

Лабораторне заняття № 1-2

ТЕМА: «Ферменти мікроорганізмів: класифікація, будова, характеристика. Роль ферментів у метаболізмі. Галузі використання у народному господарстві. Визначення позаклітинних ферментів»

ЦІЛЬ: знати визначення, класифікацію та будову ферментів мікроорганізмів, методи виявлення ферментів; вивчити отримання ферментів, необхідних людині, методами біотехнології; вміти визначати ферменти мікроорганізмів.

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ:

1. Визначення і загальна характеристика ферментів мікроорганізмів.
2. Локалізація ферментів в прокаріотической і еукаріотичної клітці.
3. Значення ферментів в господарській діяльності людини.
4. Основні групи ферментів мікроорганізмів, класифікація ферментів.
5. Хімічна будова ферментів.
6. Каталітична активність ферментів, регуляція каталітичної активності ферментів мікроорганізмів.
7. Каталітична реакція, фактори, що впливають на каталітичну реакцію
8. Поняття «ключові ферменти».
9. Отримання ферментів методами біотехнології.
10. Характеристика продуцентів ферментів.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА:

Мікроорганізми здатні використовувати в якості поживних субстратів найрізноманітніші високомолекулярні сполуки: полісахариди, білки, нуклеїнові кислоти, ліпіди та ін. Однак макромолекули не можуть проникати через мембрану клітини. Вони піддаються гідролізу, який здійснюється під впливом екзоферментів, що відносяться до класу гідролаз. Більшість з них каталізує гідроліз полімерів до розчинних продуктів, зазвичай димарів або мономерів, які надходять в клітину за допомогою специфічних транспортних механізмів. При пошуку продуцентів ферментів-гідролаз в лабораторній практиці застосовують спеціальні методи. Сутність їх полягає в наступному. Мікроорганізми вирощують на агаризованому середовищі, що містить макромолекулярний субстрат. Якщо клітини виділяють в середу екзоферменти, гідролізуючі дане з'єднання, то вирости колонії оточені зоною, в якій виявляються продукти гідролізу.

ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА:

Завдання №1. Замалювати і охарактеризувати основні етапи ферментативної реакції.

