

## Određivanje aktivnosti lipaza *Pseudomonas fluorescens*

Prof. dr. Danica KATANIĆ, dr. Vera KATIĆ, Veterinarski fakultet, Beograd

Prethodno priopćenje — Preliminary communication  
Prispjelo: 8. 6. 1991.

UDK: 637.064

### Sažetak

Aktivnost lipaza *Pseudomonas fluorescens* izolovanih iz mleka, označenih sa 10, 14, 23 i M, određena je prema mlečnoj masti i tributirinu primenom metode difuzije u agaru i titracijom slobodnih masnih kiselina sa 0,02 mol/l KOH.

Rezultati analize agar difuzionom metodom pokazuju da su lipaze *Pseudomonas fluorescens* označenih sa 10, 14 i M aktivnije prema mlečnoj masti ( $\log_{10}$  mm<sup>2</sup> 2,21—2,56) nego prema tributirinu ( $\log_{10}$  mm<sup>2</sup> 2,14—2,46). Lipaza izolovana iz *Pseudomonas fluorescens* označenim sa 23 aktivnija je prema tributirinu ( $\log_{10}$  mm<sup>2</sup> 2,56) nego mlečnoj masti ( $\log_{10}$  mm<sup>2</sup> 2,46). Rezultati određeni titracijom slobodnih masnih kiselina pokazuju da su lipaze izolovane iz *Pseudomonas fluorescens* označenih sa 10, 14 i M aktivnije prema mlečnoj masti (4,10—4,65  $\mu$ mol/ml/min) nego tributirinu (3,00—3,52  $\mu$ mol/ml/min). Lipaza izolovana iz *Pseudomonas fluorescens* 23 aktivnija je prema tributirinu (5,32  $\mu$ mol/ml/min) nego prema mlečnoj masti (5,10  $\mu$ mol/ml/min).

Natuknice: *Pseudomonas fluorescens* — Lipase activity — Assessment.

### Uvod

Organoleptičke promene mleka i proizvoda od mleka koji se čuvaju u uvjetima niskih temperatura posledica su aktivnosti psihofilnih mikroorganizama. Najčešće se među psihofilnim mikroorganizmima izoluju bakterije roda *Pseudomonas*. Kao posledica aktivnosti lipaza bakterija roda *Pseudomonas* nastaje užegao miris mleka i proizvoda od mleka (Deeth and Fitzgerald, 1983). Intenzitet organoleptičkih promena u mleku i proizvodima od mleka zavisi od aktivnosti lipaza. Cilj ovog rada je bio da se prouči aktivnost lipaza izolovanih iz *Pseudomonas fluorescens*, najčešćeg predstavnika psihofilnih mikroorganizama u mleku i proizvodima od mleka.

### Materijal i metod rada

#### Izolovanje lipolitičkih bakterija

Lipolitičke bakterije su izolovane iz sirovog mleka, uzetog iz sabirnih bazena, zasejavanjem na tributirin agaru. Izolati označeni sa 10, 14, 23 i M identifikovani su kao *Pseudomonas fluorescens* na osnovu Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1984).

### **Izolovanje lipaza**

Za izolovanje lipaza iz *Pseudomonas fluorescens* upotrebljena je metoda dijalizne membrane (Christen and Marshall, 1984). Dijalizno crevo dužine 90 mm i širine 45 mm je posle ispiranja u destilovanoj vodi (tri puta) izrezano u diskove prečnika 85 mm. Disk dijalizna creva su razdvojena filter papirom, postavljena u Petrijevu šolju prečnika 150 mm i sterilisana u autoklavu. Na podlogu koja sadrži 2% peptona, 2% agara i 0,04% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> postavljeno je sterilno disk-dijalizno crevo. Na površinu disk dijaliznog creva je zasejano 0,1 ml suspenzije ćelija *Pseudomonas fluorescens* u 0,02 mol/l fosfatnog pufera čiji je pH 7,45. Zasejana podloga je inkubirana 24 časa (21 ° C). Sadržaj sa dijaliznog creva je prenet u 2 ml 0,02 mol/l fosfatnog pufera čiji je pH 7,45, a zatim centrifugovan 15 min. (16500). Bistar supernatant je sterilisan membranskom filtracijom.

### **Određivanje aktivnosti lipaza**

Aktivnost lipaza je određivana prema mlečnoj masti i tributirinu primenom agar difuzione metode (Christen and Marshall, 1984) i titracijom slobodnih masnih kiselina (Downer et al, 1974).

