

Elektroforetske i zimografske tehnike za praćenje produkcije dve forme lipaze iz *Candida antarctica* DSM 70725

Aleksandra S. Dimitrijević, Dušan V. Veličković, Ratko M. Jankov, Nenad B. Milosavić

Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet, Beograd, Srbija

Izvod

Candida antarctica proizvodi dve forme lipaze koje se primenjuju u velikom broju različitih organskih reakcija, od kojih su mnoge primenjene i u industrijskoj proizvodnji. U ovom radu ispitana je produkcija dve forme lipaze *C. antarctica* DSM 70725 (CAL A i CAL B) u optimalnom medijumu, upotrebom različitih elektroforetskih i zimografskih tehnika. Ustanovljeno je da produkcija obe forme lipaze počinje u drugom danu fermentacije. CAL B je u fermentacionoj tečnosti prisutna dominantno u formi dimera, dok se monomer CAL B uočava tek u četvrtom danu fermentacije. Na zimogramima, aktivnost CAL B detektovana je prema svim testiranim supstratima, dok je aktivnost CAL A moguće detektovati jedino upotrebom α -naftil-butirata kao supstrata. Zimogram baziran na hidrolizi α -naftil-butirata kao supstrata pruža efikasan način za jednostavno praćenje produkcije dve forme lipaze iz *C. antarctica*, koje se po svojim osobinama veoma razlikuju.

Ključne reči: lipaza, *Candida antarctica*, elektroforeza, zimogram.

Dostupno na Internetu sa adrese časopisa: <http://www.ache.org.rs/HI/>

Lipaze (EC 3.1.1.3, glicerol estar hidrolaze) katalizuju hidrolizu triacilglicerola do glicerola i slobodnih masnih kiselina, kao i reverznu reakciju u nevodenim medijumima [1,2]. Lipaze spadaju među najznačajnije industrijske enzime, koji se uspešno primenjuju u prehrambenoj, farmaceutskoj i industriji detergenata, proizvodnji biodizela, itd. [3,4]. Danas interesovanje za lipazama, prvenstveno mikrobnog porekla, raste zbog njihove izuzetne hemoselektivnosti, stereoselektivnosti i regioselektivnosti [5].

Sa rastućom primenom, dostupnost lipaza koje imaju zadovoljavajuće karakteristike za specifične primene, postala je ograničavajući faktor. S obzirom na to da mnogi industrijski procesi zahtevaju rad na temperaturama višim od 45 °C, idealne lipaze bile bi one koje su aktivne i stabilne na temperaturama od oko 50 °C [6]. Iz toga razloga traga se za lipazama poreklom iz ekstremofilnih mikroorganizama, koje pored termostabilnosti pokazuju i povećanu otpornost na hemijske agense i ekstremne pH vrednosti [7,8].

Candida antarctica proizvodi dve forme lipaze, označene kao A i B (CAL A i CAL B). Kao što samo ime govori, soj je prvobitno izolovan sa Antarktike radi pronalaska lipaza sa ekstremnim osobinama, koje i CAL A i CAL B nesumnjivo poseduju. Dve forme lipaze se veoma razlikuju [9], obe lipaze su stabilne u relativno širokom pH opsegu; CAL A je stabilnija u kiselijem pH, dok je CAL B stabilnija na baznom pH. CAL A je izuzetno termostabilan enzim, koji zadržava aktivnost i pri tempe-

NAUČNI RAD

UDK 577.152.3:543.544:579

Hem. Ind. 66 (2) 201–206 (2012)

doi: 10.2298/HEMIND110816077D

raturama većim od 90 °C. Ova lipaza je verovatno po pitanju termostabilnosti najstabilnija lipaza koja je do sada opisana u literaturi [9]. Pored toga, pronađeno je da je CAL A jedina lipaza koja je sposobna za esterifikaciju sterno zaštićenih supstrata. Međutim, iako je CAL A uspešno primenjena u nekoliko jedinstvenih slučajeva, enzim nije u potpunosti istražen [9]. Za razliku od CAL A, CAL B je veoma dobro okarakterisan enzim, koji nalazi primenu kao katalizator u velikom broju različitih organskih reakcija, od kojih su mnoge primenjene i na velikoj skali [9].