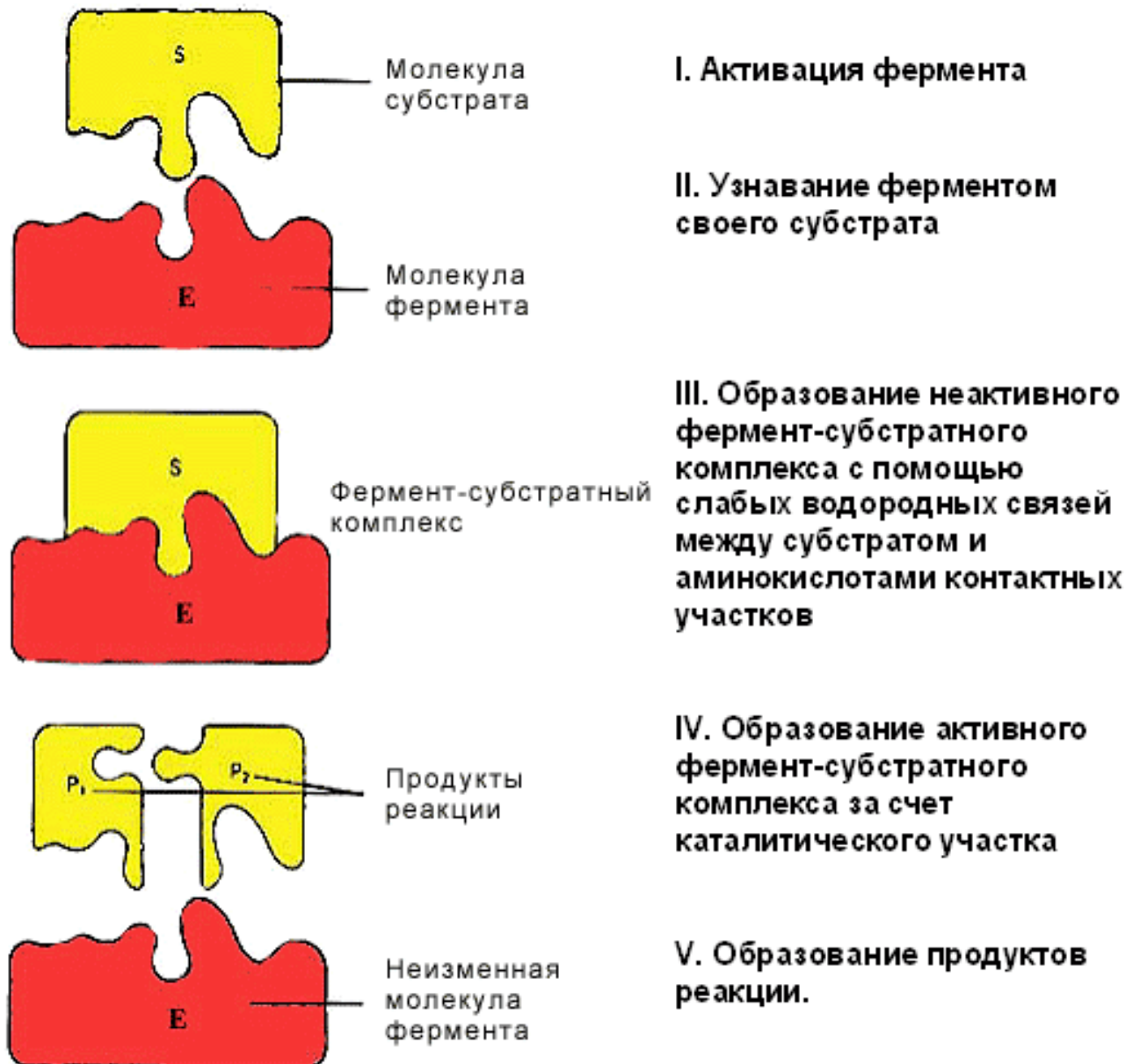


Рис. 1 – Схематичне зображення ферментативної реакції

Завдання № 2. Визначити сахаролітичну активність мікроорганізмів.

Здатність розщеплювати різні вуглеводи з утворенням кислот, альдегідів та газоподібних продуктів характерна для значної кількості бактерій. Різноманітність ферментативних реакцій у окремих родів і видів бактерій використовується в диференційно-діагностичних цілях для ідентифікації досліджуваних культур.

Властивість одних бактерій розщеплювати даний вуглевод і його відсутність у порівнюваних бактерій іноді є основною ознакою, користуючись яким можливо диференціювати збудник захворювання.

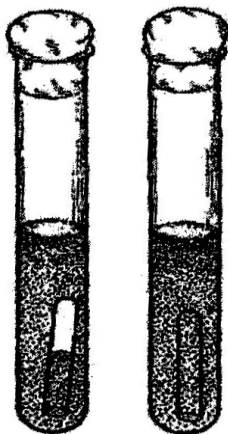
Середовища, які використовуються для визначення сахаролітичної активності бактерій, складаються з трьох основних компонентів:

- 1) основного субстрату власне живильного середовища;
- 2) досліджуваного вуглеводу;
- 3) індикатора, що вказує на наявність або відсутність розщеплення даного вуглеводу.

Для виявлення сахаролітичних ферментів досліджувану культуру бактерій засівають в рідкі поживні середовища Гіссен, звані «строкатим поруч». Середовища Гісса містить 1% -ий вуглевод і 1% -ий індикатор Андредє, до складу якого входить фуксин. Приготований реактив має солом'яно-жовтий колір, в кислому середовищі дає почервоніння.

Короткий «строкатий ряд» Гісса містить 5 пробірок: з глюкозою, лактозою, манітом, мальтозою і сахарозою. Назва «строкатий ряд» обумовлено тим, що під дією ферментів мікроорганізму одні вуглеводи залишаються незмінними, і, отже, колір живильного середовища не змінюється, в той час як мікроорганізми іншого виду розщеплюють цукру, утворюючи кислі продукти розпаду, які змінюють колір індикатора і, відповідно, колір живильного середовища.

Для виявлення газів, які є кінцевими продуктами розпаду цукрів, в пробірки з рідкими середовищами Гісса опускають «поплавок» - трубочку, запаяну з одного кінця. Так, на малюнку 1 показано: при утворенні в середовищі газоподібних продуктів поплавок спливає на поверхню середовища - 1, зростання культури не супроводжується виділенням газу - 2.



1 2

Рис. 2 – накопичення газу в поплавці

Для вивчення сахаролітичної активності візьміть два ряди із середовищами Гісса і зробіть посів - в один ряд *Escherichia coli*, у інший - *Shigella Flexneri*. Підпишіть назви мікроорганізмів. В кожну пробірку ряду опустіть "поплавок" відкритим кінцем вниз. Інкубуйте пробірки при температурі 35 - 37 °С протягом 24 - 48 годин. За отриманими результатами сахаролітичної активності і використовуючи таблицю 1, ідентифікуйте, який ряд містить будь мікроорганізм.

