

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования

«КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

(ФГБОУ ВО «КубГУ»)

Кафедра генетики, микробиологии и биотехнологии

КУРСОВАЯ РАБОТА № 1

ЛИПОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ

Работу выполнила Моисеева 16.05.18 Е. В. Моисеева  
(подпись, дата)

Факультет биологический, курс 3

Направление 06.03.01 Биология

Научный руководитель  
профессор, канд. биол. наук, Карасёва 16.05.18 Э. В. Карасёва  
доцент (подпись, дата)

Нормоконтролёр, доцент,  
канд. биол. наук Самков 29.04.18 А. А. Самков  
(подпись, дата)

Краснодар 2018

## СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	3
1 Механизм липолиза и его кинетическая модель.....	4
2 Микробные липиды и жирные кислоты.....	15
3 Липолитические ферменты микроорганизмов.....	18
3.1 Липазы бактерий.....	20
3.2 Липазы микроскопических грибов.....	22
4 Методы определения липолитической активности.....	24
5 Применение и перспективы использования микробных липаз.....	27
Заключение.....	31
Список использованных источников.....	32

---

## ВВЕДЕНИЕ

Липолитическая активность у микроорганизмов — это широкая область для исследования. Проведение исследования липолитической активности имеет не только теоретическое значение - знание физиологии и биохимии процесса липолиза, а также участвующих в нем липаз, но и огромное практическое - в производстве липидов, которые являются побочными продуктами липолиза и накапливаются в клетках микроорганизмов [Использование бактерий рода *Serratia*, 2008], триацилглицеринов [Xu, 2000], сложных эфиров [Anbu., Ki Nur, 2014], очистке сточных вод, биodeградации жиродержащих отходов и увеличением использования липаз в самых разнообразных отраслях медицины и промышленности.

Так как липидный обмен у микроорганизмов специфичен, так же как и принимающие в нем участие многообразные ферменты, то это во многом усложняет изучение процесса липолиза. В ходе этого процесса жиры под действием липаз разлагаются на составляющие их жирные кислоты.

Значимость бактериальной липазы обусловлена её физиологическими и физическими свойствами. Липазы микроорганизмов обычно более стабильны, чем животные или растительные. Липазы активны в условиях окружающей среды, а производящие их микроорганизмы получают энергию для жизнедеятельности за счет окисления внесенного субстрата.

Липазы представляют собой ценные биокатализаторы, потому что они действуют в мягких условиях, очень стабильны в органических растворителях, специфичны к субстрату, имеют регио- и / или стереоспецифичность при катализе [Snellman, Sullivan, Colwell, 2002]. Поэтому за последние двадцать лет накопилась огромная теоретическая база, требующая обзора и обобщения.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Биотехнологический способ очистки сточных вод от пищевых масел и жиров: пат. 2161595 Рос. Федерация: МПК 7 C02F3 / 34, C12N1 / 20, C12N1 / 20, C12R1:01 / Б.Г Мурзаков., А. И. Занкина, В. П. Зобнина, Е. Л. Листов, Р. А. Рогачева, Л. В. Зорина. Заявитель и патентообладатель: Российско-японская компания ЗАО "Биотэк-Япония". Заявл.03.03.1998. опубл. 10.01.2001; бюл. № 11. С.[1-10].
- 2 Внеклеточная липолитическая активность бактерий рода *Arthrobacter* / Л. В. Ерхова [и др.] // Доклады Национальной академии наук Беларуси. 2013. Т. 57. № 5. С. 78-79.
- 3 Выделение и изучение основных свойств липидоокисляющих микроорганизмов / С. Н. Орлова [и др.] // Современные проблемы науки и образования. 2014. № 3. С. 1-7.
- 4 Герхардт Ф. Методы общей бактериологии: в 3 т. // М. 1984. Т.3 261 с.
- 5 Дебабов В. Г. Биотопливо // Биотехнология. 2008. № 1. С. 3-14
- 6 Использование бактерий рода *Serratia* для утилизации жиров. / Н. В. Поскрывова [и др.] // Экология и промышленность России. 2008. С. 34-35.
- 7 Лагутин, К. А. Липиды термофильных бактерий Новой Зеландии // Автореф. дис.... канд. хим. наук. Владивосток. 2013. С. 23.
- 8 Микроорганизмы вечной мерзлоты и их биотехнологический потенциал / А. О. Комолова [и др.] //I Российский Микробиологический конгресс. 17-18 октября 2017. Материалы конгресса. Пушино. С.53-54.
- 9 Мишустин Е. Н, Емцев В. Т. Микробиология. М. 2005. 445 с.
- 10 Моргунов И. Г. Метаболическая организация окислительных путей у дрожжей *Yarrowia Lipolytica* - продуцентов органических кислот. Автореф. дис.... доктор. биол. наук. Пушино. 2009. 44 с.

