

Научная статья

УДК 579.66

EDN: IVPAEU

DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-506-515



## Влияние протатранов на биосинтез внеклеточных ферментов *Candida ethanolica* ВКМ Y-2300 T

А.С. Кирюхина\*✉, Т.С. Лозовая\*, С.Н. Адамович\*\*

\*Иркутский национальный исследовательский технический университет,  
г. Иркутск, Российская Федерация

\*\*Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского СО РАН, г. Иркутск, Российская Федерация

**Аннотация.** Целью представленного исследования являлось изучение возможности применения синтетических биологически активных соединений – протатранов – для увеличения липолитической и протеолитической активности дрожжей *Candida ethanolica*. Протатран 1 (трис(2-гидроксиэтил) аммоний-4-хлорфенил-сульфанилацетат) и протатран 2 (трис(2-гидроксиэтил) аммоний-4-хлорфенил-сульфонилацетат) вносили в состав питательной среды в микроконцентрациях от  $1 \times 10^{-6}$  до  $1 \times 10^{-8}$ % масс. по отдельности и совместно. Установлено, что при внесении в питательную среду протатраны разнонаправленно влияли на биосинтез ферментов дрожжами *Candida ethanolica*. Это зависело от концентраций данных соединений, а также от их отдельного либо совместного внесения. Для синтеза липаз все изученные концентрации были эффективными, так как увеличивали синтез ферментов в 1,7–8,6 раза. При совместном применении протатранов синтез ферментов был выше в 3,4–11,7 раза. Для образования протеаз наиболее эффективным было совместное внесение изучаемых протатранов в концентрации  $10^{-6}$ % масс., при этом синтез ферментов достигал  $184,8 \pm 7,02$  Ед/мл к.ж. При совместном внесении изучаемые протатраны трис(2-гидроксиэтил) аммоний-4-хлорфенил-сульфанилацетат и трис(2-гидроксиэтил) аммоний-4-хлорфенил-сульфонилацетат могут быть использованы для увеличения эффективности продуцирования внеклеточных липаз и протеаз дрожжами *Candida ethanolica*. Особенностью влияния протатранов оказалась неравномерная динамика накопления внеклеточных ферментов, проявляющаяся в наличии резких пиков в процессе культивирования дрожжей. Причины данной неравномерности требуют дополнительных исследований.

**Ключевые слова:** ферменты, липазы, протеазы, протатраны, *Candida ethanolica*

**Благодарности.** Исследования частично проведены на оборудовании Байкальского аналитического центра коллективного пользования СО РАН.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда и Правительства Иркутской области (проект № 23-26-10007).

**Для цитирования:** Кирюхина А.С., Лозовая Т.С., Адамович С.Н. Влияние протатранов на биосинтез внеклеточных ферментов *Candida ethanolica* ВКМ Y-2300 T // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2023. Т. 13. N 4. С. 506–515. DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-506-515. EDN: IVPAEU.

### PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

## Effect of protatranes on the biosynthesis of extracellular enzymes of *Candida ethanolica* ВКМ Y-2300 T

Aleksandra S. Kiryukhina\*✉, Tatyana S. Lozovaya\*, Sergei N. Adamovich\*\*

\*Irkutsk National Research Technical University, Irkutsk, Russian Federation

\*\*A.E. Favorsky Irkutsk Institute of Chemistry SB RAS, Irkutsk, Russian Federation

**Abstract.** The study aims to explore the possibility of using synthetic biologically active compounds (protatranes) to increase the lipolytic and proteolytic activity of *Candida ethanolica*. Protatran 1 (tris(2-hydroxyethyl) ammonium-4-chlorophenyl-sulfanyl acetate) and protatran 2 (tris(2-hydroxyethyl) ammonium-4-chlorophenyl-sulfonyl acetate) were

added to the growth medium at trace concentrations of  $1 \times 10^{-6}$ – $1 \times 10^{-8}$  wt% separately and together. It was established that with the introduction to the growth medium, protatranes had a multidirectional effect on the biosynthesis of enzymes by *Candida ethanolica* yeast. This effect was dependent on the concentrations of these compounds, as well as on their separate or combined introduction. All the studied concentrations were found to be effective for lipase synthesis, as they improved enzyme synthesis by 1.7–8.6 times. The combined use of protatranes increased enzyme synthesis by 3.4–11.7 times. For protease formation, the combined introduction of the studied protatranes at a concentration of  $10^{-6}$  wt% was found to be the most effective, with enzyme synthesis reaching  $184.8 \pm 7.02$  U/mL in the culture broth. When co-introduced, the studied protatranes tris(2-hydroxyethyl) ammonium-4-chlorophenyl-sulfanyl acetate and tris(2-hydroxyethyl) ammonium-4-chlorophenyl-sulfonyl acetate can be used to increase the production efficiency of extracellular lipases and proteases by *Candida ethanolica*. The specific effect of protatranes was revealed to be the uneven dynamics of extracellular enzyme accumulation, manifested in the presence of sharp peaks during yeast cultivation. The reasons for this unevenness require further research.

**Keywords:** enzymes, lipases, proteases, protatranes, *Candida ethanolica*

**Acknowledgements.** The studies were partially carried out on the equipment of the Baikal Analytical Center for Collective Use of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences.

**Funding.** RSF and the Government of the Irkutsk region (project no. 23-26-10007) supported this work.

**For citation:** Kiryukhina A.S., Lozovaya T.S., Adamovich S.N. Effect of protatranes on the biosynthesis of extracellular enzymes of *Candida ethanolica* BKM Y-2300 T. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2023;13(4):506-515. (In Russian). DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-506-515. EDN: IVPAEU.

## ВВЕДЕНИЕ

Значение ферментов в хозяйственной деятельности человека трудно переоценить. Они применяются практически во всех сферах: в пищевой индустрии и фармацевтике; для очистки сточных вод, загрязненных почвы и воздуха; при добыче полезных ископаемых и получении новых видов энергии и топлива; при создании комбинированных химических продуктов и пр. [1, 2]. Источником большинства ферментов являются микроорганизмы, которые обладают высокой скоростью роста, способны расти на разнообразных субстратах и синтезировать различные ферменты, в том числе ферменты класса гидролаз – липазы и протеазы [3, 4].

Протеазы представляют собой гидролитические ферменты, способные расщеплять белки до более низкомолекулярных соединений – пептидов и аминокислот. Протеолитические ферменты микробного происхождения широко используются в самых разнообразных производственных технологиях [5]. Например, протеазы применяют для очистки воды и устранения биопленок [6], для получения пищевых продуктов с повышенным содержанием пептидов и гидролизатов белков, для устранения белковых помутнений в виноделии или повышения скорости фильтрации [3, 7, 8]. В медицинской практике протеазы назначают в составе противовоспалительной терапии, при заболеваниях пищеварительной системы, а также используют в различных медицинских разработках [9–12].