Завдання № 3. Визначити амілолітичну активність у *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis*.

Крохмаль піддається гідролітичного розщеплення під дією амілаз, активними продуцентами яких є різні види бацил, псевдомонад,

стрептоміцетів і міцеліальних грибів. Для виявлення амілолітичної активності використовують крохмальний агар наступного складу: K_2HPO_4 - 0,5 г; $MgCO_3$ - 1 г; $NaCl$ - 0,2 г; KNO_3 - 2,0; $CaCO_3$ - 1,0 г; крохмаль - 20,0 г; агар - 20,0 г на 1000 мл дистильованої води.

На поверхню крохмального агару, розлитого в чашки Петрі, посіяти уколом культури випробуваних бактерій і грибів.

Чашки поставити в термостат при $28\text{ }^\circ\text{C}$ на 4 - 5 діб для грибів і при $37\text{ }^\circ\text{C}$ на 2 - 3 доби для бактерій. Після культивування поверхню чашок залити на 10 - 20 хвилин розчином йоду, що застосовуються для виявлення гранулези (7%).

Розглянути чашку в світлі, зазначивши на тлі темно-синьої середовища наявність прозорих безбарвних зон гідролізу крохмалю навколо колоній мікроорганізмів, які продукують амілазу. Чим більше діаметр світлої зони, тим вище амілолітична активність.

Завдання № 4. Визначити желатиназні властивості у *Proteus vulgaris*.

Протеолітичні ферменти (протеази) каталізують розщеплення білків на фрагменти: полі-і олігопептиди. Протеази виділяються різними видами бацил, актиноміцетів, міцеліальних грибів і ін. Активність позаклітинних протеаз визначають, використовуючи як субстрат желатину, казеїн або інші білки.

Протеоліз желатин. Стерильний 10% -ий водний або 5% -ий м'ясо-пептонний желатин розлити в пробірки по 5 мл і охолодити їх у вертикальному положенні.

Уколом бактеріологічної петлі зробити пересівання досліджуваної культури мікроорганізму з пробірки зі скошеним агаром. Засіяні пробірки поставити в термостат і культивувати при $37\text{ }^\circ\text{C}$ дві доби. Після культивування пробірки з середовищем поставити в холодильник для застигання желатину. Через 1 годину вийняти їх з холодильника і злегка струсити. Якщо мікроорганізми продукують желатинази, то стовпчик желатину розріджується. Відносну активність протеолітичних ферментів оцінюють за кількістю розрідженого желатину, вираженого в мм стовпчика середовища. Крім того, необхідно звернути увагу на форму розрідження, так як цей принцип є діагностичною ознакою (рисунок 1). Так, для аеробних мікроорганізмів характерні кратероїдне, ріповидним, воронкообразное і пошарове розрідження желатини; для факультативних анаеробів - мешковидное; для облигатних анаеробів - бульбашкоподібні.

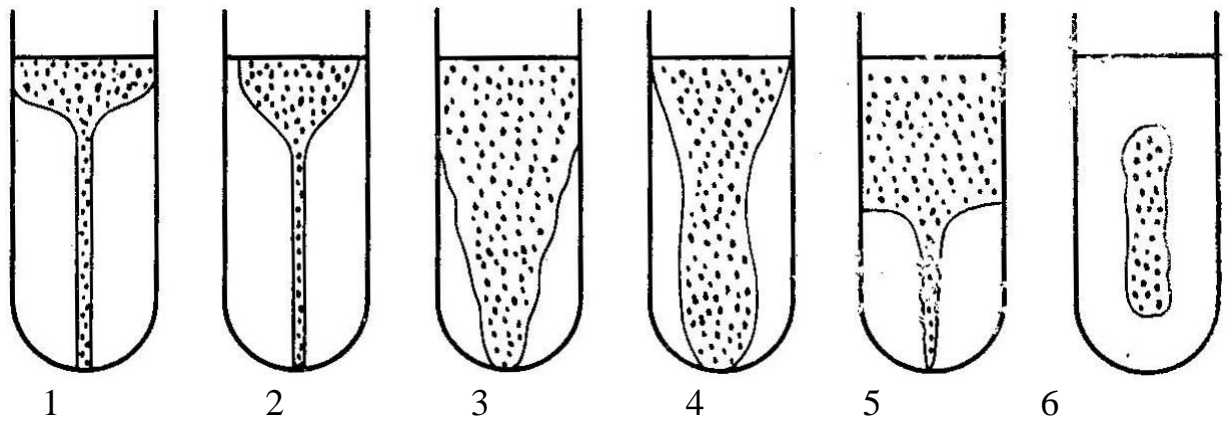


Рис. 3 – Схема розрідження желатину мікроорганізмами при посіві уколом: 1 - кратероподібне; 2 - ріпоподібне; 3 - воронкоподібне; 4 - мішкоподібне; 5 - пошарове; 6 - бульбашкоподібне.

