

**BIOSINTEZA ENZIMELOR
LIPOLITICE DE CĂTRE
PSEUDOMONAS
CNM-PsB,
MICROFLORA SATELIT
A DUNALIELLA SALINA**

Dr., conf. univ. **Victor CROITORU**¹
Acad. **Valeriu RUDIC**²

¹ Departamentul de biochimie și biofizică medicală a Institutului Karolinska, Stockholm, Suedia

² Institutul de Microbiologie și Biotehnologie, AȘM

**BIOSYNTHESIS OF LIPOLYTIC
ENZYMES BY PSEUDOMONAS CNM-
PsB, SATELLITE MICROFLORA OF
DUNALIELLA SALINA**

We have investigated biosynthetic characteristics of two newly isolated Pseudomonas sp. 1 CNM-PsB-01 and Pseudomonas sp. 2 CNM-PsB-02 strains, in parallel with biotechnological tools oriented for obtaining enzymatic fractions with an elevated lipolytic activity. Based on rational design and mathematical optimization we suggested four new nutritive media, containing secondary organic resources, finally leading to prominent levels of lipo-enzymatic complexes. Production costs of these lipolytic complexes are reduced due to utilization of the aqueous supernatant resulting after collection of the primary Dunaliella salina biomass. We concluded that via combination of modern principles of biotechnology, and making use of secondary nutrient resources, like sterilized aqua fraction of D. salina, it is possible to obtain two major products in one biotech cycle, that is Dunaliella salina biomass and the lipolytic complex resulting from cultivation of Pseudomonas on the residual media.

1. PREFAȚĂ

Enzimele lipolitice joacă un rol important în metabolismul lipidic al prokaryotelor și eukaryotelor. Aceste enzime contribuie la transferul lipidelor de la un organism la altul, de la plante la animale, iar de la animalele inferioare la cele ierarhic situate mai superior. În organismul integru aceste enzime participă la procesul de depozitare și imobilizare a grăsimilor, folosite, la rândul lor, în calitate de sursă energetică a celulei. Mai mult decât atât. Incluzându-

se în metabolismul lipidelor intracelulare, ele participă la funcționarea membranelor biologice [1].

Alături de funcțiile sale cu rol biologic inerent, enzimele lipolitice au și roluri specifice: se aplică pe larg în medicină, zootehnie, alimentație, în ansamblu cu alte enzime se folosesc pentru purificarea biologică a apelor reziduale, la transesterificare și producere a biodieselului [2].

În prezent, pentru obținerea preparatelor enzimaticе, se utilizează foarte activ microorganismele, fapt determinat de viteza mare a creșterii lor, posibilitatea reglării componenței sistemelor fermentative prin selecția tulpinilor noi de producători și crearea condițiilor optime de sinteză a acestor substanțe bioactive. La etapa actuală, industria alimentară și farmaceutică a Republicii Moldova resimte deficitul preparatelor lipoenzimaticе, ceea ce impune elaborarea tehnologiilor noi de obținere a acestor compuși folosind ca materie primă ieftină biomasa microbială. Din această cauză, problema privind selectarea, identificarea și introducerea în practică a noilor tulpini de bacterii este studiată asiduu de numeroși cercetători, în final indicând necesitatea cercetărilor vizând enzimele lipolitice și elaborarea ulterioară a procedeeleor biotehnologice pe baza lor [3].

Au capacitatea de acumulare a lipazei reprezentanții genurilor *Rhizopus*, *Penicillium*, *Aspergillus*, bacteriile *Bacillus fluorescens*, *B. piocyanus*, *B. prodigiosus*, *Pseudomonas* etc. Lipazele pot acționa într-un diapazon larg de temperatură. De exemplu, unele lipaze extrase din microorganisme sunt active la -20°C, iar cele extrase din *Vernonia anthelmintica* – la +65°C. Când se utilizează substraturi ce se lichefiază la temperaturi mai mari, se poate spori temperatura incubăției, de exemplu până la +45°C, pentru a asigura lichefierea substratului [4].