Iako je produkcija lipaza iz *C. antarctica* optimizovana [10], praćenje produkcije izvođeno je upotrebom spektrofotometrijskih eseja, koji pružaju informacije o ukupnoj lipolitičkoj aktivnosti, ali ne omogućavaju praćenje produkcije različitih formi lipaze. U ovom radu ispitana je produkcija dve forme lipaze iz *C. antarctica* u optimalnom medijumu upotrebom različitih elektroforetskih i zimografskih tehnika.

EKSPERIMENTALNI DEO

Produkcija lipaze iz *C. antarctica* DSM 70725 (Nemačka kolekcija mikroorganizama i ćelijskih kultura (DSMZ)) u optimalnoj podlozi i enzimski esej baziran na hidrolizi *p*-nitrofenil-palmitata (*p*-NPP) opisani su ranije [10]. Jedna jedinica enzimske aktivnosti je definisana kao ona količina enzima koja oslobađa 1 μ mol *p*-nitrofenolatnog jona po minutu u uslovima eseja.

S ciljem praćenja produkcije dve forme lipaze iz *C. antarctica* DSM 70725, svakog dana, u toku 7 dana uzimani su alikvoti, ćelije su uklonjene centrifugiranjem (13000 obrt/min, 15 min) a dobijeni supernatanti su analizirani elektroforetski i zimografski.

Prepiska: N. Milosavić, Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Studentski trg 12, 11000 Beograd, Srbija.

E-pošta: nenadmil@chem.bg.ac.rs

Rad primljen: 16. avgust, 2011.

Rad prihvaćen: 6. oktobar, 2011.

Nativna i SDS elektroforeza rađene su na 12%-tnom poliakrilamidnom gelu. Proteinske trake detektovane su bojenjem CBB-om (*Coomassie Brilliant Blue*) i srebrom [11].

Zimogramska detekcija lipaza rađena je nakon nativne i SDS PAGE. Nakon završene nativne elektroforeze, gel je ispiran 20 min u destilovanoj vodi, a nakon završene SDS PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) gel je ispiran 20 min u destilovanoj vodi, nakon toga 10 min u puferu za renaturaciju (50 mM Tris HCl pH 8,0, koji je sadržao 0,5% Triton X-100). Posle ispiranja/renaturacije gelovi se prebacuju u rastvor za bojenje lipolitičke aktivnosti. U radu su korišćene dve vrste zimograma za detekciju lipaza: zimogram baziran na hidrolitičkoj reakciji i zimogram koji se bazira na sintetičkoj reakciji.

Rastvor za sintetički zimogram pripremljen je emulgovanjem 1,5% rastvora oleinske kiseline i 1,5% rastvora oktanol, u 50 mM Tris-HCl puferu, pH 8,0, uz pomoć ultrazvučne sonde. Reakcioni pufer se uvek priprema svež. Gel je nakon završene elektroforeze i ispiranja/renaturacije potopljen u reakcioni pufer za zimogram, i inkubiran na 30 °C u trajanju od 30 min do 24 h, sve do pojave belih precipitata na transparentnom gelu [12].

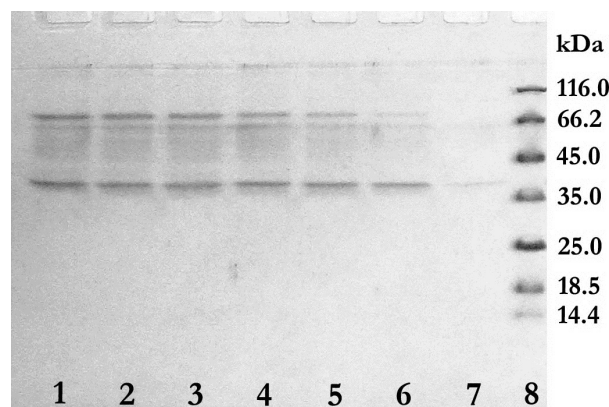
Rastvor za hidrolitički zimogram pripremljen je mešanjem 250 µL boje Fast Blue RR (20 mg/mL rastvorene u destilovanoj vodi), 1,0 mL α -naftil-acetat ili α -naftil-butirat (12 mg/mL rastvorenog u acetonu) i 10 mL 50 mM Tris pufera pH 8,0. Rastvor za zimogram se uvek priprema svež. Gel nakon završene elektroforeze i ispiranja/renaturacije je potopljen u rastvor za zimogram, i inkubiran na 30 °C do pojave traka. Prve trake uočene su već nakon 5–10 min [13].

