were selected as the best carbon and nitrogen sources for *Trametes versicolor* 1, oleic acid, soybean meal and corn steep liquor — for *Hericium erinaceus* 0912. *Hericium erinaceus* 0912 accumulated the maximum amount of lipolytic enzymes in the culture medium after 120 h, *Trametes versicolor* 1 — after 36 h. The culture medium proteins were precipitated by ammonium sulfate and dialyzed, after which the enzyme preparations of lipases were isolated by gel filtration. The weight of the preparation of lipases from *H.erinaceus* 0912 was 5.5 times greater than the weight of the preparation of lipases from *T.versicolor* 1, however the activity of the lipases from *T.versicolor* 1 (792.6 mU/mg protein) was three times higher than that of the lipases from *H.erinaceus* 0912 (204.55 mU/mg protein).

Keywords: basidiomycetes strains, lipolytic enzymes, activity.

Введение

Липазы (триацилглицерин гидролазы, К.Ф.3.1.1.3.) — класс ферментов, осуществляющих гидролиз ацилглицеридов до глицерина и свободных жирных кислот, а также синтетические реакции алкоголиза, ацидолиза, этерификации и переэтерификации в условиях низкого содержания воды [1]. В качестве активных компонентов липазы входят в состав лекарственных ферментных препаратов, назначаемых при внешнесекреторной недостаточности поджелудочной железы [2]. Благодаря высокой стабильности в органических растворителях, широкой субстрат-

ной специфичности и энантиоселективности липазы успешно применяют в фармацевтической промышленности для получения лекарственных средств: антибактериальных и противоопухолевых антибиотиков, препаратов, содержащих алкалоиды, нестероидных противовоспалительных препаратов [3, 4]. Также липазы используют для получения продуктов немедицинского назначения — ряда биополимеров и биодизельного топлива [5, 6]. Ферментативный катализ обеспечивает снижение стоимости процессов за счёт сокращения количества технологических стадий, мягких условий реакций и высокой чистоты получаемых продуктов. Использование липазы В из *Candida antarctica* позволило осуществить одностадийный синтез водорастворимой формы антибиотика клиндамицина — пальмитата гидрохло-

© Коллектив авторов, 2018

*Адрес для корреспонденции: 119021, г. Москва, ул. Б. Пироговская, 11, стр. 1. НИИНА им. Г. Ф. Гаузе.

E-mail: almyashevanelya@mail.ru

рида и повысить выход продукта на 40% по сравнению со стандартным трёх стадийным химическим способом [7].

Актуальность поиска новых липолитических ферментов и их продуцентов обусловлена тем, что липазы специфичны у разных видов организмов. Например, было показано, что панкреатическая липаза осуществляет асимметрическую альдольную реакцию между 4-нитробензальдегидомиацетоном с выходом целевого продукта более 96%, в то время как выход продукта при использовании липаз из *Mucor miehei*, *S. antarctica* и *Pseudomonas cepacea* не превышает 10% [8].

Ксилотрофные базидиальные грибы способны продуцировать широкий спектр окислительных и гидролитических ферментов, позволяющих им утилизировать все компоненты растительной биомассы. Наличие липаз отмечено как у ксилотрофных базидиомицетов (*Pleurotus sapidus*, *Schizophyllum commune*), так и у гумусовых сапротрофов (*Agaricus bisporus*), однако их активность и условия продуцирования изучены недостаточно [9–11]. В настоящей работе проведен скрининг продуцентов липолитических ферментов среди ксилотрофных базидиомицетов, а также выявлены особенности продуцирования липаз наиболее перспективными штаммами на плотных средах и в погруженной культуре.

Материал и методы

Реактивы. Трибутирин и глицерин были приобретены у «Sigma-Aldrich» (США), фосфорная кислота, гидрофосфат калия, дигидрофосфат калия были приобретены у «CarlRoth» (Германия), гуммиарабик, олеиновая кислота, сульфат аммония и сульфат магния были приобретены у ООО «Русхим» (Россия), агар-агар, глюкоза, ферментативный пептон и дрожжевой экстракт были приобретены у ООО «НТК ДИА-ЭМ». В работе использовали полуобезжиренную соевую муку, молочную сыворотку, пивное сусло (4° по Баллингу) и подсолнечное масло пищевого качества.

