

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
(ФГБОУ ВО «КубГУ»)
Кафедра генетики, микробиологии и биотехнологии

КУРСОВАЯ РАБОТА № 2
ОЦЕНКА ЛИПОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ
МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА
ПЛОТНЫХ И ЖИДКИХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ

Работу выполнила _____ *Моисеева* _____ *18.12.18* _____ Е. В. Моисеева
(подпись, дата)

Факультет биологический, курс 4

Направление 06.03.01 Биология

Научный руководитель
профессор, канд. биол. наук, _____ *Карасёва* _____ *18.12.18* _____ Э. В. Карасёва
доцент _____
(подпись, дата)

Нормоконтролёр, доцент,
канд. биол. наук _____ *Самков* _____ *18.12.18* _____ А. А. Самков
(подпись, дата)

Краснодар 2018

РЕФЕРАТ

Работа выполнена на 36 с., 3 гл., 4 рис., 4 табл., 33 источника., 2 прил.

ЛИПОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ, ЛИПАЗЫ, БАКТЕРИИ, КУЛЬТИВИРОВАНИЕ, ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ.

Целью настоящей работы является изучение липолитической активности коллекционных культур при культивировании на плотных и жидких питательных средах.

Для проведения исследования были выбраны 125 штаммов бактерий, относящихся к различным систематическим группам, из коллекции кафедры генетики, микробиологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «КубГУ».

В процессе работы для определения липолитической активности бактерий применялись качественные и полуколичественные микробиологические методы. Способность к разложению липидов, проявили штаммы, относящиеся к разным систематическим группам, а также отмечено, что даже в пределах одного рода липолитическая активность неодинакова, что говорит о штаммоспецифичности этого процесса.

На плотной среде со стопроцентной эффективностью говяжий жир окисляли четыре штамма (3,2 %) - *Pseudomonas cholororaphis* J6, *Bacillus sp.* 1.22(1), *Rhodococcus sp.* F2 и штамм J14, а на плотной среде с подсолнечным маслом - четырнадцать штаммов (11,2 %), включающих роды *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus*. На жидкой среде с подсолнечным маслом 64 (51,2 %) штамма проявили липазную активность. На всех средах с разными липидами наибольшую активность проявили штаммы *Pseudomonas cholororaphis* J6 и *Rhodococcus sp.* F2. Опытным путем было показано, что на жидкой среде с подсолнечным маслом процесс липолиза идет интенсивнее в 2-3 раза, чем на плотных средах.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	4
1 Аналитический обзор	6
1.1 Липолитические ферменты микроорганизмов	6
1.1.1 Липазы бактерий.....	7
1.2 Методы определения липолитической активности.....	9
2 Материал и методы исследования	12
2.1 Объект исследования	12
2.3 Культивирование бактерий на жидкой среде	14
2.4 Культивирование бактерий на плотной среде	14
2.5 Учет липолитической активности.....	15
3 Оценка липолитической активности микроорганизмов при культивировании на плотных и жидких питательных средах	17
3.1 Липазная активность культур бактерий на плотной питательной среде.....	17
3.1.1 Липазная активность культур бактерий на плотной среде с говяжьим жиром	17
3.1.2 Липолитическая активность на плотной среде с подсолнечным маслом.....	18
3.1.3 Сравнение липолитической активности на плотной среде с разными источниками углерода.....	20
3.2 Липолитическая активность штаммов на жидкой питательной среде	22
3.2.1 Липазная активность на жидкой питательной среде с подсолнечным маслом	23
3.2.2 Липазная активность на жидкой питательной среде с говяжьим жиром.....	24
3.3 Сравнение активности липолиза на плотных и жидких средах и с.....	26
разными источниками углерода.....	26
Заключение.....	28
Список использованных источников.....	29
Приложение А Липолитическая активность штаммов на жидких и плотных средах.....	33
Приложение Б Липазная активность штаммов на жидкой среде с говяжьим жиром.....	37

