

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACEUTICAS



**ENZIMAS LIPOLITICAS DE KRILL ANTARTICO: PURIFICACION
Y CARACTERIZACION, ¿ENZIMAS ADAPTADAS AL FRIO?**

**TESIS ENTREGADA A LA UNIVERSIDAD DE CHILE PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR EN BIOQUIMICA POR**

ANDRES ANTONIO BARRIGA GONZALEZ

Directores

Dr. Juan Asenjo

Dr. Barbara Andrews

SANTIAGO-CHILE

2006



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACEUTICAS

ESCUELA DE GRADUADOS

DOCTORADO EN BIOQUIMICA

**ENZIMAS LIPOLITICAS DE KRILL ANTARTICO: PURIFICACION Y
CARACTERIZACION, ¿ENZIMAS ADAPTADAS AL FRIO?**

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN BIOQUIMICA

ANDRES ANTONIO BARRIGA GONZALEZ

Directores

Prof. Dr. Juan Asenjo
Centro de Ingeniería Bioquímica y
Biotecnología
Departamento de Ingeniería Química y
Biotecnología
Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas
Universidad de Chile

Prof. Dr. Barbara Andrews
Centro de Ingeniería Bioquímica y
Biotecnología
Departamento de Ingeniería Química y
Biotecnología
Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas
Universidad de Chile

SANTIAGO-CHILE, 2006

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACEUTICAS

INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato:

ANDRES ANTONIO BARRIGA GONZALEZ

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Bioquímica, en el examen de defensa de Tesis rendido el día ____ de _____ de 2006.

Directores de Tesis:

Dr. Juan Asenjo

Dra. Barbara Andrews

Comisión Informante de Tesis:

Dr. Davor Cotoras (Presidente)

Dr. Romilio Espejo

Dra. Ana María Jabalquinto

Dr. Tito Ureta

Dr. Rafael Vicuña

*Hay una casa sola, sin luz
donde yo logré ocultarme
casi pude de tristeza, llorar
de un ayer cruel, infame.*

*Algunas horas allí pensando
pero nada conseguí
de pronto en la cama estaba yo
y llorando al fin me dormí*

*Y entre mis sueños yo me vi
de pie, en la nueva calle
buscando la puerta del amor
y yo ya no sufrí al ver
que esa puerta se abre
hoy siento dentro de mí... el amor.*

*Contento y sin dudas desperté
recordando aquella calle
de un pueblo llamado libertad
donde yo llegué a encontrarme
salté de la cama, bajé al bar
tú te hallabas junto a mí
perdona te dije, sonreí
me miraste, fui feliz.*

*Y entre mis sueños yo me vi
de pie, en la nueva calle
buscando la puerta del amor
y yo ya no sufrí al ver
que esa puerta se abre
hoy siento dentro de mí... el amor.*

*Junto a la puerta del amor
te hallé y logré besarte
mis sueños son ya realidad, amor.*

*Junto a la puerta del amor
te hallé y logré besarte
te siento dentro de mí.*

Dedico esta tesis a mis padres, Arsenia y Florentino.

AGRADECIMIENTOS

No existe palabra alguna, no existe una cantidad de veces suficiente con la que pueda agradecer todo lo que mi familia, mis padres Arsenia y Florentino y mis hermanos Rodrigo y Germán, me ha entregado. Por todo su apoyo, comprensión, consejos y amor, infinitas gracias por ser mi familia. He comenzado a desarrollarme como profesional y daré mi máximo esfuerzo por sembrar y cultivar lo que ustedes me enseñaron para lograrlo.

Agradezco a mis directores de tesis, Dr. Juan Asenjo y Dra. Barbara Andrews por haberme permitido realizar mi tesis en su centro de investigación (CIByB), por haber confiado en mí y apoyado durante el desarrollo de mí tesis.

Quiero hacer extensivo mis agradecimientos a la Dra. María Antonieta Valenzuela, Dra. Daniela Seelenfreund, Dra. María Elena Lienqueo y Dra. Oriana Salazar por su apoyo y tiempo.

Uno en la vida conoce muchas personas, sin embargo, sólo unas pocas logran marcar nuestra vida, y quiero agradecer particularmente a las personas que conociera en el CIByB, porque realmente los he sentido como una familia, con los cuales compartí muchos momentos felices, de quienes he aprendido muchas cosas, tanto para mi vida profesional como espiritual. Muchas gracias Nancy, Bárbara, Andrea, Paola, Consuelo, Karin, Julia, Álvaro, Darío, Cristian, Fernando, Juan Pablo, Ignacio, Juan Luis, don Patricio... y si alguno no se encuentra en la lista, en realidad más que escribir sus nombres, son sus recuerdos los que llevaré siempre conmigo. He hecho verdaderos amigos.

FINANCIAMIENTO

Esta Tesis de Doctorado se realizó en el Centro de Ingeniería Bioquímica y Biotecnología (CIByB), Departamento de Ingeniería Química y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad de Chile.

Este trabajo fue financiado por el proyecto FONDEF 01-1031 "Investigación, desarrollo y producción de proteasas y lipasas criofílicas comerciales de fuentes marinas" y del proyecto MILENIUM-MIDEPLAN ICM-P 99-031-F de responsabilidad de Dr. Juan Asenjo y Dra. Barbara Andrews.

Cabe destacar además el apoyo brindado por CONICYT a través de la Beca para Estudios de Doctorado entre los años 2002 y 2005, Beca de financiamiento parcial de Tesis de Postgrado del Departamento de Postgrado y Postítulo de la Universidad de Chile PG/111/2002 y PG/85/2003 y Beca Instituto Milenio para Término de Tesis Doctoral 2005.

INDICE

Agradecimientos, *iv*

Financiamiento, *v*

Indice, *vi*

Indice de figuras, *xii*

Indice de tablas, *xv*

Resumen, *xvii*

Abstract, *xix*

Introducción, 1

Enzimas adaptadas/activas a bajas temperaturas (criofílicas), 3

Características de las enzimas criofílicas, 3

Aplicaciones industriales, 6

Fuentes de enzimas criofílicas, 8

Descripción del krill, 9

Krill, fuente de enzimas adaptadas/activas a bajas temperaturas, 12

Enzimas lipolíticas, 13

Características, 13

Lipasas, aplicaciones industriales, 18

Lipasas criofílicas de krill antártico: un nuevo proyecto biotecnológico, 19

Hipótesis, 20

Objetivos, 20

General, 20

Específicos, 20

Diseño experimental, 22

Materiales y métodos, 25

Espécimen (krill antártico), 25

Preparación del extracto de krill mediante autólisis, 25

Preparación del extracto de krill mediante homogenización, 26

Separaciones cromatográficas, 27

Separaciones electroforéticas, 28

Remoción de lípidos y pigmentos presentes en los extractos de krill, 30

Medición de la actividad lipasa/actividad lipolítica, 31

Ensayo de actividad lipolítica *in situ*, 33

Renaturación *in situ* de proteínas en geles desnaturantes, 33

Determinación de la concentración de proteína, 33

Tinción de geles con solución de plata, 34

Determinación de masa molecular, 35

Determinación de punto isoeléctrico, 37

Extracción de RNA total de krill, 38

Aislamiento de RNA mensajero a partir de RNA total, 39

Síntesis de cDNA, 39

Amplificación de cDNA blanco, 40

Vectores, 41

Reacción de ligación, 42

Cepas bacterianas, 42

Transformación de células competentes, 42

PCR de colonias, 43

Minipreparación de DNA plasmidial, 44

Determinación de la pureza y concentración de DNA y RNA, 44

Purificación de DNA a partir de geles de agarosa, 44

Partidores, 44

Bases de datos y herramientas bioinformáticas, 47

Resultados, 50

Separación y obtención de enzimas lipolíticas de krill antártico, 50

Determinación de los ensayos enzimáticos para la detección de actividad lipolítica y actividad lipasa, 50

Evaluación de los procedimientos de autólisis y homogenización para la preparación del extracto krill, 52

Estudio de la preparación del extracto de krill mediante autólisis, 52

Estudio de la preparación del extracto de krill mediante homogenización, 60

Caracterización preliminar de las enzimas lipolíticas presentes en el extracto de krill, 67

Separación y obtención de enzimas lipolíticas purificadas mediante cromatografía y electroforesis, 69

Determinación de las características bioquímicas y fisicoquímicas de las enzimas lipolíticas purificadas de krill, 77

Determinación de las propiedades fisicoquímicas (masa molecular y punto isoeléctrico) de las enzimas lipolíticas purificadas utilizando técnicas cromatográficas y electroforéticas, 77

Caracterización de la enzima lipolítica purificada parcialmente de krill KLI, 77

Caracterización bioquímica de las enzimas lipolíticas purificadas en base a su actividad, estudios sobre el efecto de la temperatura y pH, 79

Caracterización de la enzima lipolítica purificada parcialmente de krill KLI, 79

Caracterización de la enzima lipolítica purificada de krill KL2, 80

Determinación de la energía de activación de las enzimas lipolíticas purificadas de krill, 82

Secuenciación y análisis de las secuencias de las enzimas lipolíticas de krill antártico, 83

Análisis preliminar de las secuencias aminoacídicas de enzimas lipolíticas de eucariontes: dominios y familias de lipasas, 83

Diseño de partidores para la amplificación de probables genes de enzimas lipolíticas de krill, 91

Determinación y análisis de las secuencias aminoacídicas/nucleotídicas de enzimas lipolíticas de krill, 99

Discusión, 107

Separación y obtención de enzimas lipolíticas de krill antártico, 107

Determinación de los ensayos enzimáticos para la detección de actividad lipolítica y actividad lipasa, 107

Evaluación de los procedimientos de autólisis y homogenización para la preparación del extracto de krill, 108

Caracterización preliminar de las enzimas lipolíticas presentes en el extracto de krill, 117

Separación y obtención de enzimas lipolíticas purificadas mediante cromatografía y electroforesis, 118

Determinación de las características bioquímicas y fisicoquímicas de las enzimas lipolíticas purificadas de krill, 119

Determinación de las propiedades fisicoquímicas (masa molecular y punto isoeléctrico) de las enzimas lipolíticas purificadas utilizando técnicas cromatográficas y electroforéticas, 119

Caracterización bioquímica de las enzimas lipolíticas purificadas en base a su actividad, estudios sobre el efecto de la temperatura y pH, 120

Determinación de la energía de activación de las enzimas lipolíticas purificadas de krill, 125

Secuenciación y análisis de las secuencias de las enzimas lipolíticas de krill antártico, 128

Análisis de las secuencias aminoacídicas de enzimas lipolíticas y diseño de primers para la amplificación de probables genes de enzimas lipolíticas de krill, 128

Análisis de las secuencias aminoacídicas/nucleotídicas de enzimas lipolíticas de krill, 132

Enzimas lipolíticas de krill antártico: purificación y caracterización, 136

Enzimas lipolíticas de krill antártico: ¿enzimas adaptadas al frío?, 140

Conclusiones, 143

Bibliografía, 147

INDICE DE FIGURAS

Introducción

- Figura 1.* Anatomía del krill antártico, 10
- Figura 2.* Diagrama del plegamiento α/β -hidrolasa, 16
- Figura 3.* Mecanismo catalítico de las lipasas, 17

Diseño experimental

- Figura 4.* Estrategia experimental, 24

Resultados

- Figura 5.* Obtención de proteína bajo diferentes condiciones de temperatura y tiempo en la preparación del extracto de krill mediante autólisis, 53
- Figura 6.* Actividad lipasa bajo diferentes condiciones de temperatura y tiempo en la preparación del extracto de krill mediante autólisis, 54
- Figura 7.* Recuperación de actividad lipasa y proteína para los distintos cortes de separación realizados con sulfato de amonio, 57
- Figura 8.* Ensayo de actividad lipolítica *in situ* para cortes diferenciales con sulfato de amonio, 59
- Figura 9.* Efecto del pH sobre el proceso de homogenización en el rendimiento de actividad lipasa y proteína, 62
- Figura 10.* Actividad lipasa específica y obtención de proteína para diferentes tiempos en la preparación del extracto de krill mediante homogenización, 64

- Figura 11.* Actividad lipasa específica y obtención de proteína para diferentes condiciones de velocidad en la preparación del extracto de krill mediante homogenización, 65
- Figura 12.* Ensayo de actividad *in situ* de homogenizados tratados para la eliminación de lípidos y pigmentos, 67
- Figura 13.* Determinación del punto isoelectrico de las enzimas lipolíticas de krill, 69
- Figura 14.* Cromatografía de filtración en gel, 70
- Figura 15.* Cromatografía de enfoque isoelectrico (cromatoenfoco), 70
- Figura 16.* Cromatografía de afinidad, 71
- Figura 17.* Cromatografía de intercambio aniónico en Q-sepharose, 72
- Figura 18.* Esquema de la secuencia de purificación de los pooles con actividad lipasa, 73
- Figura 19.* Actividad *in situ* post-electroforesis para las dos etapas electroforéticas de purificación de KL1, 75
- Figura 20.* Determinación de las características físicoquímicas de la enzima lipolítica purificada KL1, 78
- Figura 21.* Actividad enzimática a diferentes temperaturas de la lipasa purificada KL1, 79
- Figura 22.* Actividad enzimática a diferentes pHs de la enzima purificada KL1, 80
- Figura 23.* Actividad enzimática a diferentes temperaturas de la lipasa purificada KL2, 81
- Figura 24.* Actividad enzimática a diferentes pHs de la enzima purificada KL2, 81
- Figura 25.* Determinación de la energía de activación (E_a), 83

Figura 26. Esquema de algunas regiones conservadas en las diferentes familias de lipasas, 88

Figura 27. Sitio activo y cavidad oxianiónica de las familias de lipasas seleccionadas, 89

Figura 28. Conserved Domain Database (CDD), 92

Figura 29. Lipase Engineering Database (LED), 95

Figura 30. Blocks WWW Server, 97

Figura 31. Análisis de los productos de PCR sobre cDNA de krill utilizando distintas combinaciones de los partidores OXF/ACR, 101

Figura 32. Análisis de los productos de PCR sobre cDNA de krill utilizando los partidores diseñados, 103

Discusión

Figura 33. Actividad en función de la temperatura de lipasas activas/adaptadas a diferentes condiciones de temperatura, 124

Figura 34. Comportamiento de la actividad lipasa de KL1 en función de la temperatura, 127

Figura 35. Esquema del reconocimiento de los partidores OXF1/ACR1 y su secuencia amplificada, 131

Figura 36. Secuencia consenso determinada para la familia de lipasas de insectos, 135

INDICE DE TABLAS

Materiales y métodos

Tabla 1. Partidores, 45

Tabla 2. Bases de datos y herramientas bioinformáticas, 48

Tabla 3. Análisis de similitud de secuencias, 49

Resultados

Tabla 4. Hidrólisis no enzimática en los ensayos de actividad lipasa utilizados en esta tesis, 52

Tabla 5. Recuperación de actividad lipasa y proteína en autolisados tratados con diferentes procedimientos de eliminación de lípidos y pigmentos, 56

Tabla 6. Efectividad del tamponamiento en la preparación del extracto de krill mediante homogenización, 61

Tabla 7. Recuperación de actividad lipasa y proteína en homogenizados sometidos a diferentes procedimientos de remoción de lípidos y pigmentos, 66

Tabla 8. Características de los pools obtenidos de la segunda etapa cromatográfica de las fracciones I, II y III separadas en Q-sepharose, 74

Tabla 9. Tabla de purificación de KL1, 76

Tabla 10. Características de la enzima KL1 purificada parcialmente, 78

Tabla 11. Secuencias consenso de los dominios de lipasas eucariontes seleccionados, 85

Tabla 12. Secuencias consenso de las familias de lipasas relacionadas con el proceso de digestión, 86

- Tabla 13.* Secuencias consenso de bloques de lipasas relacionadas con la digestión, 87
- Tabla 14.* Análisis de las secuencias consenso de los dominios de lipasas eucariontes seleccionados, 93
- Tabla 15.* Análisis de las secuencias consenso de las familias de lipasas seleccionadas, 94
- Tabla 16.* Análisis de las secuencias consenso de bloques de lipasas seleccionadas, 96
- Tabla 17.* Partidores diseñados para la búsqueda de probables genes de lipasas de krill antártico, 99
- Tabla 18.* Análisis de las secuencias obtenidas de KL2 en bases de datos, 100
- Tabla 19.* Análisis de las secuencias amplificadas con los partidores OXF/ACR en bases de datos, 102
- Tabla 20.* Análisis de las secuencias amplificadas con los partidores diseñados para la inspección de genes para lipasas, 104

Discusión

- Tabla 21.* Actividad lipolítica en crustáceos, 121
- Tabla 22.* Características de las lipasas adaptadas/activas a bajas temperaturas, 122
- Tabla 23.* Similitud de secuencias entre las lipasas bacterianas, 130
- Tabla 24.* Limitaciones en la determinación de la similitud de las secuencias de lipasas, 133

RESUMEN

Enzimas lipolíticas de krill antártico: purificación y caracterización, ¿enzimas adaptadas al frío?

La temperatura es uno de los factores ambientales más importantes para la vida, siendo los ambientes fríos los que presentan la mayor distribución en la biosfera. Diferentes organismos han desarrollado diversas estrategias de tolerancia y adaptación al frío, entre ellas la síntesis de enzimas adaptadas/activas a bajas temperaturas. Estas enzimas especializadas se caracterizan por una alta eficiencia catalítica, temperaturas óptimas desplazadas a bajas temperaturas y termolabilidad a temperaturas moderadas. La disponibilidad del krill antártico, pequeño crustáceo explotado con fines comerciales, ha permitido el estudio de sus actividades enzimáticas. En el Centro de Ingeniería Bioquímica y Biotecnología los estudios se han centrado principalmente en la actividad proteasa y lipasa. Las enzimas lipolíticas están involucradas en el metabolismo lipídico, siendo las lipasas responsables de la hidrólisis y síntesis de triacilgliceroles.

Basados en estos antecedentes se propone la siguiente hipótesis de trabajo: “el krill antártico *Euphausia superba* Dana posee enzimas lipolíticas adaptadas al frío, capaces de actuar *in vitro* a bajas temperaturas”, para el abordaje de esta hipótesis se desarrollaron tres objetivos específicos: (i) separación y obtención de enzimas lipolíticas de krill antártico, (ii) determinación de las características bioquímicas y fisicoquímicas de las enzimas lipolíticas purificadas y (iii) secuenciación y análisis de las secuencias de las enzimas lipolíticas de krill antártico.

Se examinaron las condiciones para la obtención de un adecuado extracto enzimático, el procedimiento de autólisis a 40°C durante 24 h o la homogenización a

8.300 rpm durante 1-2 min a 4°C, permitió la obtención de un extracto con alta actividad lipasa específica. Se trabajó con dos enzimas lipolíticas de krill antártico, KL1 y KL2. La enzima lipolítica purificada KL1 presentó una masa molecular de 50 kDa y pI de 6,6 con una actividad sobre *p*-nitrofenilpalmitato (C16) de $2,9 \times 10^{-3}$ U/mg a 20°C y pH 8, presentó una temperatura óptima de 40°C y pH óptimo de 9. KL1 exhibió un comportamiento inusual a temperaturas moderadas, sin embargo, a 10°C retuvo el 23% de su actividad máxima. Se determinó una energía de activación de 24,7 kcal/mol (25-40°C). Adicionalmente se caracterizó la enzima lipolítica KL2 previamente purificada que presentó una temperatura óptima a 37°C y pH óptimo de 8, retuvo el 46% de su actividad máxima a 10°C. Se determinó una energía de activación de 4,9 kcal/mol (10-37°C). Las características de KL1 indicarían que corresponde a una enzima mesofílica, en cambio, KL2 presentaría las propiedades de adaptación al frío (baja energía de activación y actividad a bajas temperaturas). El análisis de las secuencias de lipasas eucariontes realizado para el diseño de partidores para la identificación y amplificación PCR de genes de lipasas de krill antártico indicó que las lipasas presentan una baja similitud entre sus secuencias aminoacídicas, la ausencia de aminoácidos conservados contiguos y la pequeña longitud de las zonas conservadas. El análisis de las secuencias amplificadas por PCR no indicó similitud con lipasas. De igual modo el análisis de la secuencia parcial de KL2 tampoco mostró similitud significativa con lipasas. La ausencia de similitud probablemente se debería a las características antes señaladas de las lipasas, como también la posibilidad que correspondan a nuevas lipasas.

ABSTRACT

Lipolytic enzymes of Antarctic krill: purification and characterization, cold-adapted enzymes?

Temperature is one of the most important environmental factors for life, cold habitats display the greater distribution in the biosphere. Different organisms have evolved diverse strategies of tolerance and adaptation to cold among them the synthesis of cold-adapted/active enzymes. These specialized enzymes are characterized by a high catalytic efficiency, optimal temperatures displaced to low temperatures and thermolability at low temperatures. The availability of Antarctic krill, a small shrimp exploited with commercial purposes, has allowed the study of its enzyme activities. In the Centre of Biochemical Engineering and Biotechnology the studies have been mainly focused on protease and lipase activities. Lipolytic enzymes are involved in lipid metabolism, and lipases are responsible for the hydrolysis and synthesis of triacylglycerols.

Based on these precedents the following hypothesis was proposed: “Antarctic krill *Euphausia superba* Dana presents lipolytic cold-adapted enzymes, which have *in vitro* enzyme activity at low temperatures”, the approach to this hypothesis was achieved through three specific objectives: (i) lipolytic enzyme purification from Antarctic krill, (ii) determination of the physicochemical and biochemical properties of purified lipolytic enzymes from krill and (iii) sequencing and analysis of lipolytic enzyme sequences from Antarctic krill.

The conditions for obtaining an adequate enzymatic extract were examined, autolysis at 40°C for 24 h and homogenization at 8,300 rpm for 1-2 min and 4°C allowed

an extract with high specific lipase activity. Two lipolytic enzymes from Antarctic krill, KL1 and KL2, were examined. The lipolytic enzyme KL1 was purified and showed a molecular mass of 50 kDa and pI of 6.6 with an activity on *p*-nitrophenylpalmitate (C16) of 2.9×10^{-3} U/mg at 20°C and pH 8. KL1 displayed an optimal temperature of 40°C and pH of 9. However, KL1 showed an unusual behavior at moderate temperatures, at 10°C it retained 23% of its maximum activity. An activation energy of 24.7 kcal/mol (25-40°C) was determined. Additionally, a previously purified lipolytic enzyme, KL2, was characterized. KL2 showed an optimal temperature of 37°C and pH of 8, and retained 46% of its activity at 10°C. An activation energy of 4.9 kcal/mol (10-37°C) was determined. The properties of KL1 would indicate that it corresponds to a mesophilic enzyme. On the other hand, KL2 shows cold-adapted features, *i.e.*, a low activation energy and activity at low temperatures. The analysis of eukaryotic lipase sequences pointed out that lipases present low similarity among their sequences, the absence of conserved contiguous amino acids and small length of the conserved zones. This analysis was used for the design of new primers for the identification and PCR-amplification of lipase genes from Antarctic krill. The analysis of the obtained sequences from PCR amplifications did not indicate significant similarities with lipases in databases. The partial sequence analysis of KL2 also did not show significant similarities with lipase sequences. The absence of similarity is probably due to the characteristics of lipase sequences and also the possibility that sequences correspond to novel lipases.

INTRODUCCIÓN

La diversidad de condiciones climáticas en conjunto con diferentes factores geográficos originan una variedad de ambientes, muchos de los cuales resultan inhóspitos e incluso extremos para la vida humana y, sin embargo, se encuentran colonizados por un sinnúmero de organismos. La mayor parte de estos organismos “extremófilos” corresponde a procariontes, aunque es posible encontrar organismos eucariontes. Dependiendo de las características del hábitat, los extremófilos se pueden dividir en: (i) termófilos (altas temperaturas), (ii) criófilos o psicrófilos (bajas temperaturas), (iii) acidófilos (altas concentraciones de ácido), (iv) alcalófilos (altas concentraciones de bases), (v) halófilos (altas concentraciones de sales), (vi) piezófilos o barófilos (elevadas presiones), (vii) xerófilos (alta sequedad ambiental), (viii) radiófilos (altos niveles de radiación ionizante y ultravioleta), (ix) metalófilos (alta concentración de metales), etc. [Jaenicke y Závodszky, 1990; Jaenicke, 1991; Jaenicke y Böhm, 1998; Hough y Danson, 1999; Niehaus *et al.*, 1999; Rossi *et al.*, 2003; Van Den Burg, 2003; Beales, 2004; Gomes y Steiner, 2004]. En general, los ambientes extremos presentan más de una condición inhóspita, por lo que los organismos extremófilos exhiben una combinación de adaptaciones.

La temperatura es uno de los factores ambientales más importantes para la vida y entre las diferentes condiciones de temperatura, los ambientes fríos son los que presentan la mayor distribución en la biosfera. Se estima que alrededor del 90% de la biosfera presenta temperaturas menores a 10°C, como las regiones ártica y antártica, regiones montañosas en la superficie terrestre, el mar que cubre el 70% de la superficie y que bajo los 1.000 m de profundidad la temperatura no excede los 5°C [Gerday *et al.*,

1997; Sheridan *et al.*, 2000; Gianese *et al.*, 2001; Feller y Gerday, 2003; Georlette *et al.*, 2004]. En los ambientes fríos habita una gran diversidad de organismos que incluye procariontes y eucariontes. Entre los eucariontes se encuentran crustáceos, peces, e inclusive organismos mayores [Arpigny *et al.*, 1997; Feller y Gerday, 2003; Georlette *et al.*, 2004]. La mayor parte de estos organismos son ectotermos (poiquilotermos), esto es, organismos que regulan su temperatura corporal por intercambio de calor con el ambiente que les rodea. Estos organismos han desarrollado una serie de estrategias de tolerancia y adaptación al frío [Gerday *et al.*, 2000], que les permite compensar el efecto de las bajas temperaturas y mantener su homeostasis [Johnston, 1990]. Entre las estrategias de tolerancia y adaptación al frío, estos organismos han desarrollado una vasta disposición de ajustes, que dependiendo del organismo, van desde un nivel molecular (*e.g.*, modificaciones en las cinéticas enzimáticas, la síntesis de moléculas especializadas de protección como proteínas de estrés frente al frío o proteínas anticongelantes), nivel supramolecular y subcelular (*e.g.*, la regulación de la fluidez de la membrana celular, la regulación de los canales iónicos, la modificación de las cinéticas de polimerización/despolimerización de los microtúbulos, el aumento del contenido celular de mitocondrias, etc.) hasta un nivel fisiológico (*e.g.*, modificaciones en las vías bioquímicas, modificaciones de los sistemas fisiológicos, dormancia estacional, etc.) [Feller y Gerday, 1997]. Una de las estrategias de tolerancia/adaptación al frío más ampliamente utilizada entre los diferentes organismos es la modificación de las cinéticas enzimáticas, principalmente de aquellas enzimas claves en las vías metabólicas, aunque también observada en muchas otras enzimas. Esta adaptación es alcanzada a través de la síntesis de enzimas adaptadas/activas a bajas temperaturas [Arpigny *et al.*, 1997; Feller y Gerday, 1997; Lonhienne *et al.*, 2000].

Enzimas adaptadas/activas a bajas temperaturas (criofílicas)

Características de las enzimas criofílicas:

La temperatura es uno de los factores que afecta la mayor parte de las reacciones bioquímicas. Las bajas temperaturas aumentan la viscosidad del agua, disminuyen las velocidades de difusión de los solutos y del agua, disminuyen la solubilidad de las sales, aumentan la solubilidad de los gases, aumentan el pH de los tampones fisiológicos afectando la solubilidad y carga de los aminoácidos de las proteínas [Marshall, 1997] y principalmente afectan la velocidad de reacción [Marshall, 1997; D'Amico *et al.*, 2002; Hoyoux *et al.*, 2004]. Desde un punto de vista físicoquímico, relacionando la velocidad de reacción con la temperatura a través de la ecuación de Arrhenius ($k_{cat} = Ae^{-E_a/RT}$), si se comparan las reacciones que ocurren en un organismo mesófilo a 37°C *versus* un organismo que habita a 0°C, las velocidades de reacción disminuirían 16 a 80 veces en ausencia de mecanismos compensatorios [Arpigny *et al.*, 1997; Feller y Gerday, 1997; Lonhienne *et al.*, 2000].

Se ha observado que las enzimas adaptadas/activas a bajas temperaturas presentan las siguientes características: (i) alta eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m), las enzimas extracelulares que trabajan a concentraciones saturantes de sustrato tienden a aumentar su k_{cat} , en cambio, las enzimas intracelulares que enfrentan bajas concentraciones de sustrato tienden a disminuir K_m [Gianese *et al.*, 2001; Zecchinon *et al.*, 2001; D'Amico *et al.*, 2002; Hoyoux *et al.*, 2004], (ii) temperaturas óptimas desplazadas a bajas temperaturas [Russell, 2000; Zecchinon *et al.*, 2001; Feller y Gerday, 2003] y (iii) termolabilidad a temperaturas moderadas (20-60°C) [Gerday *et al.*, 1997; Russell, 2000; Zecchinon *et al.*, 2001; Feller y Gerday, 2003].

Una de las teorías más ampliamente difundida y documentada que trata de explicar la adaptación/actividad de las enzimas a bajas temperaturas, propone la interrelación actividad-estabilidad-flexibilidad. Esta teoría se basa principalmente en observaciones obtenidas de alineamientos múltiples de secuencias aminoacídicas de enzimas de organismos adaptados a diferentes temperaturas, en el análisis termodinámico del plegamiento de las proteínas en función de la temperatura y en estudios de evolución dirigida. Y propone que para alcanzar tal objetivo, estas enzimas presentan modificaciones estructurales respecto de sus equivalentes mesófilos, de forma de disminuir el número de interacciones intrapeptídicas que deben romperse durante la catálisis, proporcionándoles una estructura más flexible en aquellas regiones involucradas con los cambios conformacionales durante la catálisis y manteniendo una estructura rígida en aquellas regiones no relacionadas con el proceso catalítico [Marshall, 1997; Lonhienne *et al.*, 2000; Feller y Gerday, 2003; Georlette *et al.*, 2004]. Estas modificaciones que regulan la flexibilidad/rigidez, involucran diferentes niveles de la estructura proteica (*e.g.*, el empaque local de la cadena polipeptídica, los elementos secundarios y supersecundarios, dominios y subunidades). Diversos estudios indican que la flexibilidad se alcanzaría por un menor contenido de residuos de prolina y arginina que participan en la formación de pares iónicos, un mayor contenido de residuos de glicina en los dominios funcionales, una disminución del número de puentes de hidrógeno y de interacciones aromáticas, una mayor superficie hidrofílica y la mantención de las interacciones carga-dipolo en las hélices α [Arpigny *et al.*, 1997; Feller y Gerday, 1997; Marshall, 1997; Gerday *et al.*, 2000; Feller y Gerday, 2003; Georlette *et al.*, 2004].

Sin embargo, no todas las enzimas adaptadas/activas a bajas temperaturas disponen de estos ajustes [Vajda, 1999; Russell, 2000]. Se ha reportado por ejemplo, que la enzima citrato sintetasa de *Arthrobacter sp.* DS2-3R no presenta diferencias en el contenido de aminoácidos cargados ni en el de residuos de prolina respecto de sus homólogos mesófilos [Gerike *et al.*, 1997; Russell, 2000]. En el caso de la enzima triosa-fosfato isomerasa de *Vibrio marinus*, ésta presenta un mayor número de puentes de hidrógeno que sus respectivos homólogos mesófilos [Russell, 2000]. En estudios de evolución dirigida de subtilisina SSII del organismo mesófilo *Bacillus sphaericus*, sólo cuatro sustituciones aminoacídicas permitieron obtener una enzima mutante con 10 veces mayor actividad a 10°C que su predecesor, sin embargo, ninguna de las sustituciones se observó en subtilisinas adaptadas al frío [Wintrode *et al.*, 2000]. Respecto de la estabilidad de las enzimas activas/adaptadas al frío, la reducción de la hidrofobicidad observada podría interpretarse en el sentido que el efecto hidrofóbico no es favorecido a bajas temperaturas, por lo que presentaría una baja utilidad en la estabilización intramolecular a bajas temperaturas [Fields, 2001]. La correlación entre la estabilidad y la actividad ha sido examinada en diferentes estudios, sin embargo, algunos estudios han establecido que la correlación no es tan clara, por ejemplo, en estudios de mutagénesis sitio-dirigida sobre subtilisina de *Bacillus sp.* TA39 de origen antártico, se logró inesperadamente incrementar la estabilidad de la proteína sin afectar su actividad a bajas temperaturas [Feller *et al.*, 1996; Narinx *et al.*, 1997; Lonhienne *et al.*, 2000]. Por otra parte, estudios sobre la flexibilidad de las enzimas criofílicas utilizando el método de intercambio hidrógeno-deuterio han fallado en demostrar la mayor flexibilidad de estas enzimas respecto de enzimas adaptadas a diferentes condiciones de temperatura [Feller y Gerday, 1997; Fields, 2001; Zecchinon *et al.*, 2001]. De igual forma los

estudios de dinámica molecular no muestran diferencias significativas de flexibilidad entre enzimas adaptadas a diferentes temperaturas [Gerday *et al.*, 1997]. Adicionalmente, se ha señalado que los análisis de secuencias aminoacídicas de enzimas adaptadas a diferentes temperaturas no han utilizado secuencias de ortólogos que permitan distinguir eficientemente las sustituciones reales producto de la adaptación a bajas temperaturas del ruido filogenético, producto de la deriva genética [Sheridan *et al.*, 2000; Fields, 2001]. Recientemente se ha descrito que la regulación intracelular de los niveles de algunos metabolitos, denominados factores extrínsecos o sustratos estabilizadores (*e.g.*, 2,3-difosfoglicerato, α -manosilglicerato, derivados de mio-inositolfosfato y iones inorgánicos), podría regular la estabilidad de las proteínas en función de la temperatura de acuerdo a los requerimientos celulares [Fields, 2001].

Al parecer cada proteína o familia de proteínas utiliza uno o varios ajustes estructurales para adaptarse al frío [Russell, 2000; Fields, 2001; Hoyoux *et al.*, 2004].

Aplicaciones industriales:

Las características de las enzimas adaptadas/activas a bajas temperaturas, como la alta eficiencia catalítica a bajas temperaturas, la especificidad y menor estabilidad térmica, las convierten en candidatos para el desarrollo de productos con potencial biotecnológico para diversas actividades industriales [Marshall, 1997; Gerday *et al.*, 2000; Cavicchioli *et al.*, 2002; Gomes y Steiner, 2004]. Entre las principales aplicaciones industriales destacan:

- Industria de detergentes: la utilización de enzimas criofílicas como aditivos en detergentes reduciría el consumo energético (lavado a temperatura ambiental). Serían adecuados candidatos enzimáticos proteasas, lipasas, amilasas y celulasas.

- Industria textil: las enzimas criofílicas serían útiles en procesos como pulido biológico o biopulido (“biopolishing”), descoloración mediante lavado (“stone-washing”) y en el desarrollo de productos desmotantes (“antipilling”, *e.g.*, celulasas).
- Industria de alimentos: las enzimas criofílicas serían de gran utilidad en la industria de lácteos (*e.g.*, β -galactosidasa reduciría el contenido de lactosa), en la industria de jugos (*e.g.*, pectinasas), en la industria de las carnes (*e.g.*, proteasas), en la industria cervecera y vinícola, en la industria de quesos (*e.g.*, lipasas), etc.
- Industria biotecnológica: las enzimas criofílicas serían adecuadas para procesos de biorremediación en lugares que presentan variaciones estacionales de temperatura. La eficiente inactivación por temperatura permitiría su uso en productos para biología molecular, como por ejemplo, fosfatasa alcalina y T4-DNA ligasa.
- Industria química: las enzimas criofílicas serían adecuadas para procesos que involucran reactivos y productos sensibles a temperatura.
- Industria farmacéutica: las enzimas criofílicas, como las proteasas, serían adecuadas para su utilización en preparaciones para la limpieza de heridas externas, debido a que la piel está expuesta a variaciones de temperatura, y que, además, es menor a la temperatura corporal.

