علوم و فناوری زیستی مدرس
دورهٔ ۲، شمارهٔ ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۰

اثر منابع نیتروژنی بر تولید آنزیم لیپاز مخمر *Yarrowia lipolytica*

فرشاد درویشی[۱*]، ایرج نحوی[۲]، سید حمید زرکش اصفهانی[۳]

۱- استادیار میکروبیولوژی، دانشکده علوم، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه مراغه
۲- استاد میکروبیولوژی، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه اصفهان
۳- استادیار ایمونولوژی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان

***مراغه، کدپستی ۵۵۱۸۱- ۸۳۱۱۱**
f.darvishi@ymail.com
(دریافت مقاله: ۸۹/۸/۱٤، پذیرش: ۸۹/۱۲/٤)

چکیده- آنزیم لیپاز در تولید مواد شوینده، آرایشی و بهداشتی، داروسازی، افزاینده‌های طعم و بو و مواد غذایی به‌کار می‌رود. لیپاز مخمر *Yarrowia lipolytica* برای تولید دسته مهمی از مواد واسطه شیمیایی در صنایع دارویی استفاده می‌شود. تولید آنزیم به ترکیب محیط‌های کشت و شرایط محیطی بستگی دارد. سویه مخمر *Y. lipolytica DSM 3286* روی محیط‌های مختلف حاوی منابع نیتروژن آلی و معدنی کشت شد. تولید لیپاز با اندازه‌گیری وزن خشک و فعالیت آنزیمی لیپاز با روش رنگ‌سنجی پارا نیتروفنیل‌لورات در زمان‌های مختلف طی ۷ روز انجام شد. در این پژوهش اثر منابع نیتروژن بر تولید لیپاز *Y. lipolytica DSM 3286* بررسی شد. بیشینه‌ی تولید لیپاز ۳٤/۷ واحد در میلی‌لیتر (پس از ٤۸ ساعت) در محیط حاوی عصاره مخمر به‌عنوان منبع نیتروژن تعیین شد. دما و pH مناسب برای فعالیت آنزیم به ترتیب ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۷ بود. نتایج این پژوهش در راستای توسعه تولید لیپاز *Y. lipolytica* به منظور کاربرد در صنایع دارویی است.

کلیدواژگان: یاروویا لیپولیتیکا، لیپاز، منابع نیتروژن، بهینه‌سازی.

۱- مقدمه

بسیاری از داروهای کایرال (chiral) به‌شکل مخلوط راسمیک تجویز می‌شوند که ممکن است سایر فرایندهای زیستی را مختل و یا آثار جانبی فاجعه‌آمیز داشته باشند. به همین دلیل صنایع داروسازی علاقمند به تولید داروهای تک‌انانتیومری (single-enantiomer) به‌جای مخلوط راسمیک است [۱]. تجارت انواع داروهای تک‌انانتیومری و خالص به‌سرعت در حال گسترش است؛ به‌طوری که در سال ۲۰۰۵ به رشد ۱۳ درصد و ارزش ۲۰۵ میلیارد دلار در جهان رسید [۲].

سنتز نامتقارن شیمیایی، کریستال‌سازی با آرایش فضایی انتخابی و کروماتوگرافی کایرال از راه‌های تولید انانتیومری خالص است که اغلب گران و پیچیده است اما در مقابل آنزیم‌ها به دلیل عملکرد اختصاصی نسبت به سوبسترا، شناسایی جایگاه (regioselectivity) و آرایش فضایی (stereospecificity) و همچنین قیمت ارزان، کاهش زمان و مراحل سنتز برای تبدیل مخلوط راسمیک به ترکیب تک‌انانتیومری مورد توجه است [۱] و [۳].