Lipazele se aplică la producerea compușilor chirali pentru industriile agrochimice și farmaceutice, atât în producerea substanțelor optice pure folosind lipaza, cât și în rezoluția racematelor după sinteză. Reacțiile catalizate de lipaze pot fi utilizate la producerea polimerilor optici puri [5].

Pseudomonas aurantiaca și *P. aeruginosa* posedă lipoproteidlipază (diacilglicerolipază – IN 3.1.1.34) capabilă să scindeze eterii sterinelor (colesterina), fiind notabil faptul că viteza hidrolizei este cu atât mai mare, cu cât mai lungă este catena radicalului acidului gras [6]. Dintre fosfataze (hidrolazele fosfodieterilor), mai amănunțit sunt studiate fosfolipazele, în particular fosfolipaza C, sau lecitinaza (IN 3.1.4.3), care este sintetizată de multe specii de *Pseudomonade*. Proprietățile lecitinazei *Pseudomonas aureofaciens* au fost studiate de cercetătorii japonezi [7].

2. OBIECTE ȘI METODE DE STUDIU

În cadrul studiului au fost cercetate două obiecte: alga verde *Dunaliella salina* TEOD. CALU-834 și microflora-satelit a *D. salina*, izolată în șapte fracții, din care, prin metoda expres de testare, au fost alese două fracții numite convențional 2b și 3b. Ulterior, culturile numite convențional 2b și 3b au fost identificate (la USMF „Nicolae Testemițanu”) și depozitate în Colecția Națională de Microorganisme sub numele *Pseudomonas sp.1 CNM-PsB-01* (pentru codificarea 2b) și *Pseudomonas sp.2 CNM-PsB-02* (respectiv pentru 3b).

Particularitățile de cultură și metodele de studiu al algei verzi *Dunaliella salina*

Pe mediile lichide suspensia de alge are o culoare verde care, în cazul iluminării intense, căpătă o nuanță galbenă-portocalie. Tulpina se dezvoltă bine pe mediile nutritive Ben-Amotz ce au următoarea compoziție [8]:

Macroelemente: (g/l)

Microelemente: (mg/ml)

NaCl	120	Trilon B	0.885
NaHCO ₃	1.7	MnSO ₄	0.309
NaNO ₃	0.45	MoO ₃	0.15
KH ₂ PO ₄	0.05	ZnSO ₄	0.44
MgSO ₄	0.75	CuSO ₄	0.098
KCl	0.15		
FeCl ₃	0.5 ml/l din 2.5 g/l		
CaCl ₂	0.4 ml/l din 2.5 g/l		

Creșterea și productivitatea algei *Dunaliella salina* se determină după schimbarea densității optice la lungimea de undă $\lambda=625$ nm, iar recalcularea BAU se efectuează după formula: $M = D_{625} \times 0,768$, unde 0,768 este coeficientul de recalculare a biomasei în mg/ml.

Pentru păstrarea îndelungată a tulpinii se folosește mediul agarizat Ben-Amotz [8] la temperatura de 8-10°C și iluminarea de 3-4 mii erg/cm², s. Reînnoirea culturii în aceste condiții se face la fiecare 2 luni. Tulpina poate fi menținută și pe mediul mineral lichid, la o iluminare de zi și la temperatura camerei, reînnoirea culturii efectuându-se peste fiecare 40-45 de zile [3].

Caracteristici culturale și particularități ale tulpinilor *Pseudomonas sp. 1 CNM-PsB-01* și *Pseudomonas sp. 2 CNM-PsB-02*

Tulpina *Pseudomonas sp.1* și *Pseudomonas sp.2* au fost izolate în cultură pură din microflora satelit a algei verzi, halofile *Dunaliella salina* Teod. CALU-834. Activitatea lipolitică a tulpinii propuse constituie 1661 mMol/mg (pentru *PsB-01*) și 3229 mMol/mg (pentru *PsB-02*). Reprezintă bastonașe Gram-negative, strict aerobe, mobile, cu celule solitare, baciliforme, cu dimensiunile de 0,5-1 x 1,5-4 μm.