Fuentes de enzimas criofílicas:

Dependiendo de la relación espacio-temporal de los organismos adaptados a las bajas temperaturas, psicrófilos o criófilos, con sus ambientes fríos, se puede distinguir entre psicrófilos estenotermos y psicrófilos euritermos. Los psicrófilos estenotermos, corresponden a aquellos organismos que sólo pueden crecer dentro de un estrecho rango de temperaturas, y que corresponden a psicrófilos verdaderos u obligados, los que presentan una adaptación generalizada de sus funciones a bajas temperaturas. Los psicrófilos euritermos, son aquellos organismos que pueden crecer en un rango amplio de temperaturas. Corresponden a psicrófilos facultativos (psicrotolerantes y psicrótrofos), organismos que pueden tolerar importantes variaciones de temperaturas y que presentan adaptaciones a las bajas temperaturas en sus funciones claves [Feller y Gerday, 1997; Gerday *et al.*, 2000; Feller y Gerday, 2003].

La obtención de enzimas adaptadas/activas a bajas temperaturas tiene como fuente aquellos organismos tanto psicrófilos estenotermos como euritermos (psicrófilos verdaderos y psicrótrofos). A pesar de la diversidad de especies que habitan las zonas frías, la búsqueda de estos organismos involucra expediciones a regiones extremas de difícil acceso y su posterior selección en el laboratorio, donde resulta difícil reproducir las condiciones de crecimiento, además de su lento crecimiento (*e.g.*, el tiempo de generación bacteriano puede ser del orden de 2 a 10 h) [Arpigny *et al.*, 1997]. Por lo que los organismos psicrófilos resultan en general de difícil acceso, sin embargo, uno de los pocos organismos psicrófilos que se encuentra accesible es el krill antártico, razón por la cual es uno de los organismos psicrófilos más estudiados.

Descripción del krill:

El krill (orden Euphausiacea) es uno de los animales marinos más abundantes. El género *Euphausia* da cuenta de 31 especies de 85 conocidas de Euphausiacea, e incluye dos de las especies de krill más abundantes e importantes económicamente, *Euphausia superba* y *Euphausia pacifica*. El género *Euphausia* comprende 9 especies de distribución circumglobal [Jarman *et al.*, 2000]. En las aguas antárticas existen alrededor de 7 especies, siendo el krill antártico o *Euphausia superba* Dana la especie dominante [Jarman *et al.*, 2000].

El krill antártico (Figura 1) corresponde a un pequeño crustáceo que semeja un camarón que presenta una característica coloración rosada. El krill antártico puede alcanzar un tamaño de 6 cm y un peso promedio de 0,57 g. El krill es el principal constituyente del zooplancton y representa la mayor fuente alimenticia para ballenas, pingüinos y otras aves marinas. El krill es esencialmente herbívoro (alimentándose de fitoplancton o de pequeñas algas), aunque eventualmente puede tornarse carnívoro (alimentándose de zooplancton). Vive en grupos o cardúmenes que pueden alcanzar grandes densidades de individuos, cada grupo estaría constituido por individuos de una misma edad (*i.e.*, juveniles, adultos) [Hamner *et al.*, 1983].

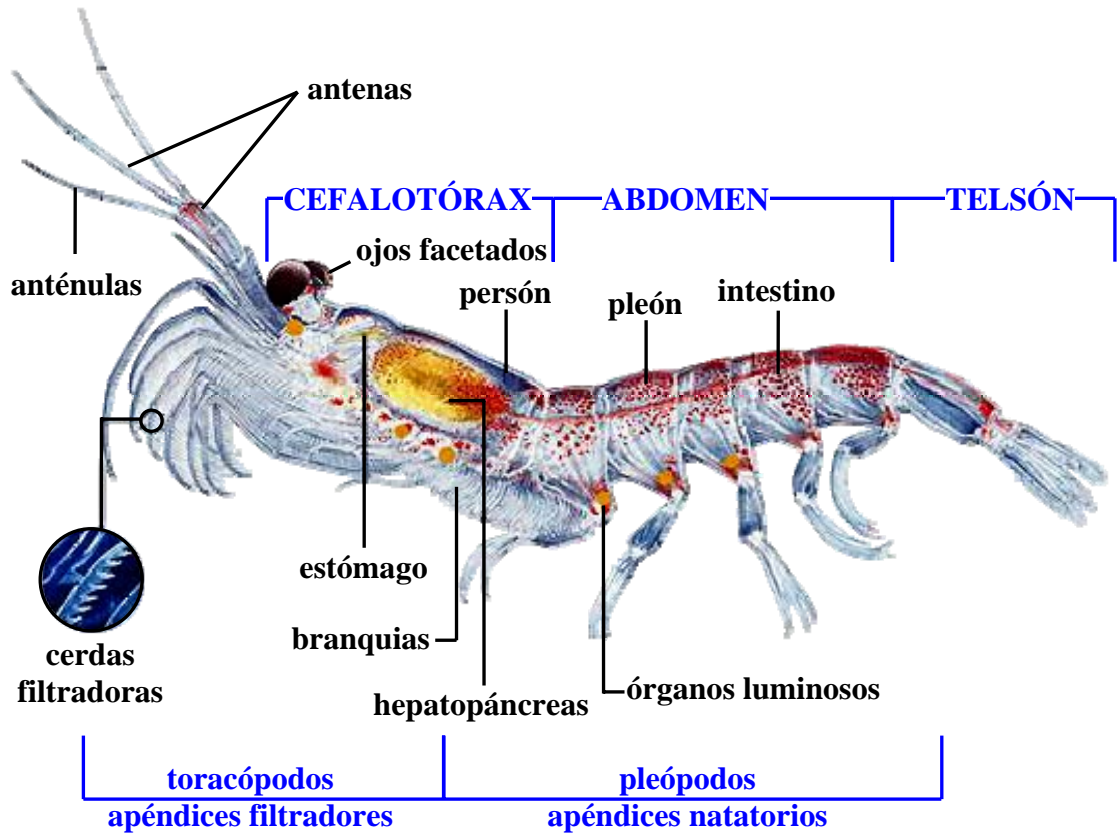


Figura 1. Anatomía del krill antártico. En el dibujo se señalan las principales partes y/o estructuras de la anatomía externa del krill. Se destaca de la anatomía interna los órganos del sistema digestivo.

La composición bioquímica del krill aún se encuentra bajo investigación, sin embargo, diferentes trabajos han establecido que el contenido lipídico del krill antártico varía estacionalmente, y además varía entre sexos, el grado de desarrollo y los diferentes cardúmenes [Virtue *et al.*, 1993; Cripps y Atkinson, 2000; Mayzaud *et al.*, 2000]. El contenido lipídico está dado principalmente por lípidos polares (fosfolípidos y glicolípidos) y lípidos neutros (triacilgliceroles) [Saether *et al.*, 1986; Virtue *et al.*, 1993; Falk-Petersen *et al.*, 2000]. El principal rol de los lípidos neutros sería como fuente energética, aunque también se ha descrito que participarían en la regulación de la flotación [Saether *et al.*, 1986; Falk-Petersen *et al.*, 2000].

El krill antártico dispone de diferentes adaptaciones que le permiten subsistir en el ambiente antártico. Durante los períodos de inanición puede producir un nuevo exoesqueleto de menor tamaño y “compactarse”, utilizando su antiguo exoesqueleto como fuente de proteínas [Peters *et al.*, 1998; Buchholz y Saborowski, 2000]. Adicionalmente, durante los períodos de inanición se ha observado que la actividad enzimática digestiva se encuentra disminuida en el estómago, sin embargo, en el hepatopáncreas se encuentra aumentada probablemente como reserva digestiva inmediatamente disponible para aquellos breves períodos de disponibilidad de alimentos [Buchholz y Saborowski, 2000]. Desde el punto de vista de protección frente a la radiación solar, los aminoácidos tipo micosporina presentes en sus tejidos, derivados del consumo de algas, absorberían la luz UV y participarían en la prevención del daño celular [Newman *et al.*, 2000]. También se ha descrito que el krill antártico presentaría una alta capacidad de reparación de su DNA [Jarman *et al.*, 1999]. Respecto de la adaptación al frío, el consumo de ácidos grasos poli-insaturados aportados por la ingesta de fitoplancton proveería de los ácidos grasos estructurales insaturados necesarios para la adecuada mantención de la fluidez de las membranas celulares [Mayzaud *et al.*, 2000].

Desde el punto de vista comercial, la captura anual de krill antártico asciende a varios cientos de toneladas por año, cuyo principal destino es la industria de alimentos para peces y animales. La captura y posterior procesamiento del krill se ve limitado por la rápida degradación, producto de la acción de las enzimas digestivas [Nicol y Endo, 1997] y también por la remoción del exoesqueleto debido a su alto contenido en flúor que puede resultar tóxico [Nicol y Endo, 1997; Sands *et al.*, 1998]. Entre los principales productos se encuentran los precipitados autoproteolíticos (para uso como colorantes y

saborizantes, los pigmentos del krill son responsables del color rosado de la carne de los salmones), concentrado de krill (para diferentes usos en el área de la salud humana, debido al alto contenido de oligoelementos, antioxidantes y ácidos grasos omega-3), hidrolizado de krill (para la industria de alimentos y acuicultura), etc. [Nicol y Endo, 1997]. En algunas regiones de Japón, parte de los productos obtenidos de krill son utilizados para el consumo humano como una fuente alimenticia rica en proteínas.

Krill, fuente de enzimas adaptadas/activas a bajas temperaturas:

La observación de la rápida degradación del krill durante su captura si no era congelado inmediatamente, fue reforzada posteriormente por diversos estudios que señalaron como responsables de la degradación o autólisis a enzimas del tracto digestivo [Osnes y Mohr, 1985; Turkiewics *et al.*, 1985; Turkiewics *et al.*, 1986; Ellingsen y Mohr, 1987; Sjødahl *et al.*, 2002]. Esto sumado a estudios sobre el comportamiento alimenticio del krill, que demostraron que la dieta consumida (fitoplancton y nanoplancton, ricos en proteínas, lípidos y carbohidratos) era rápidamente digerida a bajas temperaturas [Ellingsen y Mohr, 1987; Saborowski y Buchholz, 1999; Buchholz y Saborowski, 2000; Meyer *et al.*, 2002], lo cual indicaba la presencia de enzimas digestivas altamente activas.

Estas observaciones han servido de base para investigaciones de identificación de las actividades enzimáticas presentes en el krill, detectándose actividades proteasas, β -glucanasas, celulasas, xilanasas, α - y β -glicosidasas [Turkiewics *et al.*, 1985; Turkiewics *et al.*, 1986], etc. En el Centro de Ingeniería Bioquímica y Biotecnología, CIByB, los estudios conducidos sobre actividades enzimáticas presentes en el krill han detectado actividad proteasa (tripsina, aminopeptidasa, carboxipeptidasa) y lipasa [Salamanca,

2002; Gutiérrez, 2003; Barría, 2004]. Se ha purificado una enzima con actividad tripsina y su caracterización ha indicado que es una enzima adaptada/activa a bajas temperaturas [Salamanca *et al.*, 2002; Salamanca, 2002; Gálvez, 2002]. La continuación de la línea de investigación sobre la adaptación/actividad a bajas temperaturas se centrará en las lipasas.

Enzimas lipolíticas

Características:

Las enzimas lipolíticas están involucradas en la “degradación” de lípidos y por tanto, son importantes tanto en la movilización de lípidos intracelulares como en la transferencia de lípidos interorganismos. Las enzimas lipolíticas comprenden esterases, cutinasas y lipasas [Manco *et al.*, 1998; Pleiss *et al.*, 1998; Fojan *et al.*, 2000; Svendsen, 2000; Fischer y Pleiss, 2003].

Las lipasas son enzimas que en condiciones acuosas actúan sobre los enlaces carboxilésteres presentes en sus sustratos triacilgliceroles para liberar ácidos grasos, diacilgliceroles, monoacilgliceroles y glicerol [Jaeger *et al.*, 1993; Beisson *et al.*, 2000; Villeneuve *et al.*, 2000]. Los sustratos naturales son aquellos triacilgliceroles de cadena larga, que tienen baja solubilidad en agua, por lo que la reacción es catalizada en una interfaz lípido-agua, donde los sustratos lipídicos usualmente se encuentran en equilibrio entre los estados monoméricos, micelar y emulsionado. En condiciones micro-acuosas, las lipasas poseen la capacidad única de catalizar la reacción inversa, esto es, la esterificación. Además de su actividad, las lipasas poseen actividad esterasa y por tanto tienen un amplio rango de sustratos, aunque son catalizadores altamente específicos en un sentido quimio, regio y enantioselectivo [Gupta *et al.*, 2004]. Se consideran sustratos

para lipasas aquellos con un largo de cadena acilo ≥ 10 átomos de carbono y para estererasas aquellos con un largo de cadena < 10 átomos de carbono [Haas *et al.*, 1992; Jaeger *et al.*, 1999; Svendsen, 2000].

Aunque se ha señalado la baja similitud entre las secuencias aminoacídicas de las lipasas [Cygler *et al.*, 1993; Jaeger *et al.*, 1994; Jaeger *et al.*, 1999; Pleiss *et al.*, 2000], estas comparten una misma estructura de plegamiento denominada α/β -hidrolasa. Este plegamiento es compartido entre las demás enzimas lipolíticas (esterasas y cutinasas), como también por enzimas tan diversas como haloalcano deshalogenasas, acetilcolinesterasas, dienolactona hidrolasas, serina peptidasas y α -amilasas, etc. [Jaeger *et al.*, 1999; Gupta *et al.*, 2004].

El plegamiento α/β -hidrolasa (Figura 2) consiste de 8 láminas β centrales dispuestas en forma paralela a excepción de la segunda lámina β (lámina $\beta 2$) dispuesta en sentido antiparalelo. Las láminas $\beta 3$ a $\beta 8$ están conectadas por hélices α que rodean el sistema de láminas β centrales. Las láminas β conforman una estructura semicilíndrica. Las lipasas se diferencian en la posición de las hélices α , como también en los loops que entran en contacto con el sustrato [Jaeger *et al.*, 1999; Nardini y Dijkstra, 1999]. El sitio activo está constituido por una tríada altamente conservada: un nucleófilo (serina, cisteína o aspartato) ubicado posterior a la lámina $\beta 5$, un grupo ácido (aspartato o glutamato) situado generalmente a continuación de la lámina $\beta 7$ y una histidina altamente conservada ubicada a continuación de la última lámina β . Asociado al sitio activo se encuentra la cavidad oxianiónica formada por parte de la cadena polipeptídica, específicamente un residuo situado en la región N-terminal (entre lámina $\beta 3$ y hélice αA) y un residuo en la región C-terminal próximo al residuo nucleofílico catalítico

[Jaeger *et al.*, 1999; Nardini y Dijkstra, 1999; Pleiss *et al.*, 2000]. El residuo de la cavidad oxianiónica próximo al nucleófilo se encuentra estructuralmente conservado y puede formar parte de dos secuencias consenso: Gli-X y Gli-Gli-Gli-X [Pleiss *et al.*, 2000], originando dos tipos de cavidades oxianiónicas. El residuo nucleofílico del sitio activo está ubicado en un loop entre la lámina $\beta 5$ y la hélice αC denominado “codo catalítico”. El codo catalítico es identificado por la secuencia consenso Sm-X-Nu-X-Sm, donde Sm corresponde a un aminoácido pequeño, X a cualquier residuo y Nu al nucleófilo [Nardini y Dijkstra, 1999]. Si la serina forma parte del sitio activo, se presenta como parte de la secuencia consenso Gli-X-Ser-X-Gli [Jaeger *et al.*, 1999]. Algunas lipasas disponen estructuras adicionales que consisten en una o dos hélices α cortas unidas al cuerpo de la lipasa por elementos estructurales móviles y que constituyen “tapas”, las que restringen el acceso al sitio activo [Nardini y Dijkstra, 1999; Beisson *et al.*, 2000; Pleiss *et al.*, 2000]. Adicionalmente, el sitio activo consta de tres hendiduras o bolsillos que acomodan las cadenas acilos de los sustratos triacilgliceroles (denominadas *sn-1*, *sn-2* y *sn-3*). El carácter hidrofóbico y el tamaño de los bolsillos determinaría la preferencia de sustrato, incluyendo la enantioselectividad [Pleiss *et al.*, 1998; Jaeger *et al.*, 1999].

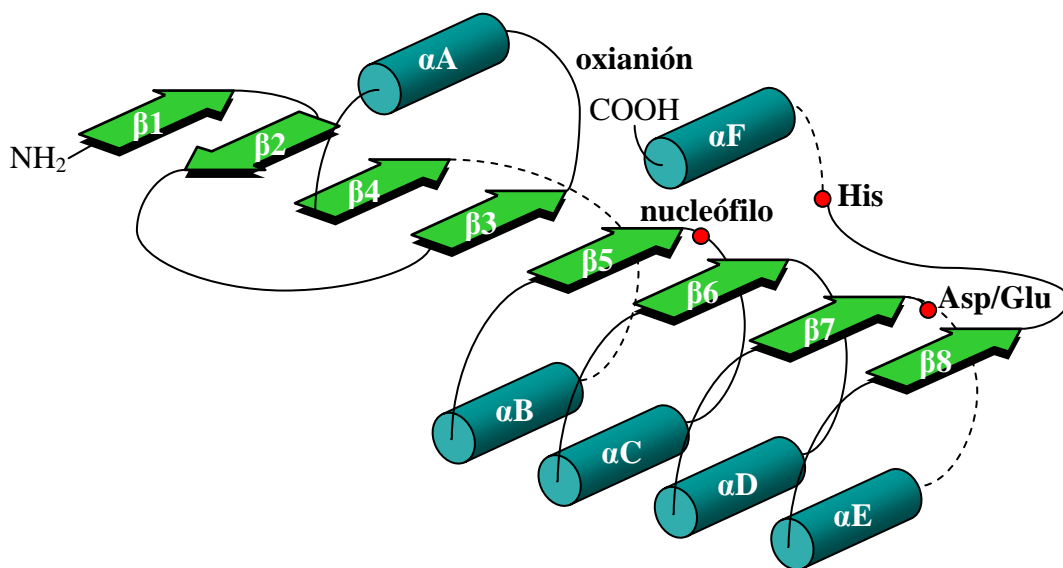


Figura 2. Diagrama del plegamiento α/β-hidrolasa. Las hélices α y las láminas β están representadas por los cilindros y flechas, respectivamente. La ubicación topológica de los residuos del sitio activo está señalada por círculos. Las líneas discontinuas indican la localización de posibles inserciones.

El mecanismo catalítico es esencialmente el mismo, tanto para lipasas como esterasas (Figura 3). En un primer paso, el sustrato interactúa con el residuo nucleofílico del sitio activo, formándose un intermediario tetraédrico, que es estabilizado por los residuos de la cavidad oxianiónica, la histidina y el residuo ácido del sitio activo. La transferencia de protón por parte de la histidina produce la liberación de alcohol y la formación de un intermediario covalente. Posteriormente, el ataque de un nucleófilo (agua en reacción de hidrólisis, alcohol o éster en reacción de trans-esterificación) forma nuevamente un intermediario tetraédrico. Finalmente, la transferencia de protón lleva a la formación de producto (un ácido o un éster) y a la regeneración de la enzima [Jaeger *et al.*, 1999; Bornscheuer, 2002].

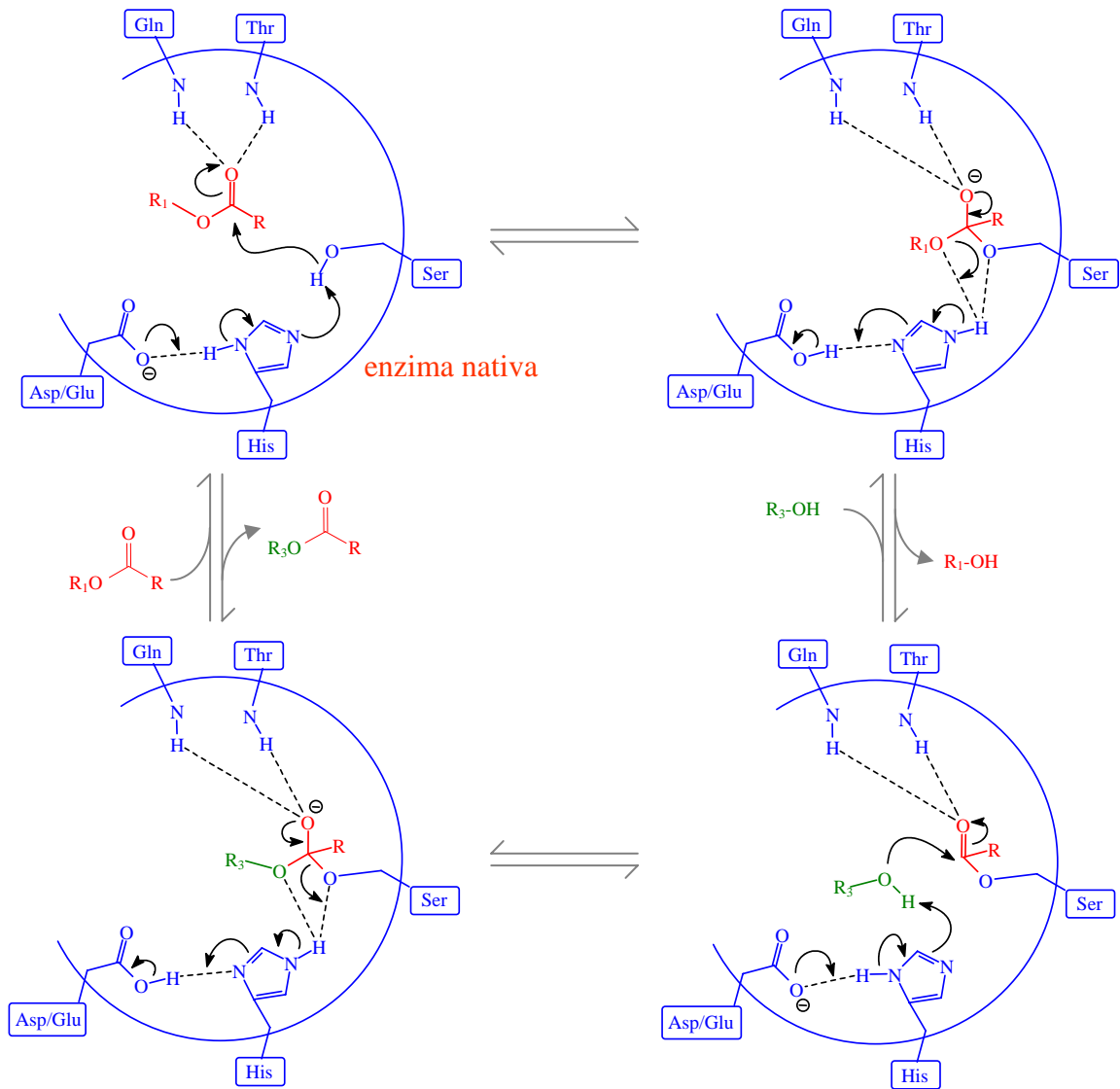


Figura 3. Mecanismo catalítico de las lipasas. En el esquema se indican los pasos involucrados en la catálisis enzimática de las lipasas: unión del sustrato, formación del intermediario tetraédrico, formación de intermediario covalente, formación de intermediario tetraédrico y liberación del producto final y regeneración del catalizador. La reacción catalizada puede corresponder a hidrólisis (si $R_3\text{-OH}$ es agua) o a esterificación (si $R_3\text{-OH}$ es un alcohol o éster).

Una característica notable de las lipasas es su comportamiento cinético cuando la concentración del sustrato (inicialmente en estado monomérico) sobrepasa su solubilidad (concentración micelar crítica) formando micelas o emulsión, observándose un considerable aumento de la actividad enzimática, fenómeno denominado activación

interfacial [Derewenda *et al.*, 1992; Jaeger *et al.*, 1999; Brzozowski *et al.*, 2000]. Este comportamiento se ha utilizado para diferenciar las lipasas de otras enzimas lipolíticas, sin embargo, parece ser un fenómeno no siempre observado y dependiente del sustrato [Verger, 1997].

Lipasas, aplicaciones industriales:

Las características de las lipasas, como la hidrólisis y síntesis de enlaces ésteres, las diferentes preferencias de sustratos, las distintas especificidades regio y enantioselectivas, les permiten tener un amplio espectro de aplicaciones industriales [Macrae, 1983; Gennaro, 1998; Pandey *et al.*, 1999; Sharma *et al.*, 2001; Bornscheuer, 2002; Jaeger y Eggert, 2002]. Entre sus principales aplicaciones se encuentran:

- **Industria de detergentes:** la actividad lipolítica se utiliza para la hidrólisis de aceites en la producción de jabones, obteniéndose productos de mejor calidad. También las lipasas se pueden incorporar como aditivos en las formulaciones de detergentes.
- **Industria de alimentos:** la capacidad de interesterificación de las lipasas se utiliza en el mejoramiento de las propiedades físicas de quesos y mantequillas.
- **Industria farmacéutica:** la actividad de esterificación se utiliza en la resolución de mezclas racémicas en la síntesis de productos farmacéuticos como en la síntesis de naproxeno, precursores de inhibidores de elastasa, ibuprofeno, antibióticos como indolmicina, agentes antidiabéticos y antioxidantes, etc. La actividad lipolítica también se utiliza en la preparación de productos cosméticos. Además, la actividad lipolítica se puede utilizar directamente como parte de sistemas comerciales para

el diagnóstico de triacilgliceroles sanguíneos y también como fármaco para personas con disfunción pancreática o malabsorción secundaria.

Lipasas criofílicas de krill antártico: un nuevo proyecto biotecnológico

Desde el punto de vista de ciencia básica esta tesis doctoral representa uno de los pocos trabajos existentes en la literatura sobre la purificación y caracterización de enzimas lipolíticas de crustáceos, y en particular de krill antártico *Euphausia superba* Dana. Adicionalmente, el krill antártico ofrece la posibilidad de estudiar enzimas lipolíticas potencialmente adaptadas/activas a bajas temperaturas, de las que en la actualidad existen pocas descritas en la literatura.

Desde el punto de vista de ciencia aplicada, esta tesis doctoral evaluará el comportamiento de las enzimas lipolíticas de krill antártico bajo distintas condiciones que indicarían potenciales aplicaciones biotecnológicas.

HIPÓTESIS

“El krill antártico *Euphausia superba* Dana posee enzimas lipolíticas adaptadas al frío, capaces de actuar *in vitro* a bajas temperaturas”.

OBJETIVOS

General

Determinar las características de las enzimas lipolíticas purificadas de krill antártico *Euphausia superba* Dana que permiten su actividad/adaptación a bajas temperaturas.

Específicos

1. Separación y obtención de enzimas lipolíticas de krill antártico.
 - Determinación de los ensayos enzimáticos para la detección de actividad lipolítica y actividad lipasa.
 - Evaluación de los procedimientos de autólisis y homogenización para la preparación del extracto krill.
 - Caracterización preliminar de las enzimas lipolíticas presentes en el extracto de krill.
 - Separación y obtención de enzimas lipolíticas purificadas mediante cromatografía y electroforesis.

2. Determinación de las características bioquímicas y fisicoquímicas de las enzimas lipolíticas purificadas de krill.
 - Determinación de las propiedades fisicoquímicas (masa molecular y punto isoeléctrico) de las enzimas lipolíticas purificadas utilizando técnicas cromatográficas y electroforéticas.
 - Caracterización bioquímica de las enzimas lipolíticas purificadas en base a su actividad, estudios sobre el efecto de la temperatura y pH. Determinación de la energía de activación de las enzimas lipolíticas purificadas de krill.

3. Secuenciación y análisis de las secuencias de las enzimas lipolíticas de krill antártico.
 - Análisis preliminar de las secuencias aminoacídicas de enzimas lipolíticas de eucariontes: dominios y familias de lipasas.
 - Diseño de partidores para la amplificación de probables genes de enzimas lipolíticas de krill.
 - Determinación y análisis de las secuencias aminoacídicas/nucleotídicas de enzimas lipolíticas de krill.

DISEÑO EXPERIMENTAL

A continuación se describe brevemente la estrategia experimental utilizada para la realización de los objetivos propuestos (Figura 4).

El objetivo específico 1 contempló la identificación de la actividad lipolítica presente en el extracto enzimático y su caracterización para utilizarlo como referencia en las posteriores etapas de purificación. Para ello se estudió las ventajas y desventajas de la preparación del extracto enzimático mediante autólisis u homogenización. Se examinó el efecto de la remoción de lípidos y pigmentos contaminantes en la preparación del extracto enzimático. De igual forma se examinó el efecto de la precipitación con sulfato de amonio en intervalos de corte de 10% de saturación sobre la preparación del extracto enzimático, de modo de facilitar la posterior separación de las enzimas lipolíticas. Se realizaron diferentes electroforesis para identificar el número de enzimas presentes con actividad lipolítica y algunas de sus propiedades como masa molecular y punto isoelectrico, propiedades que pueden ayudar en su posterior purificación. Se realizaron diferentes separaciones cromatográficas para establecer la mejor combinación de cromatografías para la purificación de las enzimas lipolíticas presentes en el extracto de krill antártico.

El objetivo específico 2 contempló la determinación de las características fisicoquímicas y bioquímicas de las enzimas lipolíticas. Se determinó la masa molecular y punto isoelectrico para las enzimas lipolíticas purificadas (propiedades

fisicoquímicas). Se estudió las propiedades bioquímicas como el efecto del pH o temperatura sobre la actividad lipolítica de las enzimas purificadas.

El tercer objetivo contempló la secuenciación de enzimas lipolíticas de krill antártico. A la estrategia inicial de obtención de las secuencias parciales a partir de las enzimas lipolíticas purificadas, se consideró el trabajo complementario de identificación de probables genes de enzimas lipolíticas en base al análisis preliminar de las secuencias aminoacídicas de enzimas lipolíticas de eucariontes que permitió el diseño de un conjunto de partidores específicos para la detección y amplificación de enzimas lipolíticas.

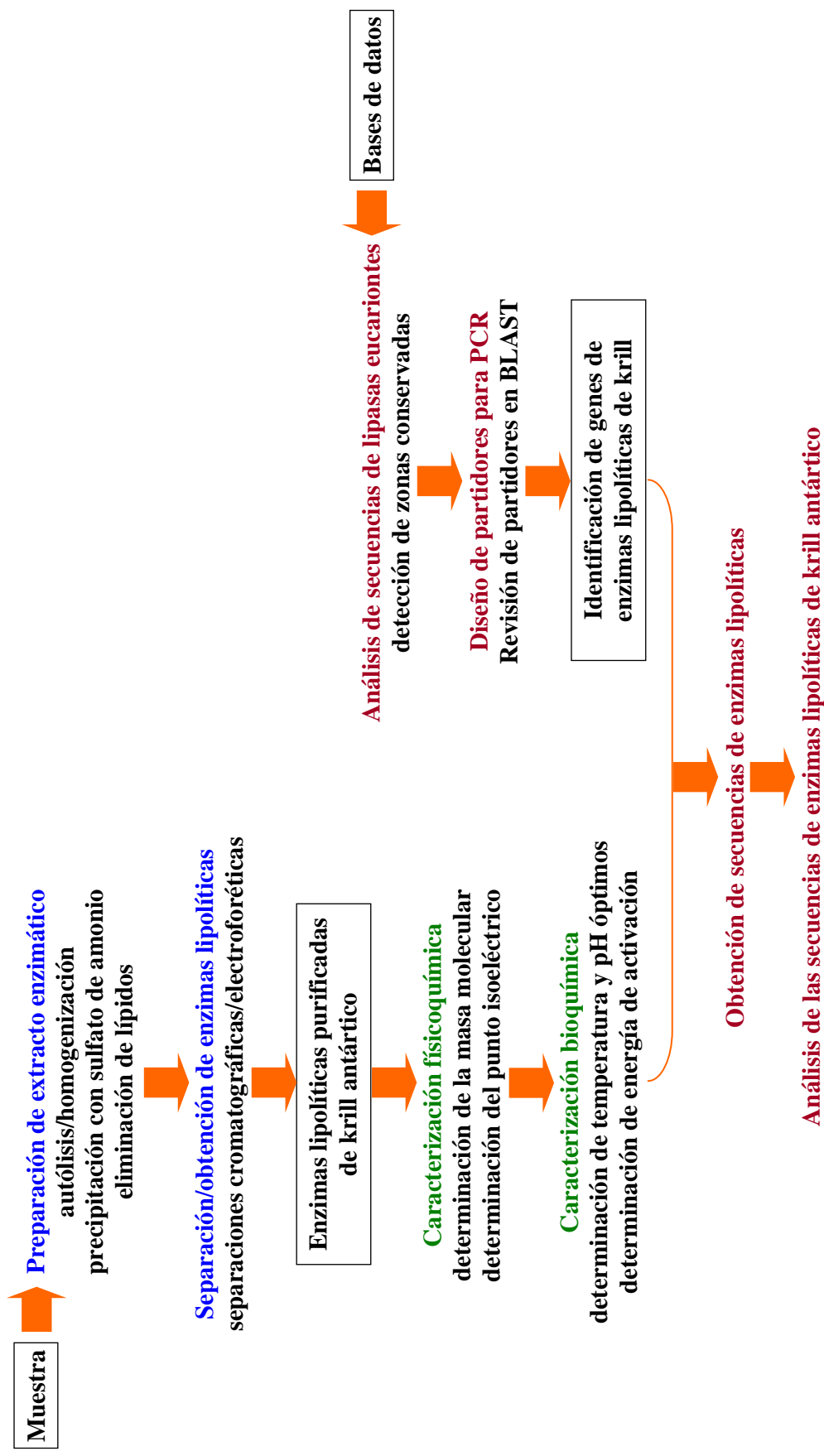


Figura 4. Estrategia experimental. Se esquematiza la estrategia experimental utilizada para la realización de los objetivos específicos propuestos. En color azul se indican las etapas correspondientes al objetivo específico 1, en verde las etapas correspondientes al objetivo específico 2 y en café se destacan las etapas del objetivo específico 3.

MATERIALES Y MÉTODOS

Espécimen (krill antártico)

Las muestras de krill utilizadas fueron proporcionadas por la empresa japonesa pesquera Hiromatsu Kyn Fishery Co., Ltd. Los especímenes capturados se congelaron a -40°C hasta su traslado al Centro de Ingeniería Bioquímica y Biotecnología CIByB, donde se almacenaron a -80°C.

Preparación del extracto de krill mediante autólisis

Para la preparación estándar de extracto mediante autólisis (autolisado), la muestra se sometió a autodegradación espontánea a 20°C durante 48 h. Posteriormente, el autolisado se filtró a través de gasa. Después se centrifugó a 18.000 rpm durante 1 h a 4°C (centrífuga Sorvall RC-28S y rotor F-28/50 Sorvall, DuPont Co., DE-USA). El sobrenadante obtenido se deslipidizó mediante filtración escalonada a través de filtros con tamaño de poro desde 10 a 0,2 µm y se desalinizó por filtración en una columna PD10 empacada con Bio-Gel P (Bio-Rad Laboratories, CA-USA) [Salamanca, 2002; Salamanca *et al.*, 2002].

Para los estudios del efecto de la temperatura y del tiempo en el proceso de autólisis, la muestra se sometió a autodegradación espontánea a tres diferentes temperaturas (5, 20 y 40°C) y durante diferentes tiempos (3, 6, 12, 24, 48 y 72 h).

Para el fraccionamiento por medio de precipitación con sulfato de amonio, se agregó la sal en intervalos de 10% de saturación sobre autolisado filtrado y se incubó bajo agitación continua durante 30 min a 4°C [Bollag *et al.*, 1996]. Luego se centrifugó a 18.000 rpm durante 30 min a 4°C. Las pellas se resuspendieron en tampón Tris/HCl 20

mM pH 8, las que posteriormente se deslipidizaron mediante filtración escalonada a través de filtros con tamaño de poro entre 10 a 0,2 μm y se desalinizaron por filtración en columnas PD10 empacada con Bio-Gel P.

Preparación del extracto de krill mediante homogenización

Para la preparación estándar de extracto enzimático de krill, las muestras se prepararon por homogenización durante 1 min a 8.300 rpm a 4°C (homogenizador Omni-Mixer, Omni International, CT-USA) en agua destilada en una proporción de 0,32 g krill/mL [Turkiewics *et al.*, 1985; Turkiewics *et al.*, 1986]. A continuación se centrifugó a 5.000g durante 20 min a 4°C (centrífuga Sorvall RC-28S y rotor F-28/50 Sorvall, DuPont Co., DE-USA) [Turkiewics *et al.*, 1985; Turkiewics *et al.*, 1986]. Posteriormente se deslipidizó mediante filtración escalonada a través de filtros con tamaño de poro entre 10 y 0,2 μm y se desalinizó por filtración en una columna PD10 empacada con Bio-Gel P.