آنزیم لیپاز *Yarrowia lipolytica* از آنزیم‌هایی است که علاوه بر مزایای بالا به خاطر پایداری زیاد، نیاز نداشتن به کوفاکتور، فعالیت سنتزی در حلال‌های آلی و طیف گسترده سوبسترا می‌تواند برای تبدیل مخلوط راسمیک به‌ترکیب تک‌انانتیومری به‌کار رود که در ادامه به برخی از این ترکیبات اشاره می‌شود: ایجاد مشتقات اتیل‌استراسید ۲- بروموتیول استیک به‌عنوان پیش‌ساز داروهای ضددرد و گیرنده غیرپپتیدی آنژیوتانسین نوع دو به کار می‌رود [۳] و [٤] افلوکساسین یک ترکیب مخلوط راسمیک کینولون با فعالیت گسترده ضدباکتریایی برعلیه باکتری‌های گرم‌مثبت و گرم‌منفی است ولی ایزومر S افلوکساسین یعنی لووافلوکساسین دو برابر قوی‌تر از مخلوط راسمیک افلوکساسین عمل می‌کند. فعالیت ضدباکتریایی لووافلوکساسین ۸ تا ۱۲۸ برابر ایزومر R افلوکساسین است [۱]. اسیدهای ۲- آریل‌پروپیونیک خصوصیات داروهای ضدالتهاب غیراستروییدی نظیر ایبوپروفن، ناپروکسن و کتوپروفن را دارند. اسیدهای ۲- هالوژنوکربوکسیلیک مهم‌ترین واسطه‌های مسیر ساخت تعدادی از داروها مانند پروستاگلاندین، پروستاسایکلین، پنی‌سیلین نیمه سنتزی و نمک‌های تیازولیوم است [۲].

در سال ۱۹٤۸ ترشح لیپاز *Y. lipolytica* گزارش شد. لیپاز در این مخمر به سه شکل درون‌سلولی، متصل به دیواره و خارج‌سلولی است. در بانک‌های ژن ۵ توالی به نام‌های LIP1, 2, 3, 7, 8 برای انواع آنزیم‌های لیپاز *Y. lipolytica* تعیین توالی و گزارش شده است که LIP2 مسئول تنظیم و تولید همه لیپازهای خارج‌سلولی است [۵] و [۷].

منابع کربن و نیتروژن از مهم‌ترین عوامل مؤثر بر تولید آنزیم لیپاز در مخمر *Y. lipolytica* است و [۸] و [۱۰]. هدف این پژوهش بررسی اثر منابع مختلف نیتروژن بر تولید آنزیم لیپاز در مخمر *Y. lipolytica* است، تا منبع نیتروژنی مناسب برای افزایش تولید این آنزیم تعیین شود.

۲- مواد وروش‌ها

۲-۱- سویه مخمر

در این پژوهش از سویه استاندارد مخمر *Yarrowia lipolytica* DSM3286 از کلکسیون میکروبی DSMZ آلمان استفاده شد. از محیط کشت YPD حاوی ۲۰ گرم در لیتر گلوکز (سیگما)، ۲۰ گرم در لیتر Bacto-Peptone (Difco) و ۱۰ گرم در لیتر Difco Yeast Extract و ۱۷ گرم در لیتر آگار-آگار برای کشت این مخمر در دمای ۲۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳-۲ روزه استفاده شد و در دمای نگهداری ٤ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد [۱۱].

محیط کشت و شرایط تولید آنزیم لیپاز

ترکیبات محیط پایه برای تولید آنزیم لیپاز با اندکی تغییر حاوی ۱۰ میلی‌گرم روغن زیتون، ۰/۵ گرم KH_2PO_4، ۰/۵ گرم K_2HPO_4، ۰/۵ گرم $MgSO_4 \times 7H_2O$، ۰/۱ گرم $CaCl_2$ و ۰/۱ گرم NaCl و از منابع مختلف نیتروژن، ۲ گرم در یک لیتر آب مقطر بود که در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه استریل شد [به غیر از اوره و کازئین که با فیلتر استریل و سپس به محیط کشت اضافه شدند].