Липазы – это ферменты, расщепляющие жиры до спиртов и жирных кислот. Они применяются для изготовления биодизеля, продуктов питания и напитков, кожи и текстиля, в составе моющих средств, в фармацевтике и медицине, для очистки жиросодержащих стоков [13–19].

В качестве продуцентов различных гидролаз используются культуры мицелиальных грибов, дрожжей и бактерий [19, 20]. Продуценты, способные расти на дешевом сырье, предпочтительны, в связи с чем определенный

интерес представляют дрожжи *Candida ethanolica*, которые в качестве источника углерода предпочитают использовать этанол – доступное и дешевое сырье, не содержащее примесей, хорошо растворимое в воде [10–12].

При получении продуктов микробного синтеза основной проблемой является повышение и сохранение высокой продуктивности микроорганизмов [12]. Известно, что уровень секреции целевых продуктов у микроорганизмов зависит от таких факторов окружающей среды, как температура, pH, количество и состав источников питания, использование стимуляторов роста [21, 22]. В качестве альтернативы привычным биостимуляторам и способа снижения расходов при получении ферментов интересно рассмотреть такие соединения, как протатраны. Это одна из разновидностей «атранов» – биологически-активных веществ, синтезирующихся путем взаимодействия биогенных аминов и биологически активных аналогов фитогормонов. Данные соединения хорошо растворяются в воде, устойчивы при хранении, нетоксичны ( $LD_{50} = 1300$ – $6000$  мг/кг). Воздействие протатранов уже изучено на нескольких биологических объектах, на которые они оказывают положительное влияние, стимулируя рост или синтез ценных метаболитов. В сравнении с другими стимуляторами роста протатраны дешевле, т.к. применяются и действуют в микроконцентрациях от  $1 \times 10^{-2}$  до  $1 \times 10^{-8}$  % масс. [23–26].

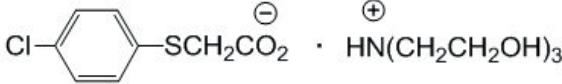
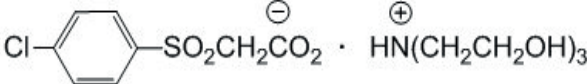
В связи с вышесказанным целью представленного исследования было изучение влияния протатранов трис(2-гидроксиэтил) аммоний-4-хлорфенил-сульфанилацетат (протатран 1) и трис(2-гидроксиэтил) аммоний-4-хлорфенил-сульфонилацетат (протатран 2) на липолитическую и протеолитическую активность дрожжей *C. ethanolica* BKM Y-2300 T.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве продуцента использовали дрожжи *C. ethanolica* Rybarova, Stros et Kockova-Kratochvilova 1980

Структура использованных протатранов

Structure of protatranes

Обозначение	Соединение	Структурная формула
Протатран 1	Трис(2-гидроксиэтил) аммоний-4-хлорфенил-сульфаниацетат	
Протатран 2	Трис(2-гидроксиэтил) аммоний-4-хлорфенил-сульфониацетат	

штамма ВКМ Y-2300 Т из коллекции Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН.

Дрожжи культивировали в течение 40 ч в колбах Эрленмейера объемом 500 мл с 200 мл синтетической питательной среды следующего состава, г/л [27]:  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  – 10,0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 10,0;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,7;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,0125;  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,0125;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,0125;  $\text{NaCl}$  – 0,0063. В качестве источника углерода для культивирования дрожжей использовали этанол в количестве 1,5% об. Питательную среду стерилизовали при 1 атм в течение 15 мин, pH среды равнялся 7,0. Корректировку pH проводили внесением в питательную среду стерильных растворов 1%-й  $\text{H}_2\text{SO}_4$  и 1%-го  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

В качестве посевного материала использовали дрожжевую суспензию. Для ее получения дрожжи культивировали в течение 48 ч на плотной питательной среде – сусло-агаре, для приготовления которой использовали сусло с концентрацией сухих веществ 6%. После выращивания дрожжей на сусло-агаре осуществляли культивирование в колбах объемом 300 мл со 100 мл синтетической питательной среды выше указанного состава в течение 24 ч. Такое получение посевного материала исключало возможность попадания остатков сусло-агара в экспериментальные колбы для культивирования, обеспечивало постоянство состава синтетической питательной среды, а также позволяло получать посевной материал с постоянной концентрацией клеток.

Готовый посевной материал вносили в экспериментальные колбы в количестве 10 мл (5% от объема среды). Количество клеток в дрожжевой суспензии перед началом культивирования составляло  $3 \times 10^6 \pm 8,2 \times 10^4$  КОЕ/мл. После засева колбы с культурой помещали в инкубационный шейкер CERTOMAT BS-1 (Sartorius Stedim Biotech, Германия). Скорость перемешивания составляла 200 об/мин. Ферментативную активность внеклеточных протеаз штамма определяли по методу, описанному в источнике [28], внеклеточных липаз – по методу Ота, Ямада [29].

В качестве стимуляторов использовали протатраны 1 и 2, синтезированные на основе биогенных этаноламинов и арилхалькогенилуксусных кислот (таблица) в Иркутском институте химии им. А.Е. Фаворского. Растворы данных химических соединений стерилизовали методом вакуумной мембранной фильтрации (диаметр пор мембраны 0,1 мкм) и вносили в питательную среду перед началом культивирования дрожжей как по отдельности, так и совместно в концентрациях  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-8}$  масс. Все исследования проводили в трехкратной повторности. Контролем служила культура

дрожжей *C. ethanolica*, выращенная в тех же условиях без добавления протатранов.

Результаты исследований были обработаны методом вариационной статистики на персональном компьютере с использованием программы Microsoft Excel. Статистическую значимость различий оценивали по t-критерию Стьюдента ( $p < 0,05$ ).

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

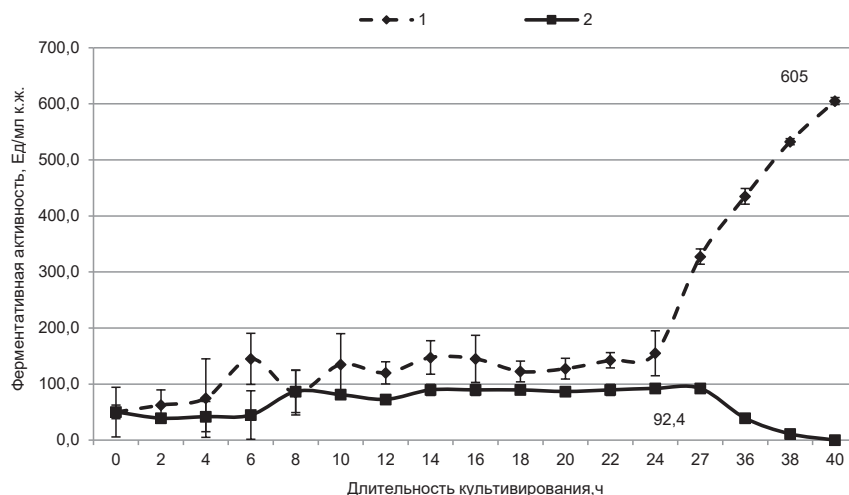
Ранее с помощью качественных биохимических тестов выявили, что дрожжи *C. ethanolica* в принципе способны образовывать внеклеточные липазы и протеазы [30], однако не было известно, насколько активными продуцентами данных ферментов они являются. В связи с этим мы провели исследования по количественному определению ферментов, продуцируемых дрожжами (рис. 1).