Para la determinación del efecto del pH sobre el proceso de homogenización se preparó dos tampones para cada pH en el intervalo de pH 6-10: citrato de sodio pH 6, fosfato de sodio pH 6, Tris/HCl pH 7, fosfato de sodio pH 7, Tris/HCl pH 8, fosfato de sodio pH 8, Tris/HCl pH 9, glicina/NaOH pH 9, carbonato de sodio pH 10 y glicina/NaOH pH 10. Los tampones se prepararon a una concentración de 20 mM. Las muestras se homogenizaron en cada tampón según la proporción 0,32 g krill/mL durante 1 min a 8.300 rpm a 4°C.

Para los estudios del efecto del tiempo, las muestras se homogenizaron durante 15, 30 seg y 1, 2 y 4 min a 8.300 rpm a 4°C. Para los estudios del efecto de la velocidad,

las muestras se homogenizaron a 500, 4.400, 8.300, 12.200 y 18.000 rpm durante 1 min a 4°C.

Separaciones cromatográficas

Las cromatografías de filtración en gel se realizaron en un equipo FPLC System (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suecia) utilizando una columna SigmaChrom GFC100 de 300×7,5 mm (Supelco Inc., PA-USA) a un flujo de 0,5 mL/min. Se utilizó como fase móvil Tris/HCl 50 mM que contenía KCl 100 mM pH 7,5 y para la mayoría de los experimentos se colectaron fracciones de 1 mL.

Las cromatografías de enfoque isoeléctrico o cromatoenfoco se realizaron en un equipo FPLC System empleando una columna Econo-Column de 30×1,5 cm (Bio-Rad Laboratories Inc., CA-USA) empacada con la resina PBE 94 (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suecia) a un flujo de 1 mL/min. La muestra correspondió a un homogenizado que se precipitó con sulfato de amonio (100% de saturación), luego se resuspendió en tampón imidazol/HCl 25 mM pH 7,4 y se desalinizó en columnas PD10 empacadas con Bio-Gel P utilizando el mismo tampón. La adsorción de la proteína se realizó utilizando tampón imidazol/HCl 25 mM pH 7,4 y la elución se realizó con tampón anfotérico polybuffer 74/HCl pH 5,0 (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suecia), generando un gradiente de pH entre 7 y 5. Se colectaron fracciones de 5 mL.

Las cromatografías de afinidad se realizaron en un equipo BioLogic LP (Bio-Rad Laboratories Inc., CA-USA) utilizando una columna Econo-Column de 5×0,5 cm (Bio-Rad Laboratories Inc., CA-USA) empacada con 1 mL de resina heparina-agarosa (Sigma-Aldrich Co., MO-USA) a un flujo de 0,5 mL/min. La muestra correspondió a eluido 1 (ver separación y obtención de enzimas lipolíticas purificadas mediante

cromatografía y electroforesis en resultados). La muestra se aplicó utilizando tampón Tris/HCl 20 mM pH 8 hasta que la absorbancia del eluyente a 280 nm alcanzó la absorbancia inicial, posteriormente la elución se realizó con tampón Tris/HCl 20 mM pH 8 que contenía NaCl 2 M generando un gradiente 0-2 M. Se colectaron fracciones de 1 mL.

Todas las cromatografías se realizaron a temperatura ambiente.

Separaciones electroforéticas

Las separaciones electroforéticas en condiciones desnaturalantes se realizaron en una cámara vertical MiniProtean II (Bio-Rad Laboratories Inc., CA-USA). Las muestras se prepararon según Bollag *et al.*, (1996). Brevemente, las muestras se mezclaron en proporción 4:1 con tampón de carga 5X (Tris/HCl 60 mM, glicerol 25% v/v, SDS 2% p/v, 2-mercaptoetanol 14,4 mM y azul de bromofenol 0,1% p/v pH 6,8), se desnaturalaron por ebullición durante 5 min y posteriormente se cargaron en geles de acrilamida. Las electroforesis se realizaron bajo voltaje constante de 200 V (fuentes de poder Power Pac 1000 de Bio-Rad Laboratories Inc., CA-USA o Power Supply EPS 3500XL de Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suecia). Se utilizó tampón de corrida Tris-glicina-SDS (Tris 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0,1% p/v) [Bollag *et al.*, 1996].

Las separaciones electroforéticas nativas se realizaron en una cámara vertical MiniProtean II. Las muestras se prepararon según Bollag *et al.*, (1996). Brevemente, las muestras se mezclaron en proporción 4:1 con tampón de carga 5X (Tris/HCl 312,5 mM, glicerol 50% v/v y azul de bromofenol 0,05% p/v pH 6,8) y luego se centrifugaron a 10.000g durante 10 min (centrífuga Eppendorf 5403 de Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) y posteriormente se cargaron en geles de acrilamida. Las electroforesis se

realizaron bajo voltaje constante de 200 V. Alternativamente, las separaciones electroforéticas en condiciones nativas se realizaron en una cámara vertical Protean II xi (Bio-Rad Laboratories Inc., CA-USA). Las muestras se prepararon según Bollag *et al.*, (1996) y luego se centrifugaron a 10.000g durante 10 min (centrífuga Sorvall RC-28S y rotor F-28/50 Sorvall, DuPont Co., DE-USA). Posteriormente se cargaron en geles de acrilamida. Las electroforesis se realizaron bajo un voltaje constante de 200 V para la región concentradora y bajo una corriente constante de 70 mA para la región separadora. La electroforesis se realizó a 10°C. En ambos sistemas de electroforesis nativas se utilizó tampón de corrida Tris-glicina (Tris 25 mM y glicina 192 mM) [Bollag *et al.*, 1996].

Las electroforesis de punto isoelectrico (isoelectroenfoque) en condiciones nativas se realizaron en una cámara vertical MiniProtean II. Las muestras se prepararon según Robertson *et al.*, (1987). Brevemente, las muestras se mezclaron en proporción 1:1 con tampón de carga 2X (glicerol 60% v/v y anfolitos 4% v/v) (anfolitos BioLyte 3/10 de Bio-Rad Laboratories Inc., CA-USA), luego se centrifugaron a 10.000g durante 10 min y posteriormente se cargaron en geles de acrilamida para punto isoelectrico. Se utilizó como solución catódica NaOH 25 mM y como solución anódica ácido acético 20 mM. Las electroforesis se realizaron bajo voltaje constante de 200 V durante 1,5 h y 400 V durante 1,5 h. Alternativamente, se utilizó un equipo PhastSystem (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suecia). Las muestras se prepararon mezclando igual volumen de muestra y tampón de carga 2X, se centrifugaron durante 5 min a 10.000g y se cargaron en geles de acrilamida para punto isoelectrico PhastGel IEF 3-9 (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suecia). Las electroforesis se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las electroforesis de DNA se realizaron en una cámara horizontal Horizon-58 (Gibco-BRL Life Technologies, Inc., MA-USA). Las muestras se mezclaron en proporción 5:1 con tampón de carga 6X (glicerol 30% p/v y azul de bromofenol 0,25% p/v) y luego se cargaron en geles de agarosa 1% p/v. Se incluyó estándar de tamaño 1 kpb DNA ladder (Gibco-BRL Life Technologies, Inc., MA-USA). Las electroforesis se realizaron bajo voltaje constante de 100 V (fuente de poder Model 500 de BRL Life Technologies, Inc., MD-USA). Se utilizó tampón de corrida Tris-Acetato-EDTA (Tris 40 mM, acetato 20 mM y EDTA 1 mM).

Las electroforesis de RNA en condiciones desnaturantes se realizaron en una cámara horizontal Horizon-58. Las muestras se mezclaron en proporción 5:1 con tampón de carga 6X (glicerol 30% p/v y azul de bromofenol 0,25% p/v) y luego se cargaron en geles de agarosa 1,5% p/v que contenían formaldehído 2% v/v y bromuro de etidio 10 mg/mL. Las electroforesis se realizaron durante 1 h a 12 V/cm (fuente de poder Model 500 de BRL Life Technologies, Inc., MD-USA) en tampón de corrida Tris-Acetato-EDTA (Tris 40 mM, acetato 20 mM y EDTA 1 mM).

Remoción de lípidos y pigmentos presentes en los extractos de krill

La extracción de lípidos y pigmentos se realizó utilizando los procedimientos de precipitación de proteínas con ácido tricloroacético, precipitación de proteínas con etanol, precipitación de proteínas con isopropanol, precipitación de proteínas con polietilenglicol y extracción con cloroformo sobre extractos filtrados. Para la precipitación con ácido tricloroacético, se agregó 100 µL de ácido tricloroacético 100% p/v por mL de extracto, la precipitación se realizó durante 30 min a 4°C y bajo agitación constante, posteriormente se centrifugó durante 5 min a 10.000g y la pella obtenida se

resuspendió en tampón Tris/HCl 20 mM pH 8 [Bollag *et al.*, 1996]. Para la precipitación con etanol, se agregó 1 mL de etanol (-20°C) por mL de extracto, la precipitación se realizó durante 15 min a 4°C y bajo agitación constante, luego se centrifugó a 10.000g durante 10 min, la pella se resuspendió en dos volúmenes equivalentes con tampón Tris/HCl 20 mM pH 8 frío [Bollag *et al.*, 1996]. Para la precipitación con polietilenglicol, se agregó 1,5 mL de polietilenglicol 6000 50% p/v (-20°C) por mL de extracto, la precipitación se realizó durante 60 min a 4°C y bajo suave agitación, posteriormente se centrifugó durante 10 min a 10.000g, la pella se resuspendió en dos volúmenes equivalentes con tampón Tris/HCl 20 mM pH 8 [Bollag *et al.*, 1996]. En el caso de la extracción de contaminantes con cloroformo, los extractos se mezclaron con cloroformo en razón 1:1, la remoción se realizó durante 1 h a 4°C y bajo vigorosa agitación, se centrifugó a 10.000g durante 10 min y finalmente se recuperó la fase superior [Castro *et al.*, 2000].

Medición de la actividad lipasa/actividad lipolítica

Para la cuantificación de la actividad lipasa (largo de cadena acilo ≥ 10 átomos de carbono) se utilizó el siguiente protocolo: para el ensayo estándar se preparó una solución stock de *p*-nitrofenilpalmitato 3 mg/mL (*p*-NFP) (Sigma-Aldrich, Inc., MO-USA) en isopropanol y una solución tampón de ensayo Tris/HCl 20 mM pH 8 que contiene Triton X-100 4,4 mg/mL y goma arábica 1,1 mg/mL (Sigma-Aldrich, Inc., MO-USA). La solución sustrato/tampón se preparó en el momento de realizar el ensayo, con: 0,875 mL de tampón de ensayo y 0,025 mL de solución stock de sustrato. El tampón de ensayo se calentó a *ca.* 45°C y se agregó el sustrato lentamente bajo continua

agitación. Se dejó enfriar y se utilizó en el ensayo, para lo cual se mezcló 0,9 mL de esta solución y 0,1 mL de muestra. La reacción se siguió espectrofotométricamente a 410 nm (espectrofotómetro UV/visible Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech Ltd., Cambridge, Inglaterra). El ensayo se realizó a 20°C y se utilizó como referencia el tampón de ensayo. El blanco de sustrato se preparó mezclando 0,1 mL de tampón Tris/HCl 20 mM pH 8 y 0,9 mL de solución sustrato/tampón (hidrólisis no enzimática), mientras que para los blancos de muestras se mezcló 0,1 mL de muestra y 0,9 mL de tampón de ensayo. Se definió la unidad de actividad lipasa (U) como los μ moles de *p*-nitrofenilpalmitato formados por minuto de reacción. Para la determinación de la actividad lipolítica (largo de cadena acilo < 10 átomos de carbono) sobre los sustratos *p*-nitrofenilbutirato y *p*-nitrofenilcaprato (Sigma-Aldrich Co., MO-USA) se siguió el mismo protocolo de ensayo estándar y registro descrito para la determinación de la actividad lipasa.

Para la determinación del efecto del pH sobre la actividad lipasa, se prepararon los siguientes tampones de ensayo para una concentración de 20 mM: citrato de sodio pH 6, Tris/HCl pHs 7-9 y CAPS pH 10 que contenían Triton X-100 4,4 mg/mL y goma arábica 1,1 mg/mL. Las soluciones sustrato/tampón se prepararon en el momento de realizar el ensayo según: 0,875 mL de tampón de ensayo y 0,025 mL de solución stock de *p*-nitrofenilpalmitato 3 mg/mL preparado en isopropanol. Los ensayos se realizaron a 20°C.

Para la determinación del efecto de la temperatura sobre la actividad lipasa/lipolítica, se utilizó el ensayo estándar descrito, excepto que se realizó para las temperaturas 10, 20, 25, 30, 35, 40 y 50°C.

Ensayo de actividad lipolítica in situ

Para determinar la actividad enzimática *in situ* (en gel), se utilizó como sustrato α -naftilacetato (Sigma-Aldrich, Inc., MO-USA). Se siguió el protocolo descrito por Brahim-Horn *et al.*, (1991) con algunas modificaciones, que consistió en solubilizar 75 mg de α -naftilacetato en una mezcla de 4,7 mL de acetona y 0,3 mL de Triton X-100. La solución obtenida se agregó lentamente a 100 mL de tampón Tris/HCl 20 mM pH 8 calentado previamente a 45°C. Posteriormente se agregó 75 mg de Fast Garnet GBC (Sigma-Aldrich, Inc., MO-USA) a la solución de sustrato/tampón fría. El gel se lavó 2 veces en tampón Tris/HCl 20 mM pH 8 durante 5 min cada vez y luego se incubó en la solución de sustrato/Fast Garnet GBC/tampón. Todas las soluciones se prepararon en el momento de realizar el ensayo.

Renaturación in situ de proteínas en geles desnaturantes

Para la renaturación *in situ* de proteínas después de una separación electroforética en condiciones desnaturantes se utilizó el procedimiento descrito por Hou *et al.*, (1999). Para ello el gel se incubó dos veces durante 10 min en isopropanol 25% v/v preparado en tampón Tris/HCl 20 mM pH 8. Todo el proceso se realizó a temperatura ambiente.

Determinación de la concentración de proteína

La concentración de proteína para las diferentes muestras se determinó mediante el ensayo de Bradford (1976) con algunas modificaciones. Se mezcló 2,4 mL de agua destilada, 1,0 mL de Coomassie R-250 1 g/L preparado en ácido clorhídrico 2,2% v/v y 0,1 mL de muestra o proteína estándar de calibración. Se realizó una curva de calibración con albúmina de suero bovino (BSA) 0,5 mg/mL como solución patrón para

la construcción de una curva de calibración en concentraciones entre 0,03125 y 0,5 mg/mL. Se midió la absorbancia a 465 (Abs_{465}) y 595 nm (Abs_{595}) y se calculó la razón Abs_{595}/Abs_{465} . El valor obtenido en ausencia de BSA se restó a todas las demás razones para obtener Abs_{595}/Abs_{465}^* . La curva de calibración se construyó graficando Abs_{595}/Abs_{465}^* *versus* concentración de BSA.

Tinción de geles con solución de plata

La visualización de proteínas presentes en los geles se realizó mediante el protocolo de tinción con plata descrito por Morrisey (1981), que consistió en prefijar el gel en una solución de metanol 50% v/v y ácido acético 10% v/v durante 30 min, seguido por la incubación en una solución de metanol 5% v/v y ácido acético 7% v/v durante 30 min. Luego el gel se fijó en glutaraldehído 10% v/v durante 30 min. El gel se lavó en agua destilada durante 2 h o toda la noche. Luego se incubó en ditiotreitól 5 μ g/mL durante 30 min. A continuación se incubó en nitrato de plata 0,1% p/v durante 30 min, se reveló en carbonato de sodio 3% p/v que contenía 50 μ L de formaldehído 37% p/v y se adicionó ácido cítrico 2,3 M para detener el revelado. Posteriormente, el gel se lavó durante 30 min en agua destilada y a continuación en carbonato de sodio 0,03% p/v durante 10 min. Previo a la tinción de geles de punto isoeléctrico, éstos se incubaron durante 10 min en ácido tricloroacético 10% v/v y luego se incubaron en ácido tricloroacético 1% v/v durante toda la noche para remover los anfolitos [Morrisey, 1981].

La visualización de proteínas presentes en los geles PhastGel IEF 3-9 (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suecia) se realizó mediante el protocolo de tinción con plata recomendado por el proveedor.

Determinación de masa molecular

La determinación de la masa molecular se realizó mediante electroforesis en condiciones desnaturalantes. Para la electroforesis desnaturalante se preparó un gel de acrilamida 7% p/v, en el que se cargaron las muestras y el marcador de masa molecular (marcador de rango amplio 8-175 kDa de Winkler Ltda., Santiago, Chile). Las muestras se hirvieron previamente y la electroforesis se realizó bajo las condiciones descritas en separaciones electroforéticas. El gel se sometió a tinción con plata. Posteriormente, el gel se digitalizó (escáner The Simplex DP30M de Compeye Europe BV, Róterdam, Holanda) y la imagen obtenida se analizó utilizando el programa SigmaGel versión 1.0 (Jandel Scientific, CA-USA). Se determinó la movilidad electroforética de las proteínas del marcador de masa molecular, del marcador de avance (azul de bromofenol) y de la muestra. Se construyó una curva de calibración del logaritmo en base 10 de la masa molecular *versus* la movilidad electroforética relativa (R_f) en base a las proteínas del marcador utilizado [Bollag *et al.*, 1996].

Para la determinación preliminar de las masas moleculares de las enzimas lipolíticas presentes en el extracto preparado mediante autólisis, se utilizaron tres métodos: electroforesis desnaturalante, electroforesis nativa y cromatografía de filtración en gel y posterior ensayo de actividad.

Para la electroforesis desnaturante se preparó un gel de acrilamida 12% p/v en el que se cargaron los cortes 0-40 y 40-80% de saturación del extracto obtenido por autólisis y el marcador de masa molecular (marcador de rango amplio 8-175 kDa de Winkler Ltda., Santiago, Chile). Las muestras no se hirvieron previamente. La electroforesis se realizó bajo las condiciones descritas en separaciones electroforéticas. Al finalizar la electroforesis, el gel se ambientó en tampón Tris/HCl 20 mM pH 8 y luego se incubó en 50 mL de *p*-NFP 13,2 mM [Abramić *et al.*, 1999]. Posteriormente, el gel se digitalizó y la imagen obtenida se analizó utilizando el programa SigmaGel, se determinó la movilidad electroforética de las proteínas del marcador de masa molecular, del marcador de avance (azul de bromofenol) y de las bandas de actividad. Los valores de R_f determinados para las bandas de actividad presentes en los diferentes cortes con sulfato de amonio se interceptaron en la curva de calibración y se determinó su masa molecular [Bollag *et al.*, 1996].

Para la electroforesis nativa se prepararon geles de acrilamida 4, 5, 6, 7, 8 y 10% p/v en los que se cargó el autolisado y el marcador de masa molecular (sistema comercial de calibración para electroforesis LMW de Amersham Pharmacia Biotech Inc., NJ-USA). Las electroforesis se realizaron bajo las condiciones descritas en la sección de separaciones electroforéticas. Al finalizar las electroforesis, se ensayó actividad lipolítica *in situ*, incubando los geles en α -naftilacetato [Brahimi-Horn *et al.*, 1991]. Posteriormente, el gel se digitalizó y la imagen obtenida se analizó utilizando el programa SigmaGel, se determinó la movilidad electroforética relativa de las proteínas del marcador de masa molecular y de las bandas de actividad. Se graficó entonces $100 \times \text{Log}(100R_f)$ versus concentración del gel (porcentaje de acrilamida) y se

determinó el coeficiente de retardo (pendiente de la curva) para cada proteína del marcador de masa molecular y de las bandas de actividad. Se construyó una curva de calibración del valor negativo del coeficiente de retardo *versus* masa molecular en base a las proteínas del marcador utilizado. Los valores negativos de los coeficientes de retardo determinados para las bandas de actividad presentes se interceptaron en la curva de calibración y se determinó su masa molecular [Bollag *et al.*, 1996].

Alternativamente, las masas moleculares de las proteínas lipolíticas se determinaron por cromatografía de filtración en gel en una columna SigmaChrom GFC100 de 300×7,5 mm (rango de separación 10-150 kDa). Se determinó el volumen de elución para cada proteína del marcador de masa molecular (sistema comercial de calibración para filtración en geles LMW de Amersham Pharmacia Biotech Inc., NJ-USA) bajo las condiciones descritas en separaciones cromatográficas, con lo cual se construyó una curva de calibración del logaritmo en base 10 de la masa molecular *versus* el volumen de elución [Bollag *et al.*, 1996]. Se realizaron cromatografías para los cortes 20-30, 30-40, 40-50 y 50-60% de saturación con sulfato de amonio del extracto obtenido por autólisis. Para las diferentes fracciones se ensayó la actividad sobre *p*-nitrofenilpalmitato en placas multipocillos [Abramić, comunicación personal]. El volumen de elución de las fracciones activas se interceptó en la curva de calibración construida previamente.

Determinación de punto isoeléctrico

Para la determinación del punto isoeléctrico de las enzimas lipolíticas purificadas de krill se realizó isoelectroenfoque en condición nativa. Las muestras se prepararon según Robertson *et al.* (1987), se cargó el marcador de punto isoeléctrico (sistema

comercial de calibración de punto isoeléctrico pH 3-10 de Amersham Pharmacia Biotech Inc., NJ-USA) y la muestra. La electroforesis se realizó bajo las condiciones descritas en separaciones electroforéticas. Al finalizar la electroforesis, el gel se sometió a tinción con plata. Posteriormente, el gel se digitalizó y la imagen obtenida se analizó utilizando el programa SigmaGel. Se determinó la distancia de migración relativa de las proteínas del marcador de punto isoeléctrico y de la muestra. Se construyó una curva de calibración del punto isoeléctrico pI *versus* la distancia de migración relativa para las proteínas del marcador utilizado [Robertson *et al.*, 1987].

Para la caracterización preliminar de los puntos isoeléctricos de las enzimas lipolíticas de krill se realizó isoelectroenfoque en condición nativa. Las muestras se prepararon según Robertson *et al.* (1987), se cargó el marcador de punto isoeléctrico y el autolisado. La electroforesis se realizó bajo las condiciones descritas en separaciones electroforéticas. Al finalizar la electroforesis, se ensayó *in situ* la actividad lipolítica, para lo cual el gel se incubó en α -naftilacetato [Brahimi-Horn *et al.*, 1991]. Los valores de distancia de migración relativa determinados para las bandas de actividad presentes se interceptaron en la curva de calibración y se determinaron sus puntos isoeléctricos [Robertson *et al.*, 1987].

Extracción de RNA total de krill

El material de partida correspondió a intestino medio y sección constrictiva de krill antártico congelado a -80°C . Se molió 1 g de este material en presencia de *ca.* 100 mL de nitrógeno líquido. Una vez homogeneizado se agregó 10 mL de Trizol (Invitrogen Corp., CA-USA), se incubó durante 5 min a temperatura ambiente y luego se

centrifugó a 12.000g durante 10 min a 4°C (centrífuga Sorvall RC-28S, DuPont Co., DE-USA). Se agregó 2 mL de cloroformo sobre el sobrenadante y se agitó vigorosamente por 30 seg. A continuación, se incubó durante 3 min a temperatura ambiente y luego se centrifugó a 10.000g durante 15 min a 4°C. Al sobrenadante se agregó 2,5 mL de isopropanol y 2,5 mL de solución salina (citrato de sodio 0,8 M y NaCl 1,2 M), la mezcla se incubó por 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12.000g por 10 min a 4°C. Al sobrenadante se agregó 10 mL de etanol 75% v/v y se centrifugó inmediatamente a 7.500g por 5 min. La pella obtenida se secó a 37°C durante 10 min y posteriormente se resuspendió en 0,6 mL de agua estéril libre de RNasa. Se determinó espectrofotométricamente la concentración de RNA total. La integridad del RNA se analizó en gel de agarosa 1,5% p/v en condiciones desnaturantes.

Aislamiento de RNA mensajero a partir de RNA total

El aislamiento de mRNA poliA se realizó a partir de 100 µL de RNA total 5 µg/µL y se utilizó el sistema comercial Oligotex mRNA Spin-Column (Qiagen Inc., CA-USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Síntesis de cDNA

Para la síntesis de cDNA a partir de RNA de krill se utilizó el sistema comercial 3' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (Invitrogen Corp., CA-USA). Brevemente, se preparó la mezcla de 2 µL de RNA total de krill 2,5 µg/µL, 1 µL de dNTP mix 10 mM, 1 µL de oligo(dT)₁₂₋₁₈ 0,5 µg/µL y 6 µL de agua-DEPC. La mezcla se incubó a 65°C durante 5 min y luego se incubó sobre hielo durante 1 min. Sobre 9 µL de la mezcla se adicionó 1 µL de la mezcla de reacción (2 µL de tampón RT 10X, 4 µL de

MgCl₂ 25 mM y 2 µL de ditioneitol 0,1 M). La mezcla resultante se incubó a 42°C durante 2 min y se adicioneó 1 µL de retrotranscriptasa SuperScript II RT. La reacción enzimática se incubó durante 50 min a 42°C. Finalmente, la reacción se detuvo por incubación a 70°C por 15 min y luego se enfrió sobre hielo.

Alternativamente, para la síntesis de cDNA se utilizó el sistema ThermoScript RT-PCR System (Invitrogen Corp., CA-USA). Brevemente, se mezcló 1 µL de partidor AP 10 µM, 1 µL de RNA total de krill 2,5 µg/µL ó 9 µL de mRNA poliA, 2 µL de dNTP mix 10 mM y agua-DEPC para completar 12 µL. La mezcla se desnaturó a 65°C durante 5 min y luego sobre hielo. Sobre esta mezcla se adicioneó 8 µL de la mezcla de reacción (4 µL de tampón síntesis de cDNA 5X, 1 µL de ditioneitol 0,1 M, 1 µL de RNase OUT 40 U/µL, 1 µL de agua-DEPC y 1 µL de retrotranscriptasa ThermoScript RT 15 U/µL). La mezcla final se incubó a 60°C durante 1 h. La reacción se terminó por incubación a 85°C durante 5 min.

Amplificación de cDNA blanco

Para la amplificación de cDNA sintetizado a partir de RNA de krill por medio de SuperScript II RT se preparó la siguiente mezcla de reacción: 5 µL de tampón PCR 10X, 1,5 µL de MgCl₂ 50 mM, 1 µL de dNTP mix 10 mM, 1 µL de partidor OXF 10 µM, 1 µL de partidor ACR 10 µM, 0,4 µL de Taq-DNA polimerasa 5 U/µL, 2 µL de reacción de síntesis de cDNA y 38,1 µL de agua destilada estéril. Para la reacción de PCR se utilizó el siguiente programa: 5 ciclos de 1 seg a 94°C, 1 min a 94°C, 1 seg a 37°C, 30 seg a 37°C, 2 min 20 seg a 72°C y 1 min a 72°C; seguido por 35 ciclos de 1 min a 95°C,

1 min a 50°C y 1 min a 72°C (termociclador PTC-100 de MJ Research Inc., MA-USA) [Bell *et al.*, 2002].

En el caso de la amplificación de cDNA sintetizado a partir de RNA de krill por medio de ThermoScript RT se utilizó el protocolo descrito en el sistema ThermoScript RT-PCR System. Brevemente, se preparó la siguiente mezcla de reacción: 5 µL de tampón PCR 10X, 3 µL de MgCl₂ 25 mM, 1 µL de dNTP mix 10 mM, 1 µL de partidores diseñados 10 µM, 1 µL de partidor AUAP 10 µM, 0,5 µL de Taq-DNA polimerasa 5 U/µL, 2 µL de síntesis de cDNA y 36,5 µL de agua destilada estéril. Para la amplificación se utilizó el siguiente programa: 1 ciclo de 3 min a 94°C; seguido por 35 ciclos de 45 seg a 94°C, 30 seg a 55°C y 1 min a 72°C; y 10 min finales a 72°C.

Vectores

El vector pGEM-T easy (Promega Corp., WI-USA) se utilizó para el clonamiento de productos PCR. El vector de 3015 pb contiene extremos 3' protuberantes con residuos de timidina en cada una de las hebras en el sitio de clonación, lo que permite la ligación de segmentos de DNA obtenidos por PCR que contienen una adenina en el extremo 3' de cada hebra, debido a la acción de la Taq-DNA polimerasa. Además contiene un gen de resistencia a ampicilina, regiones promotoras para la RNA polimerasa T7 y SP6 rodeando la región de clonamiento múltiple, que se encuentra inserta en la región codificante del α-péptido de la enzima β-galactosidasa. Además contiene las regiones de reconocimiento de los partidores M13 rodeando el sitio de clonamiento. Cuando se inserta un fragmento de DNA se produce la inactivación del α-péptido, por lo que los clones recombinantes no tienen la coloración azul producto de la hidrólisis de X-gal por acción de la β-galactosidasa.

Reacción de ligación

Para la reacción de ligación se utilizó como inserto los productos PCR obtenidos con los partidores OXF/ACR y los productos PCR extraídos y purificados de gel de agarosa obtenidos con los partidores diseñados. Los insertos se ligaron al vector pGEM-T easy utilizando la enzima T4-DNA ligasa (Promega Corp., WI-USA), para lo cual se siguió las instrucciones del proveedor.

Cepas bacterianas

Para los experimentos de ligación, transformación y extracción de plásmidos se utilizaron las cepas de *Escherichia coli* BL21 (DE3) (genotipo F⁻ *ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (λcIts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1)* [Studier y Moffat, 1986] y DH5α (genotipo *supE44 ΔlacU169 (φ80lacZDM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*) [Hanahan, 1983].

Transformación de células competentes

Sobre 20 μL de células electrocompetentes de *E. coli* BL21 (DE3) o DH5α se agregó 1 μL de mezcla de ligación. La electroporación se realizó en un equipo Cell-Porator Electroporation System (Gibco-BRL Life Technologies, Inc., MD-USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las células transformadas se mezclaron con 1 mL de medio SOC (triptona 2% p/v, extracto de levadura 0,5% p/v, NaCl 0,05% p/v, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM y glucosa 20 mM) y se incubaron a 37°C durante 1 h y a 200 rpm de agitación. Luego, se centrifugó a 13.000 rpm durante 1 min y se descartó 850 μL de sobrenadante. La pella se resuspendió en el sobrenadante

remanente y se plaqueó sobre placas de agar Luria que contenían ampicilina o carbenicilina 100 µg/mL y suplementadas con X-gal 30 µg/mL e IPTG 0,3 mM (concentraciones finales). Las placas de transformación se incubaron a 37°C durante toda la noche.

PCR de colonias

El PCR de colonias se realizó para corroborar la presencia de inserto en las colonias blancas seleccionadas como clones positivos. Las colonias blancas seleccionadas se transfirieron desde la placa de transformación a placas grillas de agar Luria con ampicilina 100 µg/mL y a un tubo Eppendorf con 50 µL de agua destilada estéril. La suspensión (tubo Eppendorf) se incubó a 95°C durante 10 min, se tomó 5 µL y se agregaron sobre 15 µL de mezcla de PCR (2 µL de tampón PCR 10X, 1 µL de MgCl₂ 25 mM, 1 µL de partidor con sentido, 1 µL de partidor reverso, 0,5 µL de Taq-DNA polimerasa 5 U/µL y 9,1 µL de agua destilada estéril). La presencia de inserto se confirmó utilizando los partidores OXF/ACR y los partidores diseñados para los cuales se utilizó los protocolos de PCR descritos en la sección amplificación de cDNA. Adicionalmente, se utilizaron los partidores M13F/M13R y el siguiente programa de amplificación: 1 ciclo de 5 min a 94°C, 2 min a 94°C, 30 seg a 50°C y 1 min 30 seg a 72°C; seguido por 22 ciclos de 1 min a 94°C, 30 seg a 55°C, 1 min 30 seg a 72°C; y 1 ciclo final de 5 min a 72°C. Los productos de PCR de colonias se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 1% p/v.

Minipreparación de DNA plasmidial

Para la extracción de DNA plasmidial de cultivos preparados en 2 mL de caldo Luria que contenía ampicilina 100 µg/mL que se incubaron durante toda la noche a 37°C y 200 rpm, se utilizó el sistema QIAprep Spin Miniprep Kit siguiendo las instrucciones del fabricante (Qiagen Inc., CA-USA).

Determinación de la pureza y concentración de DNA y RNA

Se agregó 5 µL de la muestra de DNA o RNA a 1 mL de agua Milli-Q y se midió la absorbancia a 260 nm (Abs_{260}) y a 280 nm (Abs_{280}). La concentración se determinó en base a la absorbancia determinada a 260 nm, utilizando las siguientes expresiones: µg/mL DNA = (Abs_{260})×(50 µg/mL)×(factor de dilución) ó µg/mL RNA = (Abs_{260})×(40 µg/mL)×(factor de dilución).

La pureza de las preparaciones de DNA o RNA se determinó en base a la razón de absorbancias Abs_{260}/Abs_{280} .

Purificación de DNA a partir de geles de agarosa

Para la purificación de DNA a partir de bandas cortadas de gel de agarosa se utilizó el sistema QIAEX II Gel Extraction (Qiagen Inc., CA-USA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El DNA se eluyó en agua destilada estéril.

Partidores

En la Tabla 1 se indican la secuencia, función y dirección de amplificación de los diferentes partidores utilizados en esta tesis.

Tabla 1. Partidores. Se indica la secuencia, función y direccionalidad en la reacción de PCR de diferentes partidores utilizados.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Función
AP	GGCCACGCGTCGACTAGTACT ₁₇	Síntesis de cDNA (sistema ThermoScript RT-PCR System)
AUAP	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	Amplificación de cDNA (sistema ThermoScript RT-PCR System)
M13F	GTTTTCCCAGTCACGAC	Amplificación de inserto en vector (partidor con sentido)
M13R	CAGGAAACAGTATGAC	Amplificación de inserto en vector (partidor reverso)
OXF1	CCYGTKGTSYTNGTNCAYGG	Prospección de cavidad oxianiónica (partidores con sentido)
OXF2	CCRATMRTWYTNGTNCAYGG	
OXF3	CCKYTWGTKYTNATHCAYGG	
ACR1	AGGCCNCCCAKNGARTGNSC	Prospección del sitio activo (partidores reversos)
ACR2	AGRCCNCCCAKRCTRGTGNSC	
ACR3	AGGCCRCCNTGNGARTGNSC	
ACR4	AGGCCNCCNTGRCTRGTGNSC	
EL1	CTGCCGGTGATGGTGTGGATTCATGG	Prospección de sitio de unión a sustrato (dominio esterase_lipase)
EL2	CTATCGCCTGGGCGTGCTGGGCTTTCTG	
EL3	CCTGCCGGTGATGGTGTGGATTCATGG	
GL	GGCTATGATGTGTGGCTGGGCAAC	Identificación de lipasas gástricas
HL	TCTCCATCTTCCTGGTGTCTGYAT	Identificación de lipasas hepáticas
LAL	TTTGATGTGTGGATGGGCAACAGC	Identificación de lipasas ácidas lisosomales
PL1	GACATGTGCAAGAACATGTT	Prospección de lipasas pancreáticas
PL2	AAAACCCGCTTTATTATTCATGG	

El partidor AP (adapter primer) se utilizó en la síntesis de la primera hebra de cDNA a partir de RNA de krill, el partidor se une a la cola poliA del mRNA.

El partidor AUAP (abridged universal amplification primer) se utilizó en conjunto con los partidores diseñados para la amplificación de probables genes de lipasas.

La pareja de partidores M13F/M13R se utilizó para la amplificación mediante PCR de los insertos ligados al vector de clonamiento pGEM-T easy.

Bell *et al.*, (2002) diseñaron un conjunto de partidores para PCR propuestos para la inspección de genes de lipasas en muestras de DNA genómico ambiental. En la Tabla 1 se indica la secuencia, la zona de reconocimiento y la dirección de amplificación. Los partidores OXF/ACR permiten obtener amplificadores de 180-330 pb [Bell *et al.*, 2002]. Los partidores OXF/ACR fueron diseñados como oligonucleótidos “semidegenerados” utilizando la herramienta CODEHOP [Rose *et al.*, 1998; Rose *et al.*, 2003].

