

*На правах рукописи*



ПОСКРЯКОВА НАТАЛЬЯ ВЛАДИМИРОВНА

**РАЗРАБОТКА ОСНОВЫ БИОПРЕПАРАТА  
ДЛЯ ДЕСТРУКЦИИ ЖИРОВ**

03.00.23 - биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Уфа – 2007

Работа выполнена в Институте биологии Уфимского научного центра РАН в рамках темы «Ферменты и метаболиты почвенных и ризосферных микроорганизмов» (номер государственной регистрации ГР № 01200210612)

**Научный руководитель:** доктор биологических наук, профессор  
**Логинов Олег Николаевич**

**Официальные оппоненты:** доктор биологических наук, профессор  
**Чемерис Алексей Викторович**

кандидат биологических наук, доцент  
**Петухова Надежда Ивановна**

**Ведущая организация:** **Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева**

Защита состоится «18» мая 2007 г. в 14.00 часов на заседании Регионального диссертационного совета КМ 002.136.01 при Институте биологии Уфимского научного центра РАН по адресу: 450054, г. Уфа, Проспект Октября, 69, тел/факс: 8 (347) 235-62-47, e-mail: [ib@anrb.ru](mailto:ib@anrb.ru)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Уфимского научного центра РАН и на официальном сайте АН РБ по адресу: [http:// www.anrb.ru/inbio/dissovet](http://www.anrb.ru/inbio/dissovet)

Автореферат разослан «\_\_» апреля 2007 г.

Ученый секретарь  
Регионального диссертационного совета,  
кандидат биологических наук, доцент



Р.В. Уразгильдин

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### **Актуальность проблемы.**

Развитие пищевых предприятий и расширение сети быстрого питания в России за последние годы, сделало особенно актуальным решение проблемы очистки сточных вод предприятий пищевой промышленности от жиров, масел, белков и других органических загрязнений. Другой серьезной проблемой является удаление отложения жиров в канализационных системах предприятий и утилизация жира в жиρούловителях.

Состояние водной среды, особенно в индустриально развитых регионах, заставляет разрабатывать и вводить в действие все более жесткие нормативы на сброс загрязнений в водоемы и городские коллекторы. Одним из перспективных способов решения этих проблем является биоферментная технология разложения органических веществ, в том числе жиров и растительных масел на локальных очистных сооружениях, находящихся непосредственно на предприятиях (Молоканов с соавт., 2005; Новохатко, Михельсон, 2006).

Биоферментные технологии по разложению и утилизации жиров в сточных водах основаны на использовании микробных липаз и микроорганизмов, способных к их продуцированию. Однако, на рынке Российской Федерации представлены лишь несколько препаратов зарубежного происхождения.

Таким образом, поиск активного продуцента липаз, который мог бы стать основой отечественного биопрепарата для локальной очистки жиросодержащих сточных вод, является весьма актуальным.

**Цель исследования.** Выделение новых штаммов микроорганизмов, обладающих высокой липолитической активностью, и их изучение в качестве основы биопрепарата для деструкции жиров.

**Задачи исследования.**

1. Выделить из природных и техногенных мест обитания новые штаммы липолитически активных микроорганизмов.
2. Подобрать оптимальные питательные среды для культивирования изучаемых штаммов с максимальным выходом липазы.
3. Определить спектр окислительной активности исследуемых микроорганизмов в отношении растительных и животных жиров, а также углеводов различных классов.
4. Определить эффективность использования липолитически активных микроорганизмов для биологической очистки жиросодержащих сточных вод.

**Научная новизна.** Выделена и идентифицирована группа новых штаммов бактерий рода *Serratia*, проявляющих высокую липолитическую активность: *Serratia marcescens* ИБ 2-1, *Serratia marcescens* ИБ 2-2, *Serratia species* ИБ 1, *Serratia species* ИБ 3-1, *Serratia species* ИБ 3-3.

Для каждого штамма подобрана оптимальная питательная среда, на которой биосинтез липазы максимален. Выявлено, что штаммы *S. marcescens* ИБ 2-2 и *Serratia sp.* ИБ 3-1 проявляют липазную активность намного превышающую показатели, известные для бактерий этого рода.

Определен спектр окислительной активности бактерий р. *Serratia* по отношению к жирам растительного и животного происхождения, индивидуальным углеводам, нефти и продуктам ее переработки.

**Практическая значимость.**

Предложены новые штаммы *Serratia sp.* ИБ 3-1 и *S. marcescens* ИБ 2-2, которые могут быть использованы в качестве продуцентов липолитических ферментов (Решения Роспатента о выдаче Патентов РФ от 1.03.2007 и от 11.04.2007, соответственно).

В модельных условиях выявлено, что исследуемые микроорганизмы способны осуществлять 100% биодеграцию жиров растительного и животного происхождения. Показана возможность использования штаммов

*S. marcescens* ИБ 2-2 и *Serratia* sp. ИБ 3-1 для разработки биопрепарата для очистки жиросодержащих сточных вод.

**Апробация работы.** Основные результаты исследований были представлены на III Всероссийской научной internet-конференции «Интеграция науки и высшего образования в области био- и органической химии и механики многофазных систем» (Уфа, 2004), Всероссийской молодежной школе-конференции «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, 2005), XIX Международной научно-технической конференции «Химические реактивы, реагенты и процессы малотоннажной химии» (Уфа, 2006).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 10 научных работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых научных журналах, входящих в Перечень ВАК, рекомендованных для соискателей ученой степени, и 2 патента Российской Федерации.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, экспериментальной части (5 глав), заключения, выводов, списка цитируемой литературы. Работа изложена на 115 страницах, содержит 17 таблиц и 17 рисунков. Список использованной литературы включает 144 наименования, из них 71 на русском языке.

**Благодарности.** Автор выражает огромную признательность за неоценимую помощь при обсуждении результатов работы с.н.с., к.т.н. Н.Н. Силищеву. Автор сердечно благодарит за помощь и консультации сотрудников лаборатории прикладной микробиологии Института биологии УНЦ РАН с.н.с., к.б.н. Н.Ф. Галимзянову и с.н.с., к.б.н. Т.Ф. Бойко. Автор выражает благодарность старшему научному сотруднику лаборатории молекулярной биологии и генетики Института биохимии и генетики УНЦ РАН, к.б.н. Баймиеву А.Х.

## ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектами исследований являлись штаммы липолитически активных микроорганизмов, выделенные из активного ила биологических очистных сооружений Пермского мясокомбината в лаборатории биологически активных веществ Института биологии Уфимского научного центра РАН. Качественное определение липолитической активности, позволяющее установить наличие липазы, проводили на твердых жирах (бараньем и свином), окрашенных нильским голубым серноокислым (Методы общей бактериологии, 1984).

