

Елизавета Валерьевна Подшивалова¹, Ольга Петровна Свердлова²,

Наталья Юрьевна Шарова³, Дарья Дмитриевна Белова⁴✉

^{1,3}Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

^{2,3,4}Всероссийский НИИ пищевых добавок – филиал ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН, Санкт-Петербург, Россия

¹podshivalovaliza@gmail.com

²oly.sverdlova@yandex.ru

³natalya_sharova1@mail.ru

⁴antonina-daria@mail.ru

РАПСОВЫЙ ЖМЫХ – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ИСТОЧНИК ЛИПОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

Цель исследования – оценить возможность использования нативной микробиоты рапсового жмыха как источника новых продуцентов липолитических ферментов. Задачи: ферментация рапсового жмыха в присутствии нативной микробиоты; выделение изолятов микроорганизмов; определение их липолитической активности. Проведена ферментация рапсового жмыха при гидромодуле 1:9. Полученную суспензию выдерживали в шейкере-инкубаторе, затем разводили ее в 100, 1000 и 10000 раз в стерильной дистиллированной воде. Из полученных суспензий выделены консорциумы микроорганизмов нативной микробиоты рапсового жмыха, по морфологии колоний получено 16 изолятов микроорганизмов. Липолитическую (твиназную) активность определяли методом экспресс-индикации на средах различного состава. При проведении эксперимента готовили плотную питательную среду следующего состава, г/л: пептон бактериальный – 10; NaCl – 5; CaCl₂ – 0,1; агар – 20. Стерилизацию среды проводили в автоклаве. Отдельно готовили 20 % растворы твинов-20, -40, -60 и -80 и стерилизовали их, после чего смешивали с агаровой питательной средой в асептических условиях и разливали в стерильные чашки Петри. Посев культур на среды с твином производили уколом. В качестве контроля брали чашки Петри со средой без инокулята. Установили, что 10 из 16 изолятов проявляют липолитическую активность. Наибольший диаметр зоны преципитации наблюдался для группы 8 и составил (23,2 ± 0,6) мм при инкубировании на среде с TW40. Наименьший диаметр получен для группы 5 на среде с TW20 (3,8 ± 0,5) мм. Дальнейшая работа направлена на идентификацию микроорганизмов, чтобы оптимизировать процесс их культивирования и расширить спектр промышленного применения.

Ключевые слова: рапсовый жмых, отходы пищевых производств, нативная микробиота, липолитическая активность, микробные липазы

Для цитирования: Рапсовый жмых – перспективный источник липолитических ферментов / Е.В. Подшивалова [и др.] // Вестник КрасГАУ. 2024. № 4. С. 247–253. DOI: 10.36718/1819-4036-2024-4-247-253.

Благодарности: исследования проведены по теме FGUS-2022-0003 в рамках государственного задания № 075-01190-22-00 ВНИИ пищевых добавок – филиал ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН.

Elizaveta Valerievna Podshivalova¹, Olga Petrovna Sverdlova²,
Natalya Yurievna Sharova³, Daria Dmitrievna Belova⁴✉

^{1,3}National Research University ITMO, St. Petersburg, Russia

^{2,3,4}All-Russian Research Institute of Food Additives – branch of the FSC for Food Systems named after V.M. Gorbатов RAS, St. Petersburg, Russia