En esta tesis se diseñó además, un nuevo conjunto de partidores específicos no degenerados para la amplificación de genes de lipasas de krill antártico. El diseño se realizó a partir de los alineamientos de las secuencias de dominios, de familias y bloques de lipasas y/o enzimas lipolíticas. A partir de esta información se construyeron 8 partidores directos que se utilizaron en conjunto con el partidador reverso AUAP (Tabla 1). Los partidores EL se diseñaron para la identificación de secuencias relacionadas con el dominio esterase_lipase (específicamente el sitio de unión a sustrato), el partidador GL se utilizó para la inspección de lipasas gástricas (reconocimiento de la cavidad oxianiónica y sitio de glicosilación), el partidador HL para la detección de lipasas hepáticas (detección de la secuencia péptido señal), el partidador LAL para secuencias tipo lipasas ácidas lisosomales (cavidad oxianiónica y sitio de glicosilación) y los partidores PL para la identificación de secuencias relacionadas con lipasas pancreáticas (cavidad oxianiónica). Se estimó el tamaño de amplificación para los partidores diseñados, para los partidores EL1/EL3 se esperan amplificadores de 1200-1500 pb, para EL2 de 1000-1300 pb, para GL de 700-1000 pb, para HL de 1500 pb, para LAL de 650-1000 pb, para PL1 de 680-1300 pb y para PL2 de 730-1300 pb.

Bases de datos y herramientas bioinformáticas

En la Tabla 2 se indican las bases de datos y herramientas bioinformáticas empleadas en esta tesis.

La obtención de las secuencias y los alineamientos de los dominios y bloques en las bases de datos CDD [Marchler-Bauer *et al.*, 2005] y Blocks [Henikoff y Henikoff, 1994; Henikoff *et al.*, 1999; Henikoff *et al.*, 2000] se realizó a través de la búsqueda con la palabra “lipase”; la obtención de las secuencias y los alineamientos de familias en la base de datos LED se accedió a través del índice de familias provistas por el sitio [Pleiss *et al.*, 2000; Fischer y Pleiss, 2003].

Los análisis de secuencias a través de las herramientas VecScreen y ORF Finder se realizaron utilizando los parámetros definidos por defecto.

El diseño de partidores utilizando CODEHOP empleó los parámetros definidos por defecto (degeneración de 128, estrictez de 0 y temperatura 60°C) [Rose *et al.*, 1998; Rose *et al.*, 2003].

Tabla 2. Bases de datos y herramientas bioinformáticas.

Base de datos	Descripción	Dirección
Conserved Domain Database (CDD)	Búsqueda de dominios	www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml
Lipase Engineering Database (LED)	Búsqueda de familias de lipasas	www.led.uni-stuttgart.de
Esterases α/β -hydrolase Enzyme and Relatives Database (ESTHER)	Búsqueda de α/β -hidrolasas	bioweb.ensam.inra.fr/esther
Blocks WWW Server	Búsqueda de regiones o bloques	blocks.fhcr.org
GenBank	Búsqueda de secuencias	www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/index.html
Herramienta	Descripción	Dirección
BLAST	Alineamiento e identificación de secuencias	www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
FASTA	Alineamiento e identificación de secuencias	www.ebi.ac.uk/fasta33/
VecScreen	Búsqueda de secuencias “contaminantes” de vectores	www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html
ORF Finder	Búsqueda de marcos de lecturas abiertos	www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html
CODEHOP	Diseño de partidores	blocks.fhcr.org/blocks/codehop.html

El análisis de similitud de secuencias se realizó a través de la herramienta BLAST [Altschul *et al.*, 1997] y FASTA [Pearson y Lipman, 1988; Pearson, 1990] utilizando los parámetros definidos por defecto en cada base de datos (Tabla 3).

Tabla 3. Análisis de similitud de secuencias. Se indican los diferentes tipos de análisis realizados. BLASTp y FASTA-p comparan una secuencia aminoacídica contra una base de datos de secuencias de proteínas; BLASTn y FASTA-n comparan una secuencia nucleotídica contra una base de datos de DNA; BLASTx compara una secuencia nucleotídica traducida en sus seis posibles marcos de lectura contra una base de secuencias de proteínas; y PSI-BLAST permite obtener un perfil de las proteínas más similares a la secuencia problema que se utiliza en nuevas búsquedas (iteración) incorporando nuevas proteínas al perfil, esto facilita la detección de secuencias homólogas lejanas filogenéticamente y el establecimiento de la función de proteínas hipotéticas. Para cada análisis se detalla los principales parámetros de búsqueda: valor E, tamaño de ventana (word size) y matriz. Para la matriz de análisis se indica entre paréntesis los valores de apertura de espacios y extensión de los espacios generados en los alineamientos.

Análisis	Base de datos	Valor E	Tamaño de ventana	Matriz
BLASTx	NCBI	10	3	BLOSUM 62 (11, 1)
PSI-BLAST	NCBI	10	3	BLOSUM 62 (11, 1)
BLASTn “search for short, nearly exact matches”	NCBI	1.000	7	BLOSUM 62 (11, 1)
BLASTp “search for short, nearly exact matches”	NCBI	20.000	2	PAM30 (9, 1)
BLASTp	LED			
BLASTp tipo “search for short, nearly exact matches”	ESTHER	1.000		BLOSUM 62 (11, 1)
BLASTn tipo “search for short, nearly exact matches”	ESTHER			PAM30 (9, 1)
BLASTx	ESTHER	10		BLOSUM 62 (11, 1)
FASTA-p	EBI	10	2	BLOSUM 62 (12, 2)
FASTA-n	EBI	5	6	BLOSUM 62 (16, 4)

RESULTADOS

Separación y obtención de enzimas lipolíticas de krill antártico.

Determinación de los ensayos enzimáticos para la detección de actividad lipolítica y actividad lipasa.

Previo al trabajo de purificación de una enzima es necesario un adecuado ensayo enzimático de modo de tener un medio de cuantificación de la actividad tanto para el proceso de purificación como para la caracterización de la enzima.

En la literatura se describe un sinnúmero de sustratos y métodos utilizados como ensayos enzimáticos para la determinación de la actividad lipolítica [Farooqui *et al.*, 1984; Beisson *et al.*, 2000; Gupta *et al.*, 2003; Grognux *et al.*, 2004; Schmidt y Bornscheuer, 2005], destacando *p*-nitrofenilpalmitato (*p*-NFP) como uno de los sustratos más ampliamente utilizado en ensayos espectrofotométricos [Winkler y Stuckmann, 1979; Choo *et al.*, 1998; Abramić *et al.*, 1999; Rashid *et al.*, 2001]. Entre los diversos protocolos de ensayo se utilizó el descrito por Abramić *et al.*, (1999) que utiliza 25 μL de *p*-NFP 13,2 mM preparado en dioxano, 10 μL de muestra y 965 μL de tampón Tris/HCl 50 mM que contiene desoxicolato de sodio (NaDox) 5 mM, pH 8. La formación de producto se siguió espectrofotométricamente a 410 nm. El dioxano presente en la mezcla de ensayo reaccionó con el material plástico de las cubetas, por lo que se probaron otros solventes y finalmente se seleccionó isopropanol [Winkler y Stuckmann, 1979].

El ensayo se adaptó para su utilización en placas multipocillos [Abramić, comunicación personal], con el fin de analizar las fracciones obtenidas de las separaciones cromatográficas. Para el ensayo se mezcló 100 μL de muestra y 100 μL de *p*-NFP 13,2 mM (en isopropanol) y tampón Tris/HCl 20 mM que contenía desoxicolato

de sodio 5 mM, pH 8. El producto de la reacción se midió a 405 nm en un lector de placas multipocillos. Este procedimiento resultó rápido y más cómodo de ensayar para las numerosas muestras generadas en las cromatografías. Sin embargo, la evaluación posterior de los datos enzimáticos presentó dificultades, debido a la alta hidrólisis no enzimática y a los contaminantes interferentes presentes en las muestras (pigmentos y lípidos principalmente), generando mucho ruido en las mediciones de absorbancia (Tabla 4, ensayo 2). La preparación de la solución sustrato/tampón, que consistió en calentar a *ca.* 50°C la solución resultante de mezclar el sustrato preparado en isopropanol con el tampón de ensayo (tampón Tris/HCl 20 mM que contenía desoxicolato de sodio 5 mM, pH 8), sería responsable de la alta hidrólisis no enzimática inicial. En forma alternativa se utilizó la sonicación para la preparación de la solución de sustrato/tampón, obteniéndose resultados similares a los anteriores, sumados a la solubilización incompleta del sustrato. Se revisaron diferentes protocolos de ensayo que utilizan *p*-nitrofenilpalmitato como sustrato y se encontró la incorporación de otros componentes en la preparación de la solución sustrato/tampón de ensayo, como goma arábica [Winkler y Stuckmann, 1979; Maia *et al.*, 2001; Suoniemi y Tynkkynen, 2002] y Triton X-100 [Lehner y Verger, 1997; Choo *et al.*, 1998; Maia *et al.*, 2001; Rashid *et al.*, 2001] principalmente. Para la preparación de la emulsión sustrato/tampón se calentó la mezcla de sustrato preparado en isopropanol con el tampón de ensayo (Tris/HCl 20 mM que contiene Triton X-100 4,4 mg/mL y goma arábica 1,1 mg/mL, pH 8) a *ca.* 50°C (Tabla 4, ensayo 3).

Tabla 4. Hidrólisis no enzimática en los ensayos de actividad lipasa utilizados en esta tesis. Se indica la hidrólisis inicial (expresada como el promedio y desviación estándar de la absorbancia a tiempo cero en el ensayo) y la velocidad de hidrólisis no enzimática determinada para cada condición de ensayo enzimático.

Ensayo	Hidrólisis inicial (absorbancia)		Velocidad de hidrólisis ($\mu\text{mol } p\text{-NFP}/\text{min}/\text{mL}$)	
	Promedio	Desv. est.	Promedio	Desv. est.
1. NaDox 5 mM (cubeta)	0,403	0,060	$4,8 \times 10^{-6}$	$2,2 \times 10^{-6}$
2. NaDox 5 mM (placa)	0,338	0,194	$2,6 \times 10^{-5}$	$3,1 \times 10^{-5}$
3. Triton X100 4,4 mg/mL + GA 1,1 mg/mL	0,103	0,044	$4,6 \times 10^{-5}$	$2,2 \times 10^{-5}$
4. Triton X100 4,4 mg/mL + GA 1,1 mg/mL	0,022	0,006	$4,7 \times 10^{-6}$	$2,0 \times 10^{-6}$

Finalmente, se optó por calentar el tampón Tris/HCl 20 mM pH 8 que contiene Triton X-100 4,4 mg/mL y goma arábica 1,1 mg/mL a *ca.* 40°C, agregando lentamente y con agitación *p*-nitrofenilpalmitato 3 mg/mL disuelto en isopropanol. Con este procedimiento se logró una disminución considerable de la hidrólisis no enzimática (Tabla 4, ensayo 4). El protocolo final de ensayo de actividad lipasa utilizando *p*-nitrofenilpalmitato, se resume como: 100 μL de muestra y 900 μL de *p*-NFP 3 mg/mL (isopropanol) y tampón Tris/HCl 20 mM que contiene Triton X-100 4,4 mg/mL y goma arábica 1,1 mg/mL, pH 8. La reacción se siguió espectrofotométricamente a 410 nm.

Evaluación de los procedimientos de autólisis y homogenización para la preparación del extracto krill.

Estudio de la preparación del extracto de krill mediante autólisis:

La autólisis se ha descrito como uno de los procedimientos de preparación de extracto enzimático de krill, que consiste en la autodegradación de la muestra, principalmente por enzimas digestivas del krill. Sin embargo, el proceso de autólisis

debe ser controlado cuidadosamente con el fin de obtener las condiciones adecuadas y óptimas para la obtención de la enzima a purificar. Por tal motivo, se examinó los factores más importantes que afectan la autólisis, como son la temperatura y el tiempo.

En la Figura 5 se observa el efecto de tres diferentes temperaturas (5, 20 y 40°C) y seis diferentes tiempos de autólisis (3, 6, 12, 24, 48 y 72 h) sobre la obtención de proteína. La Figura 5 muestra que para el proceso de autólisis a 5°C, la cantidad de proteína obtenida por masa de krill aumenta al incrementar el tiempo empleado en el proceso. Por otra parte, para los procesos realizados a 20 y 40°C se observa que luego de alcanzar rápidamente un máximo en la obtención de proteína ésta disminuye a medida que aumenta el tiempo de autólisis, siendo más marcada la disminución a 40°C.

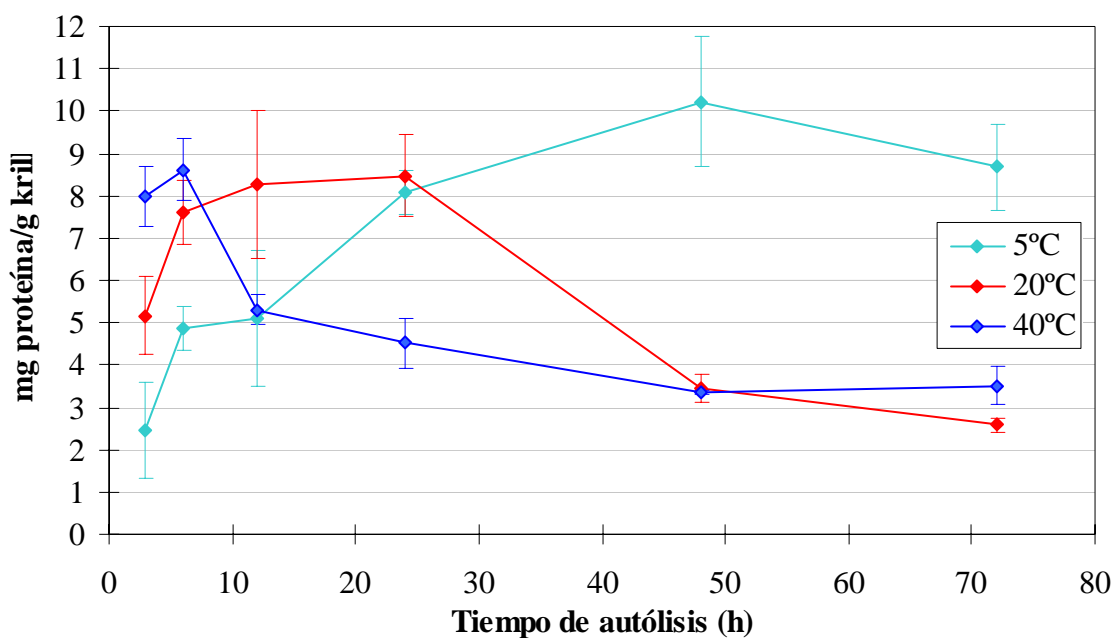


Figura 5. Obtención de proteína bajo diferentes condiciones de temperatura y tiempo en la preparación del extracto de krill mediante autólisis. Los resultados se expresan como el promedio de mg proteína/g krill y su desviación estándar (datos para n=3).

En forma similar se examinó el efecto de tres diferentes temperaturas (5, 20 y 40°C) y seis diferentes tiempos de incubación (3, 6, 12, 24, 48 y 72 h) sobre la actividad lipasa específica en el proceso de autólisis (Figura 6). Se observa que para cada una de las temperaturas en que se realizó la autólisis, se obtiene un máximo de actividad específica. El tiempo en que se presenta el máximo de actividad específica aumenta con la temperatura: 6 h para 5°C, 12 h para 20°C y 24 h para 40°C. Luego de alcanzar el máximo, la actividad para las tres temperaturas decayó al aumentar el tiempo de autólisis. Los máximos de actividad específica obtenidos para cada temperatura resultan similares en magnitud.

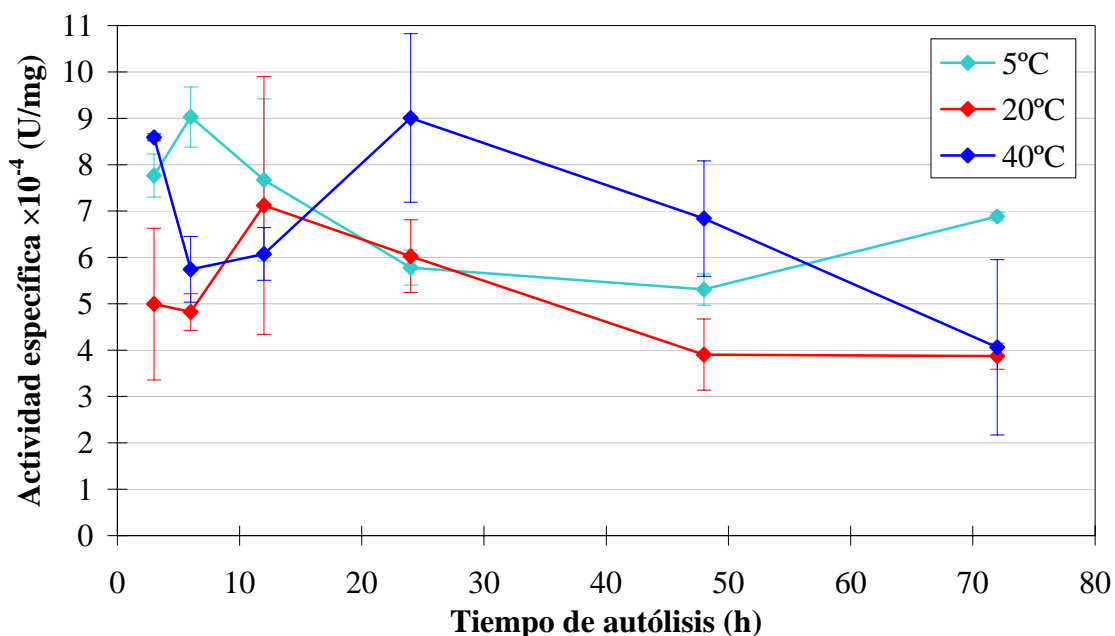


Figura 6. Actividad lipasa bajo diferentes condiciones de temperatura y tiempo en la preparación del extracto de krill mediante autólisis. Los resultados se expresan como el promedio de la actividad específica y su desviación estándar. La actividad se determinó sobre *p*-nitrofenilpalmitato (datos para n=3).

La observación de las Figuras 5 y 6 permite correlacionar la cantidad de proteína y actividad enzimática para las diferentes temperaturas y tiempos de autólisis, señalando que la autólisis a 40°C durante 24 h proporciona una alta actividad específica y una baja cantidad de proteína que la obtenida a 20°C durante 12 h y 5°C durante 6 h.

Los lípidos y pigmentos presentes en las muestras interfieren en los ensayos enzimáticos, como también alteran la migración electroforética de las proteínas [Bollag *et al.*, 1996; Westermeier y Görg, 1998] y la separación cromatográfica de éstas. Por esta razón, es necesario utilizar procedimientos de eliminación y/o extracción de estos interferentes. Con este fin, se seleccionaron cinco métodos, cuatro de ellos permiten la recuperación de proteínas en forma nativa (precipitación con etanol, precipitación con isopropanol, precipitación con polietilenglicol y extracción de lípidos con cloroformo), mientras que el quinto método no permite la recuperación de proteínas activas (precipitación de proteínas con ácido tricloroacético).

Se evaluó el efecto de los distintos tratamientos sobre la recuperación de actividad lipasa sobre un extracto de krill preparado por autólisis (Tabla 5). Se observa que el tratamiento con polietilenglicol permitió la mayor recuperación de actividad lipasa, seguido por los tratamientos con etanol y cloroformo. Sin embargo, la recuperación de actividad en términos generales resultó bastante baja (< 10%) independiente del tratamiento. No se detectó actividad para las muestras tratadas con ácido tricloroacético. Se determinó también la recuperación de proteína para cada tratamiento (Tabla 5). Se observa que el tratamiento con isopropanol recuperó *ca.* 65% de la cantidad de proteína presente previo al tratamiento y el tratamiento con cloroformo

permitió una recuperación de *ca.* 50% de la cantidad de proteína inicial. Los otros tratamientos presentaron bajas recuperaciones de proteína.

Tabla 5. Recuperación de actividad lipasa y proteína en autolisados tratados con diferentes procedimientos de eliminación de lípidos y pigmentos. Los resultados muestran el porcentaje de recuperación de actividad lipasa y proteína luego de los diferentes procedimientos para eliminar lípidos y pigmentos respecto a autolisado sin tratamiento (datos para n=3).

Tratamiento	Recuperación	
	Actividad (%)	Proteína (%)
Cloroformo	4,1±1,5	48,0±11,2
Etanol	4,8±1,6	3,1±1,2
Isopropanol	2,6±1,2	64,1±3,1
Polietilenglicol	6,2±2,3	12,7±6,2
Ácido tricloroacético	sin actividad	0,2±0,1

Se verificó visualmente la presencia de lípidos y pigmentos presentes posterior a la aplicación de los diferentes tratamientos. Los extractos tratados con etanol y ácido tricloroacético presentaron un alto contenido de pigmentos y lípidos (preparación turbia de coloración rosada), los extractos tratados con polietilenglicol también presentaron turbidez y coloración rosada, aunque menor que la observada para los tratamientos anteriores y el extracto tratado con cloroformo se observó libre de pigmentos y lípidos (preparación transparente).

Se examinó el uso de la precipitación con sulfato de amonio como etapa preparativa del extracto enzimático de krill, para determinar si este proceso concentra preferencialmente la actividad lipolítica en un determinado intervalo de saturación, para lo cual se realizó la precipitación diferencial en intervalos de 10% de saturación sobre un extracto obtenido mediante el proceso de autólisis. Eventualmente este procedimiento

sería también útil en la separación de enzimas lipolíticas frente a otras proteínas presentes en el extracto. Se determinó la cantidad de proteína y actividad enzimática sobre *p*-nitrofenilpalmitato recuperada en los 10 cortes obtenidos y en el extracto remanente después de finalizar la precipitación, denominado sobrenadante s90-100% (Figura 7).

En la Figura 7 se muestra el porcentaje de recuperación de actividad lipasa. Se observa que la actividad se centra en el intervalo de corte 0-50% de saturación, concentrando el $75,9 \pm 4,1\%$ de la actividad lipasa. También se observa que la recuperación de proteína se centra en el intervalo 0-50% de saturación de sulfato de amonio, concentrando $85,5 \pm 17,0\%$ de proteína.

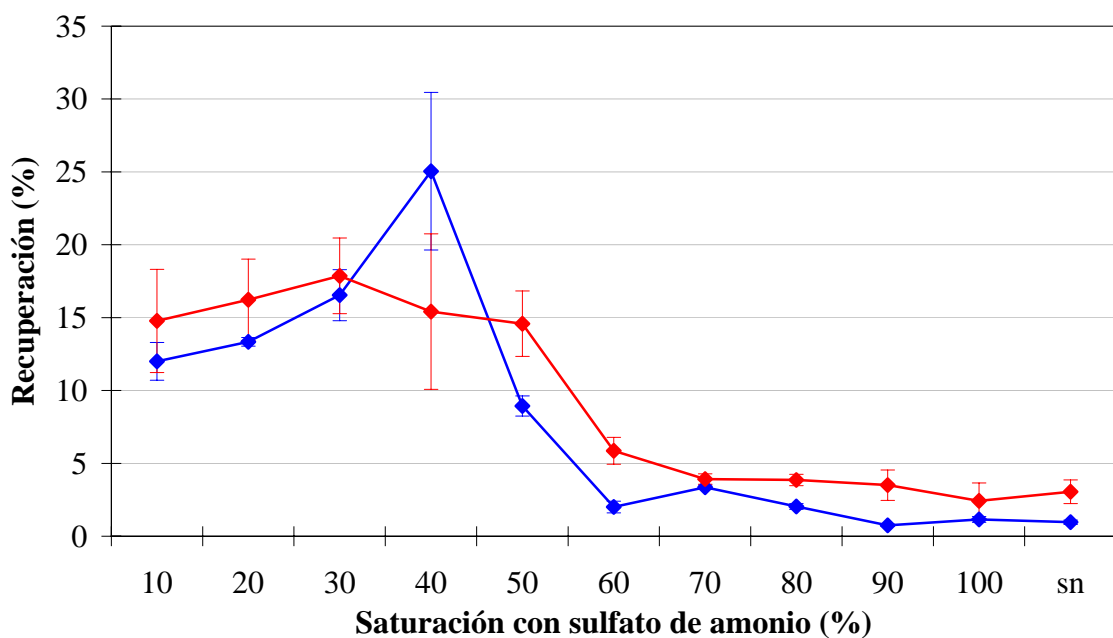


Figura 7. Recuperación de actividad lipasa y proteína para los distintos cortes de separación realizados con sulfato de amonio. Los datos se expresaron como porcentaje respecto a la actividad lipasa (—♦—) y proteína (—♦—) del extracto inicial (datos para n=3).

Se examinó mediante electroforesis en condiciones nativas en geles de acrilamida 7% p/v si los distintos cortes generados mediante precipitación diferencial con sulfato de amonio afectaban la distribución de actividad. Se utilizó un sustrato de amplio rango (sustrato lipolítico) que permite la visualización de esterasas y lipasas (Figura 8A) y también se utilizó un sustrato más específico (Figura 8B), que permite la visualización principalmente de lipasas (sustrato lipasa). Luego de incubar los geles en cada sustrato la actividad se reveló con Fast Garnet GBC.

En la Figura 8A se observa el patrón electroforético de actividad lipolítica obtenido (bandas A-E). Las bandas de actividad más intensas (bandas A y B) se presentaron en todos los cortes, otras bandas presentaron una distribución restringida al intervalo de 0-70% de saturación (banda D).

En la Figura 8B se observa el patrón electroforético de actividad lipasa obtenido. La banda c se observa para todos los cortes, en cambio se observan bandas en la parte inferior del gel presente en el intervalo 40-100% (banda d).

Las bandas tenues observadas en la Figura 8A (bandas C y D) tienen su correspondencia en migración con las bandas presentes en el gel de la Figura 8B (bandas c y d).

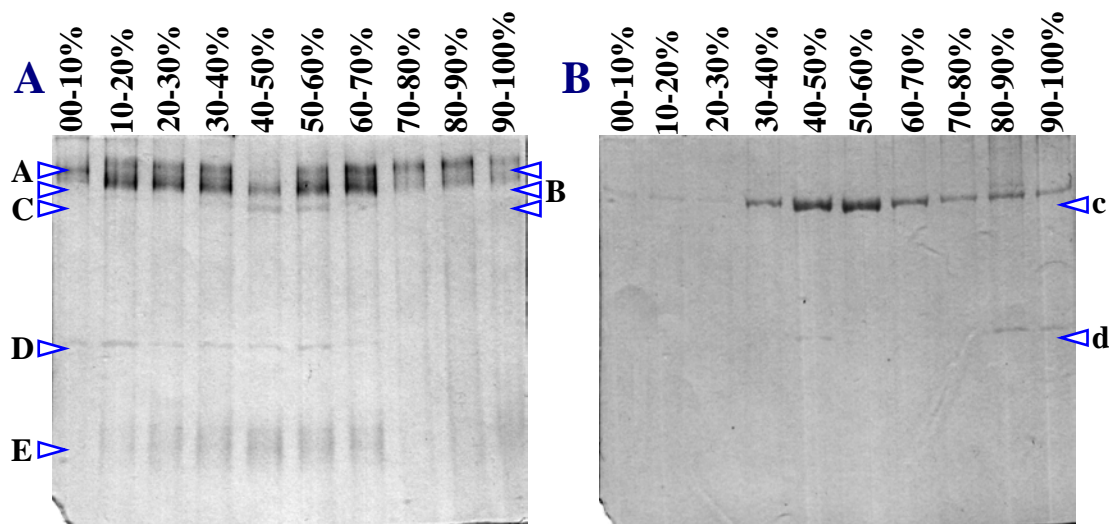


Figura 8. Ensayo de actividad lipolítica *in situ* para cortes diferenciales con sulfato de amonio. En A se muestra gel incubado en α -naftilacetato (sustrato lipolítico) y Fast Garnet GBC. En B se muestra gel incubado en α -naftilpalmitato (sustrato lipasa) y Fast Garnet GBC. El primer carril para ambos geles corresponde al corte 0-10% y el resto de los carriles se cargaron con los cortes progresivamente. Las flechas indican bandas presentes aproximadamente en similar posición para ambos geles. Los carriles se cargaron con igual cantidad de proteína.

La inspección visual de los extractos indicó que el tratamiento con cloroformo fue el más adecuado en la remoción de la coloración rosada característica presente en el extracto sin tratar y observada también en el resto de los tratamientos utilizados. Se examinó entonces el efecto del tratamiento del extracto preparado por autólisis con cloroformo sobre la distribución de la actividad lipasa y proteína en función del fraccionamiento con sulfato de amonio (datos no mostrados). Efectivamente, la recuperación de proteína se concentró en el intervalo 30-70% de saturación reteniendo $85,5 \pm 0,9\%$ de la proteína total inicial y la actividad lipasa específica en el intervalo 20-80% de saturación, concentrando $80,6 \pm 9,7\%$ de la actividad total inicial. Se examinó también el patrón electroforético para cada corte, encontrándose la pérdida de algunas bandas de actividad respecto del extracto sin tratar. Las bandas de mayor intensidad

fueron acotadas a los intervalos 40-70% de saturación para el sustrato α -naftilacetato (actividad lipolítica) y 40-60% de saturación para el sustrato α -naftilpalmitato (actividad lipasa).

Estudio de la preparación del extracto de krill mediante homogenización:

Alternativamente a la autólisis, la homogenización también permite la preparación de extracto enzimático de krill. En forma similar a la autólisis, se debe estudiar las condiciones adecuadas y óptimas de homogenización para la obtención de enzimas lipolíticas.

Con el fin de optimizar las condiciones de preparación del extracto enzimático mediante homogenización, se realizó un estudio de la efectividad del tamponamiento en la preparación de los homogenizados (midiéndose el pH antes y después de la homogenización) y el efecto del pH del tampón de extracción sobre la actividad lipasa y la recuperación de proteína.

Los homogenizados se prepararon en tampones en el rango de pH 6-10. Para cada pH se prepararon dos tampones. Los resultados se resumen en la Tabla 6. Se observa que los tampones para un mismo pH presentan un similar pH final, excepto en los tampones a pH 6. Por otra parte, la menor desviación de pH observada corresponde a la proporcionada por los tampones que ajustan a pH 8, probablemente debido a que el pH “natural” del extracto enzimático obtenido por homogenización en agua es cercano a 7,80.

Tabla 6. Efectividad del tamponamiento en la preparación del extracto de krill mediante homogenización. Para cada pH de homogenización se prepararon dos tampones, se midió el pH antes y después de la homogenización y se calculó la desviación del pH a tamponar ($\Delta\text{pH} = \text{pH final} - \text{pH inicial}$). Datos para n=2.

Tampón	pH inicial	pH final	ΔpH
citrato 20 mM	6	7,99	$1,99 \pm 0,11$
fosfato 20 mM	6	7,26	$1,26 \pm 0,12$
Tris/HCl 20 mM	7	7,73	$0,73 \pm 0,11$
fosfato 20 mM	7	7,55	$0,55 \pm 0,11$
Tris/HCl 20 mM	8	7,85	$-0,15 \pm 0,03$
fosfato 20 mM	8	7,70	$-0,30 \pm 0,01$
Tris/HCl 20 mM	9	8,18	$-0,82 \pm 0,03$
glicina/NaOH 20 mM	9	7,91	$-1,09 \pm 0,08$
carbonato 20 mM	10	8,17	$-1,83 \pm 0,07$
glicina/NaOH 20 mM	10	8,18	$-1,82 \pm 0,06$

Se evaluó la recuperación de actividad lipasa para los homogenizados preparados en los diferentes tampones. La actividad obtenida para cada homogenizado preparado en los diferentes tampones se expresó respecto de la actividad total obtenida para la homogenización en agua (Figura 9). Para una adecuada comparación la actividad de cada homogenizado se determinó bajo las condiciones estándares de ensayo (20°C y pH 8). En la Figura 9 se muestra que la mayor parte de los tampones permite retener *ca.* 60% de la actividad que se obtendría al preparar el homogenizado en agua. Se observa que el tampón citrato pH 6 permitió la mayor retención de actividad y que el tampón fosfato pH 6 recuperó la menor actividad.

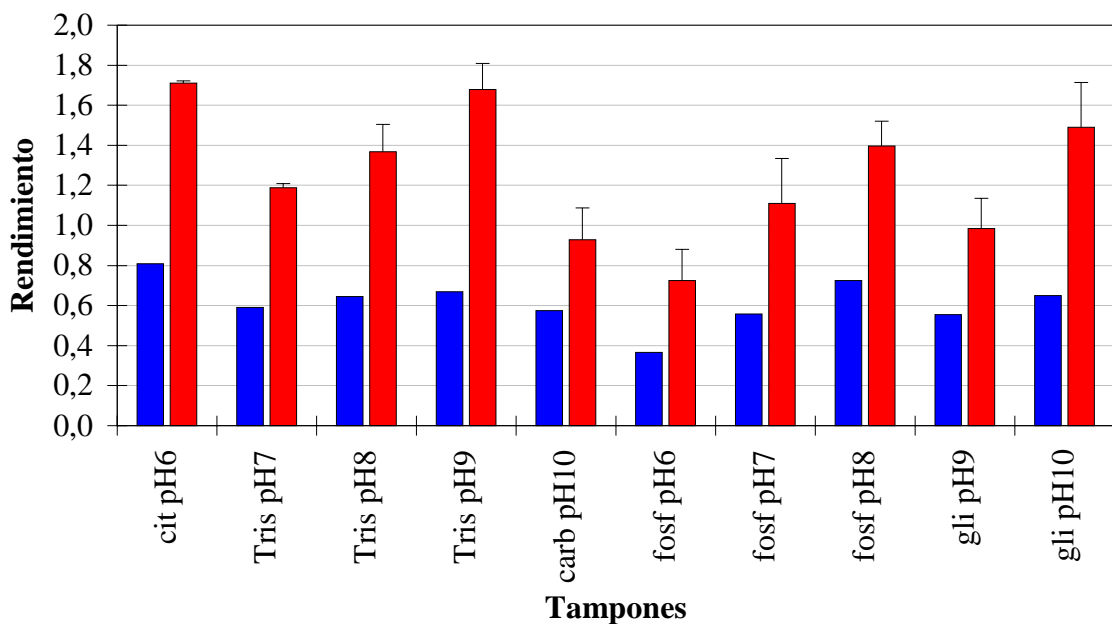


Figura 9. Efecto del pH sobre el proceso de homogenización en el rendimiento de actividad lipasa y proteína. Los resultados corresponden a la actividad total (■) obtenida para la homogenización en los diferentes tampones expresada como número de veces sobre la actividad total obtenida para el homogenizado preparado en agua (datos para n=1). La obtención de proteína (■) se expresó como mg proteína/g krill obtenida de la homogenización en diferentes tampones relativos a la concentración de proteína obtenida para la homogenización en agua (datos para n=2).

Se determinó el rendimiento de proteína para los homogenizados preparados en los distintos tampones, calculado como mg proteína/g krill y expresado como el número de veces sobre el valor determinado para el homogenizado preparado en agua (Figura 9). Se puede observar que, a excepción de los tampones pH 8, existe diferencia en la obtención de proteína entre cada par de tampones para un mismo pH. Los tampones basados en el sistema Tris/HCl pH 7, 8 y 9 presentan en general una mayor obtención de proteína respecto de los otros tampones preparados para igual pH. Los tampones citrato pH 6 y Tris/HCl pH 9 presentaron la mayor obtención de proteína respecto de los demás tampones.

Se examinó por medio de electroforesis en condiciones nativas si la preparación del homogenizado utilizando distintos pHs afectaba la actividad lipolítica (α -naftilacetato) y actividad lipasa (α -naftilpalmitato). Las diferentes condiciones de pH no afectaron los patrones electroforéticos de actividad respecto de los homogenizados preparados en agua y además resultaron similares entre los sustratos ensayados (datos no mostrados).

Se estudiaron a continuación las condiciones adecuadas y óptimas de homogenización para la obtención de un extracto con alta actividad lipasa específica. Un parámetro importante en la preparación del extracto enzimático mediante homogenización es el tiempo del proceso, para lo cual se examinaron tiempos de homogenización entre 15 seg y 4 min (Figura 10). Se trabajó con homogenizados preparados en agua.