#### **Agar difuziona metoda**

Tributirin agar i podloga sa maslacem (Shelley et al, 1987) razlivane su u Petrijeve šolje, a zatim su u podlozi pravljene rupe prečnika 4 mm. Rupe su punjene sa pet mikrolitara enzima ili fosfatnog pufera kao kontrole. Podloga je zatim inkubirana 24 časa (36 ° C). Po završenoj inkubaciji izmerena je zona lipolize (D), a izmerena vrednost korigovana je na osnovu obrasca:  $\log_{10}$  korigovana vrednost =  $\log_{10} (D/2)^2 - (4,0/2)^2$ .

#### **Titracija slobodnih masnih kiselina**

Aktivnost lipaza prema mlečnoj masti i tributirinu je određivana i na osnovu titracije slobodnih masnih kiselina sa 0,02 mol/l KOH. Za određivanje aktivnosti enzima prema mlečnoj masti reaktivna smeša je pripremana od 4,7 g 40% pavlake; 1,25 ml mol/l boratnog pufera pH 9; 1,5 ml enzima i dopunjavana je destilovanom vodom do 12,5 ml. Reaktivna smeša za određivanje aktivnosti lipaza prema tributirinu pripremana je od 4 ml 12,5% puferisane emulzije tributirina i 5 ml enzima, pH reaktivne smeše je podešen na 8,8 i reaktivna smeša dopunjena do 12,5 ml destilovanom vodom.

#### **Ekstrakcija slobodnih masnih kiselina**

Deset mililitara reaktivne smeše je neutralisano alkoholnim rastvorom KOH do ljubičasto fenolftalein boje, a zatim je ova smeša energično mučkana 30 min. sa 10 ml etanola 95% (W/v). U smešu su dodate dve kapi 0,04% (W/v) fenolcrvenog i smeša je zakiseljena sa 3 mol/l HCl do pojave ljubičaste fenol-

fatlein boje. Ekstrakciona smeša je zatim energično mućkana 30 sec. sa 20 ml etiletra-petroleum etra 2:3 (W/v) i centrifugovana (1500 o/min). Deset mililitara etarskog sloja je preneto u Erlenmajerovu posudu od 120 ml u kojoj se nalazilo 10 ml neutralnog 95% (W/v) etanola i titrovano je sa 0,02 mol/l KOH u 95% etanolu do stabilne crvene boje. Broj mililitara 0,02 mol/l KOH utrošen za titraciju pomnožen sa dva daje vrednost aktivnosti lipaze izražene u  $\mu\text{mol/ml/min}$ .

### Rezultati i diskusija

Primenom disk difuzione membrane izolovane su ekstraćelularne lipaze iz sva četiri izolata *Pseudomonas fluorescens* poreklom iz sirovog mleka. Određivanjem aktivnosti izolovanih enzima prema mlečnoj masti i tributirinu, primenom agar difuzione metode, utvrđena je razlika u aktivnosti prema tim supstratima. Rezultati analiza prikazani su u Tablici 1.

Tablica 1. Aktivnost lipaza *Pseudomonas fluorescens* određena agar-difuzionom metodom

Table 1. Lipase activity of *Pseudomonas fluorescens* determined using agar-diffusion method

Izolat Isolate	$\bar{x}$ zone lipaze Mean zone area	Tributirin agar Tributyryn agar
	Agar sa maslacem Buterfat agar $\log_{10}\text{mm}^2$	
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 10	2,56	2,46
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 14	2,31	2,21
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 23	2,46	2,56
<i>Pseudomonas fluorescens</i> M	2,21	2,14

$\bar{x}$  srednja vrednost šest merenja  
mean of six observations

Veću aktivnost prema mlečnoj masti nego prema tributirinu pokazivali su enzimi izolovani iz *Pseudomonas fluorescens* označeni sa 10, 14 i M. Samo je lipaza izolovana iz *Pseudomonas fluorescens* 23 bila aktivnija prema tributirinu ( $\log_{10}\text{mm}^2$  2,56 nego prema mlečnoj masti ( $\log_{10}\text{mm}^2$  2,46).

Aktivnost lipaza je određena i titracijom slobodnih masnih kiselina. Rezultati tih analiza prikazani su u Tablici 2.