PRIKAZ REZULTATA

Produkcija lipaza iz *Candida antarctica* DSM 70725 praćena je svakog dana, u toku 7 dana kultivacije u optimalnoj podlozi, kao što je opisano ranije [10]. Nakon uklanjanja ćelija, dobijeni supernatanti su analizirani elektroforetski i zimogramski. Na slici 1 prikazana je SDS PAGE fermentacionih tečnosti u svakom danu fermentacije. Na slici se uočavaju dve dominantne trake, jedna je molekulske mase nešto veće od 35 kDa, a druga je približne mase 66 kDa i čiji se intenzitet postepeno povećava od prvog do sedmog dana fermentacije. Traka slabog intenziteta približne molekulske mase od 45 kDa, počinje da se uočava u četvrtom danu fermentacije.

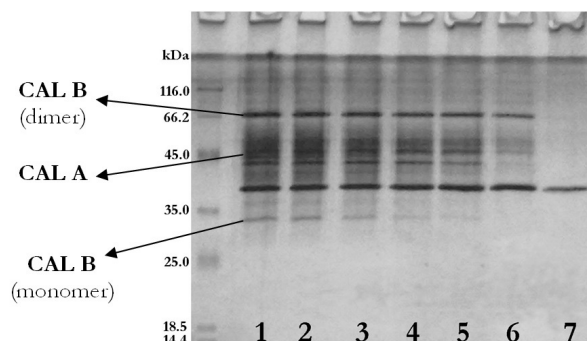
S obzirom na relativno nisku koncentraciju proteina koja je detektovana u fermentacionim tečnostima nakon uklanjanja ćelija [10] tokom svih sedam dana fermentacije, gel nakon SDS PAGE bojen je srebrom da bi detektovali proteinske trake, koje možda nisu vidljive nakon bojenja CBB-om, radi slabije osetljivosti metode. SDS

PAGE fermentacionih tečnosti tokom sedam dana fermentacije nakon bojenja srebrom prikazana je na slici 2.



Slika 1. SDS PAGE fermentacionih tečnosti u svakom danu fermentacije, nakon bojenja gela CBB-om: linije od 1 do 7 – fermentacione tečnosti od sedmog do prvog dana fermentacije, linija 8 – molekularni markeri (14,4 kDa lizozim; 18,4 kDa β -laktoglobulin; 25 kDa Rease Bsp 98I; 35 kDa laktat dehidrogenaza; 45 kDa ovalbumin; 66,2 kDa BSA; 116 kDa β -galaktozidaza).

Figure 1. SDS PAGE of fermentation broth during cultivation, after staining with CBB: lines 1 to 7 – fermentation broth starting from seventh to first day of cultivation, line 8 – molecular weight markers (14,4 kDa lysozym; 18,4 kDa β -lactoglobuline; 25 kDa Rease Bsp 98I; 35 kDa lactate dehydrogenase; 45 kDa ovalbumine; 66,2 kDa BSA; 116 kDa β -galactosidase).



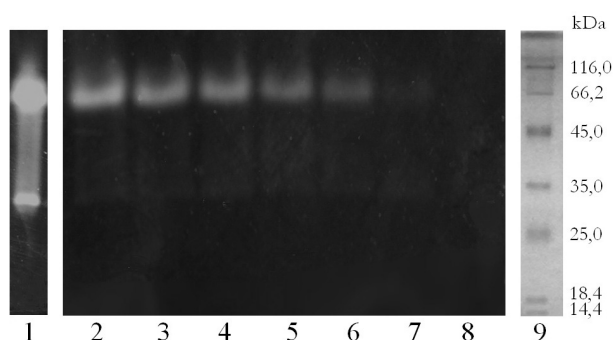
Slika 2. SDS PAGE fermentacionih tečnosti u svakom danu fermentacije, nakon bojenja gela srebrom: s leva na desno – molekularni markeri (14,4 kDa lizozim; 18,4 kDa β -laktoglobuline; 25 kDa Rease Bsp 98I; 35 kDa laktat dehidrogenaza; 45 kDa ovalbumin; 66,2 kDa BSA; 116 kDa β -galaktozidaza); linije od 1 do 7 – fermentacione tečnosti od sedmog do prvog dana fermentacije.