¹podshivalovaliza@gmail.com

²oly.sverdlova@yandex.ru

³natalya_sharova1@mail.ru

⁴antonina-daria@mail.ru

RAPESSES CAKE – A PROMISING SOURCE OF LIPOLYTIC ENZYMES

The purpose of the study is to evaluate the possibility of using the native microbiota of rapeseed cake as a source of new producers of lipolytic enzymes. Objectives: fermentation of rapeseed cake in the presence of native microbiota; isolation of microorganism isolates; determination of their lipolytic activity. Fermentation of rapeseed cake was carried out at a hydromodulus of 1:9. The resulting suspension was kept in a shaker-incubator, then diluted 100, 1000 and 10000 times in sterile distilled water. From the resulting suspensions, consortia of microorganisms of the native microbiota of rapeseed cake were isolated; 16 isolates of microorganisms were obtained based on the morphology of the colonies. Lipolytic (twinase) activity was determined by the rapid indication method on media of various compositions. During the experiment, a solid nutrient medium was prepared with the following composition, g/l: bacterial peptone – 10; NaCl – 5; CaCl₂ – 0.1; agar – 20. The medium was sterilized in an autoclave. Separately, 20 % solutions of Tween-20, -40, -60 and -80 were prepared and sterilized, after which they were mixed with an agar nutrient medium under aseptic conditions and poured into sterile Petri dishes. Crops were sown on media with Tween by injection. Petri dishes with medium without inoculum were taken as a control. It was found that 10 out of 16 isolates exhibit lipolytic activity. The largest diameter of the precipitation zone was observed for group 8 and amounted to (23.2 ± 0.6) mm when incubated in a medium with TW40. The smallest diameter was obtained for group 5 on a medium with TW20 (3.8 ± 0.5) mm. Further work is aimed at identifying microorganisms in order to optimize the process of their cultivation and expand the range of industrial applications.

Keywords: rapeseed cake, food production waste, native microbiota, lipolytic activity, microbial lipases

For citation: Rapesses cake – a promising source of lipolytic enzymes / E.V. Podshivalova [et al.] // Bulliten KrasSAU. 2024;(4): 247–253 (In Russ.). DOI: 10.36718/1819-4036-2024-4-247-253.

Acknowledgments: research has been carried out under the theme FGUS-2022-0003 within the framework of the state assignment № 075-01190-22-00 by the All-Russia Research Institute of Food Additives – a branch of FSBRI “Federal Research Center for Food Systems named after. V.M. Gorbатов” RAS.

Введение. В последние годы особое внимание уделяется снижению объема и переработке пищевых отходов. Такие отходы пищевых производств, как жмых, пшеничные отруби, свекловичный, картофельный и фруктовый жомы, богаты углеводами, белками, жирами и целлюлозой [1].

Рапс является быстроразвивающейся культурой в России. По данным уборочной кампании, в 2022 г. посевные площади рапса увеличились на 71,96 % по сравнению с 2021 г. и составили 2 341,2 тыс.га. Валовый сбор ярового и озимого рапса возрос на 61 % и составил 45 147,9 тыс. ц. Урожайность этой культуры в России повысилась по сравнению с 2021 г. на 15,6 % (19,8 ц/га) [2].

Рапсовый жмых является побочным продуктом маслопроизводства, получаемым путем прессования маслосемян. Его широко применяют в кормлении различных сельскохозяйственных животных отдельно и в составе комбикормов. Быстрое развитие производства рапса в России и его широкое распространение в мире ведет к увеличению производства рапсового жмыха. Богатый химический состав и доступность делают его перспективным источником питательных веществ, который может быть использован для культивирования микроорганизмов. Кроме того, данный процесс является перспективным направлением переработки рапсового жмыха как побочного продукта [3, 4].

Исследование нативной микробиоты рапсового жмыха при его жидкофазной ферментации позволит выделить микроорганизмы, которые представляют интерес в качестве производственных штаммов, способных расти на данном виде сырья.

Микроорганизмы потребляют липиды в процессе жизнедеятельности благодаря выделению липаз. Липазы являются третьими по распространенности ферментами после протеаз и амилаз (карбогидраз). Липазы (ЕС3.1.1.3) относятся к классу ферментов, катализирующих реакции гидролиза (гидролазы). Этот фермент катализирует гидролиз триглицеридов, превращая их в глицерин и жирные кислоты на границе раздела масло-вода. Кроме того, они катализируют широкий спектр реакций биоконверсии, включая этерификацию, переэтерификацию, ацидолиза и аминолита, что позволяет использовать их в различных отраслях промышленности, таких как агрохимическая, фармацевтическая, производство моющих средств, дубление, пищевая промышленность и производство поверхностно-активных веществ [5].

Липазы имеют растительное, животное и микробное происхождение. Однако микробные липазы представляют собой наиболее предпочтительно используемый класс ферментов в биотехнологии благодаря их стабильности в широком диапазоне температур и pH, субстратной специфичности, высокой каталитической активности, независимому от сезонных изменений производству, более низким производственным затратам и простоте генетических манипуляций [6]. Кроме того, при подборе оптимальных условий культивирования микроорганизмов можно получить высокий выход фермента за относительно короткое время, что является перспективным для его массового производства [7].

Цель исследования – ферментация рапсового жмыха в присутствии нативной микробиоты, выделение изолятов микроорганизмов и определение их липолитической активности.