В результате проведенных исследований было показано, что дрожжи *C. ethanolica* штамма ВКМ Y-2300 Т являются активными продуцентами липаз. Синтез липаз был отмечен через сутки от начала культивирования и в процессе культивирования постоянно повышался. Максимальная активность внеклеточных липаз составила  $605 \pm 6,3$  Ед/мл к.ж. на 40-й час роста культуры. При сравнении данной величины с активностью липаз известных продуцентов было выяснено, что липолитическая активность у дрожжей *C. ethanolica* выше в 2,8 раза [31, 32].

В то же время дрожжи *C. ethanolica* штамма ВКМ Y-2300 Т оказались неактивными продуцентами протеаз. Активность внеклеточных протеаз в течение 27 ч культивирования не менялась, а затем стала снижаться до нуля. Причиной, возможно, являлся неподходящий состав среды для синтеза протеаз и/или отсутствие белкового субстрата. Исходный уровень протеазы *C. ethanolica* оказался выше некоторых известных продуцентов в 3–15 раз [33, 34], однако ниже других на 40% [25] или в 2,5 раза [36].

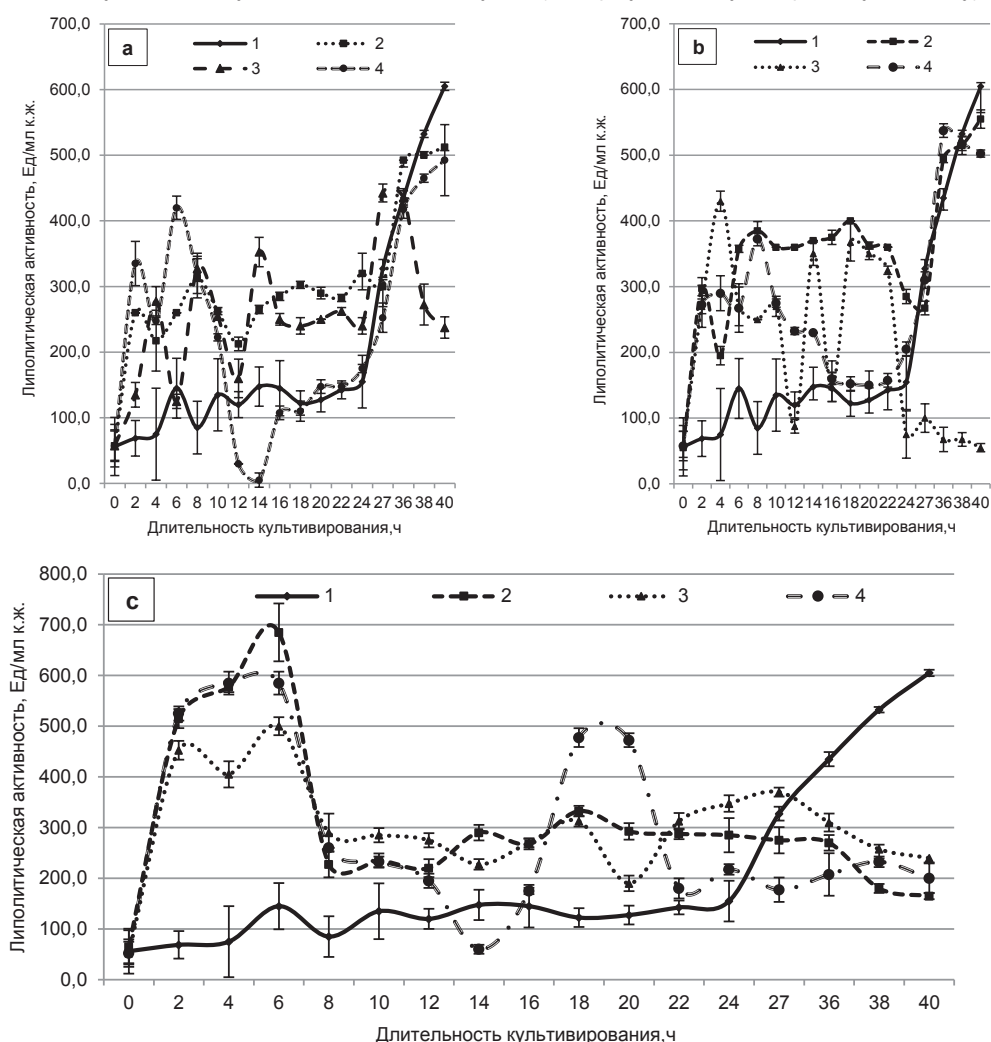
Для оценки влияния протатранов на активность ферментов было проведено культивирование дрожжей в присутствии протатранов. Протатраны 1 и 2 вносили в питательную среду в определенной концентрации как по отдельности, так и вместе с целью выяснить, могут ли они изменять свое воздействие в данных условиях и влиять друг на друга. Результаты исследований представлены на рис. 2 и 3.

Проведенные исследования показали, что процесс синтеза липаз в присутствии изученных концентраций протатрана 1 был более интенсивным и при этом более



**Рис. 1.** Внеклеточная ферментативная активность дрожжей *Candida ethanolica* (1 – липолитическая активность; 2 – протеолитическая активность)