Tulpinile se caracterizează printr-o activitate lipolitică extracelulară înaltă. Activitatea maximă a

fermenților lipolitici se constată în a 4-a zi de cultivare a bacteriilor. Sunt hemoorganotrofi cu temperaturi limite la +5°C. Nu se observă creșterea la +42°C. Temperatura optimă de dezvoltare este +24 - +26°C. Sursă de carbon pentru dezvoltare poate servi: zaharoza, lactoza, mai puțin glucoza, manitoza, maltoza. Au activitate lipolitică pronunțată. Tulpina nu este rezistentă la eritromicină, lincomicină, streptomicină și e rezistentă la oxacilină, ampicilină, ristampicină. Reacția indolică este pozitivă. Pot crește fără inhibarea proceselor de divizare în intervalul de pH 5,5-8,4. La pH-ul mediului de 3,8 tulpinile nu cresc.

Metode matematice

Metodele matematice de planificare a experiențelor implementate în acest studiu sunt: caracteristica factorilor de variație în cadrul optimizării mediilor nutritive; experiența factorială deplină și metoda mișcării pe gradient sau Box-Wilson [9]. La optimizarea mediilor de cultură, în calitate de nivel inițial poate fi ales mediul deja recomandat pentru organismul studiat sau pot fi folosite datele referitoare la componența substraturilor naturale din care a fost izolat organismul dat.

În scopul alegerii unităților de variație se montează o serie de experiențe preliminare în care se variază fiecare factor consecutiv, pe fonul invariabil al celorlalți componenți ai mediului, pentru a determina dependența productivității culturii de concentrația fiecărui factor în parte. În acest caz se ține cont de faptul că ambele nivele (+ și -) ale factorului studiat trebuie să se găsească în una din zonele active ale dependenței productivității.

În cadrul optimizării mediilor nutritive, folosindu-se metoda balanței aleatorii, nivelele de variație a factorilor se aleg astfel încât unul să se afle în zona optimă, iar al doilea în una din zonele extreme. Pentru a determina cea mai scurtă cale spre extremă în direcția gradientului, este necesar de a varia factorii proporțional coeficienților de regresie, ținând cont de semnul lor. Calculele încep cu trecerea de la variabilele codificate la cele naturale. Pentru aceasta se calculează produsul $b_i \lambda_i$ pentru toți factorii la care b_i s-au dovedit a fi semnificativi. Apoi se alege factorul, al cărui produs este cel mai mic față de mărimea absolută și se calculează raportul celorlalți factori față de factorul ales. Astfel, obținem coeficienții de proporționalitate K_i , care poartă semnele corespunzătoare ale fiecărui factor. Planificarea ulterioară cu scopul determinării maximului funcției constă în adunarea sau scăderea concomitentă (în conformitate cu semnul coeficienților de regresie) a pașilor calculați la nivelul de bază. Potrivit rezultatelor experienței „mișcarea pe gradient”, se obține variația optimă a mediului care asigură nivelul cel mai înalt al procesului studiat [9].

3. REZULTATE ȘI DISCUȚII

În cadrul cercetărilor preliminare, pentru a determina particularitățile de sinteză și separare a lipazelor produse de microflora satelit a algei *D. salina* (bacteriile genului *Pseudomonas*), s-au obținut date ce au indicat că salefiera cu sulfat de amoniu de diverse concentrații pentru separarea lipazei de alte substanțe bioactive nu e rațională, deoarece activitatea lipazică se observă doar la folosirea concentrațiilor înalte de sulfat de amoniu, iar o parte din β -caroten este pierdut din cauza trecerii lui în soluție care apoi se aruncă.