پس از کشت ۳-۲ روزه روی محیط YPD، یک کلنی مخمر به ۲۰ میلی‌لیتر محیط مایع YPD (بدون آگار-آگار) تلقیح شد و پس از ۲۴-۱۸ ساعت 10^{7}-10^{6} سلول مخمر در یک میلی‌لیتر به ۵۰ میلی‌لیتر محیط تولید لیپاز تلقیح شد. سپس این محیط در انکوباتور با دمای ۲۹ درجه سانتی‌گراد و ۲۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد و طی ۷ روز نمونه‌برداری و بررسی شد [۱۲].

۲-۲- تعیین وزن خشک توده سلولی

پس از نمونه‌برداری، یک میلی‌لیتر از محیط با دور ۴۶۰۰ g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد، پس از جدا کردن مایع رویی، نمونه‌ها در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد آون خشک و بلافاصله وزن خشک اندازه‌گیری شد [۴].

۲-۳- اندازگیری فعالیت آنزیمی با روش رنگ‌سنجی (Spectrophotometric assay)

در این روش از پارانیتروفنیل لورات (PNPL) به‌عنوان سوبسترای آنزیم لیپاز برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی استفاده شد که محصول نهایی، اسید چرب و پارانیتروفنل (PNP) است. پارانیتروفنل رنگ زرد ایجاد می‌کند که در طول موج ۴۱۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر قابل اندازه‌گیری است. در نتیجه منحنی استاندارد براساس غلظت‌های مختلف پارانیتروفنل در بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH حدود ۷ رسم شد.

در ادامه محلول ۰/۵۰۴ میلی‌مولار پارانیتروفنیل لورات در بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH حدود ۷ به‌عنوان سوبسترا آماده شد که باید مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گیرد. برای اندازه‌گیری نمونه‌ها، محیط کشت در یک ویال به مدت ۱۵ دقیقه با ۱۴ هزار دور دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوپرناتانت به ۹۰۰ میکرولیتر سوبسترا اضافه شد. پس از ۱۰ دقیقه با قرار دادن آن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، مقدار جذب نوری در طول موج ۴۱۰ نانومتر بررسی شد. با استفاده از منحنی استاندارد و فرمول آن، فعالیت آنزیمی به صورت واحد در میلی‌لیتر گزارش شد [۱۱].

۲-۴- تعیین دما و pH مناسب برای فعالیت آنزیم لیپاز

پس از تعیین بهترین محیط کشت برای تولید آنزیم، برای مشخص کردن دمای مناسب برای فعالیت آنزیم لیپاز، ابتدا سوبسترا ۱۵ دقیقه در دماهای ۴، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۳۷، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس واکنش آنزیمی به مدت ۱۰ دقیقه در همان دما انجام شد، و همچنین برای تعیین pH مناسب به جای بافر فسفات با pH حدود ۷، از بافرهای دارای محدوده بافری متفاوت بین ۱۱-۳ استفاده شد.

۳- یافته‌ها

عملکرد *Y. lipolytica* DSM3286 روی منابع مختلف نیتروژن برای تولید آنزیم لیپاز با اندازه‌گیری وزن خشک (X) بر حسب گرم در لیتر و فعالیت آنزیمی لیپاز (L) بر حسب واحد آنزیمی در میلی‌لیتر (U/ml) با روش رنگ‌سنجی پارا نیتروفنیل لورات طی ۷ روز انجام شد که نتایج خام در جدول (۱) مشاهده می‌شود. شکل (۱) وزن خشک و بیشترین میزان تولید آنزیم لیپاز به وسیله‌ی *Y. lipolytica* DSM3286 را روی منابع مختلف نیتروژن، بدون در نظر گرفتن زمان تولید نشان می‌دهد.