Определение культуральных и физиолого-биохимических характеристик культур проводили по стандартным методикам (Практикум..., 1976; Методы общей бактериологии, 1984).

Идентификацию выделенных микроорганизмов проводили на основании Определителя бактерий Берджи (1997) и путем секвенирования фрагментов гена 16S рРНК.

Липолитическую активность микробной биомассы определяли по модифицированному методу Ota и Yamada (Ota et. al., 1966). Титр культуры определяли посевом на мясо-пептонный агар (МПА).

Синтез липаз изучали на средах с различными источниками углерода (соевая мука (ТУ - 9146-002-43327088-00), свиной и бараний жиры) и органического азота (пептон, дрожжевой экстракт, автолизат пивных дрожжей).

Окислительную активность исследуемых микроорганизмов определяли по выделению углекислого газа. Культивирование микроорганизмов проводили в колбах объемом 500 мл. В качестве питательной среды использовали 250 мл минеральной среды ( $K_2HPO_4$  – 1 г;  $(NH_4)_2SO_4$  – 5 г; вода дистиллированная - 1 л) с добавлением 1% источника углерода и 5 мл суточной культуры микроорганизмов с содержанием клеток  $1,0 \cdot 10^9$  КОЕ/мл. С помощью компрессора-дозатора со скоростью 520 мл/мин в герметично закрытые колбы подавали стерильный атмосферный воздух. Воздух, прошедший через колбу с микроорганизмами, окисляющими субстрат, улавливали поглотителем

углекислого газа, в качестве которого использовали 200 мл 0,1 н. NaOH. Из колб с поглотителем посуточно отбирали аликвоту 10 мл и оттитровывали 0,1 н. HCl. Окислительную активность определяли по количеству образовавшегося углекислого газа, оттитрованного кислотой. В качестве контроля использовали колбы, не засеянные микроорганизмами. Длительность эксперимента составляла 3 суток.

Процесс биодegradации растительных и животных жиров исследуемыми микроорганизмами осуществляли на минеральной среде Раймонда. В ряде экспериментов в качестве дополнительных компонентов питательной среды вносили соевую муку (в концентрациях 0-2,5 мас.%) и автолизат пивных дрожжей (в концентрациях 3-9 мас.%). Жиры и масла вносили в количестве 1 мас.%. Микроорганизмы культивировали в колбах Эрленмейера объемом 250 мл на качалке при температуре 35°C, со скоростью вращения 180 об/мин в течение 16-96 часов. Инокулят вносили в виде суточной культуры микроорганизмов с содержанием клеток  $3,0 \cdot 10^9$  КОЕ/мл. Остаточное содержание жиров определяли весовым методом после экстракции гексаном (Bridoux et al., 1994).

Статистическую обработку результатов проводили, используя t-критерий Стьюдента на 5% уровне значимости. Полученные данные статистически обрабатывались с помощью программы Microsoft Excel-2002.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

### **1. Скрининг и определение фенотипических характеристик новых штаммов продуцентов липазы**

Из образцов активного ила биологических очистных сооружений Пермского мясокомбината было выделено 18 штаммов бактерий, обладающих липолитической активностью. Наиболее активные из них были идентифицированы как *Serratia marcescens* (ИБ 2-1, ИБ 2-2) и *Serratia species* (ИБ 1, ИБ 3-1, ИБ 3-3). Все штаммы депонированы в коллекцию микроорганизмов Института биологии Уфимского научного центра РАН.

## 2. Исследование липолитической активности бактерий р. *Serratia*

Изучена динамика липолитической активности исследуемых штаммов бактерий р. *Serratia* на питательных средах различного состава. Для каждого штамма были проанализированы 14 питательных сред, среди которых мясо-пептонный бульон (МПБ), среда Раймонда с добавлением твердых жиров (свиного, бараньего), среды с различным содержанием соевой муки и дрожжевого экстракта (табл. 1).

Таблица 1.

Состав питательных сред, использованных для изучения биосинтеза липазы бактериями р. *Serratia* (мас.%)

Наименование компонента среды	Номер питательной среды										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
CaCO <sub>3</sub>	0,5	0,5	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2	0,2	0,2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,1	0,1	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-
NaCl	-	-	0,05	-	-	-	-	-	-	-	-
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	-	0,4	-	-	-	-	-	-	-	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	-	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Дрожжевой экстракт	-	-	2,0	-	2,0	4,0	-	2,0	4,0	6,0	2,0
Крахмал	-	-	2,0	-	-	-	-	-	-	-	-
Мочевина	0,1	0,1	5,0	-	-	-	-	-	-	-	-
Соевая мука	2,0	5,0	-	0,5	0,5	0,5	2,5	2,5	2,5	2,5	-

Продукция липаз изучаемыми штаммами зависела от источника углерода в составе питательной среды. На среде МПБ, содержащей мало липидов, но достаточное количество белков, пептидов, аминокислот, обеспечивающих рост, небольшое количество липазы продуцировали лишь штаммы *Serratia* sp. ИБ 1, ИБ 3-1 и ИБ 3-3. Среда 3, включающая такие доступные субстраты как крахмал, дрожжевой экстракт, также не индуцировала синтеза липолитических ферментов изучаемыми штаммами. На среде,

содержащей бараний жир, синтез липазы наблюдался лишь у вышеперечисленных штаммов, причем после 48 часов культивирования количество фермента для каждого из них не превысило  $7,5 \text{ мкМ олеиновой кислоты} \cdot \text{мл}^{-1} \cdot \text{час}^{-1}$  (рис. 1). В то же время на среде со свиным жиром липолитическую активность проявили все исследуемые бактерии, ее величина для разных штаммов варьировала от  $34,0$  до  $45,0 \text{ мкМ олеиновой кислоты} \cdot \text{мл}^{-1} \cdot \text{час}^{-1}$ .

