

Određivanje aktivnosti i stabilnosti lipaze iz soja *Pseudomonas aeruginosa san-ai* u organskim rastvaračima

Enzimi su biokatalizatori koji učestvuju u velikom broju reakcija. Veoma važna osobina enzima jeste aktivnost u vodenoj sredini. Neke značajne reakcije se moraju odigrati u prisustvu organskih rastvarača. Lipaze su enzimi koji katalizuju hidrolazu triacil-glicerola i jedni su od retkih enzima koji pokazuju aktivnost i u organskim rastvaračima, zbog toga je veoma bitno ispitati i odrediti u kojim organskim rastvaračima lipaza pokazuje najveću aktivnost ali i stabilnost. U ovom radu ispitana je aktivnost lipaze iz soja *Pseudomonas aeruginosa san-ai* u organskim rastvaračima spektrofotometrijskom metodom, čime su određeni rastvarači u kojima je lipaza najaktivnija, a zatim i stabilnost lipaze u tim, najpovoljnijim organskim rastvaračima. Dobijeni rezultati pokazuju da je lipaza najaktivnija u acetonu i dimetilsulfoksidu, a da je njena stabilnost veća u acetonu.

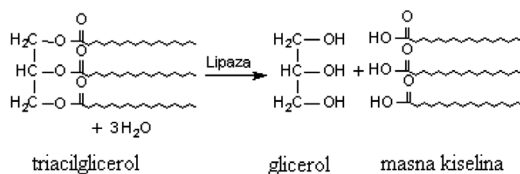
Uvod

Većina organskih molekula neophodnih za život nastaje katalitičkom aktivnošću enzima u prisustvu vode. Enzimi su biokatalizatori, čija aktivnost zavisi od reakcionih uslova (pH, temperatura, polarnost rastvarača, prisustvo određenih jona). Osobina enzima da katalizuju reakcije samo u vodenim sredinama nekada može predstavljati problem. Neka komercijalno važna organska jedinjenja su u vodi nerastvorna ili nestabilna. Takva jedinjenja moraju biti sintetisana u prisustvu organskih rastvarača, odnosno u nevodenoj sredini. Prednost organskih rastvarača je ta što oni povećavaju rastvorljivost nepolarnih supstrata što povećava aktivnost enzima. Međutim, nepovoljno svojstvo organskih rastvarača je to da mogu denatu-

risati enzim ili smanjiti njegovu aktivnost (Ogino i Ishikawa 2001).

Za nevodene enzimske reakcije koriste se monofazni i dvofazni rastvarači. Monofazni rastvarači predstavljaju sisteme vode i organskih rastvarača koji se mešaju sa vodom, dok dvofazni predstavljaju sisteme vode i organskih rastvarača koji se ne mešaju sa vodom. Monofazni rastvarači su bitni jer omogućavaju bolju kontrolu koncentracije supstrata i proizvoda reakcije oko enzima, samim tim oni povećavaju enzimsku aktivnost (Ogino i Ishikawa 2001).

Lipaza (EC 3.1.1.3) je triacilglicerol hidrolaza koja, hidrolizujući triacilglicerole, daje di- i mono- acil glicerole, masne kiseline i glicerol kao krajnje produkte (slika 1). Lipaze su površinski aktivni enzimi zato što vezujući se za emulgovane triacil-glicerolne supstrate značajno povećavaju svoju hidrolitičku aktivnost u odnosu na supstrate rastvorene u vodi (po tome se razlikuju od esteraza). Lipaze nastaju kao produkti mikroorganizama ali i u ljudskom organizmu. Osim uloge koju ima u organizmu lipaza se koristi u industrijske svrhe. Veliki broj istraživanja bavi se ovom vrstom enzima. Jedan od razloga jeste aktivnost i stabilnost lipaze u organskim rastvaračima.