Figure 2. SDS PAGE of fermentation broth during cultivation, after silver staining: from left to right – molecular weight markers (14,4 kDa lysozym; 18,4 kDa β -lactoglobuline; 25 kDa Rease Bsp 98I; 35 kDa lactate dehydrogenase; 45 kDa ovalbumine; 66,2 kDa BSA; 116 kDa β -galactosidase); lines 1 to 7 – fermentation broth starting from seventh to first day of cultivation.

Na slici 2 uočavaju se sve trake koje su detektovane i nakon bojenja CBB-om (slika 1), s tim da su detektovane i dodatne trake, uključujući i traku približne mole-

kulske mase 33 kDa, što je najverovatnije monomer CAL B. Takođe, traka od ~45 kDa jasno se uočava već u drugom danu fermentacije.

Da bismo utvrdili koje trake pokazuju aktivnost lipaze, urađen je sintetički zimogram nakon native i SDS PAGE, kao što je opisano u eksperimentalnom delu. Sintetički zimogrami nakon native i SDS PAGE urađeni su sa oleinskom kiselinom i oktanolom kao supstratima. Rezultati su prikazani na slikama 3 i 4. Radi utvrđivanja koja od traka odgovara CAL B, urađen je sintetički zimogram komercijalnog preparata CAL B (Novozym 435) nakon SDS PAGE (linija 1, slika 3).



Slika 3. Sintetički zimogram nakon SDS PAGE fermentacionih tečnosti u svakom danu fermentacije: linija 1 – komercijalna CAL B (Novozym 435); linije od 2 do 8 – fermentacione tečnosti od prvog do sedmog dana fermentacije; linija 9 – molekularni markeri koji su nakon SDS PAGE bojeni srebrom (14,4 kDa lizozim; 18,4 kDa β -laktoglobulin; 25 kDa Rease Bsp 98I; 35 kDa laktat dehidrogenaza; 45 kDa ovalbumin; 66,2 kDa BSA; 116 kDa β -galaktozidaza).

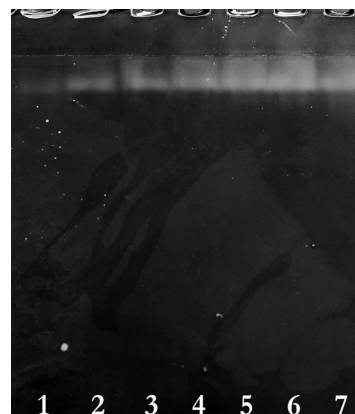
Figure 3. Synthetic zymogram after SDS PAGE of fermentation broth during cultivation: line 1 – comercial CAL B (Novozym 435); lines 2 to 8 – fermentation broth starting from seventh to first day of cultivation; line 9 – molecular weight markers after silver staining (14,4 kDa lysozym; 18,4 kDa β -lactoglobuline; 25 kDa Rease Bsp 98I; 35 kDa lactate dehydrogenase; 45 kDa ovalbumine; 66,2 kDa BSA; 116 kDa β -galactosidase).

Na slici 3 počev od drugog dana fermentacije uočavaju se dve trake sa lipolitičkom aktivnošću. Traka veće molekulske mase odgovara dominantnoj traci od 66 kDa, koju smo detektovali prilikom bojenja CBB-om i srebrom, a traka niže molekulske mase i veoma slabog intenziteta odgovara traci od približno 33 kDa koja je detektovana nakon bojenja gelova srebrom. U komercijalnom preparatu CAL B takođe se uočavaju dve trake, molekulskih masa 33 i 66 kDa.