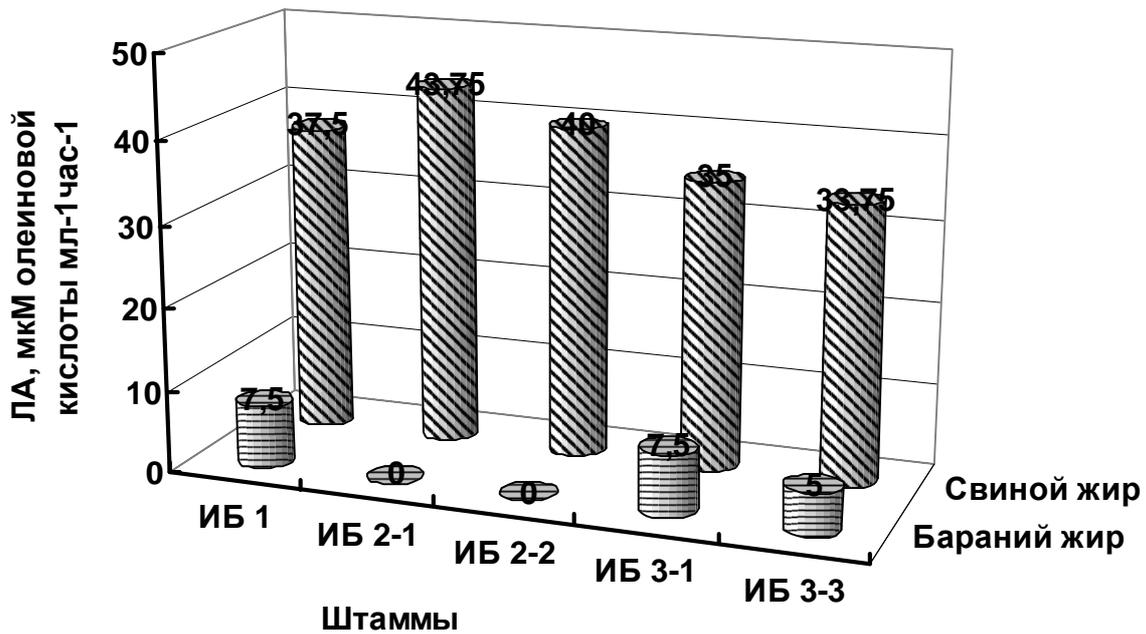


Рисунок 1. Липолитическая активность бактерий р. *Serratia* на минеральной среде Раймонда с добавлением бараньего и свиного жира

Использование для культивирования штаммов сред, содержащих соевую муку, показало, что этот субстрат стимулировал проявление липолитической активности у всех изучаемых культур. Аналогичные результаты были получены для представителей рода *Serratia* и другими авторами (Башкатова, Северина, 1979). Как видно из рисунка 2, величина продукции липаз изучаемыми штаммами зависела от концентрации соевой муки в среде. С увеличением содержания этого компонента липолитическая активность

исследуемых бактерий возрастала, изменялась и скорость синтеза фермента. Для штамма *Serratia* sp. ИБ 3-1 с повышением концентрации соевой муки с 2 мас.% до 5 мас.% липолитическая активность возрастала в 10 раз, ее максимум был отмечен через 24 часа культивирования, а штамм *Serratia* sp. ИБ 3-3 продуцировал на 25 % больше липазы за более длительный период культивирования (39 часов). Наибольшее значение липолитической активности ( $102,5 \text{ мкМ олеиновой кислоты} \cdot \text{мл}^{-1} \cdot \text{час}^{-1}$ ) наблюдалось на среде с 5 % соевой муки у штамма *S. marcescens* ИБ 2-2.

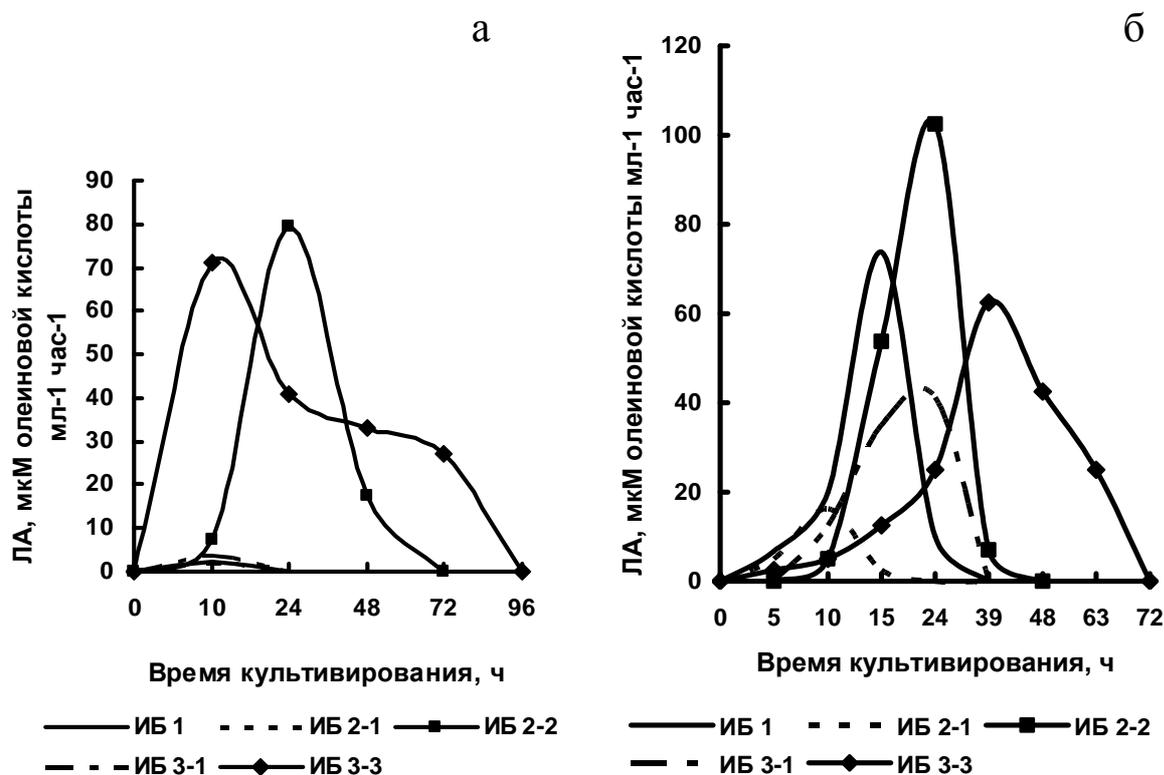


Рисунок 2. Липолитическая активность исследуемых штаммов бактерий р. *Serratia*: а – на среде № 1; б – на среде № 2.

В процессе оптимизации состава питательной среды для культивирования бактерий р. *Serratia* были протестированы питательные среды, содержащие 0,5 мас.% и 2,5 мас.% соевой муки. В качестве дополнительного источника питательных веществ в ряде сред использовали дрожжевой экстракт в концентрации 2 мас.% и 4 мас.%. Дрожжевой экстракт имеет высокую физиологическую ценность, содержит витамины группы В и часто применяется в качестве компонента

питательных сред, например, при культивировании бактерий р. *Pseudomonas* (Пат. РФ 2203945).