برای بررسی بهتر فعالیت *Y. lipolytica* DSM3286 و تولید آنزیم لیپاز، نتایج خام (جدول۱) تجزیه و تحلیل شد. از جمله این تجزیه و تحلیل‌ها می‌توان به نسبت بازده وزن خشک به سوبسترا ($Y_{X/S}$) برحسب گرم بر

گرم (g/g)، بازده تولید لیپاز به سوبسترا ($Y_{L/S}$) برحسب واحد آنزیمی بر گرم (U/g)، محصول دهی یا میزان تولید لیپاز (P_L) برحسب واحد آنزیمی در زمان تخمیر (U/h)، سرعت ویژه تولید لیپاز (q_L) برحسب واحد آنزیمی بر وزن خشک در زمان تخمیر (U/g×h) و محصول دهی یا میزان تولید حجمی لیپاز (Q_L) برحسب واحد آنزیمی بر حجم اولیه محیط کشت مایع در زمان تخمیر (U/l×h) اشاره کرد که نتایج در جدول (۲) مشاهده می‌شود [۱۳].

در ادامه برای تعیین دما و pH مناسب برای فعالیت آنزیم لیپاز، نمونه‌برداری از بهترین محیط کشت تولید انجام شد. واکنش آنزیمی نمونه‌ها در دما و pH مختلف بررسی شد. همان‌طور که در شکل‌های ۲ و ۳ مشاهده می‌شود بهترین دما و pH برای فعالیت آنزیم لیپاز *Y. lipolytica* DSM3286 به‌ترتیب ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۷ تعیین شد.

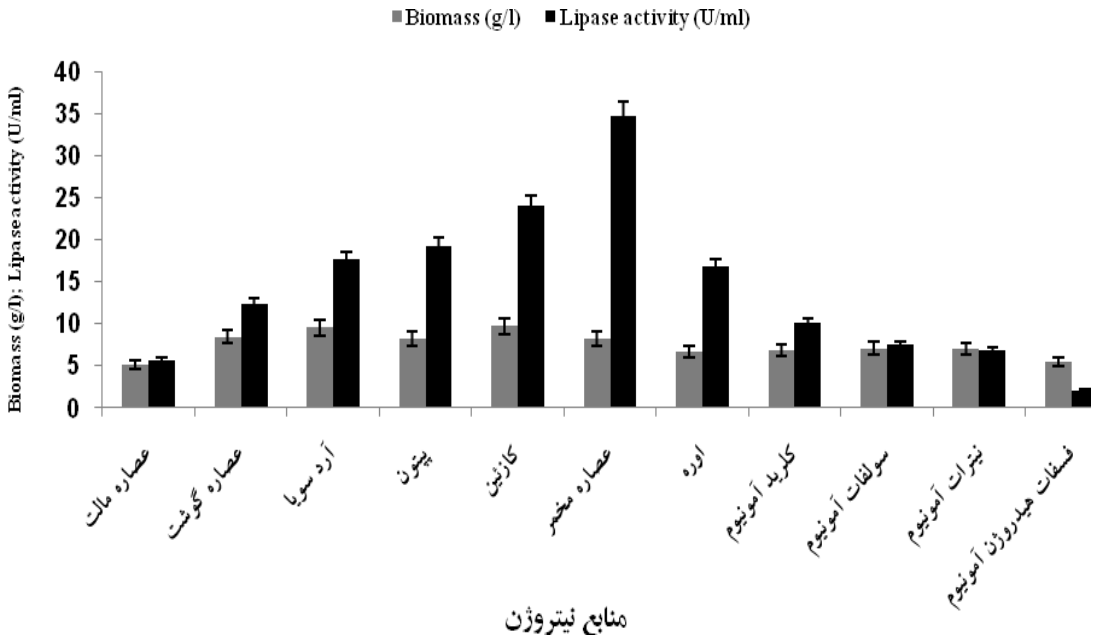
جدول ۱ اثر منابع مختلف نیتروژن بر روی وزن خشک و تولید آنزیم لیپاز *Yarrowia lipolytica* fi DSM3286