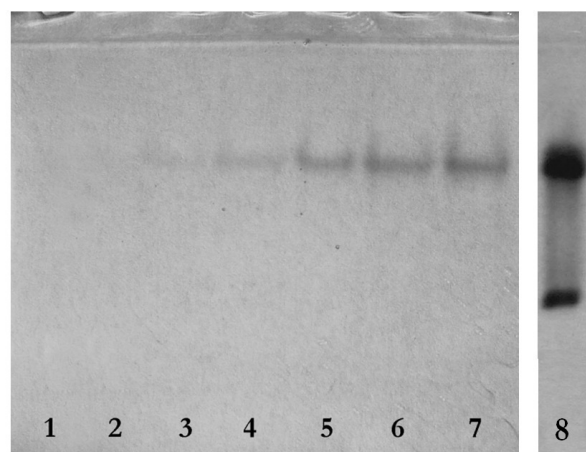
Na sintetičkom zimogramu nakon native PAGE, uočava se lipolitička aktivnost na početku kako gela za koncentrovanje tako i gela za razdvajanje (slika 4), posebno u kasnijim danima fermentacije.

Pored sintetičkog zimograma, urađen je i hidrolitički zimogram, sa Fast Blue RR i α -naftil-acetatom/ α -naftil-butiratom kao supstratima. Na slici 5 prikazan je hidrolitički zimogram sa Fast Blue RR i α -naftil-acetatom, a

na slici 6 prikazan je zimogram sa Fast Blue RR i α -naftil-butiratom kao supstratima.



Slika 4. Sintetički zimogram nakon native PAGE fermentacionih tečnosti u svakom danu fermentacije: linije od 1 do 7 – fermentacione tečnosti od prvog do sedmog dana fermentacije. Figure 4. Synthetic zymogram after native PAGE of fermentation broth during cultivation: lines 1 to 7 – fermentation broth starting from first to seventh day of cultivation.

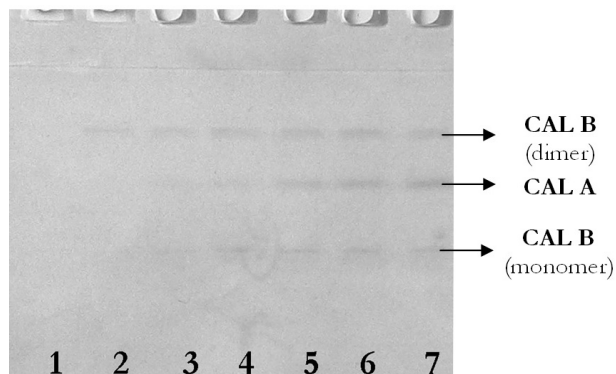


Slika 5. Hidrolitički zimogram sa naftil acetatom i Fast blue RR nakon SDS PAGE fermentacionih tečnosti u svakom danu fermentacije: linije od 1 do 7 – fermentacione tečnosti od prvog do sedmog dana fermentacije; linija 8 – komercijalna CAL B (Novozym 435).

Figure 5. Hydrolytic zymogram with α -naphthyl acetate and Fast blue RR after SDS PAGE of fermentation broth during cultivation: lines 1 to 7 – fermentation broth starting from first to seventh day of cultivation; line 8 – comercial CAL B (Novozym 435).

Za razliku od sintetičkog zimograma gde su detektovane dve trake sa lipolitičkom aktivnošću, na hidrolitičkom zimogramu (slika 5) u fermentacionim tečnostima detektuje se samo jedna traka, mase ~66 kDa, počev od trećeg dana fermentacije. Takođe je urađen i hidrolitički zimogram komercijalnog preparata CAL B (linija 8, slika 5), gde se, kao i u slučaju sintetičkog zimograma, uočavaju dve trake približnih molekulskih masa 33 i 66 kDa.

Na hidrolitičkom zimogramu gde se kao supstrati koriste Fast Blue RR i α -naftil-butirat, u drugom danu fermentacije uočava se traka od ~66 kDa, a počev od trećeg dana fermentacije, uočava se traka slabog intenziteta od ~33 kDa, kao i traka od 45 kDa.



Slika 6. Hidrolitički zimogram sa naftil butiratom i Fast blue RR nakon SDS PAGE fermentacionih tečnosti u svakom danu fermentacije: linije od 1 do 7 – fermentacione tečnosti od prvog do sedmog dana fermentacije.

Figure 6. Hydrolytic zymogram with α -naphthyl butyrate and Fast blue RR after SDS PAGE of fermentation broth during cultivation: lines 1 to 7 – fermentation broth starting from first to seventh day of cultivation.