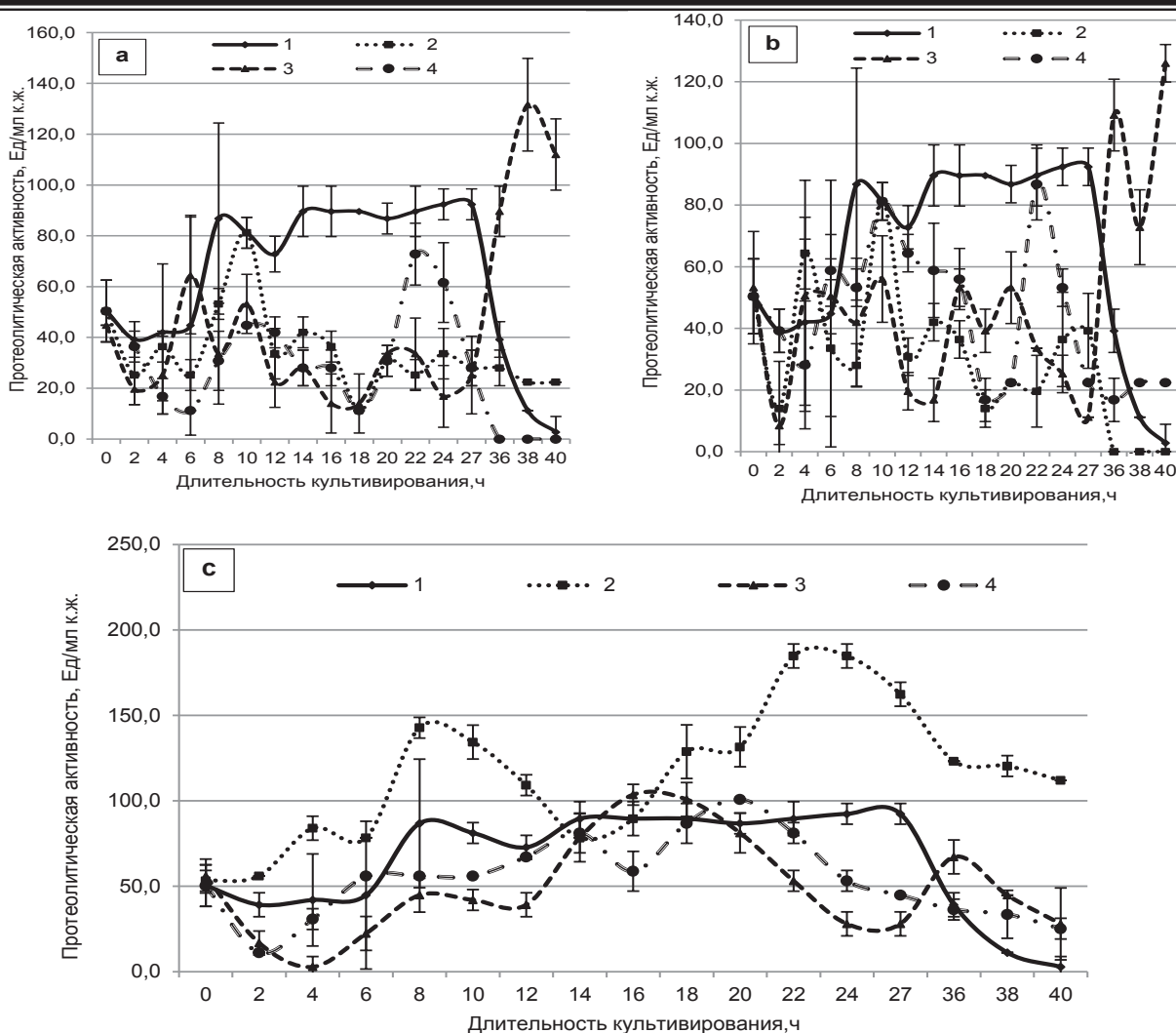
**Fig. 1.** Extracellular enzymatic activity of *Candida ethanolica* yeast (1 – lipolytic activity; 2 – proteolytic activity)



**Рис. 2.** Действие протатранов на активность внеклеточных липолитических ферментов: а – действие протатрана 1; б – действие протатрана 2; с – одновременное действие двух протатранов (1 – контроль; 2 – концентрация  $10^{-6}\%$  масс.; 3 – концентрация  $10^{-7}\%$  масс.; 4 – концентрация  $10^{-8}\%$  масс.)

**Fig. 2.** Protatranes effect on the activity of extracellular lipolytic enzymes: а – protatran 1 action; б – protatran 2 action; с – simultaneous action of two protatranes (1 – control; 2 – concentration  $10^{-6}\%$  mass; 3 – concentration  $10^{-7}\%$  mass; 4 – concentration  $10^{-8}\%$  mass)





**Рис. 3.** Действие протатранов на активность внеклеточных протеолитических ферментов: а – действие протатрана 1; б – действие протатрана 2; с – одновременное действие двух протатранов (1 – контроль; 2 – концентрация  $10^{-6}\%$  масс.; 3 – концентрация  $10^{-7}\%$  масс.; 4 – концентрация  $10^{-8}\%$  масс.)

**Fig. 3.** Protatranes effect on the activity of extracellular proteolytic enzymes: а – protatran 1 action; б – protatran 2 action; с – simultaneous action of two protatranes (1 – control; 2 – concentration  $10^{-6}\%$  mass; 3 – concentration  $10^{-7}\%$  mass; 4 – concentration  $10^{-8}\%$  mass)

неравномерным в сравнении с контролем (см. рис. 2, а). Активность ферментов была значительно выше контроля в первые 24 ч. Наиболее эффективной оказалась концентрация протатрана  $10^{-8}\%$  масс., т.к. в этом случае синтез внеклеточных липаз в 1,7–5,9 раза выше чем, в контроле (в первые 10 ч культивирования). Концентрация  $10^{-6}\%$  масс. в течение 24 ч культивирования вызывала повышение уровня липаз в 1,8–4,6 раза. Динамика синтеза ферментов при концентрации  $10^{-7}\%$  масс. характеризуется пиками как высокого, так и низкого уровня. Отрицательными эффектами стоит считать наличие неравномерности данного процесса в присутствии протатрана 1 и в целом более низкий уровень активности, чем в контроле, на момент окончания культивирования.

Похожие результаты были получены с применением протатрана 2. Отличие в данном случае заключалось лишь в том, что уровень активности липаз при концентрации  $10^{-6}\%$  масс. оказался в 1,9–8,6 раза выше

контроля, т.е. процесс протекал более эффективно, чем при культивировании дрожжей с использованием протатрана 1 (см. рис. 2, б).

При совместном использовании протатранов уровень липаз также был выше контроля, однако в период до 8 ч уровень активности ферментов оказался гораздо выше, чем в остальное время (в 3,4–11,7 раза) (см. рис. 2, с).

При добавлении протатрана 1 или протатрана 2 наблюдалось снижение активности протеаз (см. рис. 3, а, б). После 36 ч культивирования при концентрации  $10^{-7}\%$  масс. уровень протеолитической активности был несколько выше контроля. Кривые, отражающие динамику образования протеаз дрожжами, также отличались неравномерностью.

При одновременном применении протатранов 1 и 2 в одной из концентраций ( $10^{-6}\%$  масс.) активность протеаз возрастала в 1,4–2,3 раза на протяжении большего периода процесса культивирования (см. рис. 3, с).