Slika 1. Hidroliza triacilglicerola

Figure 1. Hydrolysis of triglycerides

Cilj ovog rada bio je ispitivanje uticaja organskih rastvarača na aktivnost i stabilnost lipaze iz soja *Pseudomonas aeruginosa san-ai* u organskim rastvaračima.

Marija Marković (1991), Leskovac, Norvežanska 31/3, učenica 3. razreda Gimnazije u Leskovcu

MENTOR: Vladimir Prokopović, student Hemijskog fakulteta u Beogradu

Materijal i metode

Za ispitivanje uticaja organskih rastvarača na aktivnost i stabilnost lipaze korišćena je fermentaciona smeša *Pseudomonas aeruginosa san-ai* i organski rastvarači: 2-metil-2-propanol (terc-butanol), dioksan, 2-propanon (acetone), dimetilformamid (DMF), metanol, dimetilsulfoksid (DMSO) i tetrahidrofuran (THF). Najpre je bilo potrebno ispitati uticaj organskih rastvarača na aktivnost lipaze spektrofotometrijskom metodom. Na osnovu dobijenih rezultata za aktivnost lipaze, u onim organskim rastvaračima u kojima je lipaza pokazala najveću aktivnost ispitivana je i njena stabilnost.

Fermentaciona smeša *Pseudomonas aeruginosa san-ai*. Kultura *Pseudomonas aeruginosa san-ai* aktivirana je presejavanjem na selektivni cetrimid agar a nakon toga na hranljivi agar i gajena je 24 sata na 30°C. Predfermentacija se izvodi u Erlenmajerovim bocama u osnovnoj, Lauria Bertani (LB), podlozi tokom 20 časova na temperaturi 30°C. Fermentacija se izvodi na optimalnoj podlozi (LB podloga sa dodatkom suncokretovog ulja i detergenta) na 30°C kao što je detaljno opisano.

Sastav podloge. Optimalna podloga (podloga za fermentaciju):

- pepton 1, 10g/L
- ekstrakt kvasca, 5g/L
- NaCl, 5g/L
- 0.7% w/v suncokretovog ulja
- Tween 80 1g/L

Fermentacija se izvodi 5 dana nakon čega se prekida. Fermentaciona tečnost se zatim centrifugira 20 min na 4000 g u cilju uklanjanja ćelija.

Aktivnost lipaze određivana je spektrofotometrijski, korišćenjem metode zasnovane na hidrolizi pNPP-a. Reakciona smeša se sastojala od 100 μL rastvora enzima (10,26 UimL⁻¹), 1000 μL rastvarača i 1000 μL supstrata. Enzimska aktivnost se prati merenjem promene apsorbance na λ = 410 nm. Jedna enzimska jedinica je količina enzima potrebna za dobijanje 1 μL p-nitrofenola za jedan minut u datim uslovima (pH 8.0; 25°C).

Enzimska aktivnost rastvora enzima se izražava i koncentracijom enzimске aktivnosti. Koncentracija enzimске aktivnosti je broj enzimskih jedinica po mililitru rastvora enzima i računa se po formuli:

$$C_e = \frac{\Delta A \cdot V_{rs}}{V_e \cdot \epsilon \cdot \Delta t} \cdot R \cdot 10^3$$

gde je ΔA – promena apsorbance za vreme Δt, V_{rs} – zapremina reakcione smeše, V_e – zapremina rastvora enzima R puta razblaženog i ε – ekstinkcioni koeficijent (pNP, ε = 1500 L mol⁻¹ cm⁻¹).

Stabilnost lipaze u acetonu i DMSO-u praćena je tokom pet sati. Pripremljeni su rastvori lipaze u ovim rastvaračima (150 μL rastvora lipaze i 1350 μL organskog rastvarača). Uzimani su alikvoti u određenim vremenskim intervalima (nakon 30, 60, 120, 180, 300 minuta) i određivana zaostala aktivnost u njima. Stabilnost lipaze izražena je poluživotom enzima. Poluživot enzima predstavlja vreme za koje se aktivnost enzima smanji na polovinu početne vrednosti.

