

## ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА БИОСИНТЕЗ ЛИПАЗ ИССЛЕДУЕМЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ

### Аннотация

Изучено влияние pH среды и температуры на липолитическую активность штаммов *Aeromonas salmonicida* БЖ-1 и *Aeromonas piscicola* БЖ-2. Показано, что оптимальными значениями pH для биосинтеза липаз являются 7-9. В этих условиях липолитическая активность штаммов БЖ-1 и БЖ-2 составляла 280-302 мкМ олеиновой кислоты/мл/ч и 205-218 мкМ олеиновой кислоты/мл/ч соответственно. В кислой среде липолитическая активность штаммов снижалась на 60-80%. Также установлена оптимальная температура 30-37 °С, при которой отмечалась наибольшая активность липазы – 210-302 мкМ олеиновой кислоты/мл/ч.

**Ключевые слова:** липаза, липолитическая активность, микроорганизмы – продуценты липаз

В последнее время липазы используются как ключевые ферменты в стремительно развивающейся сфере биотехнологии благодаря их многогранным свойствам, которые находят применение в широком спектре промышленного значения, например, как пищевые технологии, моющие средства, химическая промышленность и биомедицинские науки [1].

Липазы являются продуктами жизнедеятельности микроорганизмов. Бактериальные липазы играют важную роль на коммерческих предприятиях. К одним из основных продуцентов фермента относятся бактерии родов *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*.

Для промышленных целей наибольший интерес представляют внеклеточные ферменты, выделяемые микроорганизмами в окружающую среду, так как их дальнейшая очистка значительно проще и дешевле, чем препаратов из внутриклеточных ферментов [2].

Спектр применения микробных липаз достаточно широк. Эффективность их использования зависит от ряда факторов, прежде всего от их специфичности и условий проведения конкретного биотехнологического процесса.

На процесс продуцирования липаз микроорганизмами существенно влияют физико-химические параметры: pH, температура, режим перемешивания и аэрации.

В большинстве случаев бактериальные липазы имеют оптимум действия в диапазоне pH от нейтрального (pH 7,0) до щелочного (pH 11,0). Однако, липаза из *Pseudomonas fluorescens* SIK W1 имеет оптимум pH 4,8 [3]. Оптимальные значения pH среды для выращивания дрожжевых продуцентов липазы находятся в широком диапазоне от 2 до 10 и различаются у разных культур. Так, максимальное образование липазы *Candida lipolitica* происходило при pH 6,0, а *Candida mogii* 2 и *Debaryomyces hansenii* 8 – при pH 8,1. Согласно большинству литературных данных, микроскопические грибы активно развиваются и интенсивно образуют липазу при pH 4,2-7,5 [4].

Оптимальная температура для синтеза липазы обычно соответствует температуре роста микроорганизма. Например, в случае с *Bacillus sp.* RSJ1 оптимальная температура роста и продуцирования липазы 50°C. В основном бактериальные липазы имеют температурный оптимум в диапазоне от 30 до 60°C. Однако, существуют данные о бактериальных липазах с оптимумами, лежащими в более низких или высоких температурных пределах [1].

Целью исследований являлось изучение влияния pH среды и температуры на липолитическую активность штаммов – продуцентов липаз.

## Материалы и методы

Объектами исследований служили штаммы бактерий, обладающие липолитической активностью *Aeromonas salmonicida* БЖ-1 и *Aeromonas piscicola* БЖ-2.

Липолитическую активность микробной биомассы определяли по модифицированному методу Ota и Yamada, основанном на титрометрическом определении свободных жирных кислот, образовавшихся в результате гидролиза липидов [5]. Культуры выращивали в колбах Эрленмейера объемом 750 мл с 100 мл среды Раймонда на качалке со скоростью вращения 180 об/мин при 28-29°C. В качестве субстрата использовали 40%-ую эмульсию оливкового масла в 2%-ном растворе поливинилового спирта. Реакционная смесь включала следующие компоненты: 1 мл культуральной жидкости, 4,5 мл 0,05 М фосфатного буфера рН 8,0, 5 мл эмульсии оливкового масла. Гидролиз проводили в течение часа при 37°C, после чего добавляли 10 мл этанола и продукты гидролиза оттитровывали 0,05 М раствором NaOH в присутствии 1%-ного раствора фенолфталеина. Контрольные образцы титровали сразу же без выдерживания в термостате, добавив этанол. Активность липазы выражали в микромолях олеиновой кислоты, освобождающейся за 1 час при гидролизе субстрата 1 мл культуральной жидкости. Величину рН реакционной смеси устанавливали цитратно-фосфатным (рН 3-8) и кислым углекислым (рН 9-10) буферами.