Для объяснения положительного воздействия протатранов на биосинтез ферментов, вероятно, подходит предположение о том, что они имеют в молекулах благоприятное сочетание нескольких эффектов – двойное воздействие биологически активных этаноламинов и арилхалькогенилуксусных кислот, а также возможность быстрого проникновения в живую клетку за счет водородных связей и диполь-дипольного взаимодействия с полярными группами белков и липидов [25, 37]. В свою очередь, отрицательное воздействие протатранов и неравномерность данного воздействия, по-видимому, можно объяснить слишком интенсивным воздействием данных веществ на дрожжи при внесении их в экспериментальных концентрациях, особенностями строения клеточной стенки дрожжей, их метаболизма или состава питательной среды [38]. При этом в целом воздействие на объект исследования протатрана 1 не слишком отличалось от воздействия протатрана 2, что, возможно, обусловлено схожестью их строения (см. таблицу).

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе настоящего исследования установлено, что дрожжи *C. ethanolica* являются перспективными продуцентами липаз. При этом выявлено, что синтетические

биологически активные вещества – протатраны 1 и 2 – при внесении в питательную среду в микроконцентрациях (от  $1 \times 10^{-6}$  до  $1 \times 10^{-8}$  масс.) разнонаправленно влияют на биосинтез ферментов дрожжами *C. ethanolica*. Это зависит от концентраций данных соединений, а также от их отдельного либо совместного применения.

Для биосинтеза липаз все изученные концентрации протатранов (от  $1 \times 10^{-6}$  до  $1 \times 10^{-8}$  масс.) увеличивали количество ферментов в 1,7–8,6 раза. Совместное применение протатранов в концентрации  $1 \times 10^{-6}$  масс. усиливало биосинтез липаз в 3,4–11,7 раза.

Для образования протеаз все изученные концентрации протатранов (от  $1 \times 10^{-6}$  до  $1 \times 10^{-8}$  масс.) были неэффективными, и только их совместное внесение в концентрации  $10^{-6}$  масс. приводило к повышению синтеза ферментов в 1,4–2,3 раза.

Особенностью влияния протатранов оказалась неравномерная динамика накопления внеклеточных ферментов, проявляющаяся в виде резких пиков в процессе культивирования дрожжей. Причины данной неравномерности требуют дополнительных исследований.

Таким образом, протатраны 1 и 2 могут быть использованы для увеличения эффективности продуцирования внеклеточных липаз и протеаз дрожжами *C. ethanolica*.

### СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Хоконова М.Б. Использование дополнительных ферментных препаратов при соложении // Известия Кабардино-Балкарского государственного аграрного университета им. В.М. Кокова. 2019. N 2. С. 87–90. EDN: GPGWPN.
2. Вистовская В.П. Гидролитические ферменты в биотехнологии сыра // Известия Алтайского государственного университета. 2012. N 3-2. С. 9–12. EDN: PMDMBB.
3. Dos Santos Aguilar J.G., Sato H.H. Microbial proteases: production and application in obtaining protein hydrolysates // Food Research International. 2018. Vol. 103. P. 253–262. DOI: 10.1016/j.foodres.2017.10.044.
4. Bharathi D, Rajalakshmi G. Microbial lipases: an overview of screening, production and purification // Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 2019. Vol. 22. P. 101368. DOI: 10.1016/j.bcab.2019.101368.
5. Sharma K.M., Kumar R., Panwar S., Kumar A.. Microbial alkaline proteases: optimization of production parameters and their properties // Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. 2017. Vol. 15, no. 1. P. 115–126. DOI: 10.1016/j.jgeb.2017.02.001.
6. Hasan M.J., Haque P., Rahman M.M. Protease enzyme based cleaner leather processing: a review // Journal of Cleaner Production. 2022. Vol. 365. P. 132826. DOI: 10.1016/j.jclepro.2022.132826.
7. Cao S., Song J., Li H., Wang K., Li Y., Li Y., et al. Improving characteristics of biochar produced from collagen-containing solid wastes based on protease application in leather production // Waste Management. 2020. Vol. 105. P. 531–539. DOI: 10.1016/j.wasman.2020.02.043.
8. Chen Y., Liao X., Zhang C., Kong X., Hua Y. Hydrolyzing behaviors of endogenous proteases on proteins in sesame milk and application for producing low-phytate sesame protein hydrolysate // Food Chemistry. 2022. Vol. 385. P. 132617. DOI: 10.1016/j.foodchem.2022.132617.
9. Rosenberg L., Lapid O., Bogdanov-Berezovsky A., Glesinger R., Krieger Y., Silberstein E., et al. Safety and efficacy of a proteolytic enzyme for enzymatic burn debridement: a preliminary report // Burns. 2004. Vol. 30, no. 8. P. 843–850. DOI: 10.1016/j.burns.2004.04.010.
10. Cogo F., Williams R., Burden R.E., Scott C.J. Application of nanotechnology to target and exploit tumour associated proteases // Biochimie. 2019. Vol. 166. P. 112–131. DOI: 10.1016/j.biochi.2019.04.021.
11. Gräwe A., Ranglack J., Weber W., Stein V. Engineering artificial signalling functions with proteases // Current Opinion in Biotechnology. 2020. Vol. 63. P. 1–7. DOI: 10.1016/j.copbio.2019.09.017.
12. Barzkar N. Marine microbial alkaline protease: an efficient and essential tool for various industrial applications // International Journal of Biological Macromolecules. 2020. Vol. 161. P. 1216–1229. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.072.
13. Chandra P., Enespa, Singh R., Arora P.K. Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review // Microbial Cell Factories. 2020. Vol. 19. P. 169. DOI: 10.1186/s12934-020-01428-8.
14. Ray A. Application of lipase in industry // Asian Journal of Pharmacy and Technology. 2012. Vol. 2, no. 2. P. 33–37.
15. Salgado C.A., dos Santos C.I.A., Vanetti M.C.D. Microbial lipases: propitious biocatalysts for the food industry // Food Bioscience. 2022. Vol. 45. P. 101509. DOI: 10.1016/j.fbio.2021.101509.
16. Samer M. Biological and chemical wastewater treatment processes // Wastewater treatment engineering / ed. M. Samer. InTech, 2015. P. 1–50. DOI: 10.5772/61250.
17. Agobo K.U., Arazu V.A., Uzo K., Igwe C.N. Microbial lipases: a prospect for biotechnological industrial catalysis for green products: a review // Fermentation Technology. 2017. Vol. 6, no. 2. P. 144. DOI: 10.4172/2167-7972.1000144.
18. Porwal H.J., Mane A.V., Velhal S.G. Biodegradation of dairy effluent by using microbial isolates obtained from activated sludge // Water Resources and Industry. 2015. Vol. 9. P. 1–15. DOI: 10.1016/j.wri.2014.11.002.