En la Figura 10 se muestra el efecto del tiempo de homogenización sobre la actividad específica. Se observa que la actividad específica aumenta a medida que aumenta el tiempo de homogenización hasta alcanzar el máximo a tiempo 2 min, para luego decaer a medida que sigue aumentando el tiempo del proceso. También se examinó la cantidad de proteína obtenida por masa de krill *versus* el tiempo de homogenización y se observa que la cantidad de proteína aumenta a medida que incrementa el tiempo de homogenización.

La correlación entre la actividad y proteína (Figura 10), indica que un tiempo de 1-2 min de homogenización permite la obtención de un extracto con una alta actividad lipasa específica.

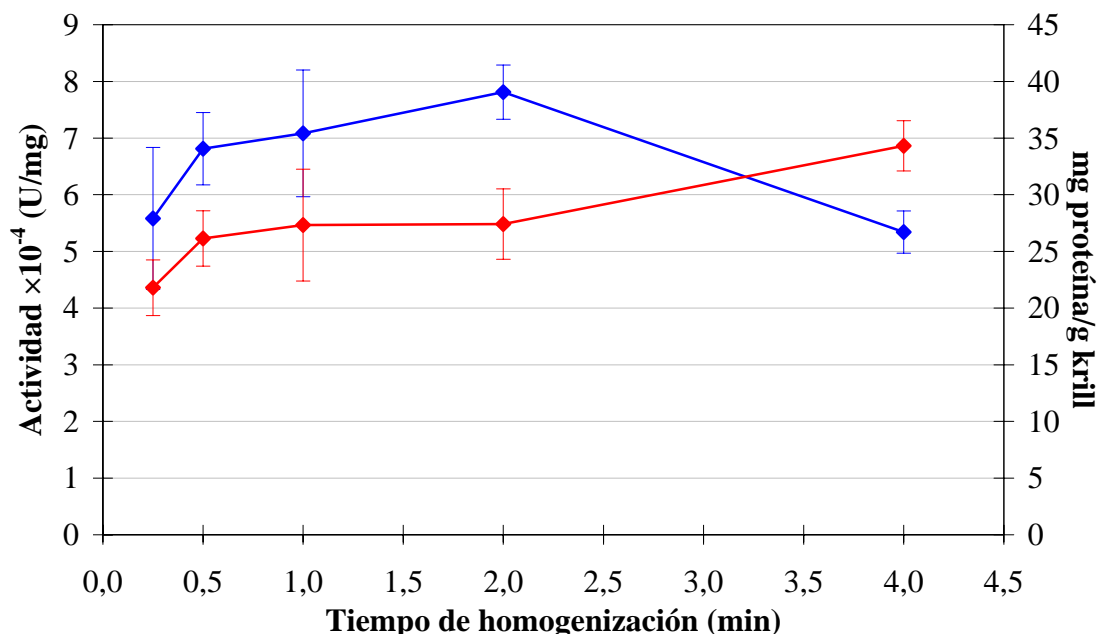


Figura 10. Actividad lipasa específica y obtención de proteína para diferentes tiempos en la preparación del extracto de krill mediante homogenización. Los resultados se expresaron como el promedio de la actividad específica (—◆—) y su desviación estándar. La actividad se determinó sobre *p*-nitrofenilpalmitato. La obtención de proteína se expresó como el promedio de mg de proteína/g de krill (—◆—) y su desviación estándar (datos para n=3).

Otro factor importante en la preparación del extracto enzimático de krill mediante homogenización, es la velocidad de homogenización. En la Figura 11 se muestra el efecto de la velocidad de homogenización sobre la actividad enzimática. Se observa que la actividad aumenta levemente a medida que aumenta la velocidad alcanzando el máximo para 8.300 rpm, sin embargo, si se sigue aumentando la velocidad decae la actividad. En la Figura 11 también se muestra el rendimiento de proteína (mg proteína/g krill) bajo distintas velocidades de homogenización. Se observa que el rendimiento decae a medida que aumenta la velocidad, alcanzando un mínimo para 8.300 rpm, para luego aumentar nuevamente.

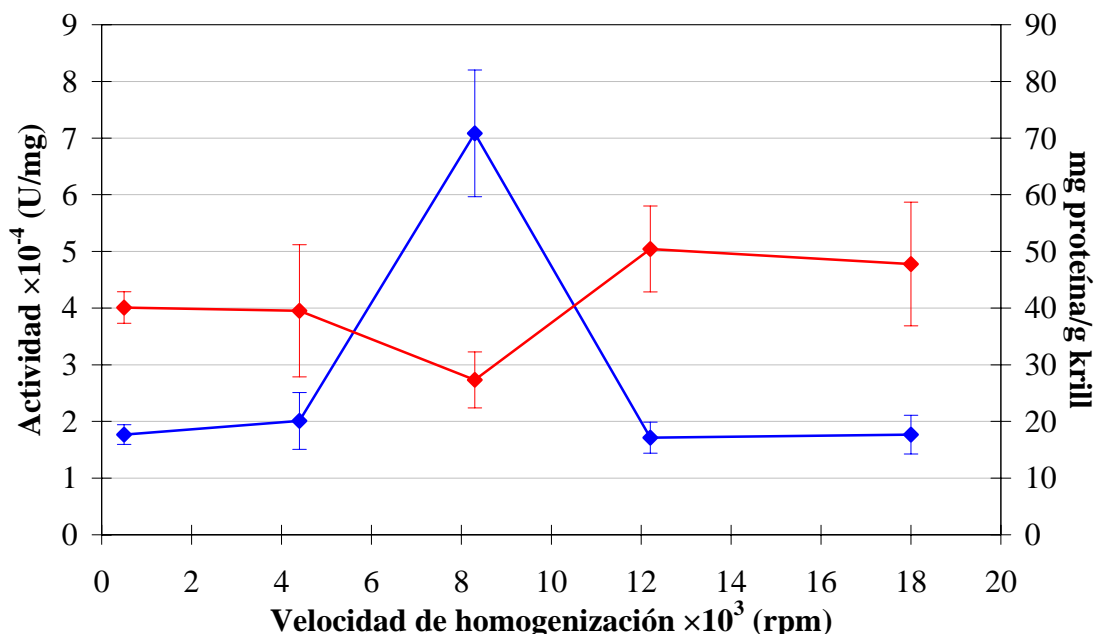


Figura 11. Actividad lipasa específica y obtención de proteína para diferentes condiciones de velocidad en la preparación del extracto de krill mediante homogenización. Los resultados se expresaron como el promedio de la actividad específica (—♦—) y su desviación estándar. La actividad se determinó sobre *p*-nitrofenilpalmitato. La obtención de proteína se expresaron como el promedio de mg de proteína/g de krill (—♦—) y su desviación estándar (datos para n=3).

Finalmente se estudió el efecto de la remoción de lípidos y pigmentos de los homogenizados. Se utilizaron los mismos tratamientos descritos para autolisado. En la Tabla 7 se muestra el efecto de los tratamientos sobre la recuperación de actividad lipasa específica y proteína. En la Tabla 7 se observa que el tratamiento con polietilenglicol permitió la mayor recuperación de actividad ($47,8 \pm 6,5\%$), seguido por el tratamiento con etanol que también permitió una alta recuperación de actividad ($33,2 \pm 7,7\%$). Los tratamientos con cloroformo, isopropanol y ácido tricloroacético presentaron una baja recuperación de actividad lipasa ($< 0,9\%$).

En la Tabla 7 se puede notar que a excepción del tratamiento con ácido tricloroacético, los diferentes tratamientos proporcionaron una recuperación de proteína

de 12-18%. Los tratamientos con isopropanol y polietilenglicol permitieron la mayor recuperación de proteína total, en cambio, el tratamiento con ácido tricloroacético proporcionó la menor recuperación de proteína.

Tabla 7. Recuperación de actividad lipasa y proteína en homogenizados sometidos a diferentes procedimientos de eliminación de lípidos y pigmentos. Los resultados muestran el porcentaje de recuperación (retención) de actividad y proteína luego de los diferentes procedimientos para eliminar lípidos y pigmentos (datos para n=3).

Tratamiento	Recuperación	
	Actividad (%)	Proteína (%)
Cloroformo	0,9±0,1	15,8±2,1
Etanol	33,2±7,7	12,2±3,1
Isopropanol	0,9±0,4	18,5±6,5
Polietilenglicol	47,8±6,5	18,3±0,5
Ácido tricloroacético	0,7±0,1	3,3±0,9

En la Figura 12 se observa el efecto de los tratamientos sobre el patrón electroforético de actividad lipolítica (α -naftilacetato). Los diferentes tratamientos eliminaron diferentes bandas de actividad respecto del patrón electroforético obtenido para el homogenizado sin tratamiento. El patrón electroforético obtenido para el homogenizado tratado con polietilenglicol resultó muy similar al patrón obtenido para el homogenizado sin tratamiento. Los patrones obtenidos para los tratamientos con cloroformo e isopropanol resultaron similares. No se observó bandas de actividad para los homogenizados tratados con etanol, a pesar que este tratamiento permitió una alta recuperación de actividad (33,2±7,7%). El tratamiento con ácido tricloroacético no presentó actividad en el ensayo *in situ*, probablemente debido a la naturaleza desnaturalante del tratamiento.

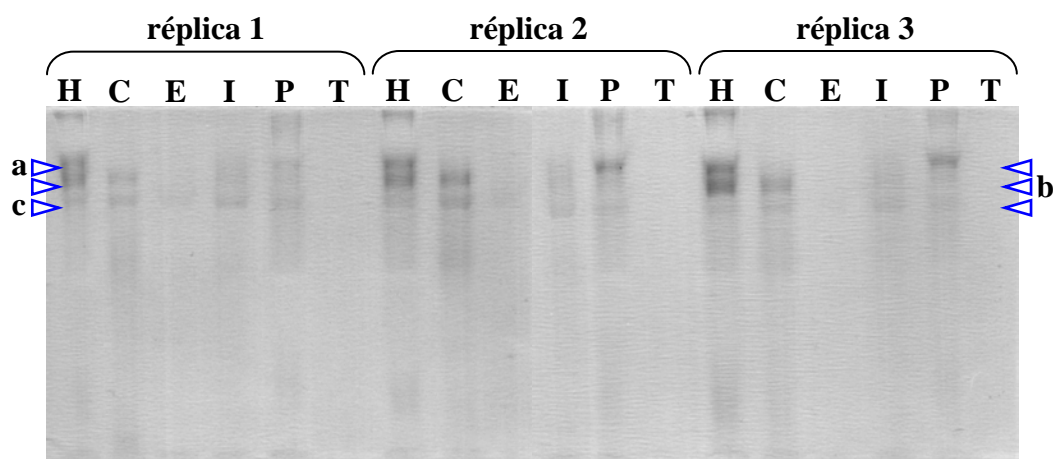


Figura 12. Ensayo de actividad *in situ* de homogenizados tratados para la eliminación de lípidos y pigmentos. Se muestra gel incubado con α -naftilacetato (sustrato lipolítico) y Fast Garnet GBC. Las muestras cargadas corresponden a: homogenizado sin tratar (H), extracción con cloroformo (C), precipitación con etanol (E), precipitación con isopropanol (I), precipitación con polietilenglicol (P) y precipitación con ácido tricloroacético (T). Las flechas indican las bandas presentes aproximadamente en similar migración. Los carriles se cargaron con igual cantidad de proteína.

Caracterización preliminar de las enzimas lipolíticas presentes en el extracto de krill.

Como una aproximación a la caracterización de las enzimas lipolíticas presentes en los extractos de krill obtenidos por autólisis, se evaluaron propiedades como la masa molecular y punto isoeléctrico.

Para la determinación de la masa molecular se utilizaron varios procedimientos, uno de ellos se basó en la separación por tamaño molecular mediante cromatografía de filtración en gel. Se realizaron cromatografías para los cortes 30-40 y 40-50% de saturación de sulfato de amonio. Para las fracciones colectadas se ensayó la actividad enzimática sobre *p*-nitrofenilpalmitato utilizando el método adaptado para placas multipocillos. En base a la curva de calibración se determinó que la separación de masa molecular para las fracciones activas correspondió a 65,7-133,9 kDa y 32,2-65,7 kDa para ambos cortes. Se realizó una nueva cromatografía considerando un menor volumen

de fracción (separación por tamaño molecular más fina) para los cortes 20-30, 30-40, 40-50 y 50-60% de saturación. Se ensayó la actividad sobre *p*-nitrofenilpalmitato en placas multipocillos. Para los cortes 20-30 y 30-40% se encontró actividad lipasa en fracciones equivalentes a la separación de proteínas de 65,7-90,5 kDa; para el corte 40-50% de saturación se encontró actividad lipasa para fracciones que proporcionan una separación de proteínas de 34,6-90,5 kDa y para el corte 50-60% proporcionan una separación de 54,9-93,8 kDa.

Otra aproximación a la determinación de la masa molecular, fue la utilización de electroforesis desnaturante. En un gel de acrilamida 12% p/v se cargaron los cortes 0-40 y 40-80% de saturación junto a un marcador de masa molecular. Las muestras no se hirvieron, pero se mezclaron con tampón de carga desnaturante. Después de la incubación del gel en *p*-nitrofenilpalmitato, se observó la aparición de tres bandas de actividad y en base a la curva de calibración se estimaron sus masas moleculares en 46,6-47,5 kDa; 34,7-35,2 kDa y 29,7-31 kDa.

Además, se utilizó el método de electroforesis nativa para la estimación de la masa molecular de las enzimas lipolíticas presentes en el autolisado. Para ello en geles preparados con distintos porcentajes de acrilamida se cargó autolisado y un marcador de masa molecular. La actividad en los geles se ensayó para α -naftilacetato. A partir de la curva de calibración realizada se estimó sus masas moleculares en 24,7-27,9 kDa y 101,9-123,8 kDa para las bandas de actividad.

Para la determinación del punto isoelectrico de las enzimas lipolíticas presentes se realizó un isoelectroenfoque del autolisado. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 13. Se observan tres zonas de actividad para α -naftilacetato, con puntos

isoelectricos de 5,5-6,0; 6,2-6,4 y 6,6-7,1. La distorsión de las bandas se puede deber a sobrecargado y/o a la presencia de lípidos y pigmentos interferentes.

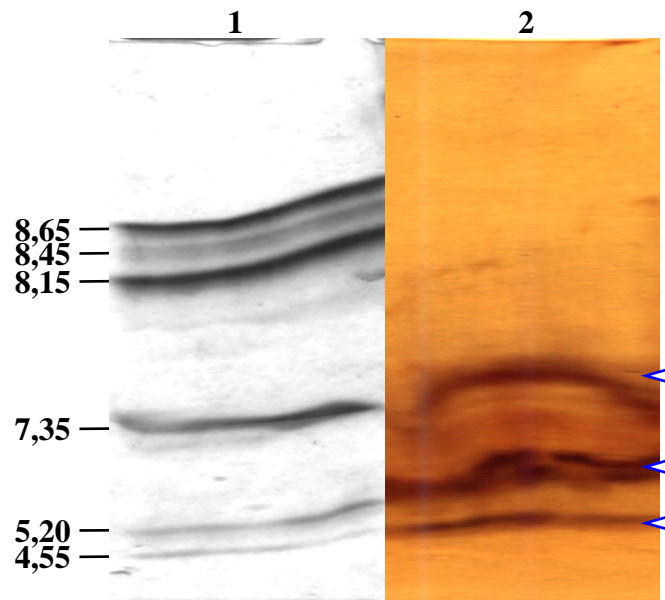


Figura 13. Determinación del punto isoelectrico de las enzimas lipolíticas de krill. El punto isoelectrico de las enzimas lipolíticas presentes en el autolisado se determinó en un gel de pI 3-9. En el carril 1 se muestra el marcador de punto isoelectrico (tinción con plata) y en el carril 2 se muestra el autolisado (tinción de actividad lipolítica *in situ* con α -naftilacetato). Las flechas indican las zonas de actividad.

Separación y obtención de enzimas lipolíticas purificadas mediante cromatografía y electroforesis.

El método más utilizado para la purificación y separación de proteínas es la cromatografía, la que explota la diferencia de propiedades físicas, químicas y biológicas entre la proteína de interés y sus contaminantes. En forma preliminar se estudió la aplicación de diferentes separaciones cromatográficas para la purificación de enzimas lipolíticas de krill a partir de extractos preparados por autólisis u homogenización. Se realizaron cromatografías como filtración en gel (Figura 14), cromatoenfoco (Figura 15) y de afinidad (Figura 16).

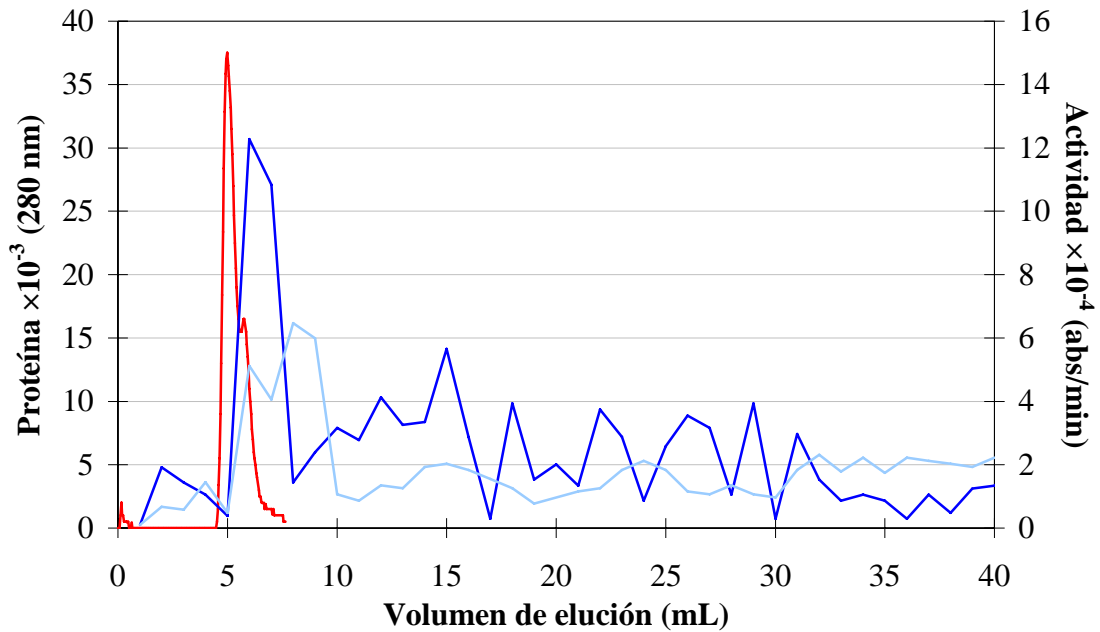


Figura 14. Cromatografía de filtración en gel. La separación se realizó para autolisado sometido a diferentes fraccionamientos con sulfato de amonio (cortes 30-40% y 40-50%). Los perfiles de elución de proteína (—) resultaron similares. Para cada fracción se determinó la actividad lipasa (corte 30-40% — y corte 40-50% —).

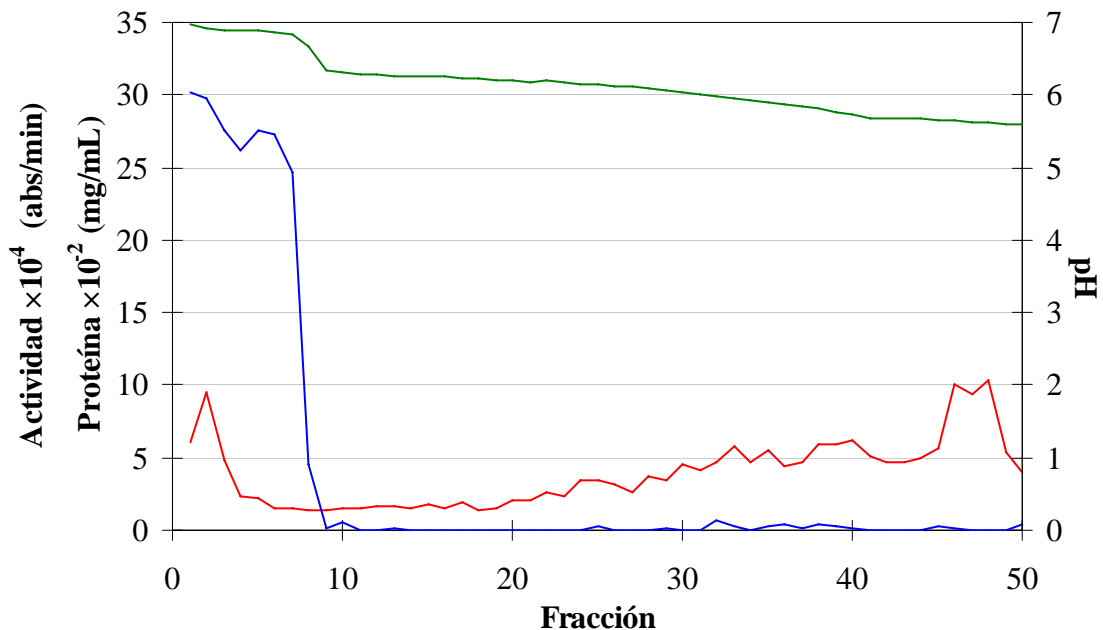


Figura 15. Cromatografía de enfoque isoelectrico (cromatoenfoque). La muestra correspondió a homogenizado. La elución de la proteína (—) se realizó mediante gradiente de pH (—), posteriormente se determinó la actividad lipasa para cada fracción (—).

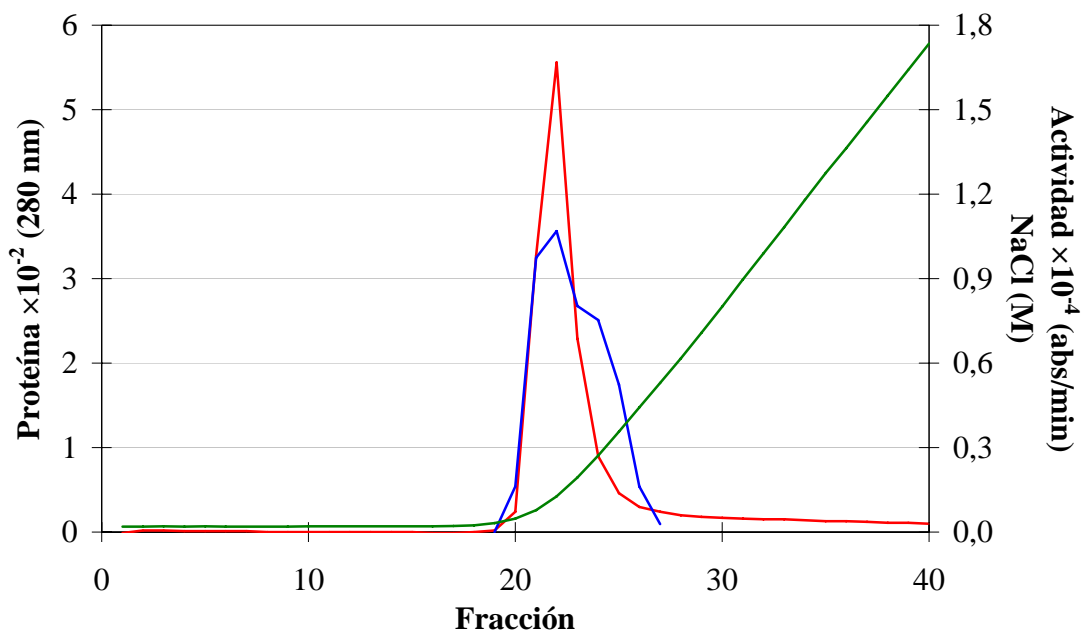


Figura 16. Cromatografía de afinidad. Se realizó la separación cromatográfica para 300 μ L de eluido 1 preparado a partir de autolisado. La elución de proteína (—) se realizó mediante un gradiente 0-2 M de NaCl (—). Se determinó la actividad lipasa para cada fracción (—).

En el Centro de Ingeniería Bioquímica y Biotecnología CIByB se ha realizado un estudio más extenso sobre la separación y purificación de enzimas lipolíticas utilizando métodos cromatográficos [Gutiérrez, 2003]. En este estudio para la purificación de enzimas lipolíticas mediante métodos cromatográficos se trabajó con extracto preparado mediante autólisis tratado con sulfato de amonio en un corte de 0-50% de saturación. Se examinó la separación de las enzimas lipolíticas presentes en diferentes tipos de resinas: S-sepharose (intercambio catiónico), Q-sepharose (intercambio aniónico), butil-sepharose, fenil-sepharose y octil-sepharose (interacción hidrofóbica), siendo la utilización de la columna de intercambio iónico Q-sepharose la que permitió la mejor separación de las enzimas lipolíticas, obteniéndose tres picos principales de actividad lipasa (pool I, II y III) (Figura 17).

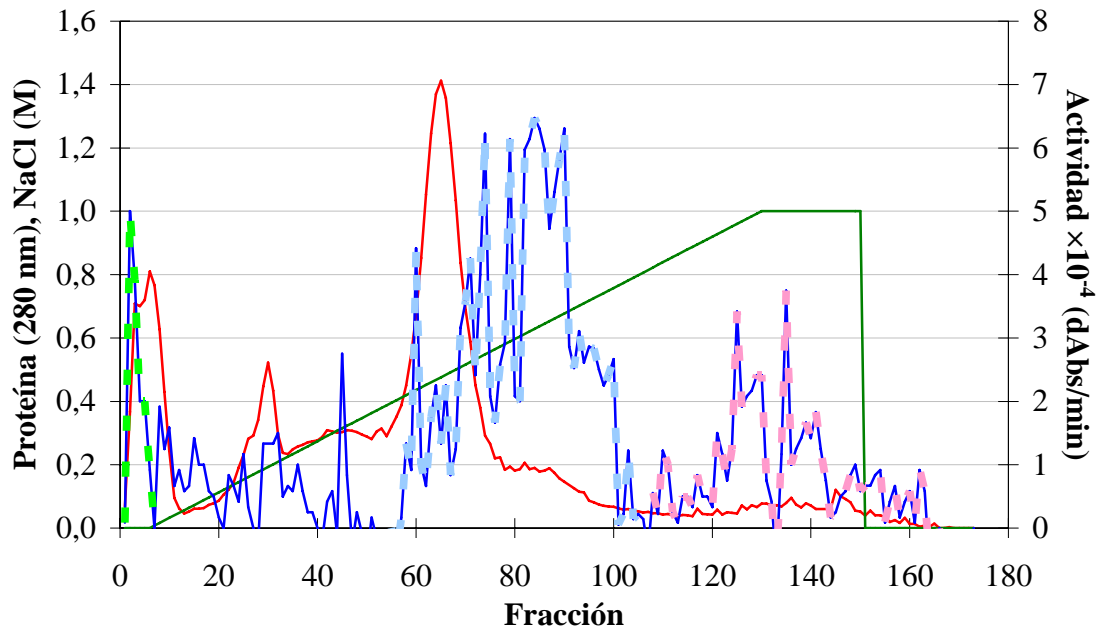


Figura 17. Cromatografía de intercambio aniónico en Q-sepharose. La muestra correspondió al corte 0-50% de saturación de sulfato de amonio de autolisado de krill. La adsorción de proteína (—) se llevó a cabo utilizando tampón Tris/HCl 20 mM pH 7,5 (5 volúmenes de columna) y la elución se realizó con tampón Tris/HCl 20 mM pH 7,5 que contenía NaCl 1 M (—) generando un gradiente 0-1 M (20 volúmenes de columna), a un flujo de 21 mL/min. La cromatografía se realizó en una columna de 5×5 cm a temperatura ambiente y se colectaron 173 fracciones de 16 mL. Las fracciones se concentraron y luego se determinó la actividad lipasa (—) para cada fracción sobre *p*-nitrofenilpalmitato. Se indican los picos de actividad, pool I (---), pool II (---) y pool III (---).

Cada uno de los pooles se sometió a una segunda etapa cromatográfica de separación que permitiera la purificación y concentración de la actividad lipasa. En la Figura 18 se muestra un esquema que resume las secuencias de purificación para cada uno de los pooles obtenidos de la primera etapa cromatográfica (Q-sepharose). En la Figura 18 se indican los porcentajes de recuperación de proteína y actividad lipasa utilizando como referencia el autolisado tratado con sulfato de amonio 0-50%.

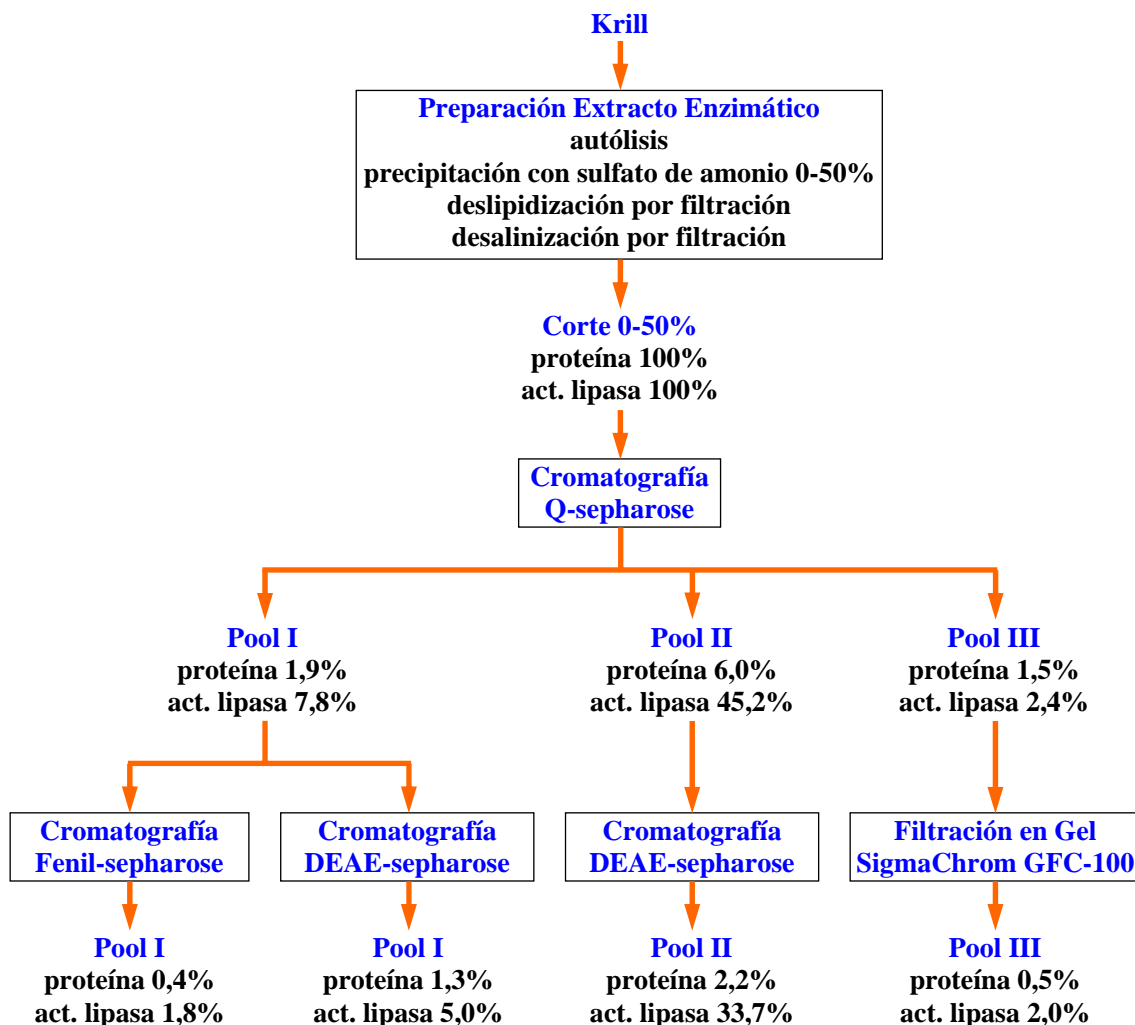


Figura 18. Esquema de la secuencia de purificación de los pools con actividad lipasa. Se indica los porcentajes de recuperación de proteína y actividad para cada una de las etapas cromatográficas de separación.

En la Tabla 8 se señalan algunas de las características determinadas para los pools obtenidos de la segunda etapa cromatográfica, como la actividad lipasa específica y el factor de purificación. Adicionalmente, para algunos pools se examinó la temperatura y pH óptimos.

Tabla 8. Características de los pools obtenidos de la segunda etapa cromatográfica de las fracciones I, II y III separadas en Q-sepharose. Se señala la actividad lipasa específica (U/mg) determinadas sobre *p*-nitrofenilpalmitato, el factor de purificación, la temperatura y pH óptimos de los pools obtenidos de la segunda etapa cromatográfica de separación de los pools I, II y III obtenidos de la separación de autolisado en Q-sepharose. Para algunos pools no se determinó la temperatura y pH óptimos (n.d.).

Muestra	Act. esp. (U/mg)	Factor de Purificación	Temperatura óptima	pH óptimo
Pool I (fenil)	$1,6 \times 10^{-3}$	4,5	n.d.	n.d.
Pool I (DEAE)	$1,4 \times 10^{-3}$	3,9	n.d.	9
Pool II (DEAE)	$1,8 \times 10^{-3}$	15,0	45°C	9
Pool III (GFC-100)	$1,5 \times 10^{-3}$	4,3	32°C	9-10

En forma paralela al trabajo de purificación mediante separación cromatográfica [Gutiérrez, 2003] se estudió la obtención de enzimas lipolíticas mediante la utilización de métodos electroforéticos.

La purificación mediante métodos electroforéticos se inició con la preparación del extracto enzimático mediante autólisis u homogenización como se describe en Materiales y Métodos. La primera etapa de purificación consistió en la realización de una electroforesis en condición nativa. Al finalizar la electroforesis se reveló *in situ* la actividad incubando el gel en α -naftilacetato (Figura 19A). Se cortó la banda con mayor actividad, indicada en la Figura 19A, luego se homogenizó y a continuación se permitió la elución de la proteína por simple difusión durante toda la noche a temperatura ambiente. El eluido obtenido se recuperó por centrifugación y se concentró por ultrafiltración, constituyendo el eluido 1.

La segunda etapa de purificación consistió en la realización de una electroforesis desnaturante. Se utilizó como muestra el eluido 1, la que previamente se desnaturó a 100°C durante 5 min en tampón de carga que contenía 2-mercaptoetanol y SDS. Al

finalizar la electroforesis, se realizó *in situ* la renaturación de las proteínas contenidas en el gel y a continuación se reveló la actividad *in situ* incubando el gel en α -naftilacetato (Figura 19B). Se recortó la banda con mayor actividad, se homogenizó y se eluyó durante toda la noche. Posteriormente, se centrifugó y concentró, obteniéndose el eluido 2. Para efectos prácticos el eluido 2 se denominó KL1.

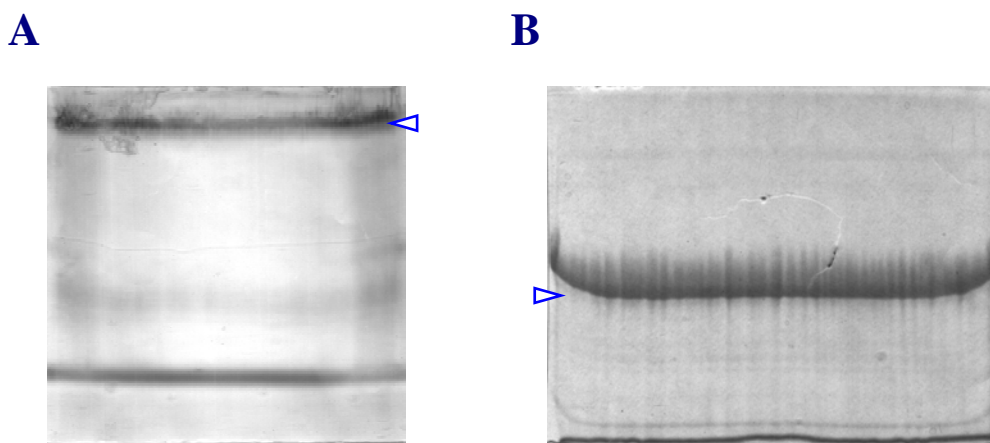


Figura 19. Actividad *in situ* post-electroforesis para las dos etapas electroforéticas de purificación de KL1. En A se muestra gel nativo incubado con α -naftilacetato (sustrato lipolítico) y Fast Garnet GBC. La flecha indica la banda seleccionada para elución (eluido 1). En B se muestra gel desnaturalante incubado con α -naftilacetato (sustrato lipolítico) y Fast Garnet GBC. La flecha indica la banda seleccionada para elución (eluido 2).