Штаммы. Штаммы *Flammulinave lutipes* 42, *Flammulinave lutipes* F-526, *Ganoderma lucidum* 5.1, *Lentinu sedodes* cs-53, *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* 1 были получены из коллекции лаборатории биосинтеза биологически активных соединений ФГБНУ «НИИНА». Штаммы *Armillariamelea* 0738, *Flammulinave lutipes* 1483, *Flammulina rossica* 1981, *Ganoderma lucidum* 1319, *Grifola frondosa* 2639, *Grifola frondosa* 0917, *Hericium erinaceus* 0912, *Hericium corraloides* 045, *Hericium corraloides* 1891, *Hypsizigu sulmarius* 1018, *Hypsizigu sulmarius* 1320, *Laetiporus sulphureus* 1429, *Laetiporus sulphureus* 1336, *Phallusim pudicus* 0613 были получены из коллекции культур базидиомицетов Ботанического института им. В. П. Комарова РАН. Штаммы *Aspergillus niger* 823, *Aspergillus terreus* 826, *Aspergillus foetidus* 734 и *Yarrowia lipolytica* 8218 были получены из Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур («Leibniz-Institut DSMZ», Германия). Рабочие культуры хранили на скошенном картофельно-глюкозном агаре при 4°C.

Скрининг продуцентов липаз. На этапе скрининга для оценки липолитической активности исследуемые штаммы выращивали на среде, содержащей (г/л водопроводной воды): агар-агар — 15,0; трибутирин — 10,0; пептон — 5,0 и дрожжевой экстракт — 3,0. Трибутирин предварительно эмульгировали в воде ультразвуком в течение 1 мин (выходная мощность 85 Вт; ультразвуковой излучатель S-450D, «Branson», США).

Чашки Петри засеивали агаровыми блоками с 10-дневными культурами грибов (диаметр 1 мм) и инкубировали при 25°C в течение 96 ч, после чего проводили измерение диаметров колоний (d) и зон просветления вокруг них (D). Липолитическую активность грибов оценивали по величине «гало» (D-d) по шкале с шагом 5 мм, маркированной от «—» (нет активности) до «++++» (наибольшая активность).

Подбор компонентов плотной питательной среды. Базидиомицеты выращивали при 25°C на 35 плотных средах, которые представляли собой парные сочетания различных источников углерода и азота. В качестве источников углерода использовали глюкозу, пивное неохмеленное сусло, крахмал, этанол, глицерин, подсолнечное масло, олеиновую кислоту в концентрациях, эквивалентных 20 г/л глюкозы, в качестве источников азота — дрожжевой экстракт, пептон, соевую муку, кукурузный экстракт и нитрат аммония в концентрациях, эквивалентных 10 г/л пептона. Исследовали штаммы, отобранные на этапе скрининга. После завершения роста колоний вырезали агарово-мицелиальные блоки (7 мм × 4 мм) и помещали их в центр чашек Петри со средой, содержащей (г/л фосфатного буферного раствора, pH 6,5): агар-агар — 15,0; трибутирин — 10,0. Чашки Петри инкубировали при 37°C в течение 48 ч. Трибутирин предварительно эмульгировали в воде ультразвуком в течение 1 мин. Липолитическую активность оценивали по величине зоны просветления по шкале с шагом 5 мм, маркированной от «—» (нет активности) до «++++» (наибольшая активность).

Условия погруженного культивирования. Погруженное культивирование отобранных штаммов проводили в колбах Эрленмейера ёмкостью 750 мл, содержащих 100 мл среды, при 220 об/мин и температуре 28°C. Объём посевного материала составлял 10% объёма ферментационной среды. В качестве посевного материала использовали 9-суточную культуру *Hericiaceus* 0912 и 5-суточную культуру *T. versicolor* 1, выращенную в описанных выше условиях на среде, содержащей (г/л водопроводной воды): глюкозу — 20,0; соевую муку — 10,0; дигидрофосфат калия — 2,5 и сульфат магния — 0,25 [12].