- 11 Мубараков А. И. Разработка энантиоселективных биокатализаторов парциального ацилирования спиртов. Автореф. дис.... канд. техн. наук. Уфа. 2002. 25 с.
- 12 Пескова Л. О., Дехтяренко Н. В.. Фермент липаза: анализ галузей використання, продуцентів, способів одержання // Проблеми біології та біотехнології. 2014. № 3. С. 63-71.
- 13 Потехина Н. В. Тейхоевые кислоты актиномицетов и других грамположительных бактерий // Успехи биологической химии. 2006. Т. 46. С. 225-278.
- 14 Промышленная микробиология: Учеб. пособие для вузов по спец. "Микробиология" и "Биология" / Под общ. ред. Н. С. Егорова. М. 1989. 688 с.
- 15 Рекомбинантный штамм дрожжей *Yarrowia lipolytica* - продуцент липазы / Соболевская Т. И [и др.]. Патент № 2451075: Патентообладатель Федеральное государственное унитарное предприятие "Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов" (ФГУП "ГосНИИгенетика"). 2009. С. 2-16.
- 16 Рубан Е. Л. Микробные липиды и липазы. М.: Наука, 1977. 216 с.
- 17 Рубан Е. Л. Синтез и гидролиз липидов у микроорганизмов // Прикл. биохимия и микробиология. 1980. Т. 16. Вып. 4. С. 490-502.
- 18 Сармурзина З. С., Ануарбекова С. С., Алмагамбетов К. Х. Характеристика изолятов и коллекционных штаммов бацилл, обладающих липолитической, протеолитической и липазной активностью // Биотехнология. Теория и практика. 2010. № 1. С. 84-85.
- 19 Скрининг продуцентов липаз / М. А. Пушкарев [и др.] // Известия СПбГТИ(ТУ). 2014. № 27. С. 44-48.
- 20 A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase / L. Brady [et al.] // Nature. 1990. Vol. 343. P. 767-770.

- 21 Aguiéiras E. C. G., Cavalcanti-Oliveira E. D., Freire D. M. G. Current status and new developments of biodiesel production using fungal lipases // *Fuel*. 2015. Vol. 159. P. 52-67.
- 22 Alvarez H. M., Steinbuchel A. Triacylglycerols in prokaryotic microorganisms // *Appl Microbiol Biotechnol*. 2002. Vol. 60. P. 367–376.
- 23 Analytical methods for lipases activity determination: a review / M. Stoytcheva [et al.] // *Current Analytical Chemistry*. 2012. Vol. 8. P. 400-407.
- 24 Anbu P., Ki Hur B. Isolation of an organic solvent-tolerant bacterium *Bacillus licheniformis* PAL05 that is able to secrete solvent-stable lipase // *Union of Biochemistry and Molecular Biology*. 2014. Vol. 61. № 5. P. 528–534.
- 25 Bacterial lipases / K-E. Jaeger [et al.] // *FEMS Microbiology Reviews*. 1994. Vol. 15. P. 29-63.
- 26 Bacterial metabolism of long-chain n-alkanes / W. Alexander [et al.] // *Appl Microbiol Biotechnol*. 2007. Vol. 76. P. 1209–1221.
- 27 Barros M., Fleuri L., Macedo G. Seed lipases: sources, applications and properties-a review // *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 2010. Vol. 27. № 1. P. 15-29.
- 28 Biochemical and molecular biological characterization of a lipase produced by the fungus *Rhizopus delemar* / M. J Haas. [et. al.] // *Fett .Lipid*. 1999. Vol. 10.№ 10. P. 364–370.
- 29 Biodiesel production from oleaginous microorganisms / X. Meng, [et. al.] // *Renew Energy*. 2009. Vol. 34. P. 1–5.
- 30 Brenner S. The molecular evolution of genes and proteins: a tale of two serines // *Nature*. 1988. Vol. 334. P. 528–530.
- 31 Cloning and expression of lipP a gene encoding a cold-adapted lipase from *Moritella* sp. 2-5-10-1 / X Yang [et. al] // *Curr Microbiol* 2008. Vol. 56. P. 194–198.
- 32 Conversion of raw glycerol to microbial lipids by new *Metschnikowia* and *Yarrowia lipolytica* strains / Canonico L. [et. al.] // *Ann Microbiol*. 2016. Vol. 66, № 4. P. 1409-1418.