În scopul optimizării termenilor de evaluare cantitativă a sintezei fermenților lipolitici de microflora bacteriană (tulpinile *Pseudomonas sp.1 CNM-PsB-01* și *Pseudomonas sp.2 CNM-PsB-02*), în dinamica dezvoltării ei, bacteriile au fost cultivate pe lichidul supernatant al *Dunaliellei* (preliminar sterilizat), adăugându-se substanțe organice la începutul experienței. Culturile *Pseudomonas sp.1 CNM-PsB-01* și *Pseudomonas sp.2 CNM-PsB-02* s-au cercetat la prezența activității lipazice începând din ziua a doua, zilnic, până în ziua a noua. După cum s-a stabilit, cultura *Pseudomonas sp.1 CNM-PsB-01* manifestă activitate lipazică maximă în ziua a 4-a și a 7-ea, iar maximul activității lipazice a culturii *Pseudomonas sp.2 CNM-PsB-02* este în ziua a 5-a. Pornind de la dinamica dezvoltării microflorei, pe viitor, culturile vor fi cercetate preponderent în zilele 4-5 de cultivare (pentru fiecare cultură respectiv). De asemenea, se observă că tulpina *Pseudomonas sp.1 CNM-PsB-01* are o activitate practic dublă, în comparație cu cultura *Pseudomonas sp.2 CNM-PsB-02* și astfel ea apare ca o sursă biotehnologică mai valoroasă de producere a lipazelor decât culturile înrudite.

Lungimea de undă pentru recalcularea biomasei absolut uscate (BAU) a culturilor *Pseudomonas sp.1 CNM-PsB-01* și *Pseudomonas sp.2 CNM-PsB-02*, s-a stabilit a fi în intervalul de 300-360 nm.

În scopul determinării variantei optime a compoziției mediului nutritiv pentru cultivarea bacteriilor însoțitoare ale *D. salina* a fost efectuată experiența de preplanificare. Ca factori de variație au fost folosiți autolizatul de drojdii, soluția de zaharoză și extractul aquasolubil din *Dunaliella salina* în diferite concentrații. Experimental s-a observat că valoarea maximă a activității lipazice se constată în cazul utilizării concentrației de 0,5% sol. de zaharoză pentru tulpinile *Pseudomonas sp.1 CNM-PsB-01* și *Pseudomonas sp.2 CNM-PsB-02*. S-a observat, de asemenea, că valoarea maximă a activității lipazice se constată în cazul folosirii concentrației de 0,9% sol. autolizat de drojdii pentru tulpina *Pseudomonas sp.1 CNM-PsB-01* și 1,5% sol. autolizat de drojdii pentru tulpina *Pseudomonas sp.2 CNM-PsB-02*.

Deoarece tulpinile în cercetare au fost izolate

din microflora satelit a algei verzi *Dunaliella salina*, s-a decis să se investigheze influența extractului aquasolubil al acestei alge ca un inductor al sintezei enzimelor lipolitice a tulpinilor în studiu. În acest scop am montat o serie de experiențe preliminare (de preplanificare), pentru a studia influența extractului din *Dunaliella salina* asupra productivității tulpinilor și, în particular, asupra capacității lor de a sintetiza enzime lipolitice, pe fonul celorlalți componenți organici invariabili.

Etapa următoare în cadrul optimizării mediului nutritiv constă în cercetarea influenței complexe a componenților organici (sol. de zaharoză și autolizatul de drojdii) asupra biosintezei enzimelor lipolitice. În acest scop a fost montată experiența factorială deplină cu 2 factori de variație (EFD 2²). Etapa finală a optimizării mediului nutritiv constă din experiențele efectuate conform schemei Box-Wilson (mișcarea pe gradient) [9], din rezultatele căreia se selectează concentrațiile optime ale factorilor cercetați.

În locul mediului anorganic *Ben-Amotz*, din considerente economice se poate utiliza lichidul supernatant rezultat după colectarea biomasei de *Dunaliella salina* prin centrifugare și ulterior sterilizat. Deoarece tulpinile studiate au fost izolate din microflora satelit a algei verzi *Dunaliella salina*, ne-am hotărât să cercetăm influența extractului apos al acestei alge ca un inductor al sintezei enzimelor lipolitice ale tulpinilor examinate. În acest scop, am montat o serie de experiențe pentru a studia influența complexă a componenților organici (inclusiv a extractului din *D. salina*) asupra productivității tulpinilor și, în particular, asupra capacității lor de a sintetiza enzime lipolitice. A fost montată experiența factorială deplină cu 3 factori de variație (EFD 2³). Etapa finală a optimizării mediului nutritiv constă din experiențele efectuate conform schemei Box-Wilson (mișcarea pe gradient), din rezultatele căreia se selectează concentrațiile optime ale factorilor cercetați.