Наши исследования показали, что различные концентрации соевой муки и дрожжевого экстракта в питательной среде по-разному влияли на величину липолитической активности всех изучаемых бактерий. Так, штамм *S. marcescens* ИБ 2-1 на среде № 4, содержащей минеральные соли и 0,5 мас.% соевой муки, липазу не синтезировал. При увеличении концентрации соевой муки в составе питательной среды до 2,5 мас.% (среда № 7), липолитическая активность штамма *S. marcescens* ИБ 2-1 достигала 21 мкМ олеиновой кислоты·мл<sup>-1</sup>·час<sup>-1</sup>. Добавление 2 мас.% дрожжевого экстракта на фоне 0,5 мас.% соевой муки (среда № 5) также способствовало синтезу небольшого количества липазы у микроорганизмов этого вида, которое с увеличением концентрации дрожжевого экстракта до 4 мас.% (среда № 6) увеличилось в 16 раз и достигало максимального значения 162 мкМ олеиновой кислоты·мл<sup>-1</sup>·час<sup>-1</sup> (рис. 3 б, в).

Максимальная липолитическая активность штамма *S. marcescens* ИБ 2-2 (222,5 мкМ олеиновой кислоты·мл<sup>-1</sup>·час<sup>-1</sup>) наблюдалась на среде № 6, содержащей 0,5 мас.% соевой муки и 4 мас.% дрожжевого экстракта (рис. 3 в). При увеличении концентрации дрожжевого экстракта с 2 мас.% до 4 мас.% на фоне 0,5 мас.% соевой муки, скорость синтеза липазы штаммом *S. marcescens* ИБ 2-2 замедлялась и максимальная активность фермента выявилась через 48 часов.

Аналогично предыдущим культурам, штамм *Serratia* sp. ИБ 1 проявил максимальную липолитическую активность (220 мкМ олеиновой кислоты·мл<sup>-1</sup>·час<sup>-1</sup>) на среде с 0,5 мас.% соевой муки и 4 мас.% дрожжевого экстракта (рис. 3 в).

Липолитическая активность штамма *Serratia* sp. ИБ 3-1 на среде, содержащей 0,5 мас.% соевой муки (среда № 4), не превышала 10 мкМ олеиновой кислоты·мл<sup>-1</sup>·час<sup>-1</sup> (рис. 3 а). Повышение концентрации соевой муки до 2,5 мас.% (среда № 7), позволило увеличить синтез фермента в 5,6 раз. Введение в состав питательных сред дрожжевого экстракта, так же как и увеличение его концентрации, позволило достичь наивысших значений липолитической активности для этого штамма.

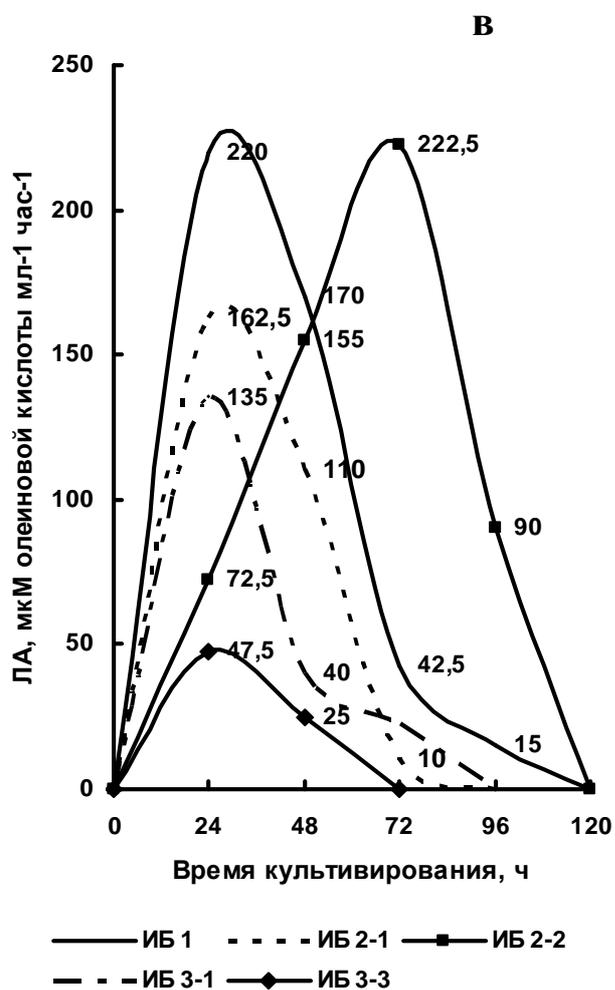
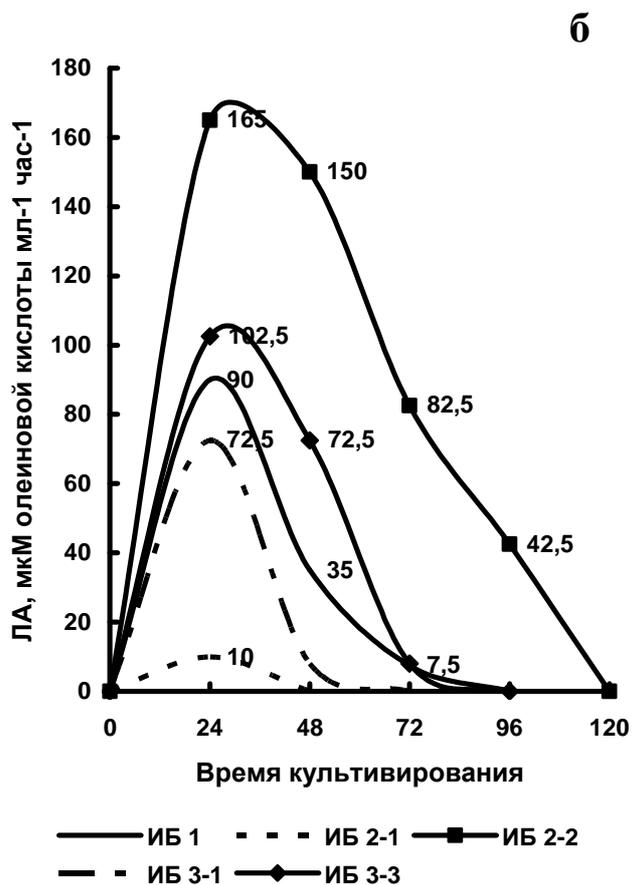
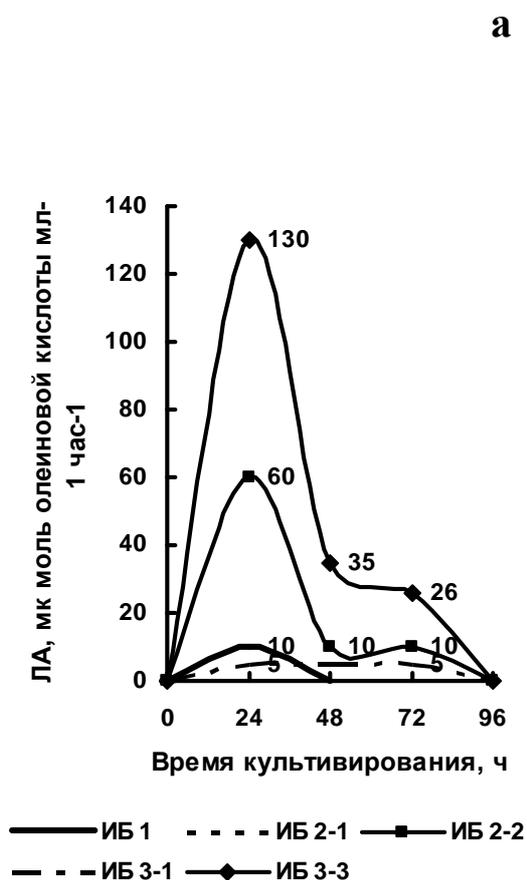