Sorensov pufer je pripremljen rastvaranjem 207 mg natrijum-dezoksilata u 90 mL fosfatnog pufera (50 mmol/L, pH 8.0) uz mešanje na magnetnoj mešalici. Po potpunom rastvaranju natrijum-dezoksilata dodato je 100 mg gumiarabike u dati rastvor uz neprekidno mešanje.

Supstrat za ispitivanje aktivnosti lipaze je pripremljen tako što je rastvoreno 30 mg para-nitrofenilpalmitat-a (p-NPP) u 10 mL izopropanola i izložen ultrazvuku 30 sekundi. Zatim je dodato 90 mL Sorensovog pufera i izloženo ultrazvuku još šest minuta.

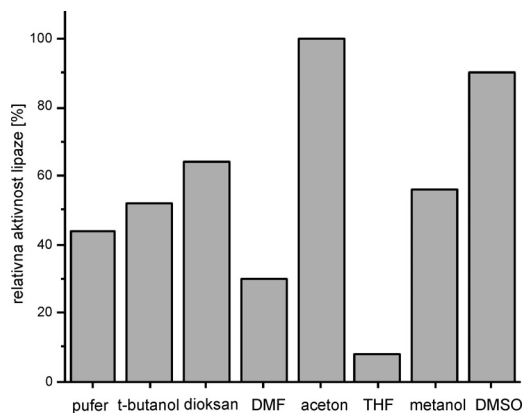
Rezultati i diskusija

Dobijeni rezultati pokazuju da je aktivnost lipaze u THF-u i DMF-u manja nego u vodenoj sredini, dok je u ostalim rastvaračima znatno veća. Najveću aktivnost lipaza ima u acetonu i DMSO-u (slika 2).

Na osnovu ovih rezultata određivana je stabilnost lipaze u acetonu i DMSO-u. Poluživot lipaze u acetonu je čak 20 minuta dok je u DMSO-u osam minuta. Aktivnost lipaze rastvorene u organskim rastvaračima u zavisnosti od vremena prikazana je na slici 3.

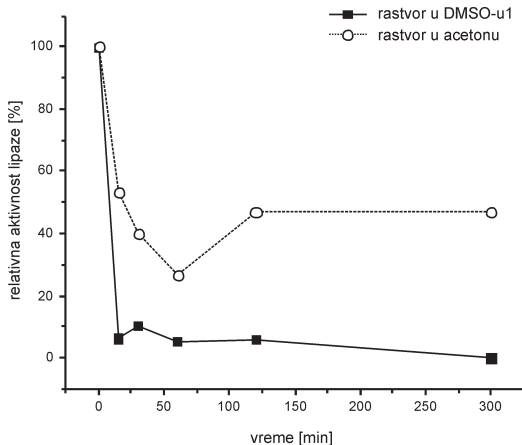
Očekivalo se da će lipaza pokazati najveću aktivnost u najpolarnijem rastvaraču (DMSO) ali je ona pokazala najveću u acetonu. Može se pretpostaviti da je uzrok veće aktivnosti lipaze u acetonu interakcija između acetona i inhibitora lipaze, tj. da je aceton blokirao inhibitor u većoj meri od DMSO-a.

Na osnovu poluživota lipaze u ovim rastvaračima može se zaključiti da je lipaza stabilnija u acetonu. Manja stabilnost lipaze u DMSO-u može biti uzrok manje aktivnosti lipaze u ovom rastvaraču nego u acetonu.