Биомассу отделяли от культуральной жидкости фильтрованием через лавсановую ткань, фильтрат использовали для дальнейших исследований. Биомассу высушивали при 50°C в течение суток.

Определение липазной активности. Липолитическую активность фильтрата культуральной жидкости определяли газохроматографическим методом с использованием эмульсии трибутирина в качестве субстрата. Субстрат готовили добавлением трибутирина (10% вес.) в водный раствор гуммиарабика (1% вес.) и обработкой смеси ультразвуком в течение 2 мин. К 400 мкл раствора субстрата добавляли 400 мкл фильтрата культуральной жидкости и инкубировали смесь при 37°C в течение 24 ч при постоянном перемешивании. Реакцию ферментативного гидролиза прерывали добавлением 30 мкл фосфорной кислоты (85%). Реакционную смесь центрифугировали в течение 10 мин при 10000 g, концентрацию масляной кислоты в водной фазе определяли на газовом хроматографе Кристалл-5000.2 («Хроматек», Россия) с колонкой Хромосорб 102 (3 м × 3 мм, «Sigma-Aldrich», США). За единицу липолитической активности (U) принимали количество масляной кислоты (µмоль), образующееся при каталитическом воздействии липаз, приходящихся на 1 мл фильтрата культуральной жидкости или 1 мг белка. Содержание белка определяли методом Лоури с использованием липазы *Rhizopusoryzae* («Sigma-Aldrich», США) в качестве стандарта.

Выделение и очистка липаз. Все этапы выделения и очистки липаз проводили при 4°C. Фильтрат культуральной жидкости центрифугировали 20 мин при 10000 g для отделения остатков биомассы и нерастворимых компонентов питательной среды. К супернатанту при постоянном перемешивании добавляли сульфат аммония до 80% насыщения и оставляли на 4 ч. Суспензию центрифугировали 20 мин при 10000 g, осадок растворяли в минимальном количестве фосфатного буфера (pH

Таблица 1. Скрининг продуцентов липолитических ферментов диффузионным методом

№	Штамм	Диаметр колонии (d), мм	Липолитическая активность
		Базидиомицеты	
1	<i>Armillaria melea</i> 0738	3,8	—
2	<i>Flammulina velutipes</i> 42	4,5	—
3	<i>F.velutipes</i> F-526	6,3	+
4	<i>F.velutipes</i> 1483	3,0	—
5	<i>Flammulina rossica</i> 1981	5,0	—
6	<i>Ganoderma lucidum</i> 5	18,3	—
7	<i>G.lucidum</i> 1319	2,5	+
8	<i>Grifola frondosa</i> 2639	3,5	—
9	<i>G.frondosa</i> 0917	4,5	+
10	<i>Hericium erinaceus</i> 0912	3,3	++++
11	<i>Hericium coralloides</i> 045	1,8	+
12	<i>H.coralloides</i> 1891	1,8	+
13	<i>Hypsizigus ulmarius</i> 1018	5,5	—
14	<i>H.ulmarius</i> 1320	3,0	—
15	<i>Laetiporus sulphureus</i> 1429	9,0	+
16	<i>L.sulphureus</i> 1336	6,3	—
17	<i>Lentinus edodes</i> cs-53	3,0	—
18	<i>Phallus impudicus</i> 0613	2,8	—
19	<i>Pleurotus ostreatus</i>	1,5	++
20	<i>Trametes versicolor</i> 1	4,0	++++
Несовершенные грибы и аскомицеты			
21	<i>Aspergillus niger</i> 823	4,0	++
22	<i>Aspergillus terreus</i> 826	6,0	—
23	<i>Aspergillus foetidus</i> 734	3,0	++
24	<i>Yarrowia lipolytica</i> 8218	15,0	+++

6,5). Раствор белков диализировали против фосфатного буферного раствора с добавлением ЭДТА (0,1 М) в течение 16 ч. Выделение липаз проводили методом гель-фильтрации с использованием сорбента Sephadex G75 («Pharmacia», Швеция) на колонке (100 мм × 10 мм), уравновешенной фосфатным буфером (рН 6,5). Элюирование производили тем же буферным раствором, отбирали 25 фракций по 1 мл, после чего определяли липолитическую активность каждой фракции.