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. Заикина, 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 Лагутин. К. А. Липиды термофильных бактерий Новой Зеландии // Автореф. дис....канд. хим. наук. Владивосток. 2013. С. 23.
- 6 Микроорганизмы вечной мерзлоты и их биотехнологический потенциал / А. О. Комолова [и др.] // I Российский Микробиологический конгресс. 17-18 октября 2017. Материалы конгресса. Пущино. С. 53-54.
- 7 Мубаракوف А. И. Разработка энантиоселективных биокатализаторов парциального ацилирования спиртов. Автореф. дис.... канд. техн. наук. Уфа. 2002. 25 с.
- 8 Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. Практикум по микробиологии //М. 2005. 608 с
- 9 Пескова Л. О., Дехтяренко Н. В. Фермент ліпаза: аналіз галузей-використання, продуцентів, способів одержання // Проблеми біології та біотехнології. 2014. № 3. С. 63-71.

- 10 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.
- 11 Скрининг продуцентов липаз / М. А. Пушкарев [и др.] // Известия СПбГТИ(ТУ). 2014. № 27. С. 44-48.
- 12 Analytical methods for lipases activity determination: a review / M. Stoytcheva [et al.] // Current Analytical Chemistry. 2012. Vol. 8. P. 400-407.
- 13 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.
- 14 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.
- 15 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.
- 16 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.
- 17 Handbook of food analytical chemistry, water, proteins, enzymes, lipids, and carbohydrates / R Wrolstad. [et. al.] // Wiley. New Jersey. Vol. 1. Part D. 2005.
- 18 Hasan F., Shah A. A., Hameed A. Industrial applications of microbial lipases //Enzyme and Microbial Technology. 2006. Vol. 39. P. 235–251.
- 19 Kapoor M., Gupta M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications // Process Biochemistry. 2012. Vol. 47. № 4. P. 555-569.
- 20 Lopez-Lopez O, Cerdan M-E., Gonzalez-Siso. *Thermus thermophilus M-I* as a source of thermostable lipolytic enzymes // Microorganisms. 2015. Vol. 3. P. 792-808.

- 21 Lowe M. Assays for pancreatic trygliceride lipase and colipase // Lipase and Phospholipase Protocols. Humana Press, Totowa. New Jersey. 1999. P. 59-70.
- 22 Popoola B. M., Onilude A. A. Microorganisms associated with vegetable oil polluted soil // Advances in Microbiology. 2017. Vol. 7. P. 377-386.
- 23 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.
- 24 Properties, structure, and applications of microbial sterol esterases. M. E. Vaquero [et. al.] // Applied microbiology and biotechnology. 2016. Vol. 100. № 5. P. 2047-2061.
- 25 Purification and substrate specificities of lipases from *Geotrichum andidum*. In: Lipases: Structure, Mechanism, and Genetic Engineering / E. Charton [et. al.] // GBF-Monographs. Verlag Chemie, Weinheim. 1991. Vol. 16. P. 335 - 338.
- 26 Recent Advances on Sources and Industrial Applications of Lipases / N. Sarmah [et al.] // Biotechnology Progress. 2017. Vol. 34. P. 26-30.
- 27 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.
- 28 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.
- 29 Thermostable lipolytic enzymes production in batch and continuous cultures of *Thermus thermophilus* HB27 / A. Domínguez [et. al.] // Bioprocess Biosyst. Eng. 2010. Vol. 33. P. 347–354.
- 30 Agueiras 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.

- 31 Alvarez H. M, Steinbuchel A. Triacylglycerols in prokaryotic microorganisms // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2002. Vol. 60. P. 367–376.
- 32 Bacterial metabolism of long-chain n-alkanes / W. Alexander [et al.] // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2007. Vol. 76. P. 1209–1221.
- 33 Zaki N. H., Saeed S. E. Production, purification and characterization of extracellular 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.