При изучении влияния температуры на липолитическую активность штаммов гидролиз оливкового масла проводили в течение часа при 5, 20, 30, 37, 50, 60 °С.

Повторность опытов 3-кратная.

Статистическую обработку результатов исследований проводили по стандартной методике с использованием критерия Стьюдента для уровня значимости  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Изучено влияние рН среды и температуры на биосинтез липаз штаммами *Aeromonas salmonicida* БЖ-1 и *Aeromonas piscicola* БЖ-2.

Результаты исследования показали, что высокая липолитическая активность штаммов БЖ-1 и БЖ-2 наблюдалась при рН 6-9 (таблица 1). При этом наибольшая активность для штамма БЖ-1 отмечена в нейтральной и слабощелочной среде (302 и 300 мкМ олеиновой кислоты/мл/ч, соответственно), а для штамма БЖ-2 – в нейтральной среде (218 мкМ олеиновой кислоты/мл/ч).

Таблица 1 – Влияние рН среды на липолитическую активность штаммов БЖ-1 и БЖ-2

Штамм	Активность липазы, мкМ олеиновой кислоты/мл/ч					
	рН					
	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0
БЖ-1	63	121	286	302	300	280
БЖ-2	45	70	188	218	205	208

Кислая среда отрицательно влияла на синтез липазы. Липолитическая активность штаммов снизилась на 60-80%.

Исследовано влияние температуры (5,20,30,37,50,60°C) на синтез липаз штаммами БЖ-1 и БЖ-2 (таблица 2).

Таблица 2 – Влияние температуры на липолитическую активность штаммов БЖ-1 и БЖ-2

Штамм	Активность липазы, мкМ олеиновой кислоты/мл/ч					
	температура, °С					
	5	20	30	37	50	60
БЖ-1	150	276	294	302	122	0
БЖ-2	156	183	210	218	65	0

Из данных таблицы 2 видно, что наибольшая активность липазы отмечена при температуре 37 °С – 302 и 218 мкМ олеиновой кислоты/мл/ч, соответственно у штаммов БЖ-1 и БЖ-2. При проведении реакции липолитического расщепления при температурах 20 и 30 °С активность фермента снизилась незначительно. Увеличение температуры до 50 °С привело к снижению липолитической активности на 60% у штамма БЖ-1 и на 70% у штамма БЖ-2. При температуре 60 °С активность липазы не отмечалась.

Таким образом, результаты исследования показали, что оптимальными условиями для биосинтеза липаз являются рН 7-9 и температура 30-37 °С.

#### Литература:

1 Gupta R., Rath P., Gupta N., Bradoo S. Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview // Biotechnol. Appl. Biochem. - 2003.- Vol. 37.- P.63-71.

2 Башкатова Н. А. Липазы некоторых граммотрицательных бактерий: автореф. ... канд. биол. наук. – Москва, 1980. – 123с.

3 Gupta R., Gupta N., Rath P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties // Appl. Microbial. Biotechnol. – 2004. – Vol.64. – P.763-781.

4 Поскрякова Н.В. Разработка основы биопрепарата для деструкции жиров: автореф. ... канд. биол. наук. - Уфа, 2007.- 115 с.

5 Ota Y., Yamada K., Tomizuka N. Lipase from *Candida cylindraceae*. I. Purification and properties // Agric.and Biol. Chem. - 1966. – Vol.30. – P.576-584.

#### Түйін

С.А. АЙТКЕЛЬДИЕВА, Э.Р. ФАЙЗУЛИНА, Т.Ш. ЗАИТОВА, А.Ж. СУЛТАНОВА

РМК «Микробиологияжәне вирусология институты» ҚР ҒБМ ҒК, Алматы қ.