Rezultati određeni titracijom slobodnih masnih kiselina pokazuju da je najveća dokazana aktivnost lipaza iz *Pseudomonas fluorescens* 23. Razlika aktivnosti lipaza u zavisnosti od supstrata je utvrđena i titracijom slobodnih masnih kiselina. Lipaze izolovane iz *Pseudomonas fluorescens* označenih sa

Tablica 2. Aktivnost lipaza *Pseudomonas fluorescens* određena titracijom slobodnih masnih kiselinaTable 2. Lipase activity of *Pseudomonas fluorescens* determined titrating free fatty acids

Izolati Isolate	Slobodne masne kiseline (μmol/ml/min) Free fatty acids (μmol/ml/min)	
	Mlečna mast Milk fat	Tributirin Tributyryn
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 10	4,65	3,00
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 14	4,50	3,30
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 23	5,10	5,32
<i>Pseudomonas fluorescens</i> M	4,10	3,52

10, 14 i M bile su aktivnije prema mlečnoj masti (4,10—4,65 μmol/ml/min) nego prema tributirinu (3,00—3,52 μmol/ml/min) nego prema mlečnoj masti (5,10 μmol/ml/min). Metode korištene za određivanje aktivnosti ekstracelularnih lipaza *Pseudomonas fluorescens* jednostavne su i lako primenjive, a rezultati se slažu sa rezultatima aktivnosti lipaza *Pseudomonas fluorescens* određenim drugim metodama (Adams and Brawley, 1981; Fox and Stepaniak 1983; Christen and Marshall 1984; Mc Keller, 1986; and Kalogrion-Vassiliadou, 1984). Primenom obe metode utvrđena je razlika u aktivnosti lipaza u zavisnosti od izolata proučavanog *Pseudomonas fluorescens* i supstrata. Lawrence (1967) smatra da je specifičnost lipaza nekih mikroorganizama u vezi sa položajem masnih kiselina u trigliceridima i sa stepenom nezasićenosti masnih kiselina. Na osnovu rezultata istraživanja zaključujemo sledeće:

Primenom metode difuzne membrane mogu se izolovati ekstracelularne lipaze iz *Pseudomonas fluorescens*, a za određivanje aktivnosti ekstracelularnih lipaza mogu se podjednako koristiti agar difuziona metoda i titracija slobodnih masnih kiselina.

#### ASSESSMENT LIPASE ACTIVITY OF THE PSEUDOMONAS FLUORESCENS

##### Summary

Lipase activity of *Pseudomonas fluorescens* designated 10, 14, 23 and M isolated from bulk milk was examined towards milk fat and tributyrine using agar diffusion method and titrating free fatty acids with 0,02 mol/l KOH.

The results revealed that lipases from *Pseudomonas fluorescens* designated 10, 14 and M were more active to milk fat ( $\log_{10} \text{mm}^2$  2.21—2.56) than to

tributyryne ( $\log_{10} \text{mm}^2$  2.14—2.46). Lipase isolated from *Pseudomonas fluorescens* 23 was more active to tributyrine ( $\log_{10} \text{mm}^2$  2.56) than to milk fat ( $\log_{10} \text{mm}^2$  2.46). The amounts of free fatty acids suggested that lipases isolated from *Pseudomonas fluorescens* 10, 14 and M were more active to milk fat (4.10—4.65  $\mu\text{mol/ml/min}$ ), than to tributyrine (3.00—3.52  $\mu\text{mol/ml/min}$ ). Lipase isolated from *Pseudomonas fluorescens* 23 was more active to tributyrine (5.32— $\mu\text{mol/ml/min}$ ) than to milk fat (5.10  $\mu\text{mol/ml/min}$ ).

Additional index words: *Pseudomonas fluorescens* — Lipase activity-assessment

#### Literatura

- ADAMS, D. M. and BRAWLEY T. G. (1981): *J. Dairy Sci.* **64**, 1951—1957.  
BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY (1984): Vol. 1, 1941—199.  
CHRISTEN, G. Z., MARSCHAL, R. T. (1984): *J. Dairy Sci.* **67**, 1680—1687.  
DEETH, H. C. and FITZ-GERALD (1983): In Developments in Dairy chemistry 2-lipids. p 195—239.  
DOWNER, W. K. and MOORE, H. J. (1974): In Ann. Bull. Int. Dairy Fed. Doc. 82, 32—39.  
FOX, F. P., STEPANIAK, L. (1983): *J. Dairy Res.* 77—89.  
KALOGRION-VASSILIADOU, D. (1984): *Milchwissenschaft*, 39, 10, 601—603.  
LAWRENCE, R. C. (1967): *D. Sci. Abstr.* **29**, 2, 59—70.  
Mc KELLER, R. C., HILAIRE CHARLOZE (1986): *J. Dairy Research* 301—312  
SHELLERY, A. W., DEETH, H. C. and MAC RAE, I. C. (1987): *J. Dairy Research* 413-420.