19. Rabbani G., Ahmad E., Ahmad A., Khan R.H. Structural features, temperature adaptation and industrial applications of microbial lipases from psychrophilic, mesophilic and thermophilic origins // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2023. Vol. 225. P. 822–839. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2022.11.146.
20. Борисенко Е.Г., Мадзу О.Б., Пироговская Е.К., Маслова Т.А., Азанова А.А. Производство дрожжевых продуктов широкого профиля // *Научный журнал НИУ ИТМО. Серия «Процессы и аппараты пищевых производств»*. 2019. N 1. С. 3–9. DOI: 10.17586/2310-1164-2019-12-1-3-9. EDN: HETJHR.
21. Mohedano M.T., Konzock O., Chen Y. Strategies to increase tolerance and robustness of industrial microorganisms // *Synthetic and Systems Biotechnology*. 2022. Vol. 7, no. 1. P. 533–540. DOI: 10.1016/j.synbio.2021.12.009.
22. Lario L.D., Pillaca-Pullo O.S., Sette L.D., Converti A., Casati P., Spampinato C., et al. Optimization of protease production and sequence analysis of the purified enzyme from the cold adapted yeast *Rhodotorula mucilaginosa* CBMAI 1528 // *Biotechnology Reports*. 2020. Vol. 28. P. e00546. DOI: 10.1016/j.btre.2020.e00546.
23. Chen Y., Wang L., Dai F., Tao M., Li X., Tan Z. Biostimulants application for bacterial metabolic activity promotion and sodium dodecylsulfate degradation under copper stress // *Chemosphere*. 2019. Vol. 226. P. 736–743. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.03.180.
24. Поморцев А.В., Дорофеев Н.В., Адамович С.Н., Оборина Е.Н. Влияние протатранов на физиологические параметры яровой пшеницы при хлоридном засолении // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2022. Т. 12. N 3. С. 485–490. DOI: 10.21285/2227-2925-2022-12-3-485-490. EDN: LTLFUE.
25. Pavlova O.N., Adamovich S.N., Novikova A.S., Gorskova A.G., Izosimova O.N., Ushakov I.A., et al. Protatranes, effective growth biostimulants of hydrocarbon-oxidizing bacteria from Lake Baikal, Russia // *Biotechnology Reports*. 2019. Vol. 24. P. e00371. DOI: 10.1016/j.btre.2019.e00371.
26. Привалова Е.А., Тигунцева Н.П., Адамович С.Н., Мирсков Р.Г., Мирскова А.Н. Трис-(2-гидроксиэтил)аммониевые ионные жидкости – новые биостимуляторы роста спиртовых дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // *Вестник Иркутского государственного технического университета*. 2015. N 11. С. 136–141. EDN: VAUERR.
27. Пат. № 2061751, Российская Федерация, МПК C12N 1/16, C12R 1/72. Штамм дрожжей *Candida ethanolica* – продуцент биомассы / Р.Н. Бравичева, А.Д. Сатрутдинов, В.М. Благодатская, Н.Б. Градова, В.К. Ерошин, Н.А. Салихова [и др.]. Заявл. 13.04.1992; опубл. 10.06.1996.
28. Карпенко Д.В., Житков В.В., Карязин С.А. Влияние нанопрепаратов на активность протеаз // *Пиво и напитки*. 2016. N 4. С. 46–49. EDN: WMZEZV.
29. Стурова Ю.Г., Гришкова А.В. Исследование активности прегастральных липаз // *Ползуновский вестник*. 2019. N 4. С. 29–33. DOI: 10.25712/ASTU.2072-8921.2019.04.007. EDN: ZVMNLT.
30. Кирюхина А.С. Характеристика продуктивности дрожжей *Candida ethanolica* штамма ВКМ Y-2300 T // *Известия Иркутского государственного университета. Серия «Биология. Экология»*. 2022. Т. 39. С. 3–14. DOI: 10.26516/2073-3372.2022.39.3. EDN: KIIOKC.
31. Гамаюрова В.С., Зиновьева М.Е., Чан Т.Т.Х., Васильева А.В. Влияние состава питательной среды на липолитическую активность дрожжей *Yarrowia lipolytica* // *Бутлеровские сообщения*. 2013. Т. 35. N 9. С. 71–77. EDN: RBZKXX.
32. Шнайдер К.Л., Зиновьева М.Е., Гамаюрова В.С. Влияние компонентов питательной среды на биосинтез липазы дрожжами *Yarrowia (Candida) lipolytica* Y-3153 (ATCC 34088) // *Вестник Пермского национального исследовательского политехнического университета. Химическая технология и биотехнология*. 2021. N 3. С. 5–21. DOI: 10.15593/2224-9400/2021.3.01. EDN: DTLUSI.
33. Пат. № 2208633, Российская Федерация, МПК C12N 1/20, C12N 9/56, C12R 1/125. Штамм *Bacillus subtilis* P-1 – продуцент протеазы / Т.Н. Кузнецова, Р.С. Нафиков, М.М. Алсынбаев, В.Ф. Кулагин. Заявл. 14.11.2001; опубл. 20.07.2003.
34. Пат. № 2272838, Российская Федерация, МПК C12N 1/20, C12N 9/14, C12R 1/07. Штамм бактерии *Bacillus macerans* BS-04 – продуцент пектиназы, протеазы, ксиланазы и амилазы / Г.Б. Бравова, Э.А. Шишкова, Т.Е. Смирнова, В.В. Бурмистрова, Е.А. Нестеренко, О.А. Полетаева. Заявл. 21.06.2004; опубл. 27.03.2006.
35. Сербя Е.М., Римарева Л.В., Погоржельская Н.С., Давыдкина В.Е., Поляков В.А. Биомасса мицелиальных грибов – субстрат для создания биологически активных добавок // *Известия Уфимского научного центра РАН*. 2016. N 3-1. С. 163–165. EDN: WJUOUT.
36. Пат. № 2303066, Российская Федерация, МПК C12N 9/56, C12N 1/20, C12R 1/66. Штамм бактерий *Bacillus licheniformis* – продуцент щелочной протеазы / Н.В. Цурикова, Л.И. Нефедова, О.Н. Окунев, А.П. Сеницын, В.М. Черноглазов, Т.А. Воейкова [и др.]. Заявл. 14.11.2005; опубл. 20.07.2007.
37. Мирскова А.Н., Адамович С.Н., Мирсков Р.Г., Воронков М.Г. Фармакологически активные соли и ионные жидкости на основе 2-гидроксиэтиламинов, арилхалькогенилуксусных кислот и эссенциальных металлов // *Известия Академии наук. Серия химическая*. 2014. N 9. С. 1869–1883. EDN: RGDPWU.
38. Seter M., Thomson M.J., Stoimenovski J., MacFarlane D.R., Forsyth M. Dual active ionic liquids and organic salts for inhibition of microbially influenced corrosion // *Chemical Communications*. 2012. Vol. 48. P. 5983–5985. DOI: 10.1039/c2cc32375c.