- 33 Desnuelle P. Pancreatic lipase // *Adv. Enzymol.* 1961. № 23. P 129-161.
- 34 Duncombe W.G. The colorimetric micro-determination of nonesterified fatty acids in plasma // *Clin. Chim. Acta.* 1964. Vol. 9. № 2. P 122-125.
- 35 Gupta R., Gupta N., Rathi P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2004. Vol. № 64. P.763–781.
- 36 Gupta, R.; Kumari, A.; Syal, P.; Singh, Y. Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: Their role in biotechnology and cellular physiology // *Progress in Lipid Research.* 2015. Vol. 57. P. 40-54.
- 37 Handbook of food analytical chemistry, water, proteins, enzymes, lipids, and carbohydrates / R. Wrolstad. [et. al.] // Wiley. New Jersey. Vol. 1. Part D. 2005.
- 38 Hasan F., Shah A. A., Hameed A. Industrial applications of microbial lipases // *Enzyme and Microbial Technology.* 2006. Vol. 39. P. 235–251.
- 39 Houde A, Kademi A, Leblanc D. Lipases and Their Industrial Applications // *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 2004. Vol. 118. P. 155-170.
- 40 Inactivation of pancreatic and gastric lipases by tetrahydrolipstatin and alkyl-dithio-5-(2-nitrobenzoic acid). A kinetic study with 1, 2 -didecanoyl-sn-glycerol monolayers / S. Ransac [et al.] // *Eur. J. Biochem.* 1991. Vol. 202. P. 395-400.
- 41 Interfacial activation of the lipase-procolipase complex by mixed micelles revealed by X-ray crystallography/ Van Tilbeurgh. [et. al.] // *Nature.* 1993. Vol. 362. P. 814-820.
- 42 Jaeger K. E., Dijkstra B. W., Reetz M. T. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases // *Annu Rev Microbiol.* 1999. Vol. 53. P. 315–351.
- 43 Kapoor M., Gupta M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications // *Process Biochemistry.* 2012. Vol. 47. № 4. P. 555-569.

44 Kwon D., Rhee J.S. A simple and rapid colorimetric method for determination of free fatty acids for lipase assay // J. Amer. Oil Chemists' Society. 1986. Vol. 63. № 1. P. 89-92.

45 Li Q., Du W., Liu D. Perspectives of microbial oils for biodiesel production // Appl Microbiol Biotechnol. 2008. Vol. 80. P. 749–756.

46 Lipids of *Cunninghamella echinulata* with emphasis to  $\gamma$ -linolenic acid distribution among lipid classes / S. Fakas [et al.] // Applied microbial and cell physiology. 2006. Vol.73. P. 676–688.

47 Lopez-Lopez O, Cerdan M-E., Gonzalez-Siso M-I. *Thermus thermophilus* as a source of thermostable lipolytic enzymes // Microorganisms. 2015. Vol. 3.P. 792-808.

48 Lowe M. Assays for pancreatic trygliceride lipase and colipase // Lipase and Phospholipase Protocols. Humana Press, Totowa. New Jersey. 1999. P. 59-70.