Результаты и обсуждение

На первом этапе исследования была оценена способность 20 штаммов базидиальных грибов продуцировать липолитические ферменты. Базидиомицеты выращивали на плотной питательной среде, содержащей трибутирин в качестве единственного источника углерода, после чего измеряли величину зон гидролиза вокруг колоний. В качестве положительного контроля были использованы штаммы известных продуцентов липаз — несовершенных грибов рода *Aspergillus* и дрожжеподобного аскомицета *Yarrowia lipolytica* [13—15].

В условиях эксперимента липолитическая активность отсутствовала у 55% исследованных штаммов базидиомицетов, слабую активность («+» и «+++») проявили 35% штаммов. Выраженная липолитическая активность, превышающая показатели положительных контролей, была отмечена у двух штаммов — *H.erinaceus* 0912 и *T.versicolor* 1. Данные штаммы были отобраны для дальнейших экспериментов (табл. 1).

В эксперименте ряд видов базидиомицетов был представлен набором штаммов. Анализ их активности показал, что способность к образованию липолитических ферментов носит преимущественно штаммоспецифический, а не видоспе-

цифический характер. Исключение составили только штаммы *H.coralloides* и *H.ulmarius*. Это заключение подтверждают имеющиеся в научной литературе работы, в которых штаммы видов *T.versicolor* и/или *H.erinaceus* показали либо невысокую липолитическую активность, либо её отсутствие. Так, исследованиями гидролитических ферментов штаммов грибов из коллекции культур базидиомицетов была отмечена низкая липолитическая активность штаммов *T.versicolor* 353 и *H.erinaceus* 970 и более высокая — у штаммов *Ganoderma lucidum* 1900, *G.frondosa* 976, *L.sulphureus* 352, *P.ostreatus* 551 и *L.edodes* 502 [16]. Изучение культур базидиомицетов, выделенных из плодовых тел, произраставших на территории Южной Индии, показало, что штамм *T.versicolor* не обладает липолитической активностью в отличие от *G.lucidum* [17].

На следующем этапе исследования было изучено образование липолитических ферментов двумя отобранными штаммами на плотных и жидких питательных средах. Для установления влияния источников питания на продукцию липолитических ферментов штаммы *H.erinaceus* 0912 и *T.versicolor* 1 выращивали на 35 плотных средах, различающихся сочетаниями источников углерода и азота. *H.erinaceus* 0912 культивировали в течение 168 ч, *T.versicolor* 1 — в течение 96 ч. После завершения роста колоний вырезали одинаковые агарово-мицелиальные блоки и помещали в центр чашек Петри с тест-средой, содержащей трибутирин. Данный опыт позволил оценить липолитическую активность метаболитов грибов, содержащихся в исследуемых агаровых

Таблица 2. Влияние источников углерода и азота в питательной среде на липолитическую активность *H.erinaceus* 0912

	Дрожжевой экстракт	Пептон	Соевая мука	Кукурузный экстракт	Нитрат аммония
Глюкоза	+	—	+	+	P/o
Пивное неохмеленное сусло	+++	—	+	+	P/o
Крахмал	+	—	+++	+	P/o
Этанол	+	—	++	+	P/o
Глицерин	+	—	++	++	P/o
Подсолнечное масло	+++	+	++	++	P/o
Олеиновая кислота	+++	+	++++	+++	P/o

Примечание. P/o – рост отсутствует.