Având ca bază rezultatele expuse mai sus, se deduce componența calitativă și cantitativă a mediului principal nou (cu inductor), pentru cultivarea de laborator și industrială a microorganismelor în studiu. Cultivarea tulpinilor *Pseudomonas sp.1 CNM-PsB-01* și *Pseudomonas sp.2 CNM-PsB-02* pe aceste medii (M1-M4) asigură sinteza maximă a enzimelor lipolitice și o productivitate înaltă a lor:

M1. Compoziția mediului nutritiv cu componenți organici optimizați, pentru menținerea și cultivarea de laborator / industrială a tulpinii *Pseudomonas sp.1 CNM-PsB-01*:

Macroelemente (în g/l): NaCl – 120; NaHCO₃ – 2,0; NaNO₃ – 0,5; KH₂PO₄ – 0,05; MgSO₄ · 7H₂O – 0,75; KCl – 0,15; FeCl₃ – 0,5 ml/l din 2,5 g/l; CaCl₂ – 0,4 ml/l din 2,5 g/l.

Microelemente (în mg/ml): Trilon B – 0.885, $MnSO_4$ – 0.309, MoO_3 – 0.15, $ZnSO_4$ – 0.44, $CuSO_4$ – 0.098.

Compoziții organici: Sol. de zaharoză – 1.6 % (16 g/l); autolizat de drojzii – 0.8 % (8 g/l);

Prin cultivarea tulpinii *Pseudomonas sp.1 CNM-PsB-01* pe acest mediu se obține un complex de enzime lipolitice cu o activitate de **1774 nMol/s.g BAU**.

M2. Compoziția mediului nutritiv cu componenți organici optimizați, pentru menținerea și cultivarea de laborator / industrială a tulpinii *Pseudomonas sp.2 CNM-PsB-02*:

Macroelemente (în g/l): NaCl – 120; $NaHCO_3$ – 2,0; $NaNO_3$ – 0,5; KH_2PO_4 – 0,05; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,75; KCl – 0,15; $FeCl_3$ – 0.5 ml/l din 2.5 g/l; $CaCl_2$ – 0.4 ml/l din 2.5 g/l.

Microelemente (în mg/ml): Trilon B – 0.885, $MnSO_4$ – 0.309, MoO_3 – 0.15, $ZnSO_4$ – 0.44, $CuSO_4$ – 0.098.

Compoziții organici: Sol. de zaharoză – 1.4 % (14 g/l); autolizat de drojzii – 0.9 % (9 g/l);

Prin cultivarea tulpinii *Pseudomonas sp.2 CNM-PsB-02* pe acest mediu se obține un complex de enzime lipolitice cu o activitate de **1935 nMol/s.g BAU**.

M3. Compoziția mediului nutritiv, principal nou, cu componenți organici optimizați și inductor, pentru cultivarea de laborator și industrială a tulpinii *Pseudomonas sp.1 CNM-PsB-01*, în scopul obținerii biomasei cu conținut sporit de enzime lipolitice:

Macroelemente (în g/l): NaCl – 120; $NaHCO_3$ – 2,0; $NaNO_3$ – 0,5; KH_2PO_4 – 0,05; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,75; KCl – 0,15; $FeCl_3$ – 0.5 ml/l din 2.5 g/l; $CaCl_2$ – 0.4 ml/l din 2.5 g/l.

Microelemente (în mg/ml): Trilon B – 0.885, $MnSO_4$ – 0.309, MoO_3 – 0.15, $ZnSO_4$ – 0.44, $CuSO_4$ – 0.098.

Compoziții organici: Sol. de zaharoză – 0,5 % (5 g/l); autolizat de drojzii – 1,5 % (15 g/l); extract din *Dunaliella salina* – 1,0 g/l.