## REFERENCES

1. Khokonova M.B. Use of additional enzyme preparations when combined. *Izvestiya Kabardino-Balkarskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta im. V.M. Kokova*. 2019;2:87-90. (In Russian). EDN: GPGWPN.
2. Vistovskaya V.P. Hydrolytic enzymes in cheese biotechnology. *Izvestiya Altaiskogo gosudarstvennogo universiteta*. 2012;3-2:9-12. (In Russian). EDN: PMDMBB.
3. Dos Santos Aguilar J.G., Sato H.H. Microbial proteases: production and application in obtaining protein hydrolysates. *Food Research International*. 2018;103:253-262. DOI: 10.1016/j.foodres.2017.10.044.



4. Bharathi D, Rajalakshmi G. Microbial lipases: an overview of screening, production and purification. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2019;22:101368. DOI: 10.1016/j.bcab.2019.101368.
5. Sharma K.M., Kumar R., Panwar S., Kumar A.. Microbial alkaline proteases: optimization of production parameters and their properties. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2017;15(1):115-126. DOI: 10.1016/j.jgeb.2017.02.001.
6. Hasan M.J., Haque P., Rahman M.M. Protease enzyme based cleaner leather processing: a review. *Journal of Cleaner Production*. 2022;365:132826. DOI: 10.1016/j.jclepro.2022.132826.
7. Cao S., Song J., Li H., Wang K., Li Y., Li Y., et al. Improving characteristics of biochar produced from collagen-containing solid wastes based on protease application in leather production. *Waste Management*. 2020;105:531-539. DOI: 10.1016/j.wasman.2020.02.043.
8. Chen Y., Liao X., Zhang C., Kong X., Hua Y. Hydrolyzing behaviors of endogenous proteases on proteins in sesame milk and application for producing low-phytate sesame protein hydrolysate. *Food Chemistry*. 2022;385:132617. DOI: 10.1016/j.foodchem.2022.132617.
9. Rosenberg L., Lapid O., Bogdanov-Berezovsky A., Glesinger R., Krieger Y., Silberstein E., et al. Safety and efficacy of a proteolytic enzyme for enzymatic burn debridement: a preliminary report. *Burns*. 2004;30(8):843-850. DOI: 10.1016/j.burns.2004.04.010.
10. Cogo F., Williams R., Burden R.E., Scott C.J. Application of nanotechnology to target and exploit tumour associated proteases. *Biochimie*. 2019;166:112-131. DOI: 10.1016/j.biochi.2019.04.021.
11. Gräwe A., Ranglack J., Weber W., Stein V. Engineering artificial signalling functions with proteases. *Current Opinion in Biotechnology*. 2020;63:1-7. DOI: 10.1016/j.copbio.2019.09.017.
12. Barzkar N. Marine microbial alkaline protease: an efficient and essential tool for various industrial applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020;161:1216-1229. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.072.
13. Chandra P., Enespa, Singh R., Arora P.K. Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. *Microbial Cell Factories*. 2020;19:169. DOI: 10.1186/s12934-020-01428-8.
14. Ray A. Application of lipase in industry. *Asian Journal of Pharmacy and Technology*. 2012;2(2):33-37.
15. Salgado C.A., dos Santos C.I.A., Vanetti M.C.D. Microbial lipases: propitious biocatalysts for the food industry. *Food Bioscience*. 2022;45:101509. DOI: 10.1016/j.fbio.2021.101509.
16. Samer M. Biological and chemical wastewater treatment processes. In: Samer M. (ed.). *Wastewater treatment engineering*. InTech; 2015, p. 1-50. DOI: 10.5772/61250.
17. Agobo K.U., Arazu V.A., Uzo K., Igwe C.N. Microbial lipases: a prospect for biotechnological industrial catalysis for green products: a review. *Fermentation Technology*. 2017;6(2):144. DOI: 10.4172/2167-7972.1000144.
18. Porwal H.J., Mane A.V., Velhal S.G. Biodegradation of dairy effluent by using microbial isolates obtained from activated sludge. *Water Resources and Industry*. 2015;9:1-15. DOI: 10.1016/j.wri.2014.11.002.
19. Rabbani G., Ahmad E., Ahmad A., Khan R.H. Structural features, temperature adaptation and industrial applications of microbial lipases from psychrophilic, mesophilic and thermophilic origins. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2023;225:822-839. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2022.11.146.
20. Borisenko E.G., Madzou O.B., Pirogovskaya E.K., Maslova T.A., Azanova A.A. Production of yeast products of wide profile. *Nauchnyi zhurnal NIU ITMO. Seriya "Protsessy i apparaty pishchevykh proizvodstv" = Scientific journal NRU ITMO. Series "Processes and Food Production Equipment"*. 2019;1:3-9. (In Russian). DOI: 10.17586/2310-1164-2019-12-1-3-9. EDN: HETJHR.
21. Mohedano M.T., Konzock O., Chen Y. Strategies to increase tolerance and robustness of industrial microorganisms. *Synthetic and Systems Biotechnology*. 2022;7(1):533-540. DOI: 10.1016/j.synbio.2021.12.009.
22. Lario L.D., Pillaca-Pullo O.S., Sette L.D., Converti A., Casati P., Spampinato C., et al. Optimization of protease production and sequence analysis of the purified enzyme from the cold adapted yeast *Rhodotorula mucilaginosa* CBMAI 1528. *Biotechnology Reports*. 2020;28:e00546. DOI: 10.1016/j.btre.2020.e00546.
23. Chen Y., Wang L., Dai F., Tao M., Li X., Tan Z. Biostimulants application for bacterial metabolic activity promotion and sodium dodecylsulfate degradation under copper stress. *Chemosphere*. 2019;226:736-743. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.03.180.
24. Pomortsev A.V., Dorofeev N.V., Adamovich S.N., Oborina E.N. Effect of protatranes on the physiological parameters of spring wheat under chloride salinity conditions. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2022;12(3):485-490. (In Russian). DOI: 10.21285/2227-2925-2022-12-3-485-490. EDN: LTLFUE.
25. Pavlova O.N., Adamovich S.N., Novikova A.S., Gorshkov A.G., Izosimova O.N., Ushakov I.A., et al. Protatranes, effective growth biostimulants of hydrocarbon-oxidizing bacteria from Lake Baikal, Russia. *Biotechnology Reports*. 2019;24:e00371. DOI: 10.1016/j.btre.2019.e00371.
26. Privalova E.A., Tiguntseva N.P., Adamovich S.N., Mirskov R.G., Mirskova A.N. Tris-(2-hydroxyethyl)ammonium ionic liquids as new biostimulants of *saccharomyces cerevisiae* alcohol yeast. *Vestnik Irkutskogo gosudarstvennogo tekhnicheskogo universiteta = Proceedings of Irkutsk State Technical University*. 2015;11:136-141. (In Russian). EDN: VAUERR.
27. Bravicheva R.N., Satrutdinov A.D., Blagodatskaja V.M., Gradova N.B., Eroshin V.K., Salikhova N.A., et al. *Strain of yeast Candida ethanolica – a producer of biomass*. Patent RF, no. 2061751; 1996. (In Russian).
28. Karpenko D.V., Zhitkov V.V., Karjazin S.A. The influence of nanopreparations on the activity of proteases. *Pivo i napitki = Beer and beverages*. 2016;4:46-49. (In Russian). EDN: WMZEZV.
29. Sturova Yu.G., Grishkova A.V. Study of the activity of pregastric lipases. *Polzunovskiy vestnik*. 2019;4:29-33. (In Russian). DOI: 10.25712/ASTU.2072-8921.2019.04.007. EDN: ZVMNLT.
30. Kiryukhina A.S. Characteristics of the yeast strain *Candida ethanolica* BKM Y-2300 T productivity. *Izvestiya Irkutskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya "Biologiya. Ekologiya" = The Bulletin of Irkutsk State University. Series Biology. Ecology*. 2022;39:3-14. (In Russian).