#### ЗЕРТТЕЛУШІ МИКРООРГАНИЗМДЕРДІҢ ЛИПАЗА БИОСИНТЕЗІН ДАҚЫЛДАУДА ФИЗИКО-ХИМИЯЛЫҚ КӨРСЕТКІШТЕРІНІҢ ӘСЕРІН ЗЕРТТЕУ

*Aeromonas salmonicida* БЖ-1 және *Aeromonas piscicola* БЖ-2 штаммдардың липолитикалық белсенділігіне ортаның рН-ы және температураның әсері зерттелді. Липаза биосинтезі үшін оптимальды рН-ы 7-9 болып табылады. Бұл жағдайда БЖ-1 және БЖ-2 штаммдарының липолитикалық белсенділігі 280-302 мкМ олеин қышқылы/мл/с және 205-218 мкМ олеин қышқылы/мл/с көрсетті. Қышқыл ортада штаммдардың липолитикалық белсенділігі 60-80 пайызға төмендеді. Сонымен қатар, оптимальды температурада 30-37 °С липазаның белсенділігі 210-302 мкМ олеин қышқылы/мл/с жоғары көрсеткішті көрсетті.

**Кілт сөздері:** липаза, липолитикалық белсенділік, липаза өнімдігі микроорганизмдер

## STUDY OF THE INFLUENCE OF PHYSICAL AND CHEMICAL CULTIVATION PARAMETERS ON THE LIPASE BIOSYNTHESIS BY INVESTIGATED MICROORGANISMS

### Summary

The influence of pH and temperature on the lipolytic activity of the strains of *Aeromonas salmonicida* BJ-1 and *Aeromonas piscicola* BJ-2 was studied. It was shown that the optimum pH for the biosynthesis of lipases is 7-9. Under these conditions, the lipolytic activity of strains BJ-1 and BJ-2 was 280-302  $\mu\text{M}$  of oleic acid/ml/h and 205-218  $\mu\text{M}$  of oleic acid/ml/h, respectively. In an acidic environment the lipolytic activity of strains was reduced by 60-80 %. The optimum temperature of 30-37 °C was also established, at which the greatest activity of lipase of 210-302  $\mu\text{M}$  of oleic acid/ml/h was recorded.

**Key words:** lipase, lipolytic activity, microorganisms – producers of lipases

Recently, lipases are used as key enzymes in the rapidly developing field of biotechnology, due to their versatile properties, which find use in a wide range of industrial value, such as food technology, detergents, chemical and biomedical sciences [1].

Lipases are the waste products of microorganisms. Bacterial lipases play an important role in commercial enterprises. To one of the main producers of the enzyme the bacteria of the genera *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia* are related.

For industrial purposes of greatest interest are extracellular enzymes secreted by microorganisms in the environment, since their further purification is much easier and cheaper than that of products from intracellular enzymes [2].

Range of application of microbial lipases is wide enough. Efficiency of their use depends on several factors, primarily on their specificity and conditions of specific biotechnological process.

The process of producing lipases by microorganisms is significantly affected by the physico-chemical parameters: pH, temperature, agitation, and aeration mode.

In most cases, the bacterial lipases has an optimum of action in the range of pH from neutral (pH 7,0) to basic (pH 11,0). However, the lipase from *Pseudomonas fluorescens* SIK W1 has an optimum pH of 4,8 [3]. The optimum pH values of the medium for cultivating the yeasts lipase producers are in a wide range from 2 to 10 and vary for different cultures. Thus, the maximum formation of the *Candida lipolitica* lipase occurred at pH 6,0, *Candida mogii* lipase - at pH 2,0, and *Debaryomyces hansenii* lipase - at pH 8,1. According to most literature data, microscopic fungi actively develop and intensively form lipase at pH 4,2-7,5 [4].

The optimum temperature for lipase synthesis commonly corresponds to the temperature of the microorganism growth. For example, in the case of *Bacillus sp.* RSJ1, the optimum temperature for growth and lipase production is of 50°C. In general, bacterial lipases have a temperature optimum in the range from 30 to 60°C. However, there is evidence of bacterial lipases with optimums lying in a lower or higher temperature ranges [1].

The aim of this study was to investigate the effect of pH and temperature on the lipolytic activity of strains - producers of lipases.

### Materials and methods

Subjects of study were the bacterial strains having lipolytic activity - *Aeromonas salmonicida* BJ-1 and *Aeromonas piscicola* BJ-2.