Prin cultivarea tulpinii *Pseudomonas sp.1 CNM-PsB-01* pe acest mediu se obține un complex de enzime lipolitice cu o activitate de **1370 nMol/s.g BAU**.

M4. Compoziția mediului nutritiv, principal nou, cu componenți organici optimizați și inductor, pentru cultivarea de laborator și industrială a tulpinii *Pseudomonas sp.2 CNM-PsB-02*, în scopul obținerii biomasei cu conținut sporit de enzime lipolitice:

Macroelemente (în g/l): NaCl – 120; $NaHCO_3$ – 2,0; $NaNO_3$ – 0,5; KH_2PO_4 – 0,05; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,75; KCl – 0,15; $FeCl_3$ – 0.5 ml/l din 2.5 g/l; $CaCl_2$ – 0.4 ml/l din 2.5 g/l.

Microelemente (în mg/ml): Trilon B – 0.885, $MnSO_4$ – 0.309, MoO_3 – 0.15, $ZnSO_4$ – 0.44, $CuSO_4$ – 0.098.

Compoziții organici: Sol. de zaharoză – 0,7% (7 g/l); autolizat de drojzii – 2,25 % (22,5 g/l); extract din *Dunaliella salina* – 0,7 g/l.

Prin cultivarea tulpinii *Pseudomonas sp.2 CNM-PsB-02* pe acest mediu se obține un complex de enzime lipolitice cu o activitate de **3576 nMol/s.g BAU**.

Utilizarea mediilor propuse în practica microbiologică și posibila lor aplicare în biotehnologie ar asigura obținerea unui complex enzimatic cu o activitate lipolitică net superioară, față de cele obținute, folosind culturile înrudite. Prețul de cost al preparatului enzimatic nou este redus, rezultat obținut prin folosirea mediilor nutritive ieftine și componenți accesibili. Mai mult decât atât, utilizarea lichidului cultural rezultat după separarea biomasei de *Dunaliella salina*, în locul mediului mineral *Ben-Amotz*, ar asigura scăderea considerabilă a costului produsului final.

Astfel, combinarea principiilor biotehnologiei moderne și utilizarea rațională a resurselor nutritive secundare (lichidul cultural sterilizat refolosit), vor permite obținerea în cadrul aceluiași ciclu biotehnologic de sinteză a două produse de importanță majoră: biomasa prețioasă de *Dunaliella salina* și complexul enzimatic obținut la cultivarea bacteriilor *Pseudomonas* pe mediul reutilizat.

Bibliografie

- [1] Lass, A., Zimmermann, R., Oberer, M. and Zechner, R. (2011). Lipolysis – a highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores. *Prog Lipid Res* 50, 14-27.
- [2] Tan, T., Lu, J., Nie, K., Deng, L. and Wang, F. (2010). Biodiesel production with immobilized lipase: A review. *Biotechnol Adv* 28, 628-34.
- [3] Rudic, V. (1993) Aspecte noi ale biotehnologiei moderne. Chisinau, Știința.
- [4] Shimada, Y., Sugihara, A. and Tominaga, Y. (1994). Microbial lipase: structure and production. *Bioprocess Technol* 19, 359-71.
- [5] Yeniad, B., Naik, H. and Heise, A. (2011). Lipases in Polymer Chemistry. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, ISSN:1616-8542.
- [6] Sugiura, M., Isobe, M., Oikawa, T. and Oono, H. (1976). Sterol ester hydrolytic activity of lipoprotein lipase from *Pseudomonas fluorescence*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 24, 1202-8.
- [7] Sonoki, S. and Ikezawa, H. (1976). Studies on phospholipase C from *Pseudomonas aureofaciens*. II. Further studies on the properties of the enzyme. *J Biochem* 80, 361-6.
- [8] Ben-Amotz, A. and Avron, M. (1972). Photosynthetic Activities of the Halophilic Alga *Dunaliella parva*. *Plant Physiol* 49, 240-3.
- [9] Box, G.P. and Wilson, K.B. (1951). On the Experimental Attainment of Optimum Conditions. *Journal of the Royal Statistical Society* 13(1), 1-45.