Завдання № 5. Визначити липолітичну активність міцеліальних грибів *Aspergillus niger*

Ліпіди піддаються гідролітичному розкладанню під дією ліпаз. Продуценти ліпаз виявляються серед дріжджів, міцеліальних грибів, бактерій роду *Clostridium* і інших груп мікроорганізмів. Для виявлення липолітичною активності досліджувані мікроорганізми висівають на середовище, що містить відповідний ліпід. Певні труднощі при постановці таких дослідів пов'язана з тим, що жири не змішуються з водою. Тому найчастіше замість жирів в середу вводять твіни - ефіри жирних кислот і сорбіту. Твін-40 містить пальмітинову, твін-60 - стеаринову, а твін-80 - олеїнову кислоти. Твіни добре розчинні у воді і мають нейтральну реакцію. Склад середовища (г/л): твін - 10,0; пептони - 10,0; NaCl - 5,0; CaCl₂ · H₂O - 0,1; агар - 20,0; рН середовища 7,4. Готують середу без твін і стерилізують її при 1 атм. Водний розчин твін стерилізують окремо при 0,5 атм і додають до стерильної основний середовищі. Середовище розливають в чашки Петрі. Коли агар застигне, на поверхню агарового платівки висівають штрихом або уколом досліджуваній мікроорганізм. Засіяні чашки Петрі витримують при відповідній температурі (для грибів - 25°C) необхідна для росту мікроорганізмів час (для грибів - 5 діб). На наявність ліпази вказує освіту навколо штриха або колонії непрозорою зони кальцієвих солей жирних кислот, звільнених з твін.

ЛІТЕРАТУРА:

Основная литература:

1. Лысак В.В. Микробиология: Учебное пособие для студентов биологических специальностей. – Мн.: БГМУ, 2005. – 261 с.
 2. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія. – К.: НУХТ, 2004. – 471 с.
 3. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія: Підруч. – 2-е вид., доп. і перероб. – К.: НУХТ, 2010. – 632 с.
 4. Промышленная микробиология / Под ред.. Н.С. Егорова. – М. Высш.шк., 1989. – 688 с.
 5. Шлегель Г.Г. Общая микробиология. М.: Мир, 1987. – 567 с.
- Информационные ресурсы:

6. biotech.nuph.edu.ua
7. http://www.labprice.ua/ukrainski_naukovi_tovarisstva/tovarisstvo_mikrobiologiv_ukraini_im_sm_vinogradskogo_tmu
8. <http://www.antibiotic.ru/index.php>
9. <http://collegemicrob.narod.ru/microbiology/>
10. http://www.allvet.ru/knowledge_base/microbiology/mikrobiologiya.php
11. <http://www.grandars.ru/college/medicina/mikrobiologiya.html>
12. <http://mikrobiki.ru/>

Таблица 1 – Дифференциально-диагностическая таблица кишечнo-тифозной группы

Название м/о	Углеводы					Индол	Подвижность	Экзотоксин
	Лактоза	Глюкоза	Мальтоза	Маннит	Сахароза			
Кишечная палочка <i>Escherichia coli</i>	К/Г	К/Г	К/Г	К/Г	-	+	±	±
Дизентерийная палочка Флекснера <i>Shigella Flexneri</i>	-	К	К или -	К или -	К или -	±	-	-
Паратифозная В - палочка	-	К/Г	К/Г	К/Г	-	-	+	-
Паратифозная А- палочка	-	К/Г	К/Г	К/Г	-	-	+	-
Брюшнотифозная палочка	-	К	К	К	-	-	+	-
Дизентерийная палочка Григорьева - Шига	-	К	К или -	К или -	К или -	±	-	-
Дизентерийная палочка Зонне	К	К	К или -	К	К	-	-	-

Где: К – изменение цвета среды, в результате образования кислых продуктов распада; Г – образование газообразных продуктов; - – отсутствие видимых изменений.