منبع نیتروژن (N)	وزن (g/l) خشک	فعالیت آنزیمی لیپاز (U/ml)	زمان تولید (h)
عصاره مالت	۵ /۰۸	۵ /۷۳	۴۸
عصاره گوشت	۸ /۴۸	۱۲ /۴۴	۴۸
آرد سویا	۹ /۵۴	۱۷ /۶۳	۴۸
پپتون	۸ /۲۳	۱۹ /۲۸	۴۸
کازئین	۹ /۷۳	۲۴ /۰۴	۴۸
عصاره مخمر	۸ /۲۰	۳۴ /۷۰	۴۸
اوره	۶ /۶۶	۱۶ /۸۳	۴۸
کلرید آمونیوم	۶ /۸۸	۱۰ /۱۲	۴۸
سولفات آمونیوم	۷ /۱۰	۷ /۴۸	۴۸
نیترات آمونیوم	۶ /۹۹	۶ /۸۲	۴۸
فسفات هیدروژن آمونیوم	۵ /۵۲	۲ /۰۴	۴۸

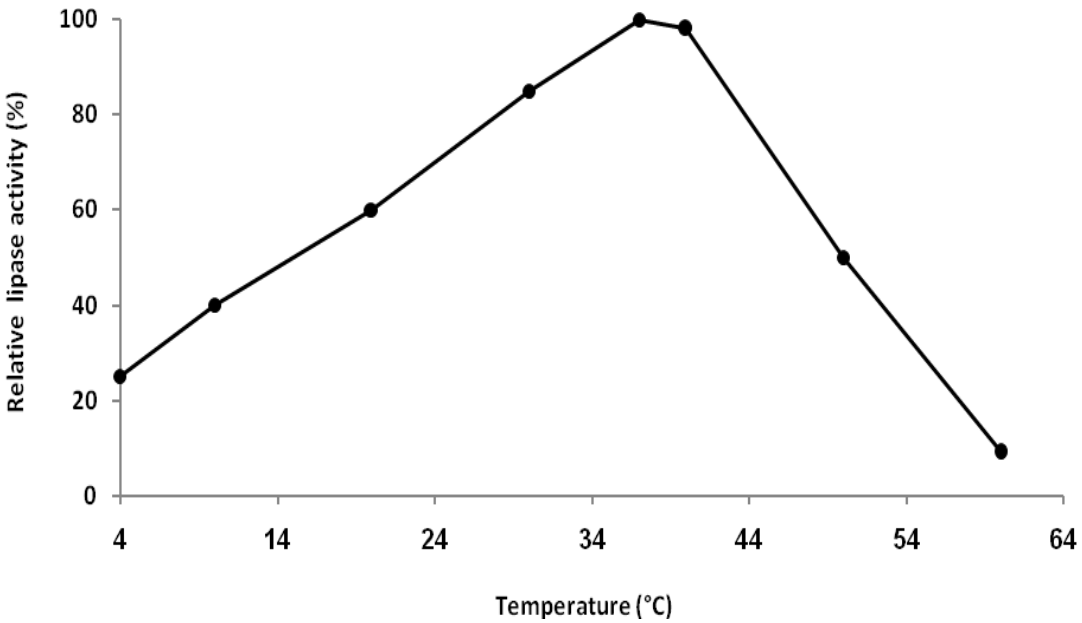
جدول ۲ تجزیه و تحلیل نتایج اثر منابع مختلف نیتروژن بر روی تولید لیپاز به وسیله‌ی *Yarrowia lipolytica* DSM3286