DISKUSIJA

S obzirom na to da je u literaturi poznato da *Candida antarctica* proizvodi dve forme lipaze (CAL A i CAL B) molekularnih masa 33 i 45 kDa [9,14], na osnovu SDS PAGE nakon bojenja CBB-om (slika 1) pretpostavili smo da se u ovim uslovima CAL B ne proizvodi u dovoljnoj meri da bi bila detektovana nakon bojenja CBB-om, pošto nismo uočili traku od ~33 kDa. Druga mogućnost je da se lipaza B proizvodi uglavnom kao dimer, što je fenomen poznat u literaturi [15–17], i da dominantna traka od ~66 kDa odgovara dimeru CALB. Traka od 45 kDa najverovatnije odgovara lipazi A.

U nativnoj elektroforezi nije došlo do razdvajanja proteina kao kod elektroforeze pri denaturišućim uslovima (rezultati nisu prikazani). Ovakav rezultat nije bio neočekivan, s obzirom na to da lipaze generalno imaju visok sadržaj hidrofobnih aminokiselina, što može da dovede do agregacije proteina [18–20]. Velike molekulske mase nastalih agregata ne dozvoljavaju ulazak proteina u gel i samim tim onemogućavaju razdvajanje proteina, dok detergentski, kakav je SDS remete makromolekularne agregate [21] i omogućavaju elektroforetsko razdvajanje proteina.

Traka približne molekulske mase 33 kDa, koja je detektovana nakon bojenja gela srebrom (slika 2) najverovatnije je monomer CAL B. Takođe, prilikom bojenja srebrom uočena je i dominantna traka od ~66 kDa kao i u slučaju bojenja CBB-om i za koju smo pretpostavili da je dimer lipaze B. Traka od ~45 kDa, za koju smo pre-

postavili da odgovara lipazi A, jasno se uočava već u drugom danu fermentacije.

Na osnovu sintetičkog zimograma nakon SDS PAGE (slika 3) može se zaključiti da se CAL B pod ovim uslovima fermentacije proizvodi uglavnom u formi dimera (molekulske mase ~66 kDa), a da je veoma mala količina CAL B u fermentacionoj tečnosti prisutna u formi monomera (približne molekulske mase 33 kDa). U komercijalnom preparatu CAL B prisutne su takođe dve trake, molekularnih masa 33 i 66 kDa, što potvrđuje pretpostavku da CAL B ima tendenciju formiranja dimera [15–17]. Međutim, na zimogramu se ne uočava traka od 45 kDa koja odgovara CAL A, što je najverovatnije posledica toga što oleinska kiselina, koja se koristi kao supstrat u zimogramu ne može da uđe u aktivni centar CAL A [22].

Na sintetičkom zimogramu nakon nativne PAGE (slika 4) uočava se da lipaze iz *C. antarctica*, slično kao i u nativnoj elektroforezi, formiraju makromolekularne strukture-agregate koji ne mogu u potpunosti da uđu u gel, pa se lipolitička aktivnost uočava na početku gela.

Za razliku od sintetičkog zimograma nakon SDS PAGE, gde su detektovane dve trake sa lipolitičkom aktivnošću, na hidrolitičkom zimogramu (slika 5) detektuje se samo jedna traka, mase ~66 kDa, koja odgovara dimeru CAL B, dok se traka od ~33 kDa ne detektuje, što ukazuje na to da je sintetički zimogram za detekciju lipaza verovatno osetljiviji. Slično kao i u sintetičkom zimogramu, u komercijalnom preparatu CAL B uočavaju se dve trake sa približnim molekularnim masama 33 i 66 kDa (monomer i dimer). Traka od 45 kDa, koja bi odgovarala CAL A ne vidi se ni na ovom zimogramu. Kako smo pretpostavili da je u pitanju nespecifičnost CAL A za naftil-acetat, s obzirom na to da CAL A pokazuje najveću aktivnost prema supstratima srednje dužine lanca (192), isti zimogram urađen je i sa naftil butiratom (slika 6). Upotrebom naftil-butirata kao supstrata, moguće je detektovati monomer i dimer CAL B (približnih molekularnih masa 33 i 66 kDa), kao i CAL A (približne molekulske mase 45 kDa).