Объекты и методы. Рапсовый жмых смешивали с дистиллированной водой в соотношении 1 : 9. Полученную суспензию выдерживали в шейкере-инкубаторе (INFORS HT Multitron standard, Швейцария) при температуре 28 °С и перемешивании с частотой вращения платформы 180 об/мин в течение 9 сут.

Суспензию микроорганизмов, полученную в результате ферментации рапсового жмыха, разводили в 100, 1000 и 10 000 раз в стерильной дистиллированной воде. Суспензию микроорганизмов в количестве 100 мкл распределяли на плотной питательной среде МПА (ГМФ-агар НИЦФ, Россия) стерильным шпателем Дригальского в трех направлениях и двухкратной повторности. После этого чашки Петри выдерживали в термостате (Memmert UF75, Германия) при температуре 28 °С в течение 3 сут, в результате чего получали консорциумы нативной микробиоты рапсового жмыха на чашках Петри.

Из полученных консорциумов микроорганизмов случайным образом отбирали отдельные оформленные колонии и высевали их на плотную питательную среду – мясоептонный агар (МПА) методом истощающего штриха. После этого чашки Петри выдерживали в термостате при температуре 28 °С в течение 3 сут. Пересев вели до тех пор, пока культура визуально не становилась однородной.

Для определения наличия липолитической активности был применен метод экспресс-индикации липолитической (твиназной) активности микробов [8]. Принцип метода заключается в измерении зоны преципитации ионов кальция, содержащихся в среде с остатками жирных кислот, образующихся в результате гидролитического расщепления твинов под действием бактериальных липаз (твиназ). Твины представляют из себя неионогенные поверхностно-активные вещества – эфиры жирных кислот (твин-20 – лауриновой кислоты (C₁₂); твин-40 – пальмитиновой (C₁₆); твин-60 – стеариновой (C₁₈) и твин-80 – олеиновой (C₁₈)). При проведении эксперимента готовили плотную питательную среду следующего состава (г/л): пептон бактериальный – 10 (Molekula Ltd, Англия); NaCl – 5; CaCl₂ – 0,1; агар – 20 (ООО «АГАТ-МЕД», Россия). Стерилизацию среды проводили в автоклаве при температуре 121 °С и давлении 1 атм в течение 20 мин. Отдельно готовили 20 % растворы твинов-20, -40, -60 и -80 и стерилизовали их при температуре 121 °С и давлении 0,5 атм в течение 30 мин, после чего смешивали с агаровой питательной средой в асептических условиях и разливали в стерильные чашки Петри.

Посев культур на среды с твином производили уколом. Для этого небольшое количество

микробной биомассы снимали петлей с агара и делали по пять последовательных уколов в толщу среды на чашке Петри. Пересев вели в двухкратной повторности. В качестве контроля брали чашки Петри со средой без инокулята. Полученные чашки и контроль выдерживали в термостате при 32 °С в течение 3 сут. Далее измеряли диаметры колоний и образовавшиеся в процессе инкубации зоны преципитации. О величине преципитации судили по отношению

диаметра зоны преципитации к диаметру колонии микроорганизма (относительный диаметр).

Результаты и их обсуждение. Выделенные изоляты при культивировании суспензий из рапсового жмыха по морфологическим характеристикам колоний были разделены на 16 групп.

Пример определения липолитической (твиназной) активности бактериальной культуры приведен на рисунке 1.

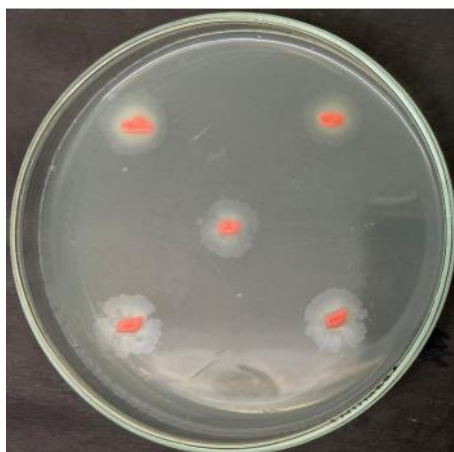


Рис. 1. Определение липолитической (твиназной) активности

Из рисунка 1 видно, что в результате инкубации микроорганизма на среде с твином вокруг колоний в процессе гидролитической реакции образовались зоны преципитации, представляющие собой белый осадок солей кальция на поверхности и в толще питательной среды. Диаметр колоний и зон преципитации изменялся в зависимости от вида твина, входящего в состав среды, и типа исследуемого микроорганизма. Полученные данные представлены на рисунках 2, 3.