منبع نیتروژن (N)	$Y_{X/S}$	$Y_{L/S}$	P_L	q_L	Q_L
عصاره مالت	۰/۵۰۸	۰/۵۷۳	۰/۱۱۹	۰/۰۲۳	۱۱۹/۳۷۵
عصاره گوشت	۰/۸۴۸	۱/۲۴۴	۰/۲۵۹	۰/۰۳۰	۲۵۹/۱۶۶
آرد سویا	۰/۹۵۴	۱/۷۶۳	۰/۳۶۷	۰/۰۳۸	۳۶۷/۲۹۱
پپتون	۰/۸۲۳	۱/۹۲۸	۰/۴۰۱	۰/۰۴۸	۴۰۱/۶۶۶
کازئین	۰/۹۷۳	۲/۴۰۴	۰/۵۰۰	۰/۰۵۱	۵۰۰/۸۳۳
عصاره مخمر	۰/۸۲۰	۳/۴۷۰	۰/۷۲۲	۰/۰۸۸	۷۲۲/۹۱۶
اوره	۰/۶۶۶	۱/۶۸۳	۰/۳۵۰	۰/۰۵۲	۳۵۰/۶۲۵
کلرید آمونیوم	۰/۶۸۸	۱/۰۱۲	۰/۲۱۰	۰/۰۳۰	۲۱۰/۸۳۳
سولفات آمونیوم	۰/۷۱۰	۰/۷۴۸	۰/۱۵۵	۰/۰۲۱	۱۵۵/۸۳۳
نیترات آمونیوم	۰/۶۹۹	۰/۶۸۲	۰/۱۴۲	۰/۰۲۰	۱۴۲/۰۸۳
فسفات هیدروژن آمونیوم	۰/۵۵۲	۰/۲۰۴	۰/۰۴۲	۰/۰۰۷	۴۲/۵۰۰

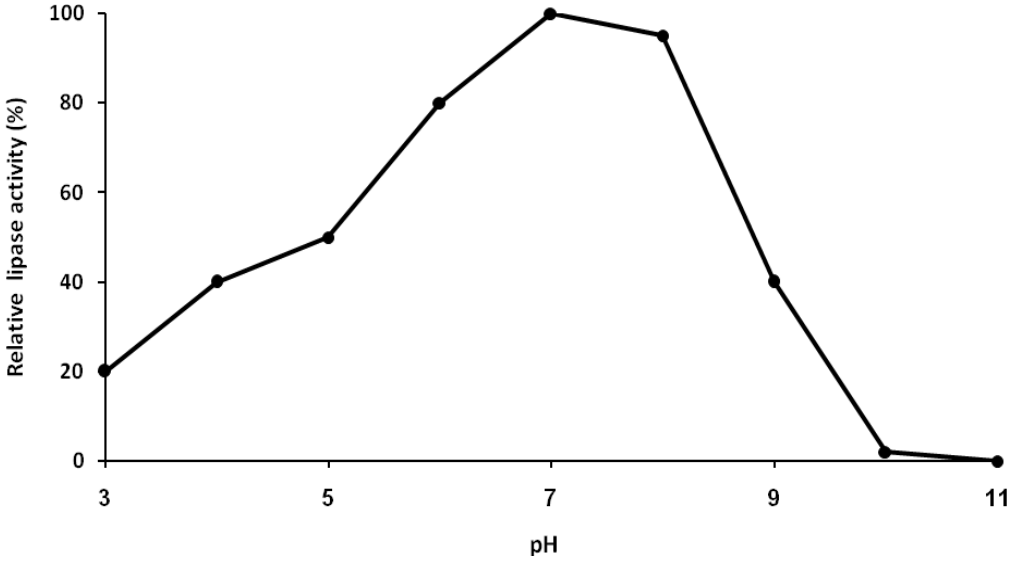
$Y_{X/S}$: بازده وزن خشک بر روی سوبسترا برحسب گرم در گرم (g/g)، $Y_{L/S}$: بازده تولید لیپاز بر روی سوبسترا برحسب واحد آنزیمی در گرم (U/g)، P_L: محصول دهی یا میزان تولید لیپاز برحسب واحد آنزیمی در زمان تخمیر (U/h)، q_L: سرعت ویژه تولید لیپاز برحسب واحد آنزیمی بر وزن خشک در زمان تخمیر(U/g×h)، Q_L: محصول دهی یا میزان تولید حجمی لیپاز برحسب واحد آنزیمی بر حجم اولیه محیط کشت مایع در زمان تخمیر(U/l×h).