DOI: 10.26516/2073-3372.2022.39.3. EDN: KIIOKC.

**31.** Gamayurova V.S., Zinov'eva M.E., Tran T.T.H., Vasileva A.V. Influence of the composition of the nutrient medium on the biosynthesis of lipase by yeasts *Yarrowia lipolytica*. *Butlerovskie soobshcheniya = Butlerov Communications*. 2013;35(9):71-77. (In Russian). EDN: RBZKXX.

**32.** Shneider K.L., Zinov'eva M.E., Gamayurova V.S. Effect of growth medium components on the biosynthesis of yeast lipase *Yarrowia (Candida) lipolytica* Y-3153 (ATCC 34088). *Vestnik Permskogo natsional'nogo issledovatel'skogo politekhnicheskogo universiteta. Khimicheskaya tekhnologiya i biotekhnologiya = PNRPU Bulletin. Chemical Technology and Biotechnology*. 2021;3:5-21. (In Russian). DOI: 10.15593/2224-9400/2021.3.01. EDN: DTLUSI.

**33.** Kuznetsova T.N., Nafikov R.S., Alsynbaev M.M., Kulagin V.F. Strain *Bacillus subtilis* P-1 as producer of protease. Patent RF, no. 2208633; 2003. (In Russian).

**34.** Bravova G.B., Shishkova E.A., Smirnova T.E., Burmistrova V.V., Nesterenko E.A. Poletaeva O.A. Strain of bacterium *Bacillus macerans* BS-04 as producer of pectinases, protease, xylanase and amylase. Patent RF, no. 2272838; 2006. (In Russian).

**35.** Serba E.M., Rimareva L.V., Pogorzshelskaya N.S., Davyidkina V.E., Polyakov V.A. The biomass of filamentous fungi as a substratum for the creation of biologically active additives. *Izvestiya Ufimskogo nauchnogo tsentra RAN = Proceedings of the RAS Ufa Scientific Centre*. 2016;3-1:163-165. (In Russian). EDN: WJUOUT.

**36.** Tsurikova N.V., Nefedova L.I., Okunev O.N., Sinitsyn A.P., Chernoglazov V.M., Voejkova T.A., et al. Bacterium strain *bacillus licheniformis* as alkaline protease producer. Patent RF, no. 2303066; 2007. (In Russian).

**37.** Mirskova A.N., Adamovich S.N., Mirskov R.G., Voronkov M.G. Pharmacologically active salts and ionic liquids based on 2-hydroxyethylamines, arylchalcogenylacetic acids, and essential metals. *Izvestiya Akademii nauk. Seriya khimicheskaya*. 2014;9:1869-1883. (In Russian). EDN: RGDPWU.

**38.** Seter M., Thomson M.J., Stoimenovski J., MacFarlane D.R., Forsyth M. Dual active ionic liquids and organic salts for inhibition of microbially influenced corrosion. *Chemical Communications*. 2012;48:5983-5985. DOI: 10.1039/c2cc32375c.

#### ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

##### **Кирюхина Александра Сергеевна,**

аспирант,  
Иркутский национальный исследовательский  
технический университет,  
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,  
Российская Федерация,  
✉ alexandra.kirukhina@yandex.ru  
<https://orcid.org/0009-0009-0305-6556>

##### **Лозовая Татьяна Сергеевна,**

к.б.н., доцент,  
Иркутский национальный исследовательский  
технический университет,  
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,  
Российская Федерация,  
tnike75@mail.ru  
<https://orcid.org/0009-0002-1905-6250>

##### **Адамович Сергей Николаевич,**

д.х.н., ведущий научный сотрудник,  
Иркутский институт химии  
им. А.Е. Фаворского СО РАН,  
664033, г. Иркутск, ул. Фаворского, 1,  
Российская Федерация,  
mir@irioch.irk.ru  
<https://orcid.org/0000-0003-1276-924X>

#### **Вклад авторов**

А.С. Кирюхина, Т.С. Лозовая – проведение экспериментальной работы по оценке биологической эффективности протатранов; обсуждение полученных результатов; написание статьи.  
С.Н. Адамович – выполнение работы по синтезу протатранов; обсуждение полученных результатов.

#### INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

##### **Aleksandra S. Kiryukhina,**

Postgraduate Student,  
Irkutsk National Research Technical University,  
83, Lermontov St., Irkutsk, 664074,  
Russian Federation,  
✉ alexandra.kirukhina@yandex.ru  
<https://orcid.org/0009-0009-0305-6556>

##### **Tatyana S. Lozovaya,**

Cand. Sci. (Biology), Associate Professor,  
Irkutsk National Research Technical University,  
83, Lermontov St., Irkutsk, 664074,  
Russian Federation,  
tnike75@mail.ru  
<https://orcid.org/0009-0002-1905-6250>

##### **Sergei N. Adamovich,**

Dr. Sci. (Chemistry), Leading Researcher,  
A.E. Favorsky Irkutsk Institute  
of Chemistry SB RAS,  
1, Favorsky St., Irkutsk, 664033,  
Russian Federation,  
mir@irioch.irk.ru  
<https://orcid.org/0000-0003-1276-924X>

#### **Contribution of the authors**

A.S. Kiryukhina, T.S. Lozovaya – carrying out the experimental work on the assessment of the protatranes biological effectiveness; discussion of the obtained results; writing the article.  
S.N. Adamovich – carrying out the experimental work on protatranes synthesis; discussion of the obtained results.

**Конфликт интересов**

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

*Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.*

**Информация о статье**

Поступила в редакцию 19.03.2023.  
Одобрена после рецензирования 12.10.2023.  
Принята к публикации 31.10.2023.

**Conflict interests**

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this article.

*The final manuscript has been read and approved by all the co-authors.*

**Information about the article**

The article was submitted 19.03.2023.  
Approved after reviewing 12.10.2023.  
Accepted for publication 31.10.2023.