En la Tabla 9 se resume el proceso de purificación de KL1 a partir del autolisado y homogenizado de krill.

Tabla 9. Tabla de purificación de KL1. Se indican las diferentes etapas de purificación de KL1 a partir de extracto enzimático preparado mediante autólisis (datos n=3) u homogenización (datos n=1). Para cada una de las etapas se determinó la concentración de proteína (mg/mL), la actividad (U/mL), la actividad específica (U/mg), el factor de purificación y el rendimiento (%).

Autólisis					
Etapas	Proteína (mg/mL)	Actividad (U/mL)	Act. esp. (U/mg)	Factor de purificación	Rendimiento (%)
autolisado	12,176	$8,4 \times 10^{-3}$	$7,0 \times 10^{-4}$	1,0	100
eluido 1	0,416	$1,3 \times 10^{-4}$	$3,2 \times 10^{-4}$	0,5	0,67
eluido 2 (KL1)	0,019	$4,6 \times 10^{-5}$	$2,9 \times 10^{-3}$	4,3	0,10

Homogenización					
Etapas	Proteína (mg/mL)	Actividad (U/mL)	Act. esp. (U/mg)	Factor de purificación	Rendimiento (%)
homogenizado	4,572	$4,7 \times 10^{-3}$	$1,0 \times 10^{-3}$	1,0	100
eluido 1	0,994	$1,1 \times 10^{-3}$	$1,1 \times 10^{-3}$	1,0	1,95
eluido 2 (KL1)	0,009	$5,2 \times 10^{-5}$	$5,7 \times 10^{-3}$	5,6	0,05

En la Tabla 9 se observa que para la purificación de la lipasa KL1 mediante separaciones electroforéticas se obtuvieron muy bajos porcentajes de rendimiento (<0,1%) para las purificaciones a partir de autolisado u homogenizado. El factor de purificación y la actividad lipasa específica final (eluido 2) resultaron similares en magnitud para las purificaciones a partir de extractos preparados mediante los procesos de autólisis y homogenización.

Alternativamente a este trabajo, Mahn (2004) examinó las enzimas lipolíticas presentes en el autolisado sometido a precipitación con sulfato de amonio en un corte 80-100% de saturación. La muestra se sometió a una separación por filtración en gel en una columna de Sephadex G50. Este único paso permitió la purificación de la lipasa KL2 de masa molecular de 86 kDa y pI de 8,2 [Mahn, 2004].

Determinación de las características bioquímicas y fisicoquímicas de las enzimas lipolíticas purificadas de krill.

Determinación de las propiedades fisicoquímicas (masa molecular y punto isoeléctrico) de las enzimas lipolíticas purificadas utilizando técnicas cromatográficas y electroforéticas.

Caracterización de la enzima lipolítica purificada parcialmente de krill KL1:

Finalizado el proceso de purificación mediante etapas electroforéticas, se determinaron las características de KL1. Mediante electroforesis desnaturalante se determinó que la principal banda de proteína tiene una masa molecular de *ca.* 50 kDa y que presenta otras cuatro bandas contaminantes (Figura 20A). Por otra parte, en isoelectroenfoque se determinó la presencia de una única banda de proteína con un punto isoeléctrico de 6,6 (Figura 20B). Los datos obtenidos de masa molecular y de punto isoeléctrico se encuentran dentro de los intervalos de masa molecular y punto isoeléctrico determinados en la caracterización preliminar de las enzimas lipolíticas en extractos enzimáticos.

En la Tabla 10 se resumen las principales características de la enzima purificada parcialmente de krill (KL1).

Tabla 10. Características de la enzima KL1 purificada parcialmente. La masa molecular se determinó en electroforesis desnaturante en gel de acrilamida 7% p/v. El punto isoelectrico se determinó en isoelectroenfoque en condiciones nativas. La actividad específica se determinó sobre *p*-nitrofenilpalmitato utilizando las condiciones estándares de ensayo.

Característica	
Masa molecular	~ 50 kDa
Punto isoelectrico	6,6
Actividad específica	$5,7 \times 10^{-3}$ U/mg homogenización
	$2,9 \times 10^{-3}$ U/mg autólisis

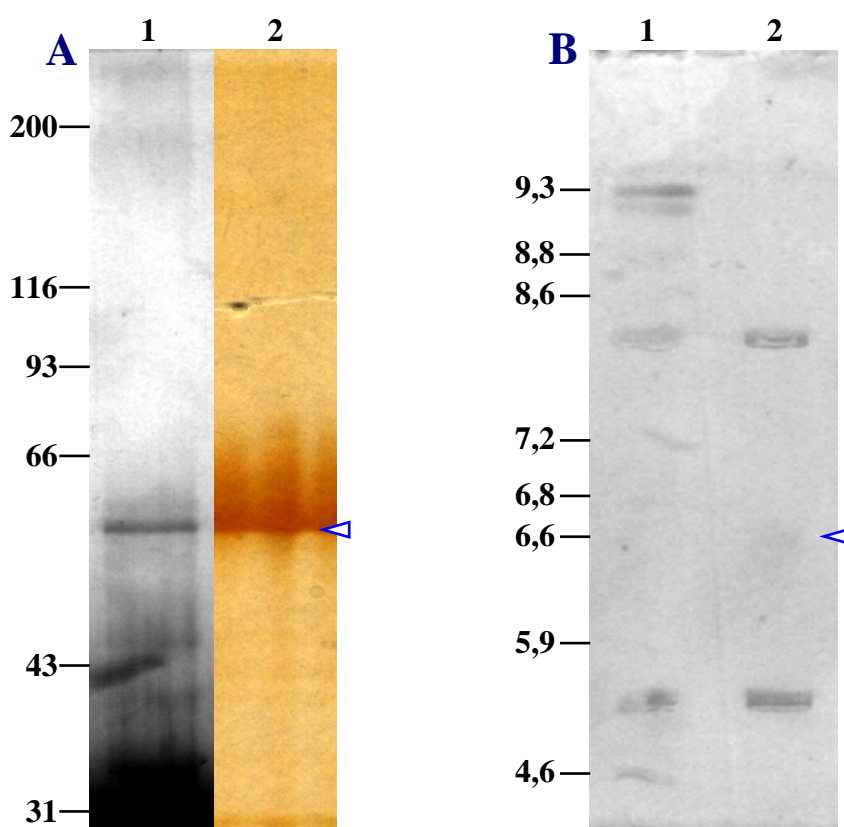


Figura 20. Determinación de las características físicoquímicas de la enzima lipolítica purificada KL1. En A se muestra la determinación de la masa molecular mediante electroforesis desnaturante. El carril 1 corresponde a KL1 (tinción con plata), en el carril 2 se muestra como referencia de migración la banda de actividad (tinción de actividad con α -naftilacetato) recortada para la purificación de KL1. En B se muestra la determinación del punto isoelectrico. El carril 1 corresponde al marcador de pI para el rango de pH 3-9, en el carril 2 se muestra KL1, la flecha indica la posición de la enzima purificada. Adicionalmente se observan dos marcas (pI 5,1 y 8,4) que corresponden a las posiciones de carga de las muestras en el gel (sistema PhastSystem).

Caracterización bioquímica de las enzimas lipolíticas purificadas en base a su actividad, estudios sobre el efecto de la temperatura y pH.

Caracterización de la enzima lipolítica purificada parcialmente de krill KL1:

Se caracterizó la actividad lipasa de la enzima purificada KL1 en función de la temperatura (Figura 21). En la Figura 21 se muestra la actividad específica de KL1 determinada en el rango de temperaturas 10-50°C ensayada sobre el sustrato *p*-nitrofenilpalmitato. Se observa que KL1 presentó una temperatura óptima de actividad a 40°C. Se observó además un mínimo de actividad a 25°C, para temperaturas menores de 25°C la actividad lipasa aumentó y a 10°C KL1 retuvo un 23,1±1,7% de la actividad a 40°C.

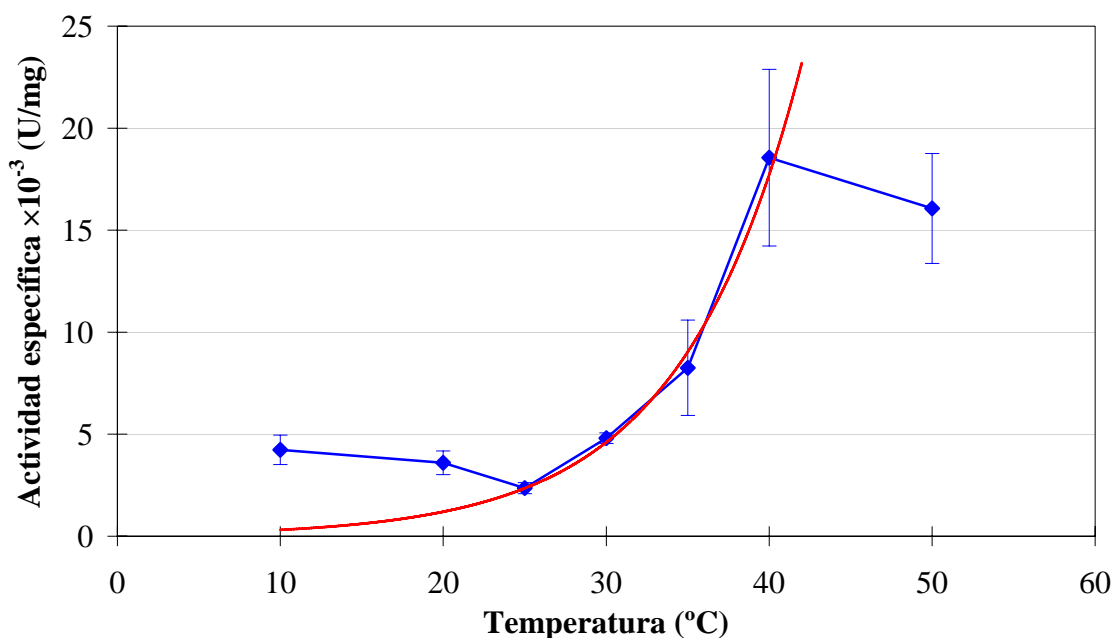


Figura 21. Actividad enzimática a diferentes temperaturas de la lipasa purificada KL1. La actividad se determinó sobre *p*-nitrofenilpalmitato (—) (datos para n=3). Se indica además la dependencia exponencial de la actividad en función de la temperatura (—).

Se evaluó el efecto del pH sobre la actividad específica de la enzima purificada (Figura 22). Como se muestra en la Figura 22, se examinó la actividad en el rango de pH 6 a 10 sobre *p*-nitrofenilpalmitato a 20°C. Se determinó el máximo de actividad lipasa a pH 9. Se puede observar que la actividad de la enzima es mayor en la parte básica de la curva (pH 8-10).

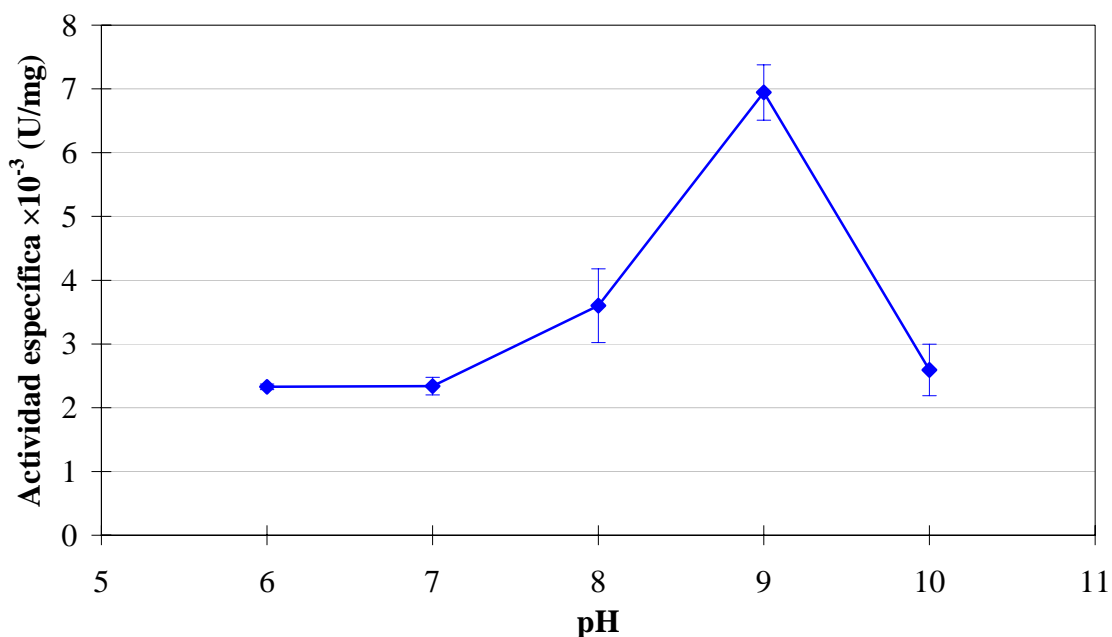


Figura 22. Actividad enzimática a diferentes pHs de la enzima purificada KL1. La actividad se determinó sobre *p*-nitrofenilpalmitato bajo las condiciones de ensayo estándar (datos para n=3).

Caracterización de la enzima lipolítica purificada de krill KL2:

De igual forma se caracterizó la actividad de la enzima purificada KL2. Se caracterizó la actividad de KL2 sobre los sustratos *p*-nitrofenilbutirato (C4) y *p*-nitrofenilcaprato (C10) en función de la temperatura (Figura 23). La selección de estos sustratos para la caracterización bioquímica de KL2 se basó en un estudio preliminar de la preferencia de sustratos.

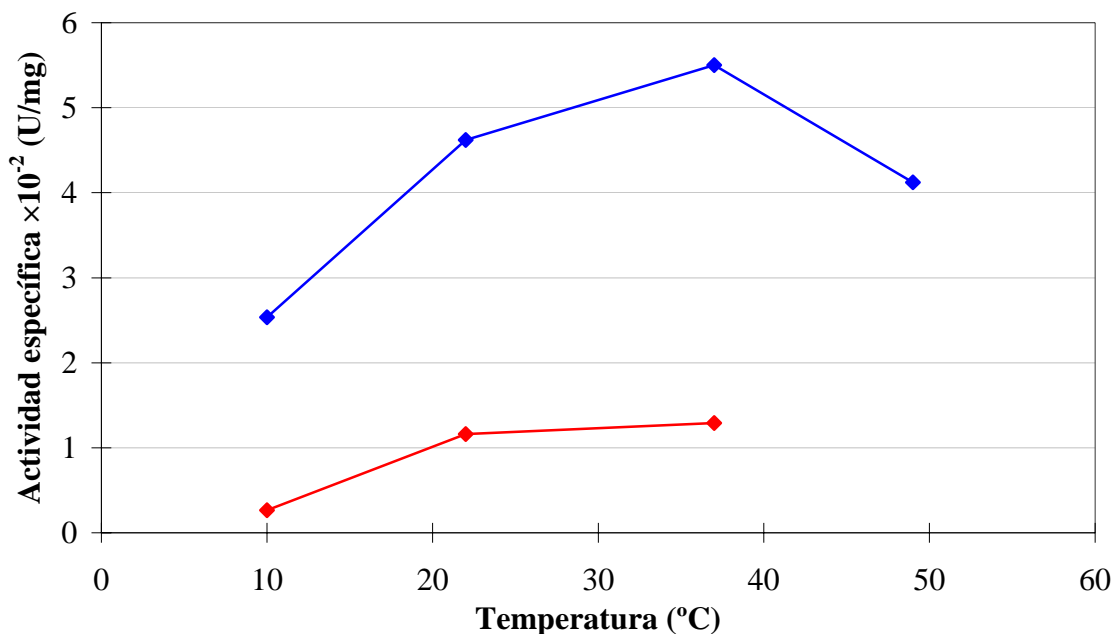


Figura 23. Actividad enzimática a diferentes temperaturas de la lipasa purificada KL2. La actividad se determinó sobre *p*-nitrofenilbutirato (—◆—) y *p*-nitrofenilcaprato (—◆—). Datos para n=1.

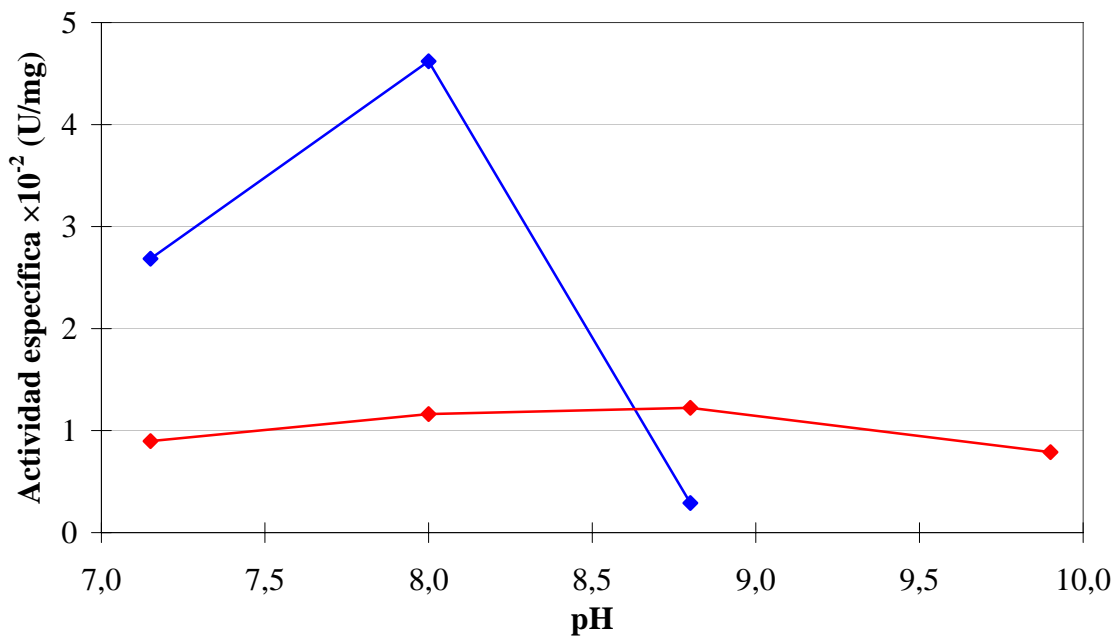


Figura 24. Actividad enzimática a diferentes pHs de la enzima purificada KL2. La actividad se determinó sobre *p*-nitrofenilbutirato (—◆—) y *p*-nitrofenilcaprato (—◆—). Datos para n=1.

En la Figura 23 se observa que la temperatura óptima para KL2 es 37°C para la actividad sobre *p*-nitrofenilbutirato, mientras que a 10°C KL2 retuvo alrededor del 46% de su actividad máxima a 37°C. La actividad sobre el sustrato *p*-nitrofenilcaprato se determinó tan sólo para tres temperaturas, por lo que los datos no son concluyentes sobre la actividad óptima.

Se examinó también el efecto del pH sobre la actividad específica de KL2 (Figura 24). En la Figura 24 se observa que el pH óptimo fue de 8 cuando se ensayó la actividad sobre *p*-nitrofenilbutirato. El pH óptimo fue de 8,8 cuando se examinó el efecto del pH sobre *p*-nitrofenilcaprato. El efecto del pH sobre la actividad cuando se ensayó sobre *p*-nitrofenilcaprato fue menos pronunciado que sobre *p*-nitrofenilbutirato, manteniendo una alta actividad entre los pHs 8 y 9,9.

Determinación de la energía de activación de las enzimas lipolíticas purificadas de krill.

Se calculó la energía de activación (E_a) de la reacción catalizada sobre *p*-nitrofenilpalmitato para KL1 y sobre *p*-nitrofenilbutirato para KL2 (Figura 25) a partir de las curvas de actividad lipolítica/lipasa en función de la temperatura. La Figura 25 muestra el logaritmo natural de la actividad específica *versus* el inverso de la temperatura absoluta, la pendiente de la curva corresponde a $-E_a/R$ donde R corresponde a la constante de los gases. Los datos graficados corresponden a la parte exponencial de las curvas de actividad en función de la temperatura. Para KL1 se obtuvo un valor de E_a de $24,7 \pm 5,3$ kcal/mol para el rango de temperaturas de 25-40°C; para KL2 el valor de E_a fue de 4,9 kcal/mol para *p*-nitrofenilbutirato en el rango de

temperaturas de 10-37°C. Para *p*-nitrofenilcaprato no se determinó la energía de activación, debido a que se determinó la actividad sólo para tres temperaturas.

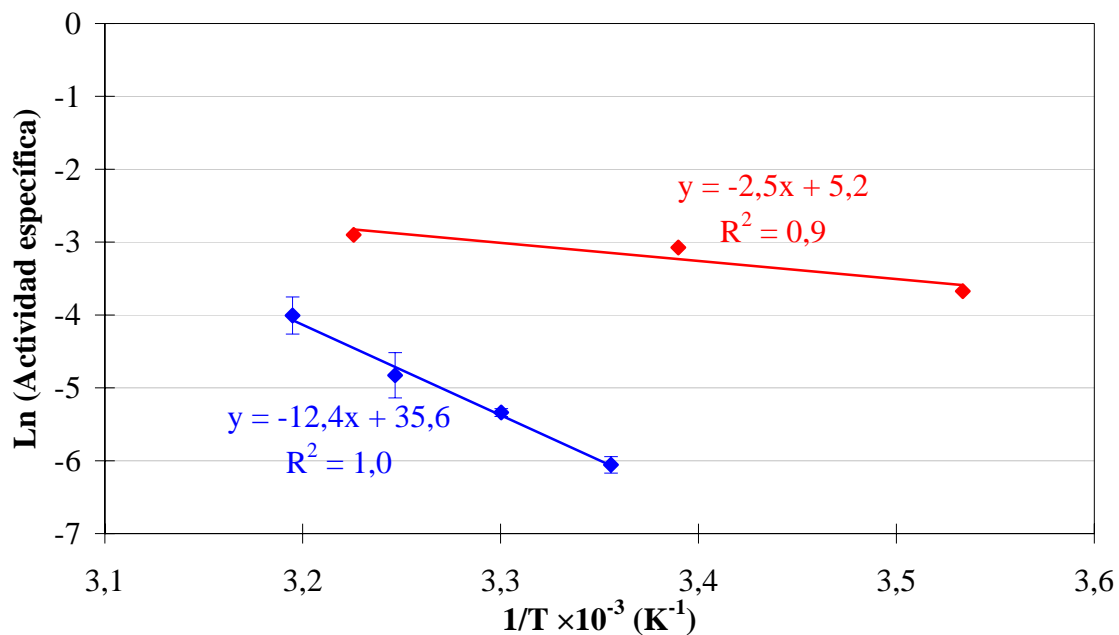


Figura 25. Determinación de la energía de activación (E_a). Se determinó la energía de activación de KL1 para la reacción catalizada sobre *p*-nitrofenilpalmitato (—◆—). Datos para $n=3$. Para KL2 se evaluó la energía de activación utilizando como sustrato *p*-nitrofenilbutirato (—◆—). Datos para $n=1$.

Secuenciación y análisis de las secuencias de las enzimas lipolíticas de krill antártico.

Análisis preliminar de las secuencias aminoacídicas de enzimas lipolíticas de eucariontes: dominios y familias de lipasas.

Las lipasas de origen bacteriano han recibido una especial atención y al respecto se han publicado varios artículos relacionados con las características de sus secuencias y que han permitido su clasificación en diferentes familias [Jaeger *et al.*, 1994; Arpigny y Jaeger, 1999; Jaeger *et al.*, 1999]. Por el contrario, las lipasas eucariontes han sido poco

descritas en función de sus secuencias [Hide *et al.*, 1992; Wong y Schotz, 2002], por lo que la caracterización preliminar de los dominios, familias y bloques de enzimas lipolíticas permitiría la identificación de zonas conservadas para un posterior diseño de partidores.

Las secuencias consenso para los dominios, familias y bloques de lipasas se muestran en las Tablas 11, 12 y 13. En color rojo se indican las zonas conservadas, en azul se muestran los aminoácidos del sitio activo y se señalan subrayados los aminoácidos del sitio de unión a sustrato y la cavidad oxianiónica.

Las secuencias consenso para los dominios y bloques de lipasas fueron proporcionados por sus respectivas bases de datos y fueron generadas a través de modelos ocultos de Markov [Henikoff *et al.*, 2000; Marchler-Bauer *et al.*, 2002]. En cambio las secuencias consenso de las familias de lipasas fueron generadas considerando una fracción aminoacídica de 50% (frecuencia de aparición en una determinada posición de un determinado aminoácido), a partir de los alineamientos proporcionados por la base de datos LED generadas utilizando el algoritmo CLUSTALW [Pleiss *et al.*, 2000; Fischer y Pleiss, 2003].

Tabla 11. Secuencias consenso de los dominios de lipasas eucariotes seleccionados. Secuencias consenso proporcionadas por CDD de los dominios seleccionados.

Abhydro_lipase	
1	D ESNLT S Q L IEK W Y P A E EH V T T ED G Y L L T L H R I P R G K K N - S E- L GG R PP V LL Q H L LD S SN W V S N L 69
CVT17	
1	FASPLHLGCIIL--LCLIAIFYALPDYLSVGKSSR--MDQKSD--FRLKSIYRHGVGANHRLHORLEVTPEVISAA-- 72
73	---T---EDMLPLLLQTPYGYG---E--LRRVQLASVRFKSVLE---IYSERLSTAQ---MWQYETIV 125
126	FPNI TD RVTLLSLIEMSNAYHSIPLDGDRNVTPEWNETVPTFGMDGDLGRVFNDSKIVVAFKGGKTSIMGLEGG 205
206	G--TSRKDKLNDNL L FSCCCARVSYLWTTVCDCVYSICDKECLEEETREFD--RYYSAA L DILGAVRRIY P DARLWL 280
281	TGHLGGAIASLLGIRFGLPVVAFESPDAYAANRHLHPDPLGPNMEGIIWHFGHNADPIFRGECTGLYSPCGILGYAM 360
361	ETRCTGRSCYDVVRDRKWDLSLVYHHRGMVAKIVMSKEYVLI E CKEDINCVDCYNK F -P--DWES 425
Esterase_lipase	
1	LVVTP-rGKVRGVDEg-----GVYSFLGIPYAEPPVgdLRFKEPOPEpw-----sdVIDATSYPPSCMOWdqIgggI-- 67
68	-----wnakIpgSEDDCLYNVYTPkntk-----p gn sLPVMYI HGGGF WFGSGsly----- 114
115	-p9DGLAREGd-----nVIVSINRILGVLGFLstgdi-----elppNYGLKQRLAKLKWQDNIAAFGGDDPSVTIFGE 183
184	SAGGAS VSLLLLSpds-----kgLFRALISQSGSALspwai--genarGRAKRLARLLGcndtss-----aelLDCLRS 250
251	KSAE LLDAt r klIlf-----sy sp lFPGPVVDG-----FIPDDEELIkeg-kfakVPLIIGVTKDEGGY 312
313	FaamlInfdak-----lietndrwl LELLPYLL Fyad-----daLADKVEKYPgqvdv-----sves 365
366	r h NLSDMLTDLLFKCpa-RYFLAQHr k ag-gspVVA V YFDhr s slsvg-----r w ppwlgt VHGDE IFFVf g np l lkeg 437
438	lr-----e ee eklsr t mKYANFAK T GNPnteg-----nlvVVPAYtse---seKYLDInI--egTEIKQ 493
HSL_N	
1	MDLr T WTQSLVTLAEDNIAFFSSQPGETAQRLSGVFAGVROALGLEPALGRLLGLVAHLFDLDPETPANGYRSILVHTAR 80
81	CCLAHLLHKSRVYASNRRSIFPRTSHNLAELAYLAALTQLRALVYAQRLLVTNRPGLVFFEGDEGLTADFLREYVTLH 160
161	KGCFYGRCLGFQFTPAIRPFLQTSIGLVSGEYHKRNETGLSVAASSLFTSGRFAIDPELGAEFERITQNLVDVHFWKA 240
241	FWNITEMEVLSSLANMASATVRSRLLSLPPPEAFEMPLTADPTLIVTISPPLAHTGPGFVLVRLISYDLREGQDSEELSS 320
321	LKKSNGORSLELMPRPQOAPRSRL 345
Lipase	
1	SEVPYQLGCGFKDKKPTAGnTLARPAKSLP-WQPKFGE--VRFLLYTNEP--NNCQLIPTGLPSTIEAVNFNTSKLTQA 75
76	I HG YNDKqg-----EESWISD CK NLFQVt-EGVNVIVD W SGSGSTTHYRQAVLNVRVVGAVV 133
134	AKLLVELEELNVSPENVHLI G HSLGAHVAGAAGRRYKk--hKLRITGLDPAGCPFKGTPELRLSPGDADFDVAIHT 211
212	DTRPI-PGLGMGTSORVGHVDFPFGSE-OPGCKNNYL-----EGTO-FVACA H MRSRVRYFAESIL--NER-NF 275
276	PAYPCSSYDFEKND C FGCPK---RCPYMGY-ATDFDGT S KV E GYIQTNSKSPF 330
lipase3_N	
1	LLSAVACACAGAWAKASTQS-----RECSYTYSEDSNFWVQYAAAEY--FEPVPRGARAILLAVYCGk---LRC 64
65	PEVEPAGATILL 76
PLAT	
1	VRYQVVAVTGG-StgAGTTGKYGISLYGEEGESTLIPLLKPELka-----PGSTYSFTFDVD-EDLGE L GAVRIRNE 70
71	---HSGL-----SP EW FLK S ITVKDGGTQ-----GK V HFP C NS W YV G a-----DEYLF L R I F 114

Tabla 13. Secuencias consenso de bloques de lipasas relacionadas con la digestión.
Secuencias consenso proporcionadas por Blocks.

Heplipase

```

1  mgnpLCISIFLVLFCIFIQSSACGGQGLGPEPFGRAGATEskplkkpetrflffqdendrlgGCQIRPQHPTLQEGfns 80
81  sqplimihihgwsvdgllewiwkivsalLKSQPAQPVNVGLdwislavqhytiavqntriavqgdvaalllwleesakfsr 160
161 skvhligyslgahvVSGFAGSSMGGKHKIritgldpagpmfegtspnerlspddanfvdaihtftrehmglsvgikqpia 240
241 hydfypnggsfpggchfleykhiaehgltnaitqtikcahersvhpfidslqHSLQSMGYQCSDMNFSQlclscckg 320
321 rcntlgdirkdirsgkskrflitraqspfkvyhyqfkiqfinqiekpveptftmsllgtTKEEMQKIPITLGEGITSNt 400
401 ysflitldkdigelillkfkWENSAVWANVWNTVQTIMPWi ephhsglilktiwvketqqrmtfcCPENLDDLQLHP 480
481 TQEKfvncevksk 493

```

Lipolipase

```

1  rdfidieskfALRTPEDPEDTCHLIPGvaesvatchfnhssktfmvihgwTVTGMYESWVPKLVAALYKREPDSNvivv 80
81  dwLTRAQQHYPSAGYTKLvggdvarfinwmeeefnypldnvhllyslgahaaGIAGSLTNKKVNRitgldpagpnfey 160
161 aeapsrlspddadfvdlhtftRGSPGRSIGIQKPVGHVdiypnggtfpgcni gearviaaerglgdvdqlvkcs 240
241 ihlfidslneenpskayrcskskeafekglclscrknrcnnglyeinkvrakrskmylktersqmpykvhfygvkIHFSG 320
321 TENxTHTNQAFeislygtvaesenipftlpevstnkysfliytevdigellmlklkksdSYFSWSDWSSSPFGIQki 400
401 rvkagetqkkvifcsREKVSHLQKGKEEVFVKCHDKSLnkks 444

```

Panclipase

```

1  lllgavagsEVCYDRLGCFSDDKPWAGGTVERPLKVLWPpstintrfFLLYTNENPNNYQvtadDPSTIKASNFQTRDR 80
81  fiihxyiIDKGEENWLSMCKNMVFQVEvncCICVDWKGGSRTTYTQAAQNrvvgaevayfvdalqsqlgysspnvhiigh 160
161 slgshvageagrtrngnigrigritgldpaepcfqgtpelvrldpsdaqfvdihtDAAPIIPFLGFGMSQTVGLdffpngg 240
241 vempgqkniisqivdingiwegtrdafaacnlrsykyidsilnptgfagfscsyntfssnncfpasggcpqmgghya 320
321 drfsgktnelfqqfylvntgdasnfswryqiavtlsgrkvtghlvslvlysgsgtskqyeiykgsllpgpvtsvnqidsdvd 400
401 vgdiekvkiwynninptlpkvgassiqvtrndgrvfnfFCSSDTRVEDVLLTLYP 457

```

Taglipase

```

1  fqtqlsdpstIQNCNFNHSRKRTRFIHGWIDGGEENWIPDMCKAMfqueevncICVDWLSGAQQHYTQAannvRIVGAE 80
81  VAYFINWLEEEFGYsasNVHLIGHSLGAHAAGEAGSrtpglgritgldpveanfegtpvevrlpsdadfvdihtdaap 160
161 lipflgfgtnqmvghfdffpnggqympgckknalsqivdidgiwsgtrdfvaCNHERSYHYIDSILNpdgfaaypcasy 240
241 rdFEKNKCFPCPKGGCPQMGhyadkfanntsvepqkfflntgeakPFKRWHYQVKITFSGQvtvtgqkvsvlfgsngntrq 320
321 cdifrgiikpgaTHSFEIDTDVDVGELQVKFLWnnhvvnpsfp 364

```

Al comparar las secuencias consenso señaladas en las Tablas 11, 12 y 13 se observa que los dominios presentan mayor número de regiones conservadas, como también, una mayor longitud de estas respecto de las familias y bloques de lipasas. Sin embargo, se debe considerar el número de secuencias con que se construyó cada secuencia consenso (e.g., el dominio HSL_N se construyó en base a dos secuencias de lipasas sensibles a hormona, el dominio CVT17 se construyó utilizando tres secuencias) y también el método con el que se generó la secuencia consenso (i.e., modelos ocultos de Markov o fracción aminoacídica).

Se comparó los dominios con las familias de lipasas (Figura 26). Como se observa en la Figura 26, las familias lipasa pancreática y lipasa hepática contienen el dominio lipase. En el caso de las lipasas pancreáticas el dominio lipase presente contiene los aminoácidos del sitio activo (A1, A2 y A3) y los aminoácidos que conforman la

cavidad oxianiónica (O1 y O2), en cambio en la familia lipasa hepática el dominio lipase no contiene el residuo de histidina del sitio activo (A3). En la Figura 26 también se observa que las familias lipasa gástrica y lipasa ácida lisosomal contienen el dominio abhydro_lipase. En ambas familias el dominio contiene sólo el residuo O1 de la cavidad oxianiónica. En el caso de los bloques de lipasas seleccionados, todos los bloques excepto heplipase contienen el dominio lipase.