شکل ۱ وزن خشک و بیشترین میزان تولید آنزیم لیپاز به وسیله‌ی *Y. lipolytica* DSM3286 با منابع مختلف نیتروژن



شکل ۲ اثر دما بر فعالیت آنزیم لیپاز مخمر *Y. lipolytica* DSM3286



شکل ۳ اثر pH بر فعالیت آنزیم لیپاز مخمر *Y. lipolytica* DSM3286

٤- بحث و نتیجه‌گیری

تحقیقات زیادی در صنایع به‌ویژه صنایع دارویی، تولید داروهای تک‌انانتیومری و آنتی‌بیوتیک‌ها برای استفاده از آنزیم لیپاز *Y. lipolytica* انجام شده و یا در حال انجام است که نتیجه این تحقیقات اهمیت و کاربرد لیپاز را در این صنایع اثبات می‌کند. پس از این تولید آنزیم لیپاز در مقیاس صنعتی و تجاری از منابع ارزان قیمت مورد توجه است. تولید آنزیم لیپاز به‌وسیله‌ی محققین و با استفاده از سویه‌های مختلف *Y. lipolytica* روی منابع مختلف بررسی شده است و هم اکنون نیز در حال بررسی است [٥، ١٤، ١٥].

در تحقیقات قبلی معمولاً یک و یا تعداد محدودی منبع نیتروژن با تنوع کم و بیشتر برای تولید اسیدسیتریک در این مخمر بررسی شده است و اثر آن کمتر برای تولید لیپاز مطالعه شده است [١٦] و [١٧] ولی در این پژوهش از منابع نیتروژن متنوعی [آلی و معدنی] بررسی شده است.

از کازئین، پپتون، عصاره مخمر، عصاره گوشت، عصاره مالت، آرد سویا و اوره به‌عنوان منبع نیتروژن آلی و سولفات آمونیوم، فسفات هیدروژن آمونیوم، کلرید آمونیوم و نیترات آمونیوم به‌عنوان منبع نیتروژن معدنی در این پژوهش استفاده شد . پس از ٤٨ ساعت بیشترین میزان تولید لیپاز با استفاده از منابع نیتروژن آلی و معدنی به‌دست آمد که میزان تولید با منابع آلی بیش از معدنی بود. بازده تولید لیپاز بر سوبسترا ($Y_{L/S}$)، محصول‌دهی یا میزان تولید لیپاز (P_L)، سرعت ویژه تولید لیپاز (q_L) و محصول‌دهی یا میزان تولید حجمی لیپاز (Q_L) برای عصاره مخمر به‌ترتیب ٣/٤٧، ٠/٧٢، ٠/٠٨٨ و ٧٢٢/٩١ است که بیشترین مقادیر به کار رفته بین سایر منابع نیتروژن آلی و معدنی را دارا است. در نتیجه با توجه به

نتایج (جدول ۱)، عصاره مخمر با بیشینه‌ی تولید U/ml ۳٤/۷ پس از ٤۸ ساعت مناسب ترین منبع نیتروژن برای تولید آنزیم لیپاز به‌وسیله‌ی مخمر *Y. lipolytica* است. دما و pH مناسب برای فعالیت آنزیم لیپاز *Y. lipolytica* DSM3286به ترتیب ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۷ است.

نتایج حاصل مشخص کرد که منابع نیتروژن آلی و به‌ویژه عصاره مخمر بهترین منبع نیتروژن برای افزایش تولید لیپاز است. پس از عصاره مخمر، کازئین و پپتون به‌ترتیب می‌توانند برای افزایش تولید به‌کار روند. نتایج این پژوهش در راستای افزایش و بهینه‌سازی تولید لیپاز مخمر *Y. lipolytica* است.

۵- مراجع

[1] Kim J.T., Kang S.G., Woo J.H., Lee J.H., Jeong B.C., Kim S.J. Screening and its potential application of lipolytic activity from a marine environment: characterization of a novel esterase from *Yarrowia lipolytica* CL180. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 74 (4):820-8.