Рисунок 3. Липолитическая активность бактерий р. *Serratia*: а – на среде № 4; б – на среде № 5; в – на среде № 6.

Максимальное значение ферментативной активности этой культуры (350 мкМ олеиновой кислоты·мл<sup>-1</sup>·час<sup>-1</sup>) было достигнуто на среде с 2,5 мас.% соевой муки и 4 мас.% дрожжевого экстракта, при этом динамика синтеза фермента не изменялась.

Максимальный синтез липазы бактериями *Serratia* sp. ИБ 3-3 наблюдался на среде № 4, содержащей 0,5 мас.% соевой муки и минеральные соли, и составил 130 мкМ олеиновой кислоты·мл<sup>-1</sup>·час<sup>-1</sup> (рис. 3 а).

Наши исследования показали, что добавление дрожжевого экстракта в состав питательной среды и повышение его концентрации на порядок увеличивает липолитическую активность культур *S. marcescens* ИБ 2-1, *S. marcescens* ИБ 2-2, *Serratia* sp. ИБ 1 и *Serratia* sp. ИБ 3-1. Однако, при культивировании штаммов на среде № 11, содержащей дрожжевой экстракт без соевой муки, активность ферментов была незначительной, либо отсутствовала вообще. Это свидетельствует о том, что на синтез липазы исследуемыми штаммами большое влияние оказывают оба компонента питательной среды.

Для штаммов *S. marcescens* ИБ 2-2 и *Serratia* sp. ИБ 3-1, проявивших максимальную липолитическую активность по сравнению с другими штаммами, было проведено более детальное изучение динамики синтеза липаз. Для культивирования штамма ИБ 2-2 использовали среду № 10, содержащую более высокую концентрацию дрожжевого экстракта (6 мас.%), так как в предыдущем эксперименте было показано, что увеличение концентрации этого компонента значительно (на 36 %) повышает липолитическую активность штамма. Динамика липолитической активности штаммов *S. marcescens* ИБ 2-2 и *Serratia* sp. ИБ 3-1 представлена в таблице 2.

Анализ полученных данных показал, что повышение концентрации дрожжевого экстракта до 6 мас.% позволило увеличить липолитическую активность *S. marcescens* ИБ 2-2 еще на 26%. Максимум продукции фермента был отмечен уже через 30 часов культивирования.

Изучение синтеза липазы *Serratia* sp. ИБ 3-1 на среде, содержащей 2,5 мас.% соевой муки и 4 мас.% дрожжевого экстракта, показало, что данный

штамм проявил максимальную активность фермента по сравнению с другими культурами, которая выявилась также через 30 часов культивирования.

Таблица 2

Липолитическая активность штаммов *Serratia marcescens* ИБ 2-2 и *Serratia species* ИБ 3-1 на оптимальных питательных средах

Время культивирования, ч	Липолитическая активность, мкМ олеиновой кислоты/мл <sup>-1</sup> · час <sup>-1</sup>	
	Штамм <i>Serratia marcescens</i> ИБ 2-2	Штамм <i>Serratia species</i> ИБ 3-1
5	0	0
10	15	2
15	50	150
20	110	275
25	125	350
30	285	490
35	13	312
40	50	25
45	0	0

Таким образом, изучение влияния состава питательной среды на биосинтез липаз новыми штаммами бактерий рода *Serratia* показало, что значения липолитической активности сильно варьируют не только среди различных видов *Serratia*, но и в пределах одного вида, и зависят от содержания в питательной среде сложных органических компонентов (соевой муки, дрожжевого экстракта).

Для *Serratia sp.* ИБ 3-1 и *S. marcescens* ИБ 2-2 были подобраны питательные среды, на которых эти штаммы показали ферментативную активность, намного превышающую показатели, известные нам из патентных данных, для бактерий этого рода. Эти бактерии запатентованы в Российской Федерации как «Штамм бактерий *Serratia species* – продуцент липазы» и «Штамм бактерий *Serratia marcescens*, продуцирующий липолитические ферменты, для получения препарата для очистки сточных вод от жиров».

### 3. Исследование спектра окислительной активности новых штаммов бактерий р. *Serratia*

Определен спектр окислительной активности бактерий р. *Serratia* по отношению к жирам растительного и животного происхождения, индивидуальным углеводородам, нефти и продуктам ее переработки. Результаты определения окислительной активности бактерий р. *Serratia* приведены в таблице 3.

Показано, что все изученные штаммы обладали достаточно высокой окислительной активностью по отношению к растительным маслам. Подсолнечное масло лучше окисляли штаммы *Serratia* sp. ИБ 1 и ИБ 3-3, оливковое - штамм *S. marcescens* ИБ 2-2. Кукурузное масло успешно окисляли все исследуемые культуры.

Жиры животного происхождения окислялись изученными штаммами сложнее. Твердые животные жиры с высокой эффективностью окисляли штаммы ИБ 2-2, ИБ 3-1 и ИБ 3-3. Наивысшую окислительную активность, равную 143 мг CO<sub>2</sub>/г субстрата, проявил штамм *Serratia* sp. ИБ 3-1 при культивировании на свином жире.

Полученные результаты по величинам окислительной активности для растительных масел и животных жиров, очевидно связаны с соотношением насыщенных и ненасыщенных жирных кислот в том или ином субстрате (Тютюников, 1974).