Таблица 3. Влияние источников углерода и азота в питательной среде на липолитическую активность *T.versicolor* 1

	Дрожжевой экстракт	Пептон	Соевая мука	Кукурузный экстракт	Нитрат аммония
Глюкоза	—	—	—	—	—
Пивное неохмеленное сусло	+	—	—	—	—
Крахмал	+	—	+	—	—
Этанол	+	—	—	—	—
Глицерин	+	—	—	—	—
Подсолнечное масло	+	+	+	+	—
Олеиновая кислота	++	—	—	+	+

блоках. Полученные результаты показали, что в условиях эксперимента штамм *H.erinaceus* 0912 проявил более высокую липолитическую активность по сравнению с *T.versicolor* 1 (табл. 2, 3). Состав питательной среды ожидаемо оказал принципиальное значение на образовании липолитических ферментов базидиомицетами. Существенная липолитическая активность *T.versicolor* 1 была отмечена только на одной среде, содержащей олеиновую кислоту и дрожжевой экстракт. Лучшей для образования липолитических ферментов штаммом *H.erinaceus* 0912 оказалась среда с олеиновой кислотой и соевой мукой. Также высокая активность этого штамма была отмечена на средах, содержащих пивное сусло и дрожжевой экстракт, подсолнечное масло и дрожжевой экстракт, олеиновую кислоту и дрожжевой экстракт, крахмал и соевую муку, олеиновую кислоту и кукурузный экстракт. Таким образом, полученные результаты показали, что проявлению высокой липолитической активности способствуют установленные сочетания источников углерода и азота, внесение же в питательную среду источника углерода липидной природы без учёта используемого источника азота не гарантирует успеха при получении липаз. Однако при подборе компонентов питательной среды авторы большинства работ не учитывают влияние источников азота на липолитическую активность грибов, что затрудняет анализ представленных в литературе данных. Так, наличие липидных компонентов в среде способствовало продукции липаз такими видами базидиомицетов, как *Tyromyces sambuceus* и *Pleurotussapidus* [18, 19]. Однако известна работа со штаммом *Antrodia cinnamomea* BCRC 35396, у которого выход липаз на средах с глицерином и сахарозой более чем в 3 раза пре-

вышал выход липаз на средах, содержащих жирные кислоты [20].

Погруженное культивирование базидиомицетов проводили на средах, содержащих те же источники углерода и азота, что и отобранные плотные питательные среды, а именно олеиновую кислоту и дрожжевой экстракт для *T.versicolor* 1 и олеиновую кислоту и соевую муку для *H.erinaceus* 0912. Штамм *T.versicolor* 1 накапливал наибольшее количество липаз в культуральной жидкости уже через 36 ч (75,42 мU/мл культуральной жидкости), в то время как максимальный выход биомассы (0,83 г/100 мл) был получен через 60 ч (см. рис. 1). Полученные результаты превышают показатели несовершенных грибов, например, оптимальным для получения липаз временем культивирования *Aspergillus oryzae* являлось 72 ч, *Penicillium melinii* UzLM-4 — 96 ч [21, 22]. Время культивирования является основным критерием, определяющим эффективность биотехнологического процесса. Таким образом, возможность получения целевого продукта за более короткий срок по сравнению с известными продуцентами делает *T.versicolor* 1 перспективным штаммом для промышленного получения липаз. Использование отобранных базидиальных грибов в биотехнологических процессах получения ферментных препаратов также предпочтительнее за счёт отсутствия токсичных метаболитов в культуральной жидкости, отсутствии споровой нагрузки на персонал и экологической чистоты отходов. Сравнение продуктивности штамма *T.versicolor* 1 с продуктивностью используемых в промышленности липолитически активных штаммов можно будет проводить после оптимизации процесса образования липаз этим штаммом.

Погруженное культивирование *H.erinaceus* 0912 на отобранной среде показало, что штамм

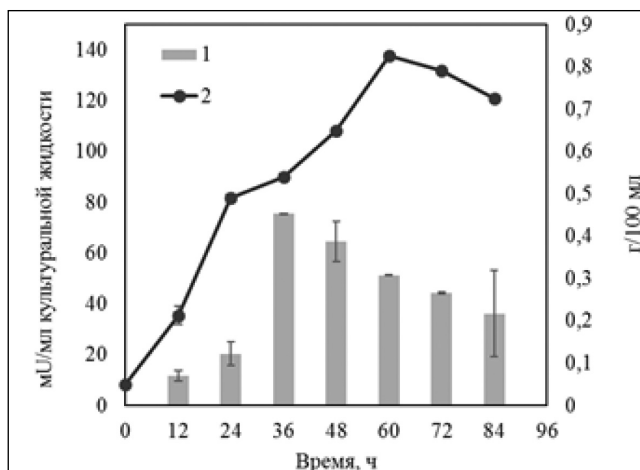


Рис. 1. Кривая роста *T.versicolor* 1 и динамика накопления внеклеточных липаз при погруженном культивировании.