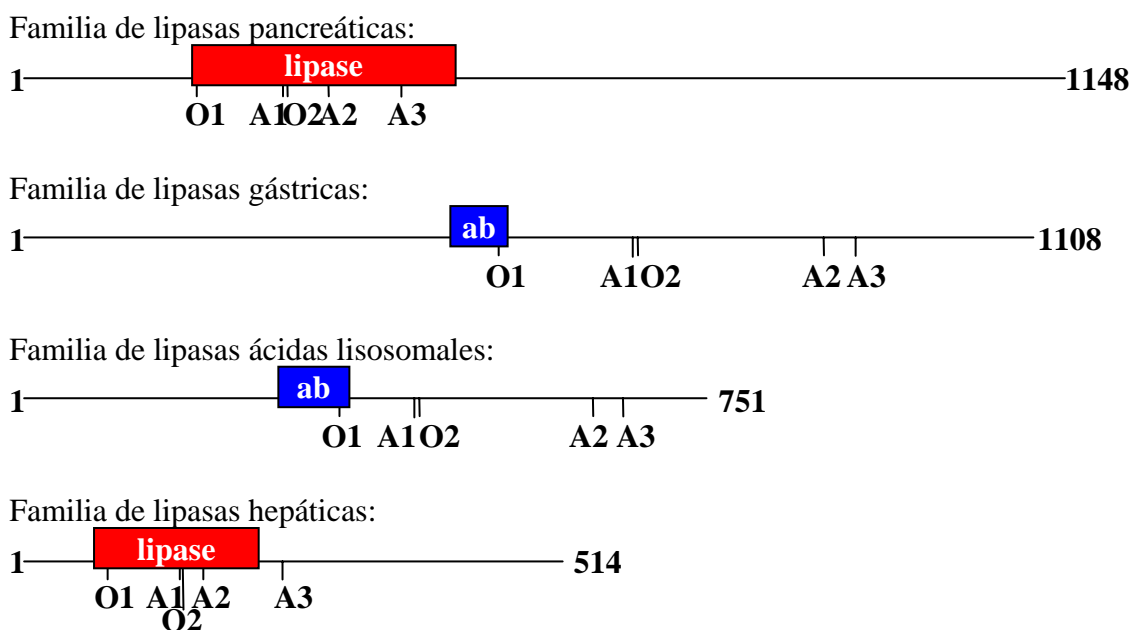


Figura 26. Esquema de los dominios presentes en las diferentes familias de lipasas. Se indica los dominios observados en las familias de lipasas (dominio lipase en rojo y dominio abhydro_lipase en azul) y además la distribución de los residuos de la cavidad oxianiónica (O) y del sitio activo (A). Se indica la longitud aminoacídica de cada familia de lipasas.

En la Tabla 12 se observa además que las familias de lipasas contienen varias secuencias conservadas distribuidas a lo largo de la secuencia consenso, sin embargo, la mayoría de las secuencias conservadas presentaron una pequeña longitud o alternativamente los aminoácidos conservados se encontraron separados por pequeñas

regiones no conservadas o de baja conservación. Incluso los aminoácidos del sitio activo (tríada catalítica) y de la cavidad oxianiónica se encuentran dentro de zonas poco conservadas o bien dentro de zonas conservadas cortas. En la Tabla 13 se observan también varias regiones conservadas dentro de los bloques de lipasas, de longitud media (ca. 10 aminoácidos), sin embargo, sólo unas pocas secuencias conservadas contienen a los aminoácidos de la tríada catalítica o de la cavidad oxianiónica.

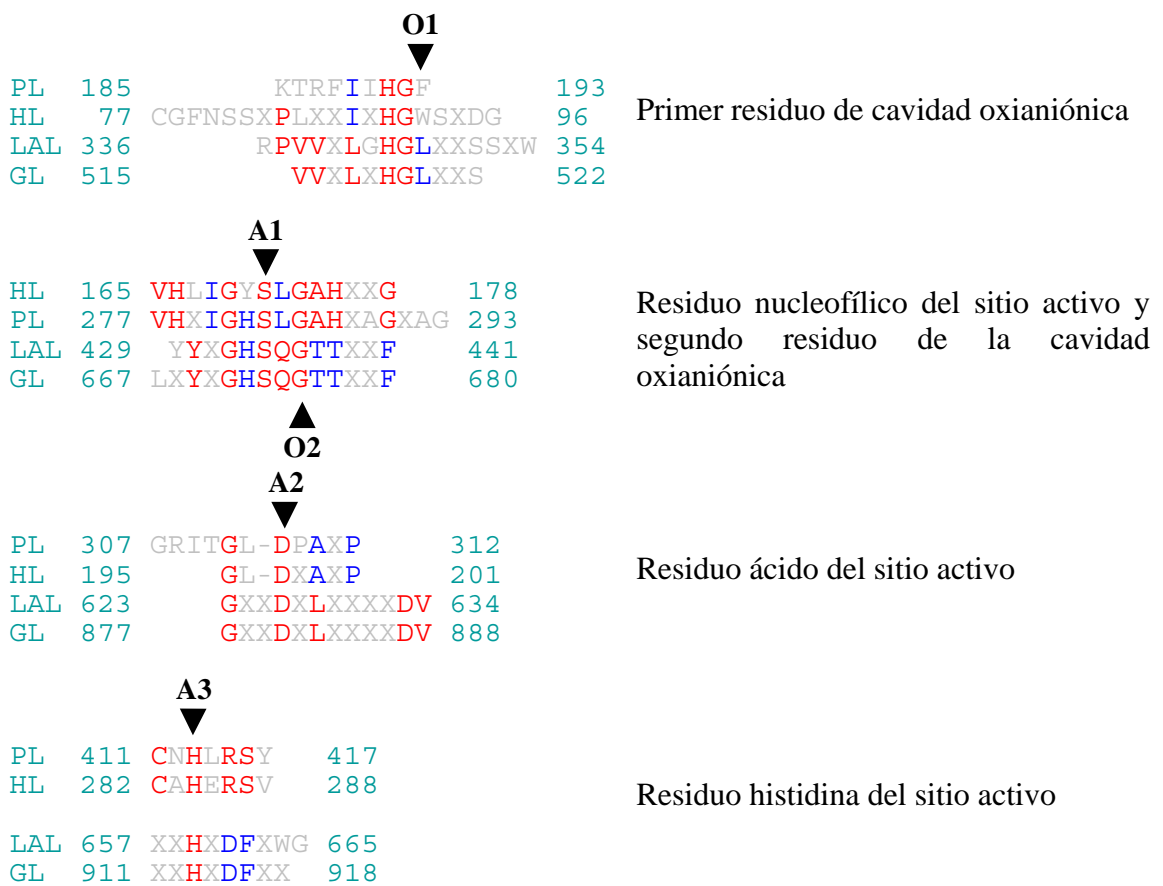


Figura 27. Sitio activo y cavidad oxianiónica de las familias de lipasas seleccionadas. Se muestra los alineamientos correspondientes a las secuencias que contienen los aminoácidos del sitio activo (A1, A2 y A3) y la cavidad oxianiónica (O1 y O2) para las familias lipasa pancreática (PL), lipasa hepática (HL), lipasa ácida lisosomal (LAL) y lipasa gástrica (GL). En rojo y azul se destacan los aminoácidos más conservados. Las posiciones están referidas a la longitud aminoacídica de cada familia.

En la Figura 27 se muestra en mayor detalle las secuencias que contienen la tríada catalítica y la cavidad oxianiónica. Se observa que el primer residuo de la cavidad oxianiónica (O1) corresponde a un residuo hidrofóbico vecino al dipéptido HG. Este residuo O1 está rodeado por unos pocos residuos conservados (indicados en rojo y azul). El residuo nucleofílico para las familias de lipasas examinadas corresponde a serina (A1) contenida en la secuencia consenso GXSXG, donde además el residuo de glicina conservado más próximo al extremo C-terminal corresponde al segundo residuo de la cavidad oxianiónica (O2). El residuo ácido corresponde a aspártico en las familias de lipasas seleccionadas. En el caso de las familias lipasa pancreática y lipasa hepática el residuo ácido se encuentra vecino al dipéptido GL, en cambio para las familias lipasa gástrica y lipasa ácida lisosomal está flanqueado por una glicina N-terminal y por el dipéptido DV C-terminal. En general el residuo ácido está dentro de una secuencia poco conservada. La histidina del sitio catalítico está próxima al dipéptido DF formando parte de la secuencia consenso **H**XDF para las familias lipasa gástrica y lipasa ácida lisosomal. A pesar que las familias lipasa pancreática y familia hepática contienen un residuo de histidina dentro de la secuencia consenso HXDFXPNGG que contiene a la secuencia HXDF, ésta no participa del sitio activo, sino un residuo de histidina contenido en la secuencia consenso CX**H**XRS (se utilizó las secuencias consenso de los bloques de lipasas para una mejor claridad). Esta diferencia podría deberse a las distintas funciones que realizan, como también, a las condiciones en que llevan a cabo la catálisis (*e.g.*, las familias lipasa gástrica y lipasa ácida lisosomal tienen pHs óptimos ácidos).

El análisis de las secuencias consenso involucradas en la catálisis muestra que las familias lipasa gástrica y lipasa ácida lisosomal están relacionadas y de igual forma las familias lipasa pancreática y lipasa hepática.

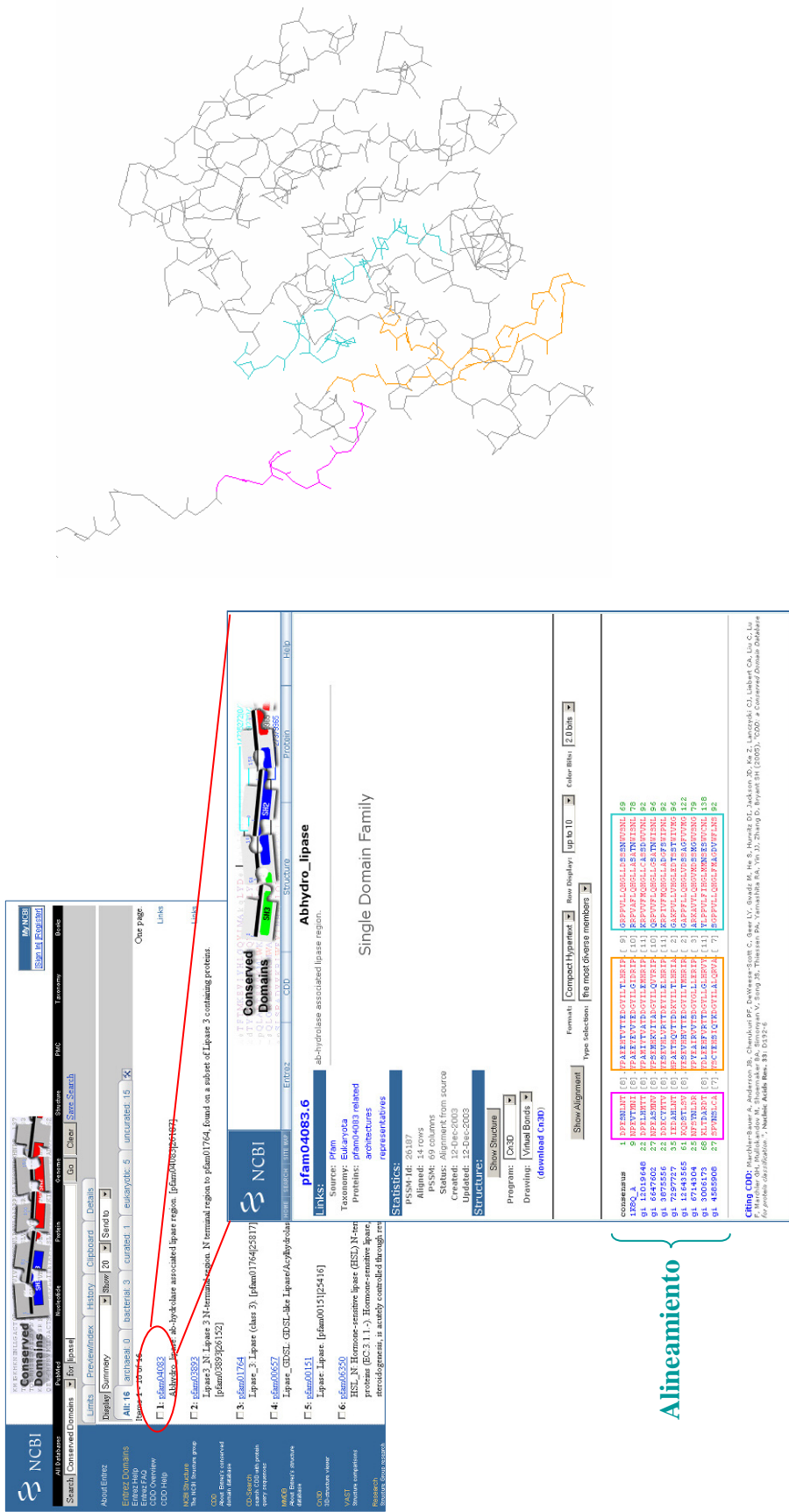
Diseño de partidores para la amplificación de probables genes de enzimas lipolíticas de krill.

Se diseñó un nuevo conjunto de partidores específicos no degenerados para la identificación de probables genes de enzimas lipolíticas de krill.

Se utilizó la base de datos CDD para la obtención de los alineamientos correspondientes a dominios relacionados con lipasas (Figura 28). En la Figura 28 se muestra la página de resultados de búsquedas de dominios en CDD, además se muestra la página que entrega la información de los dominios (una breve descripción, taxonomía, acceso a estructuras 3D disponibles, etc.).

La búsqueda arrojó 16 dominios: abhydro_lipase, Aes, ArpD, COG1647, COG3675, CVT17, esterase_lipase, HSL_N, LIP, lipase3_N, lipase, lipase_2, lipase_3, lipase_chap, lipase_GDSL y PLAT. De estos dominios se seleccionaron aquellos cuya clasificación taxonómica correspondiera a organismos eucariontes: abhydro_lipase, CVT17, esterase_lipase, HSL_N, lipase, lipase3_N y PLAT (Tabla 14).

En la Tabla 14 se indica la información extraída para cada dominio seleccionado, así como el número de secuencias aminoacídicas alineadas utilizadas para la construcción de los dominios. También se señala el largo aminoacídico del dominio, la cantidad de aminoácidos conservados (longitud conservada) y el número de zonas en que están distribuidos los aminoácidos conservados (zonas conservadas). Se seleccionaron las regiones altamente conservadas obtenidas del alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas proporcionadas por CDD, las que se utilizaron en búsquedas BLASTp opción “search for short, nearly exact matches” (utilizando los parámetros definidos por defecto), con el fin de seleccionar aquellas secuencias con una alta identidad con lipasas [Korf *et al.*, 2003].



Zonas Conservadas

Figura 28. Conserved Domain Database (CDD). Se muestra la ventana de búsqueda, al seleccionar el dominio de interés se muestra el alineamiento que originó el dominio. Se enmarcan en rosado, naranja y verde secuencias que están conservadas dentro del dominio.

Tabla 14. Análisis de las secuencias consenso de los dominios de lipasas eucariontes seleccionados. Para los dominios seleccionados se indica una breve descripción, el número de secuencias empleadas en el alineamiento, el número total y conservado de aminoácidos (aa) que conforman el dominio y el número de zonas en que se distribuyen.

Dominio	Descripción	Longitud		Zonas conservadas	
		Secuencias	Total Conservada		
abhydro_lipase	Región α/β -hidrolasa	13	69 aa	52 aa	3
CVT17	Lipasas de función intracelular	3	425 aa	268 aa	12
esterase_lipase	Región común a esterasas y lipasas (sitio activo)	23	493 aa	304 aa	25
HSL_N	Región N-terminal de lipasas sensibles a hormonas	2			
lipase	Región lipasa, contienen tríada catalítica y codo nucleofílico	15	330 aa	261 aa	18
lipase3_N	Región N-terminal de lipasas	11	76 aa	52 aa	6
PLAT	Dominio de interacción con lípidos y/o membranas	74	114 aa	45 aa	8

Por medio de la base de datos LED se obtuvieron los alineamientos correspondientes a familias de lipasas (Figura 29). En la Figura 29 se muestra la página de inicio de LED, la página que contiene el índice de familias y se muestra además la página de los alineamientos de los miembros de las familias seleccionadas. Se trabajó con aquellas familias relacionadas con el proceso de digestión: lipasa gástrica, lipasa hepática, lipasa ácida lisosomal y lipasa pancreática (Tabla 15).

Tabla 15. Análisis de las secuencias consenso de las familias de lipasas seleccionadas. Se señalan algunas características para las familias de lipasas seleccionadas como las secuencias que conforman la familia, el largo del alineamiento (aminoácidos, aa), el número y longitud de las zonas conservadas (aminoácidos) dentro del alineamiento.

Familia	Secuencias	Alineamiento	Zonas Conservadas	
			Número	Longitud
Lipasa gástrica	50	1108 aa	47	8
Lipasa hepática	10	514 aa	24	11
Lipasa ácida lisosomal	25	751 aa	35	7
Lipasa pancreática	54	1148 aa	40	9

En la Tabla 15 se indican las características de las familias seleccionadas, como el número de secuencias aminoacídicas que conforman la familia, el largo total del alineamiento, el número y largo máximo de las zonas en que están distribuidos los aminoácidos conservados. A partir de los alineamientos múltiples proporcionados por LED se determinaron las secuencias aminoacídicas consenso que se utilizaron en búsquedas BLASTp para seleccionar aquellos péptidos con alta identidad a lipasas [Korf *et al.*, 2003].

Blocks WWW Server proporcionó información de regiones conservadas o bloques de las lipasas (Figura 30). En la Figura 30 se detallan los pasos para la obtención de las regiones conservadas y la utilización de CODEHOP para el diseño en línea de partidores. Se realizó la búsqueda de lipasas y se seleccionaron aquellos bloques relacionados con lipasas asociadas al proceso de digestión: heplipase, lipolipase, panclipase y taglipase (Tabla 16).

Tabla 16. Análisis de las secuencias consenso de bloques de lipasas seleccionadas. Se señalan algunas características como las secuencias que conforman cada bloque, el número y longitud de las zonas conservadas (aminoácidos) dentro del alineamiento.

Bloque	Función	Secuencias	Bloques	
			Número	Longitud
Heplipase IPB002333	Lipasas hepáticas	6	9	13-20 aa
Lipolipase IPB002330	Lipoproteína lipasas	18	8	13-25 aa
Panclipase IPB002331	Lipasas pancreáticas	23	8	17-20 aa
Taglipase PR00821	Triacilglicerol lipasas	30	9	15-22 aa

En la Tabla 16 se indican las características de los bloques seleccionados como el número de secuencias aminoacídicas con que se construyó el alineamiento, el número y largo de los bloques. A diferencia de las bases de datos anteriores Blocks WWW Server, permite la selección de los bloques y el diseño en línea de partidores a través de la herramienta CODEHOP. Se construyeron los partidores para los bloques seleccionados utilizando los parámetros definidos por defecto por CODEHOP.

Las secuencias aminoacídicas obtenidas de CDD y LED, y seleccionadas mediante BLASTp se convirtieron en secuencias oligonucleotídicas, las que en conjunto con las proporcionadas directamente por CODEHOP se utilizaron en búsquedas BLASTn “search for short, nearly exact matches” para seleccionar aquellas secuencias con una alta identidad con lipasas o relacionadas a ellas. Se construyó un conjunto de 70 secuencias oligonucleotídicas. Posteriormente se examinó para cada secuencia que cumpliera con los requerimientos para el diseño de partidores, es decir, se seleccionaron aquellas secuencias con un contenido de GC en el rango 35-60%, temperatura T_m en el rango 40-75°C, una longitud de 20-25 nucleótidos y que presentaran la menor formación de estructuras secundarias (*i.e.*, dímeros y horquillas) [Rychlik, 1993; Chen *et al.*, 2002; Hyndman y Mitsuhashi, 2003]. Varias de las secuencias seleccionadas de los alineamientos fueron descartadas en el análisis de identidad y varias otras secuencias fueron descartadas por no cumplir los requerimientos para el diseño de partidores. Finalmente se seleccionaron 8 partidores de sentido directo que se utilizaron en conjunto con el partidor reverso AUAP para la amplificación de probables genes de lipasas (Tabla 17).

Brevemente, se diseñaron los partidores EL para la identificación de secuencias relacionadas con el dominio esterase_lipase, el partidor GL para la inspección de lipasas gástricas, el partidor HL para la detección de lipasas hepáticas, el partidor LAL para secuencias tipo lipasas ácidas lisosomales y los partidores PL para la identificación de secuencias relacionadas con lipasas pancreáticas.

Tabla 17. Partidores diseñados para la búsqueda de probables genes de lipasas de krill antártico. Secuencias obtenidas del análisis de dominios, familias y bloques de lipasas.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Función codificada
EL1	CTGCCGGTGATGGTGTGGATTCATGG	sitio de unión a sustrato
EL2	CTATCGCCTGGGCGTGCTGGGCTTTCTG	entre sitios de unión a sustrato
EL3	CCTGCCGGTGATGGTGTGGATTCATGG	sitio de unión a sustrato
GL	GGCTATGATGTGTGGCTGGGCAAC	cercano a cavidad oxianiónica y sitio de glicosilación
HL	TCTCCATCTTCCTGGTGTTCGYAT	péptido señal
LAL	TTTGATGTGTGGATGGGCAACAGC	cercano a cavidad oxianiónica y sitio de glicosilación
PL1	GACATGTGCAAGAACATGTT	cercano a cavidad oxianiónica dentro de dominio lipasa
PL2	AAAACCCGCTTTATTATTCATGG	cavidad oxianiónica

Determinación y análisis de las secuencias aminoacídicas/nucleotídicas de enzimas lipolíticas de krill.

En base a que KL2 presentó una mayor actividad lipasa específica, un proceso de purificación simple que consistió de una etapa de separación cromatográfica y que permitió obtener un mayor volumen de trabajo respecto de KL1, se seleccionó para su secuenciación a través de espectrometría de masa en la Plataforma de Análisis y Microsecuenciación de Proteínas del Instituto Pasteur. Se obtuvo tres secuencias de 15 aminoácidos cada una. Se examinó la similitud de las secuencias con enzimas lipolíticas en diferentes bases de datos a través de BLAST (NCBI, LED y ESTHER). En la Tabla 18 se muestran los resultados de análisis de similitud.

Tabla 18. Análisis de las secuencias obtenidas de KL2 en bases de datos. En NCBI se utilizó la herramienta BLASTp opción “search for short, nearly exact matches”. En LED se utilizó la herramienta BLAST disponible. En ESTHER Database se utilizó la herramienta BLASTp estableciendo los parámetros de búsqueda para secuencias cortas.

NCBI

Secuencia	Función	Fuente	Score (bits)	Valor E	Identidad
SSVTIPDIPSFDFIK	subunidad 3 hemocianina	<i>Cancer magister</i>	40.5	0.006	80%
LVIQWDTDNISFEFD	precursor ompW	<i>Vibrio cholerae</i>	26.1	9.2	100%
IIQHEGYVSATISND	tripsina	<i>Marsupinaeus japonicus</i>	35.4	0.21	80%

LED

Secuencia	Función	Fuente	Score (bits)	Valor E	Identidad
SSVTIPDIPSFDFIK	lipasa gástrica	<i>Mus musculus</i>	21	8.3	72%
LVIQWDTDNISFEFD	sin resultado				
IIQHEGYVSATISND	sin resultado				

ESTHER Database

Secuencia	Función	Fuente	Score (bits)	Valor E	Identidad
SSVTIPDIPSFDFIK	α/β -hidrolasa	<i>Candida lipolytica</i>	23	2.9	85%
LVIQWDTDNISFEFD	probable protil- endopeptidasa	<i>Proteobacterium EBAC31A08</i>	24	1.2	85%
IIQHEGYVSATISND	lipasa	<i>Homo sapiens</i>	24	1.2	85%

Las búsquedas BLAST de similitud de las secuencias aminoacídicas en las diferentes bases de datos examinados no proporcionaron antecedentes concluyentes sobre la similitud de KL2 con enzimas lipolíticas.

Complementario al trabajo de caracterización y secuenciación de enzimas lipolíticas purificadas de krill, se realizó el trabajo de identificación de probables genes de enzimas lipolíticas de krill. En una primera aproximación se utilizaron los partidores

OXF/ACR, descritos en la literatura para la inspección de genes de lipasas en muestras de DNA genómico ambiental [Bell *et al.*, 2002]. El partidor OXF (Tabla 1) reconoce la secuencia consenso de la cavidad oxianiónica y el partidor ACR reconoce la secuencia consenso para el sitio activo (Tabla 1).

Se utilizaron distintas combinaciones de los partidores OXF/ACR sobre cDNA de krill preparado a partir de RNA total o mRNA poliA. Se obtuvieron amplificados del tamaño esperado de 180-330 pb (Figura 31). Los amplificados se obtuvieron principalmente para el partidor OXF1 en conjunto con los partidores ACR1, ACR2 y ACR3 y para la pareja de partidores OXF2/ACR1. Adicionalmente las amplificaciones resultaron bastantes limpias, por lo que las reacciones de PCR se utilizaron directamente para la ligación de los amplificados al vector pGEM-T easy y su posterior clonamiento.

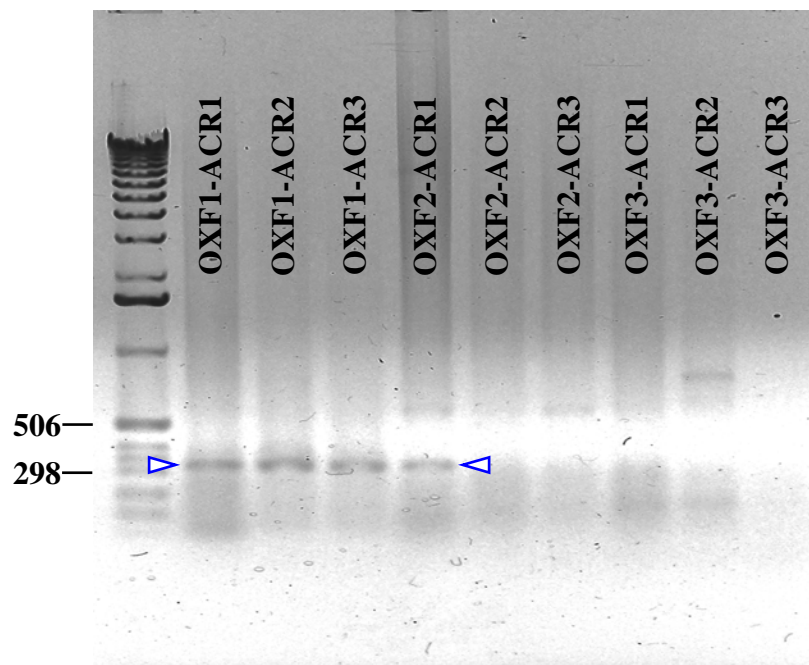


Figura 31. Análisis de los productos de PCR sobre cDNA de krill utilizando distintas combinaciones de los partidores OXF/ACR. Se indica el producto de la amplificación dentro del rango de tamaño esperado de 180-330 pb (flecha).

En la Tabla 19 se muestra los resultados obtenidos del análisis de similitud en distintas bases de datos de las secuencias obtenidas de la amplificación con los partidores OXF/ACR.

Tabla 19. Análisis de las secuencias amplificadas con los partidores OXF/ACR en bases de datos. Las secuencias obtenidas por reacción de amplificación utilizando diferentes combinaciones de los partidores OXF/ACR se examinaron en tres bases de datos para establecer su identidad. Para los análisis se utilizó las herramientas BLASTx de NCBI, FASTAx de EBI y BLASTx de ESTHER Database.

NCBI					
Secuencia	Función	Fuente	Score (bits)	Valor E	Identidad
OXF1-ACR2	proteína hipotética	<i>Candida albicans</i>	34.3	1.3	29%
OXF1-ACR3	proteína hipotética	<i>Pan troglodytes</i>	89.4	3E-17	69%
EBI					
Secuencia	Función	Fuente	Score (bits)	Valor E	Identidad
OXF1-ACR2	metalotioneína	<i>Homarus americanus</i>		3E-12	71%
OXF1-ACR3	proteína hipotética	<i>Rattus norvegicus</i>		3E-20	62%
ESTHER Database					
Secuencia	Función	Fuente	Score (bits)	Valor E	Identidad
OXF1-ACR2	probable hidrolasa	<i>Nocardia farcinica</i>	25	2.0	42%
OXF1-ACR3	aminopeptidasa	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	24	4.1	41%

Los análisis no muestran datos concordantes sobre las similitudes de las secuencias entre las diferentes bases de datos examinadas (NCBI y EBI), además se observó similitud a proteínas hipotéticas sin función asignada. Por otra parte el análisis en la base de datos ESTHER muestra una baja similitud de la secuencias con enzimas lipolíticas (valor E > 1.0).

Los partidores diseñados (partidores con sentido) se utilizaron en conjunto con el partidador AUAP (partidor reverso) para la amplificación de probables genes de lipasas de krill desde cDNA preparado a partir de mRNA poliA. El resultado de las amplificaciones PCR se muestra en la Figura 32. Sólo para los partidores PL1 y PL2 se obtuvieron amplificados dentro del intervalo de tamaño esperado (700-1300 pb). Sin embargo, debido a que las amplificaciones con los distintos partidores fueron bastantes limpias (se observa un bajo número de amplificaciones con cada partidador), se purificaron a partir de un gel de agarosa para su posterior clonamiento y secuenciación.

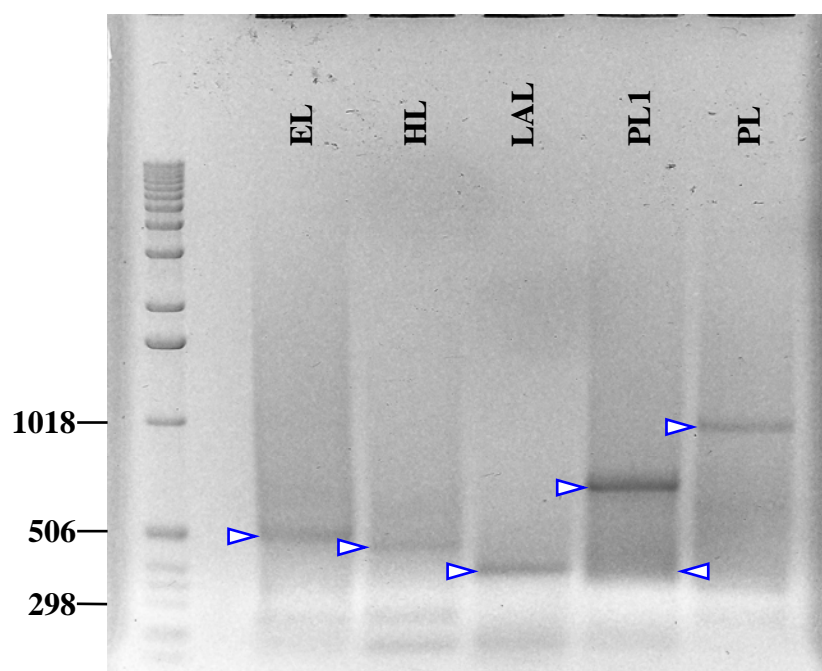


Figura 32. Análisis de los productos de PCR sobre cDNA de krill utilizando los partidores diseñados. Se muestra para los distintos partidores diseñados las amplificaciones obtenidas a partir de cDNA de krill. Con flechas se indica los amplificadas seleccionados para su posterior clonamiento.

Los resultados de los análisis de similitud de las diferentes secuencias amplificadas se indican en la Tabla 20.

Tabla 20. Análisis de las secuencias amplificadas con los partidores diseñados para la inspección de genes para lipasas. Las secuencias obtenidas por reacción de amplificación utilizando los partidores diseñados se examinaron en tres bases de datos para establecer su identidad. Para los análisis se utilizó las herramientas BLASTx de NCBI, FASTAx de EBI y BLASTx de ESTHER Database.

NCBI

Secuencia	Función	Fuente	Score (bits)	Valor E	Identidad
EL1	probable proteína MLC1	<i>Anopheles gambiae</i>	54.7	1E-6	45%
HL	proteína ribosomal S3a	<i>Crassostrea gigas</i>	143	2E-33	66%
LAL	ENSANGP00000011882	<i>Apis mellifera</i>	77	2E-13	52%
PL1-1	polipéptido 20 del complejo t	<i>Drosophila virilis</i>	131	2E-29	40%
PL1-2	sin resultado				
PL2	proteína hipotética	<i>Guillardia theta</i>	42.4	0.017	23%

EBI

Secuencia	Función	Fuente	Score (bits)	Valor E	Identidad
EL1	ENSANGP00000018154	<i>Anopheles gambiae</i>		5E-5	49%
HL	proteína ribosomal S3a	<i>Crassostrea gigas</i>		7E-27	62%
LAL	probable ATPasa	<i>Tetraodon nigroviridis</i>		9E-10	55%
PL1-1	polipéptido 20 del complejo t	<i>Drosophila virilis</i>		4E-37	57%
PL1-2	proteína hipotética	<i>Schistosoma japonicum</i>		0.0043	73%
PL2	proteína MURF1	<i>Leishmania tarentolae</i>		0.077	25%

ESTHER Database

Secuencia	Función	Fuente	Score (bits)	Valor E	Identidad
EL1	oxireductasa/proteasa	<i>Arabidopsis thaliana</i>	25	4.2	36%
HL	hidrolasa	<i>Rhodopirellula baltica</i>	27	1.3	30%
LAL	pn47p	<i>Pharbitis nil</i>	26	0.83	54%

PL1-1	esterasa	<i>Synechocystis</i> <i>sp.</i>	26	4.8	47%
PL1-2	glucosa aciltransferasa	<i>Solanum</i> <i>berthaultii</i>	26	1.1	35%
PL2	proteína hipotética	<i>Plasmodium</i> <i>falciparum</i>	31	0.18	30%

El análisis de las secuencias en las bases de datos generales NCBI (a través de BLAST) y EBI (a través de FASTA) no muestra similitud con secuencias de enzimas lipolíticas (Tabla 20).

Las secuencias obtenidas utilizando los partidores HL y PL1 mostraron concordancia entre las bases de datos NCBI y EBI y corresponderían con una alta probabilidad (bajo valor $E < 0.001$) a la proteína ribosomal S3a y al polipéptido 20 del complejo t, respectivamente. La proteína ribosomal S3a estaría relacionada con la regulación de la síntesis de proteína en situaciones frente a daño de DNA. El péptido 20 del complejo t tendría la función de chaperonina activada por estrés en respuesta al frío.

Las secuencias obtenidas para los partidores EL1, PL2 y LAL no mostraron correspondencia entre las bases de datos NCBI y EBI. Sin embargo, la secuencia amplificada con EL1 muestra una alta probabilidad de corresponder a una proteína MLC1, cuya función sería de canal catiónico (NCBI). La secuencia obtenida para PL2 correspondería a una proteína MURF1, proteína muscular cuya función sería de ubiquitina-ligasa (EBI).

El análisis de las secuencias amplificadas en la base de datos ESTHER muestra que la mayoría de las secuencias presentaron una muy baja probabilidad de corresponder a enzimas lipolíticas (bajo valor de score y alto valor $E > 1.0$), excepto las secuencias amplificadas con los partidores LAL y PL2 que presentaron valores E menores a 1, sin

embargo, éstos no son confirmatorios de similitud con enzimas lipolíticas. El porcentaje de identidad obtenido para la secuencia amplificada con PL2 (30%) sugeriría la presencia de alguna región similar con una proteína hipotética tipo enzima lipolítica.

DISCUSIÓN

Separación y obtención de enzimas lipolíticas de krill antártico.

Determinación de los ensayos enzimáticos para la detección de actividad lipolítica y actividad lipasa.

Previo al trabajo de purificación de cualquier enzima, es necesario un adecuado ensayo enzimático de modo de tener un medio de cuantificación de la actividad en el proceso de purificación, como también, para evaluar las características de la enzima purificada bajo diferentes condiciones. El ensayo de actividad lipasa inicialmente utilizado en el trabajo de esta tesis se basó en el protocolo descrito por Abramić *et al.* (1999). Este ensayo se utilizó para la cuantificación de la actividad lipasa del extracto de krill tratado con sulfato de amonio en diferentes porcentajes de saturación y principalmente en la detección de la actividad lipasa en las distintas fracciones obtenidas de diferentes separaciones cromatográficas realizadas en experimentos preliminares. El ensayo presentó una serie de inconvenientes que se relacionaban con la velocidad de hidrólisis no enzimática y la baja reproducibilidad en las lecturas de absorbancia (hidrólisis inicial). A pesar que este ensayo (en cubeta) presentó una baja velocidad de hidrólisis no enzimática ($4,8 \pm 2,2 \times 10^{-6}$ μ moles de *p*-nitrofenilpalmitato/min/mL), se observó que la absorbancia decaía en el tiempo, probablemente como consecuencia de la precipitación de material insoluble en la mezcla de ensayo. Estos inconvenientes llevaron a la incorporación de Triton X-100 (detergente no iónico) y goma arábica (agente emulsificante) [Tiss *et al.*, 2001] en la mezcla de ensayo, descritos en diferentes protocolos de actividad lipasa que utilizan *p*-nitrofenilpalmitato como sustrato [Maia *et al.*, 2001] y a la eliminación de desoxicolato de sodio (detergente aniónico) [Shilnikov *et al.*, 1987]. Estas modificaciones disminuyeron la hidrólisis no enzimática y mejoraron la

reproducibilidad en las lecturas de absorbancia. Gupta *et al.*, (2003) describieron inconvenientes similares en la utilización del ensayo enzimático con *p*-nitrofenilpalmitato. Según estos autores la baja reproducibilidad de las lecturas de absorbancia se debería a dos factores, una solubilización incompleta del sustrato en la solución tampón que causaría turbidez en la mezcla de reacción o podría ser también consecuencia de la baja solubilidad en la mezcla del ensayo de los ácidos grasos liberados durante la reacción enzimática. Los autores proponen que la utilización de Triton X-100 como agente dispersante minimizaría la turbidez.