Как видно из таблицы 3 способностью окислять углеводороды различного химического строения, а также нефть и нефтепродукты, обладали в различной степени все изученные штаммы бактерий р. *Serratia*.

Проведенные эксперименты показали, что изученные штаммы *Serratia* sp. ИБ 1, *Serratia* sp ИБ 3-1, *Serratia* sp ИБ 3-3, *S. marcescens* ИБ 2-1, *S. marcescens* ИБ 2-2 обладают высокой окислительной активностью по отношению к жирам растительного и животного происхождения, а также способны окислять углеводороды, нефть и продукты ее переработки.

Окислительная способность микроорганизмов р. *Serratia* по отношению к различным субстратам, мг CO<sub>2</sub>/г субстрата

Субстрат	Штамм				
	<i>Serratia</i> sp. ИБ 1	<i>Serratia</i> sp. ИБ 3-1	<i>Serratia</i> sp. ИБ 3-3	<i>Serratia</i> marcescens ИБ 2-1	<i>Serratia</i> marcescens ИБ 2-2
Подсолнечное масло	194	61	198	99	69
Кукурузное масло	122	156	114	137	134
Оливковое масло	69	100	100	61	154
Свиной жир	88	143	35	7	91
Говяжий жир	28	60	121	56	120
Кулинарный жир	25	65	120	67	109
Нонан	24	29	29	49	93
Декан	72	44	149	86	106
Ундекан	90	119	185	104	100
Тетрадекан	74	65	74	109	106
Парафин	25	21	67	8	5
Толуол	12	28	12	60	73
Циклогексан	63	156	22	28	32
Нафталин	14	45	21	11	10
Бензиловый спирт	17	17	91	61	31
Октиловый спирт	55	51	30	24	34
Нефть	106	106	35	53	9
Дизельное топливо	33	108	95	29	8

#### 4. Исследование процесса биодеструкции жиров бактериями рода *Serratia*

Для оценки возможности применения исследуемых бактерий р. *Serratia* для локальной очистки жиросодержащих сточных вод на следующем этапе эксперимента исследовали способность выделенных штаммов утилизировать жиры. Биодеграцию жиров изучали на средах, обеспечивающих максимальную липолитическую активность штаммов.

Чтобы уменьшить стоимость питательной среды для культивирования продуцентов, дорогостоящий компонент среды - дрожжевой экстракт, заменили автолизатом пивных дрожжей. Отработанные пивные дрожжи в настоящее время не находят квалифицированного применения. Для получения автолизата отработанные пивные дрожжи подвергали термической обработке при 100°C. Готовый продукт - дрожжевой автолизат, содержал 34 мг/мл сухих веществ, 22 мас.% которых составляли белки. Очевидно, что стоимость автолизата пивных дрожжей намного ниже цены коммерческого продукта - дрожжевого экстракта.

Для культивирования бактерий р. *Serratia* использовали среду Раймонда с соевой мукой в концентрациях 0,5 мас.%, 2,5 мас.% и автолизатом пивных дрожжей в концентрациях 3 мас.%, 6 мас.%, 9 мас.%. В качестве субстрата для деструкции использовали кулинарный жир. Кулинарный жир представляет собой комбинацию говяжьего жира (90%) и растительных масел, поэтому он может служить подходящей моделью для изучения процесса биодеструкции жиров.

Анализ полученных данных показал, что степень биодеграции кулинарного жира бактериями р. *Serratia* зависела от состава питательной среды. После 96 часов культивирования степень утилизации кулинарного жира исследуемыми штаммами достигала 100% на средах, содержащих соевую муку и дрожжевой автолизат.

Показано, что полная деструкция (100%) кулинарного жира штаммом *Serratia* sp. ИБ 1 достигалась на среде, содержащей 2,5 мас.% соевой муки и 9 мас.% дрожжевого автолизата, штамм *S. marcescens* ИБ 2-2 полностью

разлагал жир при наличии 2,5 мас.% соевой муки и 6 мас.% автолизата пивных дрожжей, *S. marcescens* ИБ 2-1 нуждался лишь в высокой концентрации дрожжевого автолизата, штамм *Serratia* sp. ИБ 3-3 разлагал жир на среде с 2,5 мас.% соевой муки и 3 мас.% автолизата пивных дрожжей (рис. 4 а, б, в, д).

Наиболее активным штаммом - деструктором жира оказался *Serratia* sp. ИБ 3-1. Степень утилизации кулинарного жира этим штаммом на разных средах колебалась от 85% до 100% (рис. 4 г). Наилучшие результаты по биодegradации жира штаммом ИБ 3-1 были получены на средах, содержащих 6 мас.% дрожжевого автолизата. Даже в отсутствии соевой муки степень утилизации кулинарного жира составила 95%, добавление в среду 2,5 мас.% соевой муки привело к 100% деструкции жира штаммом ИБ 3-1.

Для штамма *Serratia* sp. ИБ 3-1, проявившего себя самым активным деструктором кулинарного жира, была исследована способность утилизировать свиной жир, оливковое и подсолнечное масла. В условиях лабораторного опыта полная биодegradация свиного жира достигалась в течение 48 часов при использовании питательной среды, содержащей 2,5 мас.% соевой муки и 3 мас.% автолизата пивных дрожжей. Аналогичный результат по биодegradации растительных масел (оливкового и подсолнечного) на питательной среде указанного состава достигался уже за 24 часа культивирования.

Показано, что степень биодegradации жиров бактериями р. *Serratia*, как и липолитическая активность, зависят от состава питательной среды. Максимальная деструкция субстратов микроорганизмами наблюдалась на средах, содержащих 2,5 мас.% соевой муки (при концентрации автолизата пивных дрожжей в составе питательных сред от 3 мас.% до 9 мас.%). Показана возможность 100% дегradации свиного и кулинарного жиров, оливкового и подсолнечного масел штаммом *Serratia* sp. ИБ 3-1.