1 – липолитическая активность; 2 – выход биомассы.

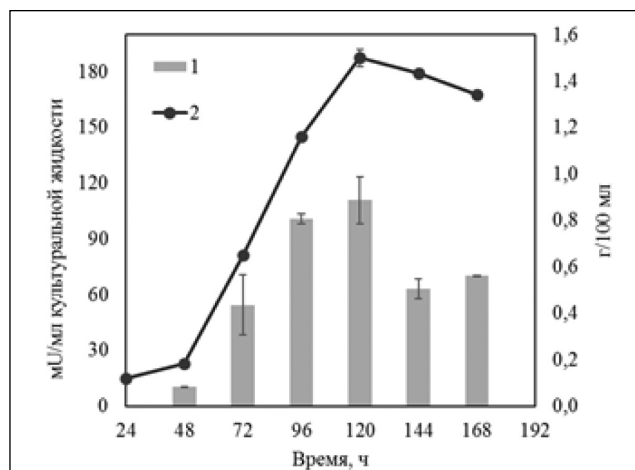


Рис. 2. Кривая роста *H.erinaceus* 0912 и динамика накопления внеклеточных липаз при погруженном культивировании

1 – липолитическая активность; 2 – выход биомассы.

Таблица 4. Липолитическая активность *H.erinaceus* 0912 в результате погруженного культивирования в течение 96 ч

№	Исходная среда	Дополнительные источники питания	Липолитическая активность, мU/мл культуральной жидкости	Выход воздушно-сухой биомассы, г/100 мл
1	Олеиновая кислота,	—	22,36±9,10	0,42±0,16
2	соевая мука	Пивное неохмеленное сусло	75,89±0,43	1,20±0,09
3		Дрожжевой экстракт	46,81±0,78	0,92±0,19
4		Кукурузный экстракт	100,82±2,79	1,12±0,04

Таблица 5. Активность выделенных препаратов липолитических ферментов базидиомицетов

Этапы выделения и очистки	<i>T.versicolor</i> 1		<i>H.erinaceus</i> 0912	
	активность, мU/мг белка	выход белка, %	активность, мU/мг белка	выход белка, %
Фильтрат культуральной жидкости	1,66±0,01	100,00	4,05±0,04	100,00
Осаждение сульфатом аммония и диализ	155,53±0,01	3,33	61,04±0,03	3,53
Гель-фильтрация	792,64±52,70	0,08	204,55±3,51	0,44

является медленно растущим. Липолитическая активность на 96 ч процесса культивирования была невысока — 22 мU/мл культуральной жидкости. Вероятно, это было связано со слабым ростом базидиомицета на данной жидкой питательной среде, выход воздушно-сухой биомассы составил 0,42 г/100 мл. Добавление в питательную среду дополнительных источников питания позволило увеличить липолитическую активность и выход биомассы базидиомицета, однако не было отмечено прямой зависимости между изменениями этих показателей. Максимальное значение активности было получено при использовании кукурузного экстракта в качестве дополнительного источника азота и составило 100,82 мU/мл культуральной жидкости (табл. 4).

На жидкой питательной среде, содержащей олеиновую кислоту, соевую муку и кукурузный экстракт, липолитическая активность *H.erinaceus* 0912 увеличивалась с ростом биомассы и достигала максимального значения (110,87 мU/мл куль-

туральной жидкости) через 120 ч погруженного культивирования (рис. 2).