Из диаграмм на рисунке 2 можно отметить, что зона преципитации появилась не для всех исследованных групп микроорганизмов. Для групп 1, 3, 12, 14, 15, 16 осадок соединений кальция не образовывался ни в одном случае. Для группы 6 осадок не образовывался на среде с твином-20. Остальные группы образовывали преципитат на всех исследованных средах.

Размеры зон преципитации различались для разных типов микроорганизмов и разных сред. Так, наибольший диаметр наблюдался для группы 8 и составил $(23,2 \pm 0,6)$ мм при инкубировании на среде с TW40. Наименьший диаметр был достигнут для микроорганизма с морфоло-

гией группы 5 на среде с TW20 – $(3,8 \pm 0,5)$ мм. Для некоторых типов колоний наблюдалось значительное изменение диаметра зоны преципитации в зависимости от содержащегося в среде твина. Так, для группы 2 наибольшая зона достигалась при культивировании на среде с TW60 – $(20,5 \pm 0,6)$ мм, тогда как в случае с TW80 значение заметно снижается – $(8,9 \pm 0,5)$ мм. Для группы 13 наибольшее значение преципитации пришлось на среду с TW40 – $(21,9 \pm 1,4)$ мм, тогда как на среде с TW80 величина составила $(14,4 \pm 0,9)$ мм. Из представленных данных можно сделать вывод, что для разных микроорганизмов предпочтительными являются различные твины, что может быть связано с различной природой липолитических ферментов. Оценив величины диаметров зон преципитации, можно косвенно судить о липолитической активности микроорганизмов. Однако сами диаметры, очевидно, зависят от размеров колонии. В связи с этим было решено оценить величину относительных диаметров. Для этого величину диаметра зоны преципитации делили на величину диаметра колонии. Полученные данные представлены на рисунке 3.

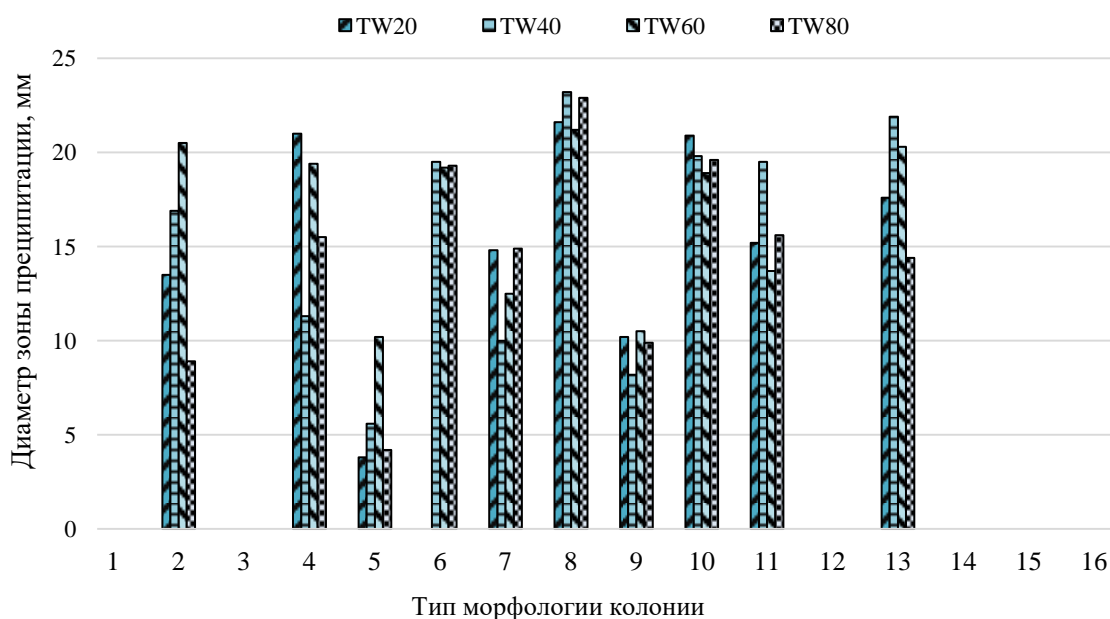


Рис. 2. Диаметры зон преципитации исследованных микроорганизмов на средах различного состава