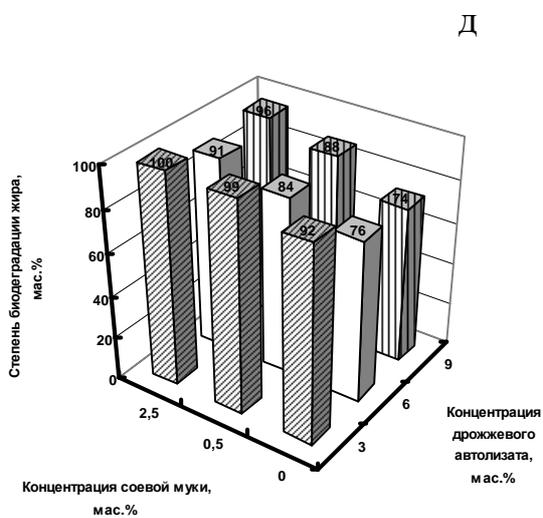
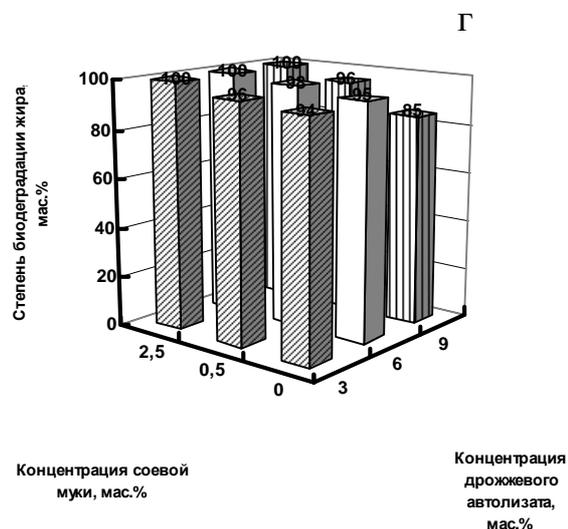
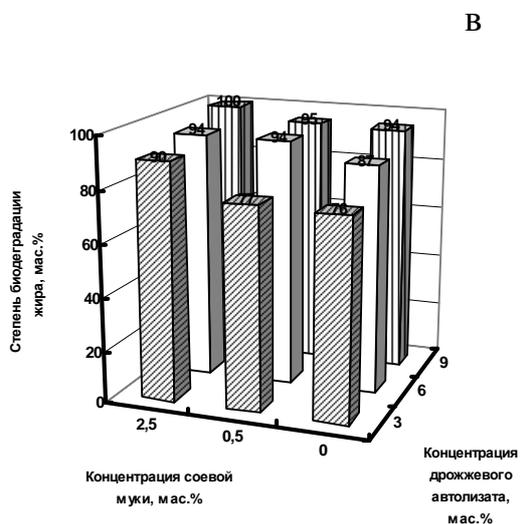
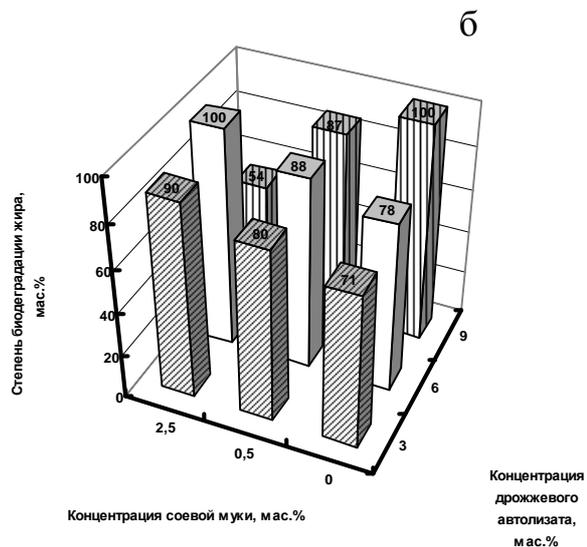
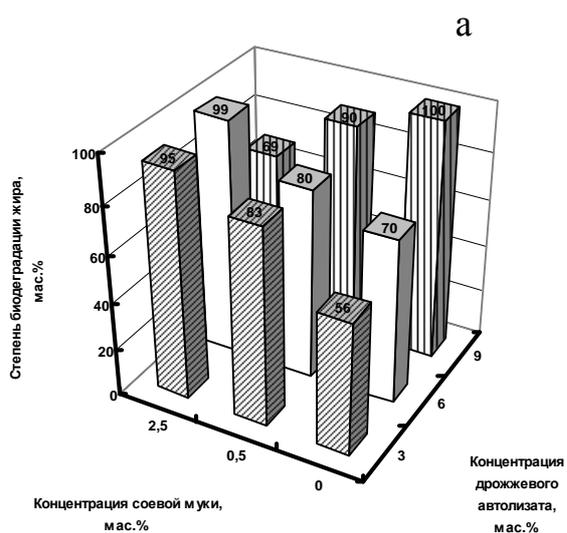


Рисунок 4. Степень биодegradации жиров бактериями р. *Serratia* на богатых питательных средах через 96 часов культивирования: а - *S. marcescens* ИБ 2-1, б - *S. marcescens* ИБ 2-2, в - *Serratia* sp. ИБ 1, г - *Serratia* sp. ИБ 3-1, д - *Serratia* sp. ИБ 3-3.

## 5. Изучение эффективности процесса очистки модельных растворов жиросодержащих сточных вод бактериями рода *Serratia*

Изучение эффективности процесса очистки жиросодержащих сточных вод исследуемыми микроорганизмами проводили на модельных растворах. Растворы готовили на основе среды Раймонда. В качестве субстратов использовали оливковое и подсолнечное масла, а также свиной и кулинарный жиры, которые вносили в модельные растворы в концентрации 1 мас.%. В качестве инокулята была использована биомасса изучаемых микроорганизмов р. *Serratia*, полученная на оптимальных для синтеза липазы питательных средах.

Показано, что все исследуемые штаммы бактерий р. *Serratia* утилизируют жиры с достаточно высокой степенью (табл. 4). Уже после 16 часов культивирования степень биodeградации оливкового масла для разных штаммов составляла от 65% до 100%. Для подсолнечного масла соответствующий показатель варьировал от 64% до 98%. Жиры животного происхождения утилизируются медленнее растительных масел. Очевидно, это обусловлено их плохим эмульгированием в воде. Степень биodeградации кулинарного жира разными штаммами составляла от 51% до 100% в зависимости от продолжительности культивирования. Свиной жир утилизировался исследуемыми бактериями несколько быстрее, степень его биodeградации для разных штаммов составила от 61% до 100%.

Наилучшие результаты по биodeградации растительных масел получены для штаммов *Serratia* sp. ИБ 3-1 и ИБ 1. Эти штаммы на 100% утилизировали оливковое масло уже после 16 и 24 часов культивирования соответственно, максимальное потребление подсолнечного масла для обоих штаммов достигалось за 24 часа. Твердые жиры животного происхождения (свиной и кулинарный) полностью утилизируются после 96 часов культивирования лишь штаммами *S. marcescens* ИБ 2-2 и *Serratia* sp. ИБ 3-1.