Масса препарата липолитических ферментов, выделенных из культуральной жидкости *H.erinaceus* 0912, в 5,5 раз превышала, массу препарата из культуральной жидкости *T.versicolor* 1 (табл. 5). Сравнительное изучение действия липаз двух штаммов показало, что активность ферментов *T.versicolor* 1 (792,6 мU/мг белка) более чем в три раза превышает активность ферментов *H.erinaceus* 0912 (204,55 мU/мг белка). Различие в активности ферментных препаратов данных штаммов указывает на то, что *H.erinaceus* 0912 и *T.versicolor* 1 скорее всего продуцируют разные типы липолитических ферментов.

Выводы

1. Исследование липолитической активности 20 штаммов базидиальных грибов позволило выявить два перспективных штамма-продуцента липаз — *T.versicolor* 1 и *H.erinaceus* 0912 и предположить, что способность продуцировать липоли-

тические ферменты носит штаммоспецифичный характер.

2. Исследованы особенности продуцирования липолитических ферментов штаммами *T. versicolor* 1 и *H. erinaceus* 0912 на плотных средах и в погруженной культуре. Наибольшая активность штамма *T. versicolor* 1 была отмечена через 36 ч погруженного культивирования на среде, содержащей олеиновую кислоту и дрожжевой экстракт, штамма *H. erinaceus* 0912 — через 120 ч на среде с

олеиновой кислотой, соевой мукой и кукурузным экстрактом.