Lipolytic activity of the microbial biomass was determined by the modified method of Ota and Yamada based on the titrimetric determination of free fatty acids formed as a result of the lipid hydrolysis [5]. Cultures were grown in 750 ml Erlenmeyer flasks with 100 ml of the Raymond medium in a shaker with a speed of 180 rpm at 28-29°C. As a substrate, 40 %

emulsion of olive oil in a 2 % solution of polyvinyl alcohol was used. The reaction mixture contained the following components: 1 ml of the culture fluid, 4,5 ml of 0,05 M phosphate buffer (pH 8,0), 5 ml of olive oil emulsion. Hydrolysis was carried out for one hour at 37°C, after which 10 ml of ethanol were added, and the hydrolysis products titrated with 0.05 M NaOH solution in the presence of the 1% phenolphthalein solution. Control samples were titrated immediately without incubation and with ethanol adding. Lipase activity was evaluated in micromoles of oleic acid releasing during 1 hour at hydrolysis of substrate - 1 ml of the culture fluid. The pH of the reaction mixture was adjusted with citrate- phosphate (pH 3-8) and hydrocarbonate (pH 9-10) buffers.

When studying the effect of temperature on the lipolytic activity of strains, the hydrolysis of olive oil was carried out during 1 hour at 5, 20, 30, 37, 50, 60°C.

Replication of experiments was 3-fold.

Statistical processing of the research results was carried out by the standard procedure using Student's test for the significance level of  $p < 0.05$ .

### Results and discussion

The influence of pH and temperature on the lipase biosynthesis by *Aeromonas salmonicida* strains BJ-1 and *Aeromonas piscicola* BJ-2 was studied.

The results showed that the high lipolytic activity of strains BJ-1 and BJ-2 was observed at pH 6-9 (Table 1). At that the highest activity for the strain BJ-1 was observed in neutral and weakly alkaline medium (302 and 300  $\mu\text{M}$  of oleic acid/ml/h, respectively), and for strain BJ-2 - in neutral medium (218  $\mu\text{M}$  of oleic acid/ml/h).

Table 1 – The influence of pH on the lipolytic activity of strains BJ-1 and BJ-2

Strain	Lipase activity, $\mu\text{M}$ of oleic acid/ml/h					
	pH					
	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0
BJ-1	63	121	286	302	300	280
BJ-2	45	70	188	218	205	208

Acidic environment negatively affected the lipase synthesis. Lipolytic activity of strains was decreased by 60-80%.

The effect of temperature (5, 20, 30, 37, 50, 60°C) on the lipase synthesis by the strains BJ-1 and BJ-2 was studied (Table 2).

Таблица 2 – The influence of temperature on the lipolytic activity of strains BJ-1 and BJ-2

Strain	Lipase activity, $\mu\text{M}$ of oleic acid/ml/h					
	temperature, °C					
	5	20	30	37	50	60
BJ-1	150	276	294	302	122	0
BJ-2	156	183	210	218	65	0

The data in Table 2 show that the highest lipase activity was recorded at a temperature of 37°C - 302 and 218  $\mu\text{M}$  of oleic acid ml/h, respectively, in strains BJ-1 and BJ-2. When conducting the reaction of lipolytic cleavage at 20 and 30°C, the enzyme activity decreased slightly, but remained high. Increasing the temperature to 50°C resulted in reduction of the

lipolytic activity by 60 % in the strain BJ-1 and by 70 % in the strain BJ-2. At a temperature of 60°C, the lipase activity was not recorded.

Therefore, the study results showed that the most optimal conditions for the biosynthesis of lipases are pH of 7-9 and temperature of 30-37°C.

**References:**

1 Gupta R., Rathi P., Gupta N., Bradoo S. Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview // *Biotechnol. Appl. Biochem.* - 2003.- Vol. 37.- P.63-71.

2 Башкатова Н. А. Липазы некоторых грамотрицательных бактерий: автореф. ... канд. биол. наук. – Москва, 1980. – 123с.

3 Gupta R., Gupta N., Rathi P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties // *Appl. Microbial. Biotechnol.* – 2004. – Vol.64. – P.763-781.

4 Поскрякова Н.В. Разработка основы биопрепарата для деструкции жиров: автореф. ... канд. биол. наук. - Уфа, 2007.- 115 с.

5 Ota Y., Yamada K., Tomizuka N. Lipase from *Candida cylindraceae*. I. Purification and properties // *Agric. and Biol. Chem.* - 1966. – Vol.30. – P.576-584.