ZAKLJUČAK

Produkcija dve forme lipaze iz *Candida antarctica* DSM 70725 (CAL A i CAL B) počinje u drugom danu fermentacije. CAL A, molekulske mase 45 kDa ne pokazuje na zimogramu aktivnost prema dugolančanim (oleinska kiselina) i kratkolančanim (α -naftil-acetat) supstratima, već je aktivnost moguće detektovati jedino upotrebom α -naftil-butirata kao supstrata. CAL B je u fermentacionoj tečnosti prisutan dominantno u formi dimera (približne molekulske mase 66 kDa). Monomer CAL B (približne molekulske mase 33 kDa) uočava se tek u četvrtom danu fermentacije. Za razliku od CAL A, CAL B pokazuje aktivnost i u sintetičkom i u hidrolitičkim zimo-

gramima, tj. ova forma lipaze je aktivna prema svim testiranim supstratima nezavisno od dužine niza.

Zahvalnica

Autori se zahvaljuju Ministarstvu prosvete i nauke Republike Srbije na finansijskoj podršci (u okviru projekata 172049 i 046010), kao i međunarodnom projektu FP7 Reg Pot FCUB ERA, GA No 256716.

LITERATURA

- [1] N.D. Ognjanović, S.D. Petrović, D.I. Bezbradica, Z.D. Knežević-Jugović, Lipases as biocatalysts for biodiesel production, *Hem. ind.* **64** (2010) 1–8.
- [2] H.M. Rifaat, A.A. El-Mahalawy, H.A. El-Menofy, S.A. Donia, Production, optimization and partial purification of lipase from *Fusarium oxysporum*, *J. Appl. Sci. Environ. Sanit.* **5** (2010) 39–53.
- [3] S.B. Stojaković, D.I. Bezbradica, D.Ž. Mijin, Z.D. Knežević, S.S. Šiler-Marinković, The effect of zeolite and silica gel on synthesis of amyl isobutyrate catalyzed by lipase from *Candida rugosa*, *Hem. ind.* **62** (2008) 64–68.
- [4] Z. Knezevic, N. Milosavic, D. Bezbradica, Z. Jakovljevic, R. Prodanovic, Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Eupergit® C supports by covalent attachment, *Biochem. Eng. J.* **30** (2006) 269–278.
- [5] R. Sharma, Y. Chisti, U.C. Banerjee, Production, purification, characterization, and applications of lipases, *Biotechnol. Adv.* **19** (2001) 627–662.
- [6] D.S. Dheeman, G.T.M. Henehan, J.M. Frias, Purification and properties of *Amycolatopsis mediterranei* DSM 43304 lipase and its potential in flavour ester synthesis, *Bioresource Technol.* **102** (2011) 3373–3379.
- [7] S.Ž. Grbavčić, D.I. Bezbradica, I.M. Karadžić, Z.D. Knežević-Jugović, Lipases and proteases produced by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* strain as potential detergent additives, *Hem. ind.* **63** (2009) 331–335.
- [8] S.Y. Sun, Y. Xu, D. Wang, Novel minor lipase from *Rhizopus chinensis* during solid-state fermentation: Biochemical characterization and its esterification potential for ester synthesis, *Bioresource Technol.* **100** (2009) 2607–2612.
- [9] O. Kirk, M.W. Christensen, Lipases from *Candida antarctica*: Unique Biocatalysts from a Unique Origin, *Org. Process Res. Dev.* **6** (2002) 446–451.
- [10] A. Dimitrijević, D. Veličković, D. Bezbradica, F. Bihelović, R. Jankov, N. Milosavić, Production of lipase from *Pseudozyma aphidis* and determination of the activity and stability of the crude lipase preparation in polar organic solvents, *J. Serb. Chem. Soc.* **76** (2011) 1081–1092.
- [11] M.P. Deutscher, Guide to protein purification, *Methods Enzymol.* **182** (1990) 430.
- [12] M.A. Kwon, H.S. Kim, D.H. Hahm, J.K. Song, Synthesis activity-based zymography for detection of lipases and esterases, *Biotechnol. Lett.* **33** (2011) 741–746.
- [13] M. Adamczak, Synthesis, properties, and application of lipase from *Candida antarctica* for high yield monoacylglycerol biosynthesis, *Pol. J. Food Nutr. Sci.* **12** (2003) 3–8.
- [14] S.A. Patkar, F. Bjorking, M. Zundel, M. Schulein, A. Svendsen, H.P. Heldt-Hansen, E. Gormsen, Purification of two lipases from *Candida antarctica* and their inhibition by various inhibitors, *Indian J. Chem.* **32B** (1993) 76–80.
- [15] J. Uppenberg, N. Ohrner, M. Norin, K. Hult, G.J. Kleywegt, S. Patkar, V. Waagen, T. Anthonsen, T.A. Jones, Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols, *Biochemistry* **34** (1995) 16838–16851.
- [16] Z. Qian, J.R. Horton, X. Cheng, S. Lutz, Structural redesign of lipase B from *Candida antarctica* by circular permutation and incremental truncation, *J. Mol. Biol.* **393** (2009) 191–201.
- [17] H.S. Seo, S.E. Kim, K.Y. Han, J.S. Park, Y.H. Kim, S.J. Sim, J. Lee, Functional fusion mutant of *Candida antarctica* lipase B (Cal B) expressed in *Escherichia coli*, *Biochim. Biophys. Acta* **1794** (2009) 519–525.
- [18] E.J. Gilbert, A. Cornish, C.W. Jones, Purification and properties of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa* EF2, *J. Gen. Microbiol.* **137** (1991) 2223–2229.
- [19] M.L. Rua, C. Schmidt-Dannert, S. Wahl, A. Sprauer, R.D. Schmid, Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenulatus* large-scale production, purification and properties: aggregation behaviour and its effect on activity, *J. Biotechnol.* **56** (1997) 89–102.
- [20] W. Stuer, K.E. Jaeger, U.K. Winkler, Purification of Extracellular Lipase from *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Bacteriol.* **168** (1986) 1070–1074.
- [21] M.A. Salameh, J. Wiegel, Effects of Detergents on Activity, Thermostability and Aggregation of Two Alkalithermophilic Lipases from *Thermosyntropha lipolytica*, *Open Biochem. J.* **4** (2010) 22–28.
- [22] J. Pfeffer, S. Richter, J. Nieveler, C.E. Hansen, R.B. Rhlid, R.D. Schmid, M. Rusnak, High yield expression of lipase A from *Candida antarctica* in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and its purification and characterisation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **72** (2006) 931938.