Slika 2. Aktivnost lipaze u različitim rastvaračima

Figure 2. Lipase activity in various organic solvents



Slika 3. Aktivnost lipaze tokom vremena u prisustvu acetona i DMSO-a

Figure 3. Lipase activity in DMSO and acetone during time

Zaključak

Ispitivanje aktivnosti lipaze u organskim rastvaračima je pokazalo da lipaza ima veću aktivnost u acetonu i DMSO-u i ta aktivnost je dva puta veća nego u vodenoj sredini. Poluživot lipaze u DMSO-u je osam minuta dok je u acetonu čak 20 minuta (dva i po puta duži). Navedene osobine lipaze iz soja *Pseudomonas aeruginosa san-ai* pokazuju da se ovaj

enzim može koristiti i u nevodenoj sredini i to sa značajnim učinkom. Dobijeni rezultati mogu koristiti u daljem proučavanju lipaza u nevodenoj sredini.

Zahvalnost. Mnogo truda i rada bilo je potrebno uložiti u ovo istraživanje. Meni ono ne bi bilo moguće da nije bilo određenih ljudi. Pre svega veliko hvala mom mentoru i dragom prijatelju Vladimiru Prokopoviću, studentu II godine Hemijskog fakulteta u Beogradu, na ideji, ogromnom strpljenju i neiscrpnim savetima. Takođe bih se zahvalila i dr Nenadu Milosaviću, naučnom saradniku Centra za hemiju IHTM-a, na ogromnoj pomoći u realizaciji ovog rada, idejama i značajnim savetima.

Literatura

Grujić-Injac B. 1983. *Hemija prirodnih proizvoda*. Niš: Univerzitet u Nišu

Karadzic I., Masui V., Izrael L., Fujiwara N. 2006. Purification and characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas aeruginosa* isolated from putrid mineral cutting oil ascomponent of metalworking fluid. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **102** (2): 82.

Koraćević D., Bjelaković G., Đorđević B. V. 2006. *Biohemija*. Beograd: Savremena administracija

Mihailović B. M. 2000. *Biohemija*. Beograd: Naučna knjiga

Ogino H., Ishikawa H. 2001. Enzymes which are stable in the presence of organic solvents. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **92** (2): 109.

Rozengart V. I. 1956. *Enzimi – pokretači života*. Beograd: Centar, književna izdavačka zadruga

Marija Marković

Determination of Activity And Stability of Lipase from *Pseudomonas Aeruginosa San-Ai* in Organic Solvents

Enzymes are very important biocatalysts in biochemical and biological research, because of their capability for regulating chemical reactions in organisms, but also in artificial conditions. One subgroup of enzymes are lipase, triacyl glycerol ester hy-

drolases (E.C. 3.1.1.3), which by hydrolysis of triacylglycerols give mono- and di-acylglycerols and fatty acids. This enzyme is active only in water surroundings. This characteristic is a very big problem when there is a need for hydrolysis in an organic surrounding. We can bypass this problem by using some single-phase and two-phase solvent systems – systems of water and water-soluble organic solvent or water and water-insoluble organic solvent.

There is a need to determine organic solvents in which lipase shows the greatest activity and stability. Because of that, in this research we determined the activity and stability of lipase in organic solvents. For the determination, we used lipase of the cluster *Pseudomonas aeuginosa*, gathered from the Faculty of Chemistry, University of Belgrade. Organic solvents used in the research are t-butanol, dioxane, acetone, dimethylformamide (DMF), methanol, dimethyl sulfoxide (DMSO) and

tetrahydrofuran (THF). LIPASE activity was determined spectroscopically, based on hydrolysis p-nitrophenylpalmitat in presence of organic solvents.

Results of this research show that lipase has the greatest activity in acetone and DMSO, which is twice the activity of lipase in water surroundings. Based on these results, we were determining stability of lipase in acetone and DMSO. Stability was monitored during the period of five hours by determining lipase activity in the given solvents. That showed that lipase is more stable in acetone, and that its half-life in this solvent is 20 minutes, while in DMSO it is 8 minutes. We can assume the cause of these results. That cause can be the stability of lipase in acetone, which is quite bigger than in DMSO, or it can be an interaction between solvents and enzyme inhibitors. This assumption can be a base for further research. 