Таким образом, показано, что все исследуемые штаммы бактерий р. *Serratia* весьма эффективно утилизируют растительные и животные жиры в условиях очистки модельных жиросодержащих растворов.

Биодеградация растительных и животных жиров бактериями р. *Serratia* в условиях модельных опытов по очистке воды, %

Время культивирования, ч	Штаммы				
	ИБ 1	ИБ 2-1	ИБ 2-2	ИБ 3-1	ИБ 3-3
Оливковое масло					
16	81	75	72	100	65
24	100	82	75	100	86
48	100	89	77	100	88
Подсолнечное масло					
16	81	64	72	98	88
24	100	64	72	100	89
48	100	83	94	100	98
Кулинарный жир					
24	75	73	70	51	67
45	82	76	86	78	71
72	91	89	99	97	80
96	93	95	100	100	87
Свиной жир					
24	93	84	61	92	74
45	97	85	73	95	90
72	98	95	83	97	92
96	100	97	100	100	93

Оценивая перспективы дальнейшего использования исследованных штаммов бактерий р. *Serratia*, следует рекомендовать штаммы *S. marcescens* ИБ 2-2 и *Serratia* sp. ИБ 3-1 в качестве основы биопрепаратов для локальной очистки жиросодержащих сточных вод и биоферментной очистки канализационных систем от твердых жиров. Эти штаммы, как показал комплекс проведенных исследований, обладают высоким уровнем липолитической и окислительной активности, и могут эффективно разлагать жиры растительного и животного происхождения, содержащиеся в сточных водах.

## ВЫВОДЫ

1. Выделены и идентифицированы пять новых штаммов бактерий рода *Serratia*: *Serratia marcescens* ИБ 2-1, *Serratia marcescens* ИБ 2-2, *Serratia species* ИБ 1, *Serratia species* ИБ 3-1, *Serratia species* ИБ 3-3, обладающих высокой липолитической активностью.

2. Установлен оптимальный состав сред, обеспечивающий максимальное продуцирование липолитических ферментов каждым штаммом. Показано, что штаммы *Serratia marcescens* ИБ 2-2 и *Serratia species* ИБ 3-1 могут быть использованы в качестве продуцентов липаз.

3. Определена величина окислительной активности новых штаммов по отношению к жирам растительного и животного происхождения, а также углеводородам (алифатическим, циклическим, окисленным) нефти и нефтепродуктам.

4. Показано, что штаммы *Serratia marcescens* ИБ 2-2 и *Serratia species* ИБ 3-1 могут служить основой биопрепарата для очистки жиросодержащих сточных вод.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Паканещикова Н.В., Логинов О.Н., Силищев Н.Н. Исследование липолитической активности на твердых жирах // Материалы III всероссийской научной internet-конференции «Интеграция науки и высшего образования в области био- и органической химии и механики многофазных систем» (15-31.12.2004 г., Уфа). Уфа: Гос. изд-во научн-техн. лит-ры «Реактив», 2005.- С. 4-5.

2. Паканещикова Н.В., Логинов О.Н., Соков Ю.Ф. Выделение микроорганизмов, обладающих липолитической активностью // Материалы III всероссийской научной internet-конференции «Интеграция науки и высшего образования в области био- и органической химии и механики многофазных систем» (15-31.12.2004 г., Уфа). Уфа: Гос. изд-во научн-техн. лит-ры «Реактив», 2005.- С. 20-22.

3. Паканещикова Н.В., Соков Ю.Ф. О роли липолитических ферментов – липаз // Материалы III всероссийской научной internet-

конференции «Интеграция науки и высшего образования в области био- и органической химии и механики многофазных систем» (15-31.12.2004 г., Уфа). Уфа: Гос. изд-во научн-техн. лит-ры «Реактив», 2005.- С.100-102.

4. Паканещикова Н.В., Логинов О.Н., Силищев Н.Н. Скрининг новых микроорганизмов, обладающих липолитической активностью // Материалы Всероссийской Молодежной школы-конференции «Актуальные аспекты современной микробиологии» (1-3.11.2005 г., Москва). М.: МАКС Пресс, 2005.- С. 100-101.

5. Логинов О.Н., Паканещикова Н.В., Силищев Н.Н., Галимзянова Н.Ф., Бойко Т.Ф. «Штамм бактерий *Serratia marcescens*, продуцирующий липолитические ферменты для получения препарата для очистки сточных вод от жиров // Заявка на изобретение № 2006107802/13 (008473) от 13.03.2006 г. Решение Роспатента о выдаче Патента РФ от 11.04.2007.

6. Логинов О.Н., Паканещикова Н.В., Силищев Н.Н., Галимзянова Н.Ф., Бойко Т.Ф. «Штамм бактерий *Serratia species* – продуцент липазы // Заявка на изобретение № 2006107803/13 (008474) от 13.03.2006 г. Решение Роспатента о выдаче Патента РФ от 1.03.2007.

7. Паканещикова Н.В., Силищев Н.Н., Логинов О.Н. Влияние компонентов питательной среды на биосинтез липазы // Башкирский химический журнал, 2006.- Т. 13.- № 2.- С. 16-19.

8. Паканещикова Н.В., Силищев Н.Н., Логинов О.Н. Утилизация кулинарного жира бактериями рода *Serratia* // Тезисы докладов XIX Международной научно-технической конференции «Химические реактивы, реагенты и процессы малотоннажной химии» (2-4.10.2006 г., Уфа). Уфа: Гос. изд-во научн-техн. лит-ры «Реактив», 2006.- Т. 1.- С. 189-190.

9. Паканещикова Н.В., Силищев Н.Н., Галимзянова Н.Ф., Логинов О.Н. Сравнительное изучение зависимости липолитической активности бактерий рода *Serratia* от состава питательной среды // Башкирский химический журнал, 2006.- Т. 13.- № 4.- С.31-34.

10. Поскрякова Н.В., Силищев Н.Н., Галимзянова Н.Ф., Логинов О.Н. Бактерии *Serratia* sp. ИБ 3-1 как основа биопрепарата для локальной очистки жиросодержащих сточных вод // Экология и промышленность России, 2007, № 6 (в печати).

Подписано в печать 14.04.2007. Формат 60x84 1/16.  
Бумага ксероксная. Печать ризографическая. Тираж 100 экз. Заказ 101.  
Гарнитура «Times New Roman». Отпечатано с готовых оригинал-макетов  
в типографии «ПЕЧАТНЫЙ ДОМЪ». ИП ВЕРКО.  
Объем 1,4 п.л. Уфа, Карла Маркса12/4,  
т/ф: 2727-600, 2729-123