SUMMARY**ELECTROPHORETIC AND ZYMOGRAPHIC TECHNIQUES FOR PRODUCTION MONITORING OF TWO LIPASE FORMS FROM *Candida antarctica* DSM 70725**

Aleksandra S. Dimitrijević, Dušan V. Veličković, Ratko M. Jankov, Nenad B. Milosavić

University of Belgrade, Faculty of Chemistry, Belgrade, Serbia

(Scientific paper)

Yeast *Candida antarctica* produces two lipase forms, which are widely used as catalysts in variety of organic reactions, many of which are applied on a large scale. In this work, production of two forms of lipase from *C. antarctica* DSM 70725 (CAL A and CAL B) was monitored during seven days of cultivation in the optimal medium using different electrophoretic and zymographic techniques. According to electrophoresis after silver staining, *C. antarctica* lipase A (molecular mass 45 kDa) was produced starting from the second day of cultivation. *C. antarctica* lipase B (CAL B) was also produced starting from the second day, but protein was present in the fermentation broth predominantly as dimer (molecular weight 66 kDa), while presence of monomeric form of CAL B (molecular weight of 33 kDa) was observed starting from the fourth day of cultivation. Both types of zymograms (based on hydrolysis and synthesis reactions) were used for detection of lipase activity in the fermentation broth. *C. antarctica* lipase A showed activity only in hydrolytic zymogram, when α -naphthyl butyrate was used as substrate. In the same zymogram, with α -naphthyl acetate as substrate no CAL A activity was detected. Similarly, CAL A showed no activity in synthesis based zymograms towards oleic acid and octanol as substrates, indicating that CAL A is not active towards very short- or long-chain substrates. As opposite of CAL A, both monomeric and dimeric form of CAL B were detected in the all zymograms, suggesting that CAL B is active towards wide range of substrates, regardless to the chain length. Thus, zymogram based on hydrolysis of α -naphthyl butyrate represents a simple method for monitoring the production of two forms of lipase from *C. antarctica*, that greatly differ in their characteristics.

Keywords: Lipase • *Candida antarctica* • electrophoresis • zymogram