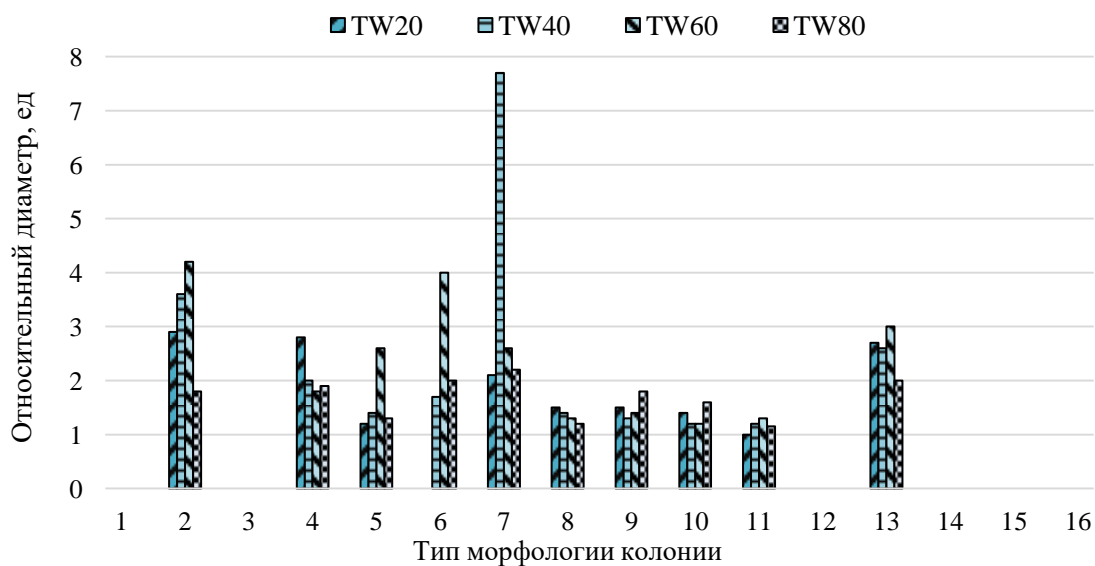


Рис. 3. Отношение диаметров зон преципитации к диаметрам колоний исследованных микроорганизмов на средах различного состава

Проанализировав данные рисунка 3, установили, что, несмотря на сравнительно высокие диаметры колонии и зоны преципитации, группы 8 и 11 значительно отстают по относительному диаметру от групп 2, 7 и 13. Однако следует учитывать плотность осадка в среде. Для группы 8 визуально она практически совпадает с таковой для группы 2, несмотря на весомые различия в величине относительных диаметров.

Причиной этого может быть различная природа фермента – различия в размерах молекул или их зарядах и др. Наибольший относительный диаметр соответствует группе 7, где на среде с TW40 его значение составило $(7,7 \pm 0,4)$ ед. Наименьшее значение величины наблюдается для микроорганизма с морфологией из группы 11 – $(1,0 \pm 0,1)$ ед.

Заключение. Липолитические ферменты имеют большое значение для различных областей промышленности. Поиск новых продуцентов липаз и сырья для их культивирования, отвечающих заданным требованиям, остается важной задачей. Рапсовый жмых, содержащий в своем составе значительное количество масла, может стать потенциальным субстратом для получения липолитических ферментов, а возможными продуцентами могут быть микроорганизмы, составляющие его нативной микробиоты.

В процессе данной работы проведена качественная оценка изолятов, выделенных из рапсового жмыха на предмет липолитической (твиназной) активности экспресс-методом. Полученные результаты свидетельствуют о том, что большинство из исследованных микроорганизмов обладают липолитической активностью на разных уровнях, о чем можно судить по размеру зон преципитации и плотности осадка. Данные параметры в свою очередь зависят от особенностей самого фермента – характеристик молекулы. Таким образом, для дальнейшего исследования на продукцию липаз в результате определения липолитической активности было выделено несколько групп микроорганизмов – 2, 6, 7, 8, 13.