[2] Cancino M., Bauchart P., Sandoval G., Nicaud J.M., André I., Dossat V., *et al*. A variant of *Yarrowia lipolytica* lipase with improved activity and enantioselectivity for resolution of 2-bromo-arylacetic acid esters. Tetrahedron: Asymmetry, 2008, 19 (13):1608-12.

[3] Guieysse D., Sandoval G., Faure L., Nicaud J-M., Monsan P., Marty A. New efficient lipase from *Yarrowia lipolytica* for the resolution of 2-bromo-arylacetic acid esters. Tetrahedron: Asymmetry, 2004, 15 (22): 3539-43.

[4] Yu M.R., Lange S., Richter S., Tan T.W., Schmid R.D. High-level expression of extracellular lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica* in *Pichia pastoris* and its purification and characterization. Protein Expression and Purification, 2007, 53 (2): 255-63.

[5] Barth G., Gaillardin C. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica.* FEMS Microbiology Reviews, 1997, 19 (4): 219-37.

[6] Yu M., Qin S., Tan T. Purification and characterization of the extracellular lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica*. Process Biochemistry, 2007, 42 (3): 384-91.

[7] Pereira-Meirelles F.V., Rocha-Leao M.H.M., Sant' Anna G.L. Lipase location in *Yarrowia lipolytica* cells.

Biotechnology Letters, 2000, 22 (1): 71-5.

[8] Amaral P.F.F., Rocha-Leao M.H.M., Marrucho I.M., Coutinho J.A.P., Coelho M.A.Z. Improving lipase production using a perfluorocarbon as oxygen carrier. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2006, 81 (8): 1368-74.

[9] Fickers P., Nicaud J.M., Gaillardin C., Destain J., Thonart P. Carbon and nitrogen sources modulate lipase production in the yeast *Yarrowia lipolytica*. Journal of Applied Microbiology, 2004, 96 (4):742-9.

[10] Guerzoni M.E., Lanciotti R., Vannini L., Galgano F., Favati F., Gardini F., *et al*. Variability of the lipolytic activity in *Yarrowia lipolytica* and its dependence on environmental conditions. International Journal of Food Microbiology, 2001, 69 (1-2):79-89.

[11] Amaral P.F.F., Almeida A.P.R., Peixoto T., Rocha-Leao M.H.M., Coutinho J.A.P., Coelho M.A.Z. Beneficial effects of enhanced aeration using perfluorodecalin in *Yarrowia lipolytica* cultures for lipase production. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2007, 23 (3):339-44.

[12] Corzo G., Revah S. Production and characteristics of the lipase from *Yarrowia lipolytica* 681. Bioresource Technology, 1999, 70 (2):173-80.

[13] Papanikolaou S., Galiotou-Panayotou M., Chevalot I., Komaitis M., Marc I., Aggelis G. Influence of glucose and saturated free-fatty acid mixtures on citric acid and lipid production by *Yarrowia lipolytica*. Current Microbiology, 2006, 52 (2):134-42.

[14] Song H.T., Jiang Z.B., Ma L.X. Expression and purification of two lipases from *Yarrowia lipolytica* AS 2.1216. Protein Expression and Purification, 2006, 47 (2):393-7.

[15] Yu M.R., Qin S.W., Tan T.W. Purification and characterization of the extracellular lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica*. Process Biochemistry, 2007, 42 (3):384-91.

[16] Rane K.D., Sims K.A. Citric acid production by *Yarrowia lipolytica*: Effect of nitrogen and biomass

concentration on yield and productivity. Biotechnology Letters, 1996, 18 (10):1139-44.

[17] Il'chenko A.P., Chernyavskaya O.G., Shishkanova N.V., Finogenova T.V. Biochemical characterization of the yeast *Yarrowia lipolytica* overproducing carboxylic acids from ethanol: Nitrogen metabolism enzymes. Microbiology, 2003, 72 (4):418-22.