49 Oxidative stability of DHA phenolic ester / M H.H. Roby [et al.] // Food Chem. 2015. Vol. 169. P. 41–48.

50 Papanikolaou S., Aggelis G. *Yarrowia lipolytica* a model microorganism used for the production of tailor-made lipids // Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2010. Vol. 112. P. 639–654.

51 Patil K. J., Chopda M. Z., Mahajan R. T. Lipase biodiversity // Indian Journal of Science and Technology. 2011. Vol. 4. № 8. P. 971-982.

52 Popoola B. M., Onilude A. A. Microorganisms associated with vegetable oil polluted soil // Advances in Microbiology. 2017. Vol. 7. P. 377-386.

53 Production and use of lipases in bioenergy: a review from the feed stocks to biodiesel production / B. D Ribeiro [et. al.] // Enzyme research. 2011. Vol. 2011. P. 1-16.

54 Properties, structure, and applications of microbial sterol esterases. M. E Vaquero [et. al.] // Applied microbiology and biotechnology. 2016. Vol. 100. № 5. P. 2047-2061.



55 Purification and properties of thermostable lipase from a thermophilic bacterium *Bacillus licheniformis* IBRL-CHS2. A. Azzahra [et. al.] // Journal of pure and applied microbiology. 2013. Vol. 7, № 3. P. 1635-1645.

56 Purification and substrate specificities of lipases from *Geotrichum candidum*. In: Lipases: Structure, Mechanism, and Genetic Engineering / E. Char-ton [et. al.] // GBF-Monographs. Verlag Chemie, Weinheim. 1991. Vol. 16. P. 335-338.

57 Recent Advances on Sources and Industrial Applications of Lipases / N. Sarmah [et al.] // Biotechnology Progress. 2017. Vol. 34. P. 26-30.

58 Redding W., Mayer G. G., Lornell J. W. A semiautomated assay for nonesterified fatty acids in the 0.02 to 0.4 mueq / ml range // J. Lipid Res. 1983. Vol. 24. № 1. P.100-139.

59 Sarda L., Desnuelle P. Action de la lipase pancratique sur les esters eulsion // Biochim. Biophys. 1958. Vol. 30. P. 513-521.

60 Shukla P., Gupta K. Ecological screening for lipolytic molds and process optimization for lipase production *Rhizopus oryzae* KG-5. Journal of Applied Sciences in Environmental Sanitation. 2007. Vol. 2. № 2. P. 35-42.

61 Snellman E. A., Sullivan E. R., Colwell R. R. Purification and properties of the extracellular lipase, LipA, of *Acinetobacter* sp. RAG-1 // FEBS JOURNAL. 2002. Vol. 269. № 23. P. 5771-5779.

62 Stimulation of novel thermostable extracellular lipolytic enzyme in cultures of *Thermus* sp / A Domínguez [et. al.] // Enzyme Microb. Technol. 2007. Vol. 40. P. 187-194.

63 Su E., Xu J., You P. Functional expression of *Serratia marcescens* H30 lipase in *Escherichia coli* for efficient kinetic resolution of racemic alcohols in organic solvents // Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 2014. Vol. 106. P. 11-16.

64 Thermostable lipolytic enzymes production in batch and continuous cultures of *Thermus thermophilus* HB27 / A. Domínguez [et. al.] // Bioprocess Bi-osyst. Eng. 2010. Vol. 33. P. 347-354.

65 Verger R., de Haas G. H. Interfacial enzyme kinetics of lipolysis // Annu. Rev. Biophys. Bioeng. 1976. Vol. 5. P. 77-117.

66 Xu X. Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reactions: a review // Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2000. Vol. 102. P. 287-303.

67 Yi S. J., Zheng Y. P. Research and application of oleaginous microorganism // China Foreign Energy. 2006. Vol. 11. № 2. P. 90-94.

68 Zaki N. H., Saeed S. E. Production, purification and characterization of extra cellular lipase from *Serratia marcescens* and its potential activity for hydrolysis of edible oils // Journal of Al-Nahrain University. 2012. Vol. 15. № 1. P. 94-102.