3. Исследована активность липолитических ферментов базидиальных грибов, выделенных из культуральной жидкости. Активность липаз *T. versicolor* 1 составила 792,6 мУ/мг белка, *H. erinaceus* 0912 — 204,55 мУ/мг белка.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, проект 16-38-00904 мол_а.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Gandhi N.N.* Applications of lipase. Journal of the American Oil Chemists' Society 1997; 74: 6: 621–634.
2. *Шифрин О. С.* Ферментные препараты в лечении внешнесекреторной недостаточности поджелудочной железы. Гастроэнтерология. Приложение к журналу Consilium Medicum 2007; 1: 14–16. / *Shifrin O. S.* Fermentnye preparaty v lechenii vneshnesekretornoj nedostatochnosti podzheludochnoj zhelezy. Gastroenterologiya. Prilozhenie k zhurnalul Consilium Medicum 2007; 1: 14–16. [in Russian]
3. *Безбородов А. М., Загустина Н. А.* Липазы в реакциях катализа в органическом синтезе (обзор). Прикладная биохимия и микробиология 2014; 50: 4: 347–347. / *Bezborodov A. M., Zagustina N. A.* Lipazy v reakcijakh kataliza v organicheskom sinteze (obzor). Prikladnaja biokhimiya i mikrobiologija 2014; 50: 4: 347–347. [in Russian]
4. *Pandey A. et al.* The realm of microbial lipases in biotechnology. Biotechnology and applied biochemistry 1999; 29: 2: 119–131.
5. *Uyama H., Wada S., Fukui T., Kobayashi S.* Lipase-catalyzed synthesis of polyesters from anhydride derivatives involving dehydration. Biochemical engineering journal 2003; 16: 2: 145–152.
6. *Samoylova Y. V. et al.* Application of the immobilized bacterial recombinant lipase from *Geobacillus stearothermophilus*. Catalysis in Industry 2016; 8: 2: 187–193.
7. *Li Z. et al.* Lipase-catalyzed one-step and regioselective synthesis of clindamycin palmitate. Organic Process Research & Development 2013; 17: 9: 1179–1182.
8. *Li C. et al.* Biocatalytic promiscuity: the first lipase-catalysed asymmetric aldol reaction. Green Chemistry 2008; 10: 6: 616–618.
9. *Fermor T. R., Grant W. D.* Degradation of fungal and actinomycete mycelia by *Agaricus bisporus*. Microbiology 1985; 131: 7: 1729–1734.
10. *Singh M.K., Singh J., Kumar M., Thakur I.S.* Novel lipase from basidiomycetes *Schizophyllum commune* ISTL04, produced by solid state fermentation of *Leucaena leucocephala* seeds. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 2014; 110: 92–99.
11. *Zorn H., Breithaupt D. E., Takenberg M., Schwack W., Berger R. G.* Enzymatic hydrolysis of carotenoid esters of marigold flowers (*Tagetes erecta* L.) and red paprika (*Capsicum annum* L.) by commercial lipases and *Pleurotus sapidus* extracellular lipase. Enzyme and microbial technology 2003; 32: 5: 623–628.
12. *Соболева П. Ю., Краснополяская Л. М., Федорова Г. Б., Кампуха Г. С.* Антибиотические свойства штаммов базидиального гриба *Lentinusedodes* (Berk.) Sing. Антибиотики и химиотер 2006; 51: 7: 3–8. / *Soboleva P. Ju., Krasnopol'skaja L. M., Fedorova G. B., Katrukha G. S.* Antibioticheskie svojstva shtammov bazidial'nogo griba *Lentinusedodes* (Berk.) Sing. Antibiotiki i khimioter 2006; 51: 7: 3–8. [in Russian]
13. *Al'myasheva N.R., Kopitsyn D.S., Vinokurov V.A., Novikov A.A.* Methanolysis of Sunflower Oil Using Immobilized Fungal Cells as Biocatalyst. Chemistry and Technology of Fuels and Oils 2015; 50: 6: 449–452.
14. *Fabiszewska A.U., Stolarzewicz I.A., Zamojska W.M., Bialecka-Florjańczyk E.* Carbon source impact on *Yarrowia lipolytica* KKP 379 lipase production. Applied Biochemistry Microbiol 2014; 50: 4: 404–410.
15. *Nair C.S., Bone D.H.* Production of lipase of *Aspergillus foetidus* in a batch stirred reactor. Biotechnology Letters 1987; 9: 8: 601–604.
16. *Krupodorova T., Ivanova T., Barshteyn V.* Screening of extracellular enzymatic activity of macrofungi. The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences 2014; 3: 4: 315.
17. *Goud M.J.P., Suryam A., Lakshmiipathi V., Singara Charya M. A.* Extracellular hydrolytic enzyme profiles of certain South Indian basidiomycetes. African Journal of Biotechnology 2009; 8: 3: 354–360.
18. *Hädrich-Meyer S., Berger R.G.* Localization of lipolytic and esterolytic activities of *Tyromyces sambuceus*, a 4-decanolide-producing basidiomycete. Applied Microbiology and Biotechnology 1994; 41: 2: 210–214.
19. *Linke D., Zorn H., Gerken B., Parlar H., Berger R.G.* Foam fractionation of exo-lipases from a growing fungus (*Pleurotus sapidus*). Lipids 2005; 40: 3: 323–327.
20. *Lin E.S., Wang C.C., Sung S.C.* Cultivating conditions influence lipase production by the edible Basidiomycete *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. Enzyme and Microbial Technology 2006; 39: 1: 98–102.
21. *Makhsumkhanov A.A., Yakubov I.T., Davranov K.* Conditions for cultivation of the fungus *Penicillium melinii* UzLM-4 and its biosynthesis of lipases. Applied Biochemistry and Microbiology 2003; 39: 1: 40–43.
22. *Ohnishi K., Yoshida Y., Sekiguchi J.* Lipase production of *Aspergillus oryzae*. J Fermentation and Bioengineering 1994; 77: 5: 490–495.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Альмяшева Н. Р. — инженер, ФГБНУ «НИИНА», лаборатория биосинтеза биологически активных соединений; аспирант РГУ нефти и газа (НИУ) им. И. М. Губкина, кафедры физической и коллоидной химии, Москва

Гольшукин А. В. — инженер, ФГБНУ «НИИНА», лаборатория биосинтеза биологически активных соединений, Москва

Зиангирова М. Ю. — научный сотрудник, ФГБНУ «НИИНА», лаборатория биосинтеза биологически активных соединений, Москва

Петрова Д. А. — инженер, РГУ нефти и газа (НИУ) им. И. М. Губкина, кафедра физической и коллоидной химии; аспирант МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва

Краснополяская Л. М. — д. б. н., зав. лабораторией, ФГБНУ «НИИНА», лаборатория биосинтеза биологически активных соединений, Москва