Дальнейшая работа направлена на идентификацию микроорганизмов для определения их видовой принадлежности, что позволит выявить другие полезные характеристики и подобрать более подходящие условия для культивирования.

Список источников

1. Sustainability of food waste biorefinery: A review on valorisation pathways, techno-economic constraints, and environmental assessment / C. Caldeira [et al.] // *Bioresource Technology*. 2020. Vol. 312. Article number 123575.
2. Итоги уборочной кампании 2022 // Федеральная служба государственной статистики (2023). URL: <https://rosstat.gov.ru/compendium/document/13277> (дата обращения: 01.11.2023).
3. Потенциал рапсовых жмыхов в качестве сырья пищевого назначения / Т.В. Рензяева [и др.] // *Хранение и переработка сельхозсырья*. 2020. № 2. С. 143–160.

4. Evaluating the effects of high-oil rapeseed cake or natural additives on methane emissions and performance of dairy cows / A.R. Bayat [et al.] // *Journal of Dairy Science*. 2022. Vol. 105. № 2. P. 1211–1224.
5. Lipases: An Overview / L. Casas-Godoy [et al.] // *Lipases and Phospholipases*. 2012. Vol. 861. P. 3–30.
6. Adetunji A.I., Olaniran A.O. Production strategies and biotechnological relevance of microbial lipases: a review // *Brazilian Journal of Microbiology*. 2021. Vol. 52. P 1257–1269.
7. Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review / P. Chandra [et al.] // *Microbial Cell Factories*. 2020. Vol. 19. Article number 169.
8. Sierra G. A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates // *Antonie van Leeuwenhoek*. 1957. Vol. 23. № 1. P. 15–22.

References

1. Sustainability of food waste biorefinery: A review on valorisation pathways, techno-economic constraints, and environmental assessment / C. Caldeira [et al.] // *Bioresource Technology*. 2020. Vol. 312. Article number 123575.
2. Itogi uborochnoj kampanii 2022 // Федеральная служба государственной статистики (2023). URL: <https://rosstat.gov.ru/compendium/document/13277> (data obrascheniya: 01.11.2023).
3. Potencial rapsovyh zhmyhov v kachestve syr'ya pischevogo naznacheniya / T.V. Renzyaeva [i dr.] // *Hranenie i pererabotka sel'hozsyr'ya*. 2020. № 2. S. 143–160.
4. Evaluating the effects of high-oil rapeseed cake or natural additives on methane emissions and performance of dairy cows / A.R. Bayat [et al.] // *Journal of Dairy Science*. 2022. Vol. 105. № 2. P. 1211–1224.
5. Lipases: An Overview / L. Casas-Godoy [et al.] // *Lipases and Phospholipases*. 2012. Vol. 861. P. 3–30.
6. Adetunji A.I., Olaniran A.O. Production strategies and biotechnological relevance of micro-

- bial lipases: a review // Brazilian Journal of Microbiology. 2021. Vol. 52. P 1257–1269.
7. Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review / P. Chandra [et al.] // Microbial Cell Factories. 2020. Vol. 19. Article number 169.
8. Sierra G. A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates // Antonie van Leeuwenhoek. 1957. Vol. 23. № 1. P. 15–22.

Статья принята к публикации 13.12.2023 / The article accepted for publication 13.12.2023.

Информация об авторах:

Елизавета Валерьевна Подшивалова¹, магистр факультета биотехнологий

Ольга Петровна Свердлова², аспирант, младший научный сотрудник лаборатории биотехнологии и биоинженерии

Наталья Юрьевна Шарова³, заместитель директора по научной работе, доцент практики факультета биотехнологий, доктор технических наук, профессор РАН

Дарья Дмитриевна Белова⁴, старший научный сотрудник лаборатории биотехнологии и биоинженерии, кандидат технических наук

Information about the authors:

Elizaveta Valerievna Podshivalova¹, Master of the Faculty of Biotechnology

Olga Petrovna Sverdlova², Postgraduate student, Junior Researcher at the Laboratory of Biotechnology and Bioengineering

Natalya Yurievna Sharova³, Deputy Director for Research, Associate Professor of Practice, Faculty of Biotechnology, Doctor of Technical Sciences, Professor of the Russian Academy of Sciences

Daria Dmitrievna Belova⁴, Senior Researcher, Laboratory of Biotechnology and Bioengineering, Candidate of Technical Sciences