Evaluación de los procedimientos de autólisis y homogenización para la preparación del extracto de krill.

Se examinó la preparación del extracto enzimático a través de los procedimientos de autólisis (extracción físicoquímica) y homogenización (extracción mecánica) de manera de establecer el procedimiento más adecuado de preparación del extracto en función de parámetros como la actividad lipolítica/lipasa, proteína, presencia de lípidos y simplicidad del procedimiento.

El proceso de preparación del extracto de krill mediante autólisis es en sí mismo una etapa del proceso de purificación, debido a que muchas proteínas presentes son degradadas enzimáticamente. Es también una etapa selectiva que permite seleccionar aquellas proteínas, o parte de ellas, que resultan resistentes a la degradación por proteasas.

Se examinó el efecto de la temperatura y del tiempo de autólisis sobre la cantidad de proteína (Figura 5) y actividad lipasa específica (Figura 6). Un mayor tiempo de autólisis permite una mayor degradación, por lo que inicialmente aumentaría la cantidad

de proteína hasta alcanzar un máximo, para luego disminuir en el tiempo. Esto es lo que se observa en los procesos de autólisis en las diferentes temperaturas ensayadas. Por otra parte, para iguales tiempos de autólisis se observa que la cantidad de proteína disminuye al aumentar la temperatura de 5 a 40°C. Esto podría explicarse basado en la observación que la mayoría de las enzimas adaptadas/activas a bajas temperaturas presentan una temperatura óptima de actividad dentro del rango de 25-45°C [Marshall, 1997; Gerday *et al.*, 1997; Huston *et al.*, 2000; Mayordomo *et al.*, 2000]. En el caso del krill, diversos estudios han determinado las temperaturas óptimas para diferentes enzimas digestivas, por ejemplo, la enzima endo-(1→3)-β-D-glucanasa tiene una temperatura óptima de 65°C [Turkiewics *et al.*, 1985], la actividad proteinasa presenta una temperatura óptima de 40°C [Turkiewics *et al.*, 1986], la actividad péptido hidrolasa de 50°C [Osnes y Mohr, 1985; Ellingsen y Mohr, 1987] y las actividades caseinolíticas y tripsinolíticas de 50°C [Osnes y Mohr, 1985; Salamanca, 2002]. Por lo tanto los resultados observados podrían explicarse por un aumento en la actividad de las enzimas digestivas, que al incrementar la temperatura estarían más cercanas a su óptimo de actividad.

El efecto de la temperatura y del tiempo de autólisis sobre la actividad específica en el extracto no sigue un comportamiento claro (Figura 6). Los datos muestran que el tiempo en que se alcanza la máxima actividad específica aumenta con la temperatura.

Junto a la determinación de la cantidad total de proteína y de la actividad lipasa específica, se estudió el pH de los diferentes autolisados (datos no mostrados), observándose que en general el pH aumenta al incrementar el tiempo de autólisis y que para cada tiempo utilizado, el pH aumenta con el incremento de la temperatura. El aumento del pH favorecería la actividad enzimática degradativa. Para krill se ha descrito que la actividad proteinasa presenta un pH óptimo de 6 [Turkiewics *et al.*, 1986], la

actividad péptido hidrolasa un pH óptimo en el intervalo 7-8 [Osnes y Mohr, 1985], la actividad tripsinolítica un pH óptimo de 9 pero estable dentro del intervalo de pH 7,5-10 [Barría, 2004] y las actividades caseinolíticas y carboxipeptidasa B un pH óptimo de 7 [Barría, 2004]. También es necesario considerar que los aminoácidos productos de la degradación de las proteínas pueden sufrir reacciones de desaminación que llevan a un aumento en la acumulación de amonio en los autolisados aumentando el pH [Ellingsen y Mohr, 1987].

El aumento de la temperatura en combinación con el aumento del pH favorecerían la desnaturalización de las proteínas y su degradación, tanto enzimática como espontánea [Geiger y Clarke, 1987; Brennan y Clarke, 1993; Athmer *et al.*, 2002].

La selección de las condiciones óptimas de autólisis debe combinar la obtención de una alta actividad y de una baja cantidad total de proteína (alta actividad específica). Se estimaron como condiciones óptimas de autólisis 24 h a 40°C, ya que proporcionó una alta actividad lipasa específica (una baja cantidad total de proteína y alta actividad).

El contenido de lípidos totales de *Euphausia superba* Dana varía entre 15 a 30% del peso seco incrementando con la madurez de los organismos [Falk-Petersen *et al.*, 2000; Hagen *et al.*, 2001; Ju y Harvey, 2004]. Debido a que los lípidos pueden llegar a representar una alta proporción del peso seco, se realizaron estudios para determinar si la eliminación de los lípidos presentes en el extracto facilitaría la purificación de lipasas. La presencia de lípidos y pigmentos en las muestras puede causar una variedad de efectos en el comportamiento de las proteínas que afectan directamente la separación y la purificación. Las proteínas pueden adsorber lípidos y pigmentos sobre su superficie, cambiando las propiedades superficiales de aquellas, afectando por ejemplo, las

separaciones electroforéticas [Boulter y Wang, 2001; Garavito y Ferguson-Miller, 2001] o favoreciendo la formación de agregados de proteínas [Lund *et al.*, 1989; Taipa *et al.*, 1992; Garavito y Ferguson-Miller, 2001]. La presencia de lípidos en medios acuosos puede también generar estructuras que adsorben y/o secuestran a las proteínas (*e.g.*, micelas) [Garavito y Ferguson-Miller, 2001]. Para el caso de separaciones cromatográficas estas interacciones entre lípidos y proteínas puede agregar equilibrios adicionales y por tanto distorsionar la separación cromatográfica. También, los contaminantes presentes en las muestras pueden interferir en el ensayo enzimático, favoreciendo la hidrólisis no enzimática, como también, actuar como adsorbentes de sustrato (que tiene carácter lipídico) o del producto formado afectando la reproducibilidad de las mediciones.

Se examinó el efecto de diferentes tratamientos para la remoción de lípidos y pigmentos sobre la recuperación de proteína y actividad (Tabla 5) respecto del extracto enzimático preparado por autólisis sin tratamiento. Se emplearon cinco tratamientos, de los cuales cuatro permiten la recuperación de proteína en forma nativa (precipitación con etanol, isopropanol, polietilenglicol y extracción con cloroformo) y el quinto método permite la recuperación de proteína en forma inactiva (precipitación con ácido tricloroacético). A pesar que los tratamientos con etanol, isopropanol y polietilenglicol utilizan un principio similar para la precipitación de proteína, que consiste en disminuir la capacidad de solvatación del medio y por lo tanto favorecen la agregación de las proteínas, mostraron comportamientos diferentes, tanto en la recuperación de proteína como de actividad. Al favorecer la agregación de las proteínas y su posterior precipitación, los tratamientos con etanol, isopropanol y polietilenglicol inducen también la agregación de otros componentes del autolisado, que pueden ser adsorbidos en la

superficie de las proteínas o las proteínas asociarse a ellos. La presencia de estos contaminantes se aprecia visualmente después de los tratamientos. Los tratamientos con etanol, isopropanol, polietilenglicol y TCA constituyen métodos indirectos de remoción de lípidos y pigmentos, puesto que en realidad remueven las proteínas del extracto. En cambio, el tratamiento con cloroformo remueve directamente los lípidos y pigmentos por medio de su efecto de extracción por solvente, sin embargo, las enzimas lipolíticas y principalmente las lipasas, son proteínas que se caracterizan por interactuar con una interfase, por lo que pueden ser removidas por el tratamiento con cloroformo, lo que podría dar cuenta de la pérdida de actividad lipolítica. El tratamiento con etanol permitió la mayor recuperación de proteína respecto del autolisado sin tratar, en cambio, el tratamiento con polietilenglicol permitió la mayor recuperación de actividad. Sin embargo, la inspección visual del tratamiento con cloroformo mostró la eliminación de la característica coloración rosada presente en los diferentes tratamientos, optándose por el tratamiento con cloroformo para la eliminación de los interferentes presentes en el autolisado.

La precipitación de un extracto mediante la adición de sales neutras como sulfato de amonio, es el método más comúnmente usado en el fraccionamiento de proteínas y basa su capacidad de separación en las diferencias de solubilidad en agua de las proteínas. Las proteínas así precipitadas usualmente no se desnaturalan y su actividad se recupera al resuspender la pella. Además, el sulfato de amonio estabiliza las proteínas evitando la desnaturalación y proteólisis.

Se realizaron fraccionamientos cada 10% de saturación de sulfato de amonio y se examinó la recuperación de proteína y actividad (Figura 7) respecto del autolisado sin

tratar. Se encontró que el fraccionamiento en el intervalo 0-50% de saturación de sulfato de amonio concentra $85,5 \pm 17,0\%$ de la proteína total y $75,9 \pm 4,1\%$ de la actividad lipasa total. En un estudio realizado anteriormente sobre el efecto que el fraccionamiento con sulfato de amonio tiene sobre diferentes actividades proteolíticas presentes en el autolisado de krill, se encontró que las actividades tripsina y carbopeptidasa A se concentran en el intervalo 50-80% de saturación de sulfato de amonio, fracción que retiene 86 y 85% de las actividades respectivamente [Salamanca, 2002]. Las actividades aminopeptidasa y carbopeptidasa B se concentran en el intervalo 40-80% de saturación reteniendo 80 y 90% de las actividades respectivamente [Salamanca, 2002]. De estos resultados se deduce que la fracción 0-50% de saturación tendría un bajo porcentaje de actividad proteolítica contaminante. El fraccionamiento de la actividad lipasa en el rango 0-40% de saturación permitiría la disminución al máximo de la actividad proteolítica y proporcionaría una alta recuperación de actividad lipasa de $66,9 \pm 4,2\%$.

Se realizó el mismo estudio del efecto del fraccionamiento con sulfato de amonio sobre un extracto enzimático preparado mediante autólisis y tratado con cloroformo para la remoción de lípidos y pigmentos. La distribución de la recuperación de proteína y actividad se vio claramente afectada, presentándose la mayor recuperación de proteína en el intervalo 30-70% ($85,5 \pm 0,9\%$) de saturación y la recuperación de actividad en el intervalo 30-80% ($75,6 \pm 9,1\%$).

A diferencia del proceso de autólisis, la preparación de extracto enzimático de krill mediante homogenización corresponde sólo a un proceso preparativo que no involucra separación o purificación. Se examinaron las condiciones óptimas para la preparación de extracto enzimático mediante homogenización.

Se estudió el efecto de utilizar diferentes tampones en el proceso de homogenización y se comparó la recuperación de proteína y actividad lipasa con los obtenidos al realizar la homogenización en agua (Figura 9), principalmente porque el tampón de homogenización o el control del pH del extracto podría ser una herramienta útil para seleccionar ciertas enzimas de las posibles enzimas lipolíticas presentes en el extracto. Los diferentes tampones permitieron una mayor recuperación de proteína respecto de la homogenización en agua, a excepción de los tampones fosfato pH 6, glicina/NaOH pH 9 y carbonato pH 10. Se observó que la pareja de tampones de pH 7 y pH 8 permitieron una recuperación similar de proteína. Para las parejas de tampones de pH 6 y pH 10 se observó la mayor diferencia en la recuperación de proteína. En términos generales no se encontró una correlación de la recuperación de proteína en función del pH de homogenización, excepto que para el mismo tampón (*i.e.*, tampones Tris/HCl, fosfato y glicina) un aumento del pH se correlaciona con un aumento de la recuperación de proteína. Desde el punto de vista de la actividad lipasa, ninguno de los tampones utilizados permitió una recuperación de actividad mayor a la obtenida para el proceso de homogenización en agua. A excepción de la pareja de tampones pH 6, las diferentes parejas de pHs permitieron similares recuperaciones de actividad. No se observó una relación clara entre el pH y la recuperación de actividad, sin embargo, para un mismo tampón (*i.e.*, tampones Tris/HCl, fosfato y glicina) un aumento del pH permitió una mayor recuperación de actividad lipasa. Los patrones electroforéticos de actividad lipolítica y lipasa no mostraron diferencias entre los extractos preparados por homogenización en los diferentes tampones (datos no mostrados).

Al examinar el efecto del tiempo de homogenización sobre la cantidad total de proteína y actividad específica (Figura 10), se observó un aumento en la cantidad de

proteína extraída al incrementar el tiempo de homogenización, lo que se explicaría porque un mayor tiempo de homogenización aumenta el material soluble liberado por el proceso. En forma similar a lo observado en el proceso de autólisis, la actividad lipasa específica alcanza un máximo en el tiempo, después de lo cual decae. Probablemente a tiempos mayores de homogenización se incorpora más material soluble, lo que agregaría enzimas degradativas en mayor cantidad. También es posible que a mayor tiempo de homogenización, se favorezca la desnaturación de las enzimas lipolíticas. La selección de las condiciones óptimas de homogenización también considera la obtención de una alta actividad específica combinada con una baja cantidad de proteínas, condiciones alcanzadas al realizar la homogenización durante 1 ó 2 min.

Otro factor importante es la velocidad de homogenización. Se examinó el efecto de cinco velocidades de homogenización sobre la extracción de proteína y actividad lipasa (Figura 11). Se observó que a bajas velocidades la cantidad de proteína se mantuvo constante, sin embargo, para una velocidad de 8.300 rpm la cantidad de proteína decayó, al seguir aumentando la velocidad la cantidad de proteína comenzó a aumentar hasta alcanzar un nivel de saturación. Se observó que la actividad aumenta a medida que aumenta la velocidad de homogenización hasta alcanzar un máximo para una velocidad de 8.300 rpm. Sin embargo, a mayores velocidades la actividad decayó, probablemente debido a desnaturación durante el proceso de homogenización. La velocidad de homogenización de 8.300 rpm se seleccionó como adecuada para el proceso de homogenización, dado que permite la recuperación de alta actividad lipasa específica.

Se examinó el efecto de diferentes tratamientos para la remoción de lípidos y pigmentos sobre la recuperación de proteína y actividad respecto del homogenizado sin tratamiento (Tabla 7). A excepción del tratamiento con ácido tricloroacético, los diferentes tratamientos presentaron una recuperación similar de proteína de *ca.* 12-18%, siendo los tratamientos con isopropanol y polietilenglicol los que permitieron la mayor recuperación de proteína. Los tratamientos con etanol, isopropanol y polietilenglicol utilizan un principio similar para la precipitación de proteína. A diferencia de lo observado para el tratamiento de autolisados, mostraron comportamientos similares en la recuperación de proteína, sin embargo, comportamientos diferentes en la recuperación de actividad lipasa. La diferencia obtenida entre los tratamientos para autolisado y homogenizado probablemente está relacionada con el contenido de pigmentos y lípidos que presenta el autolisado respecto del homogenizado.

Las condiciones seleccionadas para la homogenización *versus* las condiciones seleccionadas para la autólisis, muestran que ambos procedimientos generan extractos con similar actividad específica. Sin embargo, la homogenización proporciona 2-3 veces más proteína total por masa de krill que la autólisis, debido a que la homogenización es un proceso mecánico no selectivo de extracción de proteína, a diferencia de la autólisis que es un proceso físicoquímico de extracción de proteína que evita la incorporación de sólidos mayores (*e.g.*, tejidos, exoesqueleto, etc.). La ventaja de la homogenización es que el tiempo requerido para la preparación del extracto es menor que el tiempo requerido en la autólisis. Además, la comparación de los patrones electroforéticos de actividad lipolítica y lipasa entre los extractos obtenidos por homogenización y autólisis muestran similitudes, lo que indicaría que ambos procesos permiten la recuperación de

las mismas enzimas lipolíticas (datos no mostrados). Finalmente no se descartó ninguno de los procedimientos de preparación del extracto, puesto que la autólisis permite la selección de proteínas de mayor resistencia a la degradación y la homogenización un menor tiempo de preparación.

Caracterización preliminar de las enzimas lipolíticas presentes en el extracto de krill.

La caracterización por medio de filtración en geles de las enzimas lipolíticas de la fracción 20-30 y 30-40% de saturación con sulfato de amonio reveló que la actividad lipasa se origina en proteínas de masa molecular en el rango 65,7-90,5 kDa. En el corte 40-50% la actividad lipasa está asociada con proteínas de masa molecular en el rango 34,6-90,5 kDa y para el corte 50-60% un rango de 54,9-93,8 kDa. Estudios similares de masas moleculares determinadas mediante separaciones electroforéticas han reportado que las enzimas lipolíticas de la langosta de pinzas rojas (*Cherax quadricarinatus*) poseen masas moleculares del orden de 43, 63 y 118 kDa [López-López *et al.*, 2003]. Para las enzimas lipolíticas de camarón tigre (*Penaeus monodon*) se han reportado masas moleculares en el rango de 50-690 kDa y para el langostino japonés (*Penaeus japonicus*) en el rango de 74-760 kDa [López-López *et al.*, 2003].

Respecto del punto isoelectrico de las enzimas lipolíticas, los resultados obtenidos indican tres zonas de actividad lipolítica en geles nativos con puntos isoelectricos pI de 5,5-6,0; 6,2-6,4 y 6,6-7,1 (Figura 13). No se encontraron datos de pI para lipasas de crustáceos en la literatura.

Separación y obtención de enzimas lipolíticas purificadas mediante cromatografía y electroforesis.

Las técnicas cromatográficas son amplia y preferencialmente utilizadas en la purificación de proteínas. En la literatura ha recibido especial interés la purificación de lipasas que se ha traducido en varios artículos de revisión [Macrae, 1983; Taipa *et al.*, 1992; Sharma *et al.*, 2001; Saxena *et al.*, 2003; Gupta *et al.*, 2004]. En base a estos antecedentes se ha estudiado la aplicación de separaciones cromatográficas en la purificación de enzimas lipolíticas de krill a partir de extractos enzimáticos preparados por autólisis [Gutiérrez, 2003]. Se examinó la utilización de diferentes tipos de separaciones cromatográficas como intercambio iónico, interacción hidrofóbica y filtración en gel. La cromatografía de intercambio iónico permitió la separación más adecuada de la actividad lipasa. A pesar que las enzimas lipolíticas interaccionan con lípidos, la cromatografía de interacción hidrofóbica no permitió una adecuada purificación y/o separación de las enzimas lipolíticas de krill, ya sea como una primera o una segunda etapa de purificación. La variación de la hidrofobicidad de la resina (butil-, octil- y fenil-sepharose) no afectó la separación de las enzimas lipolíticas. En forma adicional, la capacidad de las lipasas de formar agregados proteicos afectaría la purificación de éstas, como también dificultaría la determinación de las propiedades como masa molecular y punto isoeléctrico [Gutiérrez, 2003].

Para la purificación de enzimas lipolíticas de krill se utilizó además cromatografía de afinidad en heparina-agarosa. Se ha descrito que la heparina interaccionaría tanto específicamente como electrostáticamente con gran parte de las lipasas y fosfolipasas, como también con otras proteínas [Farooqui y Horrocks, 1999]. Sin embargo, no resultó adecuada para la purificación de enzimas lipolíticas. Se utilizó

también cromatoenfoco pero no mostró mejores resultados en la purificación de enzimas lipolíticas de krill. Sobre estos antecedentes se consideró la estrategia de purificación en base a la utilización de métodos electroforéticos para controlar y evitar la formación de agregados proteicos.

La estrategia de purificación empleada permitió la purificación parcial de una enzima con una masa molecular de 50 kDa, punto isoeléctrico pI 6,6 y una actividad específica de $2,9 \times 10^{-3}$ U/mg a partir de un extracto de krill preparado mediante autólisis. La razón de la baja purificación y bajo rendimiento se asociaría con dos procedimientos limitantes utilizados en la purificación. Uno de éstos corresponde a la elución desde el gel, que consistió en la simple difusión de la enzima desde la matriz de gel hacia una solución de recuperación, que se ha descrito en la literatura como un procedimiento poco eficiente [Bollag *et al.*, 1996]. Otro de los procedimientos que afectaría el rendimiento y la purificación, es el método empleado de renaturación basado en la simple remoción de SDS. Este procedimiento permitiría la renaturación espontánea y al azar, lo que eventualmente determinaría la baja actividad específica, así como podría afectar la reproducibilidad del proceso.

Determinación de las características bioquímicas y fisicoquímicas de las enzimas lipolíticas purificadas de krill.

Determinación de las propiedades fisicoquímicas (masa molecular y punto isoeléctrico) de las enzimas lipolíticas purificadas utilizando técnicas cromatográficas y electroforéticas.

Existe muy poca información en la literatura respecto de las propiedades fisicoquímicas (masa molecular y pI) de enzimas lipolíticas (esterasas y lipasas) de

crustáceos y la información disponible se centra principalmente en datos de masa molecular.

La masa molecular determinada para la lipasa de krill se asemeja a las descritas para lipasas de crustáceos. Se ha descrito una lipasa de 43 kDa para la langosta americana (*Homarus americanus*) y la langosta de pinzas rojas (*Cherax quadricarinatus*) [López-López *et al.*, 2003]. La mayor parte de la literatura hace referencia a rangos de masas moleculares de las lipasas de crustáceos, estableciendo un rango de masas de 50-750 kDa [López-López *et al.*, 2003].

Caracterización bioquímica de las enzimas lipolíticas purificadas en base a su actividad, estudios sobre el efecto de la temperatura y pH.

La actividad lipasa específica exhibe una gran variación que depende del sustrato utilizado, del organismo, etc. No existen en la literatura descripciones de lipasas purificadas de crustáceos, pero sí se ha caracterizado la actividad enzimática a nivel de extracto (Tabla 21). Para una adecuada comparación se indica en la Tabla 21 la actividad lipasa determinada para los extractos preparados mediante autólisis.

Como se observa en la Tabla 21, las lipasas de crustáceos exhiben un amplio rango de actividad, sin embargo, la mayor parte de los crustáceos muestran actividades lipasas del orden de 10^{-5} - 10^{-2} U/mg, incluyendo el krill antártico. Además, en la literatura existen varios reportes que indican que la actividad lipolítica en crustáceos es dependiente entre otros factores de la madurez del organismo [González-Baró *et al.*, 2000; Hammer *et al.*, 2000; Yao *et al.*, 2005; Ziaei-Nejad *et al.*, 2005]. Desde este punto de vista se desconoce la madurez y/o edad del krill con que se trabajó, de modo que desde esta perspectiva sería necesario un estudio de la actividad lipasa en función de la

madurez del krill con el fin de determinar las condiciones más adecuadas para la preparación de un extracto enzimático con una mayor actividad lipasa específica.

Tabla 21. Actividad lipolítica en crustáceos.

Organismo	Actividad	Sustrato	Referencia
<i>Euphausia superba</i> (KL1)	$2,9 \times 10^{-3}$ U/mg	<i>p</i> -NF palmitato	
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	$9,4 \times 10^{-3}$ U/mg		Yao <i>et al.</i> , 2005
<i>Fenneropenaeus indicus</i>	$2,0 \times 10^{-2}$ U/mg	<i>p</i> -NF palmitato	Ziaei-Nejad <i>et al.</i> , 2005
<i>Litopenaeus stylirostris</i>	10-15 U/mg	β -naftilcaprilato	Casillas-Hernández <i>et al.</i> , 2002
<i>Litopenaeus setiferus</i>	no detectada		Guzmán <i>et al.</i> , 2001
<i>Cherax quadricarinatus</i>	4,6 U/mg	trioleína	Figueiredo <i>et al.</i> , 2001
<i>Procambarus clarkii</i>	4,5 U/mg	<i>p</i> -NF caproato	Hammer <i>et al.</i> , 2000
<i>Jasus edwardsii</i>	1,2 U/mg	<i>p</i> -NF caprato	Johnston <i>et al.</i> , 2004
<i>Macrobrachium borellii</i>	$7,0 \times 10^{-5}$ U/mg	trioleína	González-Baró <i>et al.</i> , 2000

Las enzimas purificadas KL1 y KL2 se caracterizaron en función de la temperatura con el fin de establecer sus temperaturas óptimas de actividad y adaptación a bajas temperaturas. La lipasa KL1 presentó una temperatura óptima cercana a 40°C y KL2 de aproximadamente 37°C, valores que se encuentran dentro del rango de temperaturas óptimas descritas para lipasas adaptadas/activas a bajas temperaturas (Tabla 22) [Arpigny *et al.*, 1997; Choo *et al.*, 1998; Mayordomo *et al.*, 2000; Rashid *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2003] y dentro del rango de temperaturas óptimas de 25-45°C normalmente descrito entre diferentes enzimas

adaptadas/activas a bajas temperaturas [Marshall, 1997; Gerday *et al.*, 1997; Huston *et al.*, 2000; Mayordomo *et al.*, 2000].

Tabla 22. Características de las lipasas adaptadas/activas a bajas temperaturas.

Organismo	Temp.	pH	E_a	Referencia
<i>Euphausia superba</i> (KL1)	40°C	9,0	24,7 kcal/mol	
<i>Euphausia superba</i> (KL2)	37°C	8,0	4,9 kcal/mol	
<i>Pseudomonas sp.</i> cepa B11-1	45°C	8,0	11,2 kcal/mol	Choo <i>et al.</i> , 1998
<i>Pseudomonas putida</i>	40°C	7,5	17,4 kcal/mol	Hasona <i>et al.</i> , 2002
<i>Pseudomonas fragi</i>	54°C	7,5		Lu y Liska, 1969b
<i>Photobacterium lipolyticum</i> <i>sp. nov.</i>	25°C	9,0	2,1 kcal/mol	Ryu <i>et al.</i> , 2005
<i>Acinetobacter sp.</i> cepa n°6	45°C		9,0 kcal/mol	Suzuki <i>et al.</i> , 2002
<i>Serratia marcescens</i>	37°C	8,0	9,2 kcal/mol	Abdou, 2003
<i>Psychrobacter immobilis</i> B10	35°C		15,1 kcal/mol	Arpigny <i>et al.</i> , 1997
<i>Psychrobacter sp.</i> Ant300	35°C		4,6 kcal/mol	Kulakova <i>et al.</i> , 2004
<i>Aeromonas sp.</i> LPB4	10°C			Lee <i>et al.</i> , 2003
<i>Aspergillus nidulans</i>	40°C	6,5		Mayordomo <i>et al.</i> , 2000
<i>Pseudomonas sp.</i> cepa KB700A	35°C	8,5		Rashid <i>et al.</i> , 2001
<i>Moraxella</i> TA144			5,8 kcal/mol	Manco <i>et al.</i> , 1998
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	28°C	8,5	8,6 kcal/mol	Oh <i>et al.</i> , 1999
<i>Propionibacterium shermanii</i>	47°C	7,2	8,1 kcal/mol	Oterholm <i>et al.</i> , 1970

Sin embargo, la energía de activación de la reacción enzimática catalizada y la estabilidad térmica son índices más adecuados para medir una posible adaptación a la temperatura. Las temperaturas óptimas determinadas también se enmarcan dentro del rango de temperaturas óptimas de 35-45°C descritas para lipasas de crustáceos [López-López *et al.*, 2003]. Ambas lipasas KL1 y KL2 retienen un alto porcentaje de actividad lipasa específica a bajas temperaturas, KL1 retiene a 10°C aproximadamente 23% de la actividad a su temperatura óptima y KL2 retiene 46% a 10°C de su actividad a

temperatura óptima. En la literatura se reportan lipasas que tienen alta actividad a bajas temperaturas, por ejemplo, la lipasa de *Serratia marcescens* a 5°C mantiene el 90% de su actividad máxima a 37°C [Abdou, 2003], mientras que la lipasa de *Pseudomonas fragi* a 10°C tiene el 60% de su actividad máxima a 29°C [Alquati *et al.*, 2002] y la enzima lipolítica de *Acinetobacter sp.* cepa 6 a 4°C presenta el 57% de su actividad máxima [Suzuki *et al.*, 2001].

En general se ha observado que a temperaturas moderadas (20-30°C) la actividad de estas lipasas disminuye lentamente (Figura 33, ver lipasa de *Pseudomonas sp.* cepa B11-1). Sin embargo, KL1 exhibe un extraño comportamiento, presentando su menor actividad a 25-30°C pues a temperaturas menores se observa que la actividad vuelve a aumentar (Figura 33). Este comportamiento también ha sido descrito para una lipasa aislada del organismo psicrótrofo *Serratia marcescens* [Abdou, 2003]. Esta lipasa mostró una temperatura óptima de 37°C, cuya actividad disminuye cuando la temperatura se reduce hasta 15°C, pero que al seguir disminuyendo la temperatura vuelve a aumentar considerablemente la actividad, tanto que a 5°C la actividad corresponde al 90% de la actividad obtenida en su temperatura óptima (Figura 33). Se desconocen los mecanismos que explican este comportamiento.

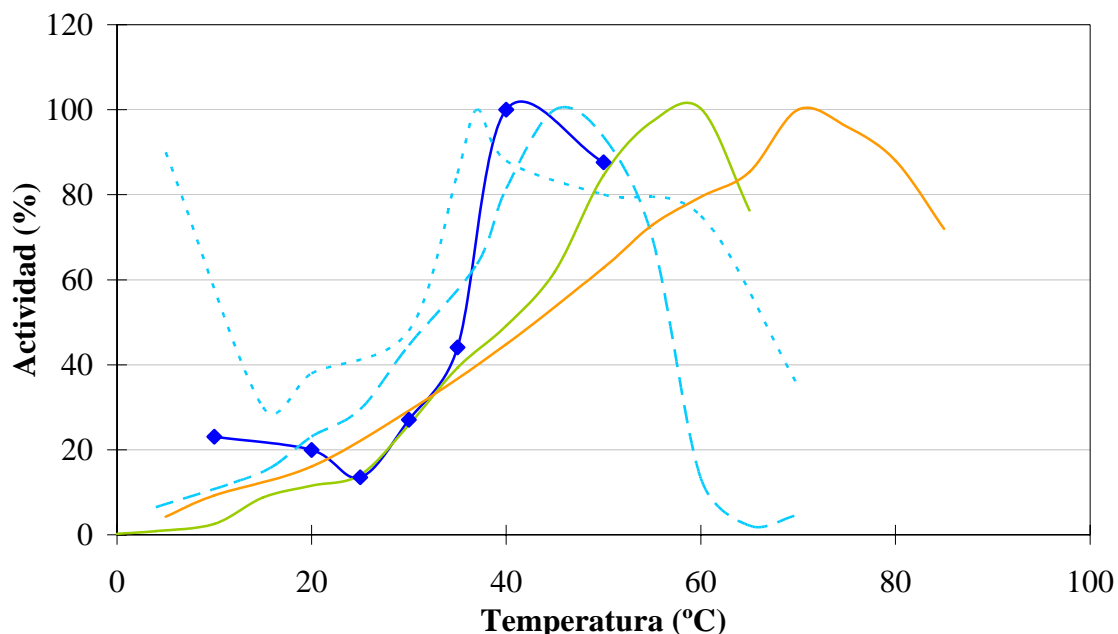


Figura 33. Actividad en función de la temperatura de lipasas activas/adaptadas a diferentes condiciones de temperatura. Los colores representan el tipo de adaptación a la temperatura de lipasas: adaptadas al frío (KL1 de *Euphausia superba* —◆—, *Serratia marcescens* ---- y *Pseudomonas sp.* cepa B11-1 —), mesofílicas (*Burkholderia cepacia* —) y termofílicas (*Bacillus acidocaldarius* —).

También se caracterizó la actividad específica en función del pH de la reacción. La lipasa KL1 presentó su máxima actividad a pH 9 y KL2 a pH 8. Gran parte de las lipasas descritas presentan pH óptimos básicos [Fojan *et al.*, 2000]. Sin embargo, también se ha descrito lipasas que presentan pH óptimos de actividad a pHs ácidos [Poulsen *et al.*, 2005]. Los pHs óptimos de KL1 y KL2 se encuentran dentro de los valores de pH óptimos de 4,5-10 descritos para lipasas de crustáceos, valores que son dependientes del tipo de sustrato y del tampón utilizados [López-López *et al.*, 2003]. La mayor actividad lipasa a pH básicos es favorable si se piensa en posibles aplicaciones biotecnológicas de estas lipasas en la industria de detergentes.

Determinación de la energía de activación de las enzimas lipolíticas purificadas de krill.

A partir de los datos de actividad a diferentes temperaturas se determinó la energía de activación. La determinación de la energía de activación debe realizarse con los datos de la curva exponencial, puesto que siguen la ecuación de Arrhenius ($k_{cat} = Ae^{-E_a/RT}$). En base a la actividad determinada para KL1 en el intervalo de temperaturas 25-40°C se obtuvo una energía de activación (E_a) de 24,7 kcal/mol para la reacción catalizada sobre *p*-nitrofenilpalmitato (C16). Para KL2 se obtuvo un valor de E_a de 4,9 kcal/mol para la reacción catalizada sobre *p*-nitrofenilbutirato (C4) en el intervalo de temperaturas de 10-37°C. En la Tabla 22 se indican varios valores de energía de activación para diversas lipasas adaptadas/activas a bajas temperaturas. Como se observa, los valores de E_a son bastante variables, por ejemplo, la lipasa M37 de *Photobacterium lipolyticum sp. nov.*, presenta una E_a de 2,1 kcal/mol determinada utilizando aceite de oliva como sustrato [Ryu *et al.*, 2005] y la esterasa EstZ de *Pseudomonas putida* presenta una E_a de 17,4 kcal/mol para el sustrato α -naftilacetato [Hasona *et al.*, 2002]. Como referencia algunos autores utilizan los valores de energía de activación de enzimas adaptadas al frío de bacterias antárticas de 12-17 kcal/mol y de enzimas mesofílicas un valor de E_a de 25 kcal/mol de lipasas de *Pseudomonas aeruginosa* [Choo *et al.*, 1998; Oh *et al.*, 1999; Ryu *et al.*, 2005]. Sin embargo, las lipasas termofílicas también presentan valores de energía de activación bajos, por ejemplo: 4,8 kcal/mol para lipasas obtenidas de muestras ambientales; 6,2 kcal/mol para lipasa de *Archaeoglobus fulgidus*; 6,3 kcal/mol para la lipasa de *Pyrobaculum calidifontis*

y 7,6 kcal/mol para lipasa de *Alicyclobacillus acidocaldarius* [Rhee *et al.*, 2005]. En base a los valores de referencia utilizados en la literatura, el valor E_a de 4,9 kcal/mol de KL2 se encuentra en el intervalo descrito para lipasas adaptadas al frío y el valor E_a de 24,7 kcal/mol de KL1 se encuentra próximo al valor descrito para lipasas mesofílicas.

En la Figura 34 se muestra el comportamiento completo del logaritmo natural de la actividad *versus* el inverso de la temperatura para KL1, como también, el comportamiento de lipasas adaptadas a diferentes temperaturas. Para KL1 se puede apreciar dos zonas donde se observan valores positivos de pendiente, en que la primera zona (línea verde) corresponde al intervalo de temperaturas 40-50°C. Este cambio en la pendiente es reflejo del cambio conformacional de la estructura nativa de la proteína que se traduce en la desnaturación térmica de la proteína, que lleva finalmente a su inactivación, esto es, la disminución y pérdida de actividad [Feller y Gerday, 1997]. La segunda zona de pendiente positiva (línea azul) corresponde al intervalo de temperaturas 10-20°C. En forma similar a lo que ocurre a 40-50°C, este cambio en la pendiente podría reflejar un cambio conformacional de la lipasa asociado también a la disminución de la actividad, que podría interpretarse como un proceso de desnaturación y que sería inducido por un cambio en las propiedades físicas de la mezcla de ensayo. No obstante, los diferentes estudios de caracterización de lipasas purificadas de krill utilizaron el mismo ensayo enzimático en función de la temperatura (hasta temperaturas de 5°C), no observándose este comportamiento [Gutiérrez, 2003; Mahn, 2004]. Además en la literatura no se ha descrito problemas con los diferentes ensayos que utilizan *p*-nitrofenilpalmitato a bajas temperaturas.

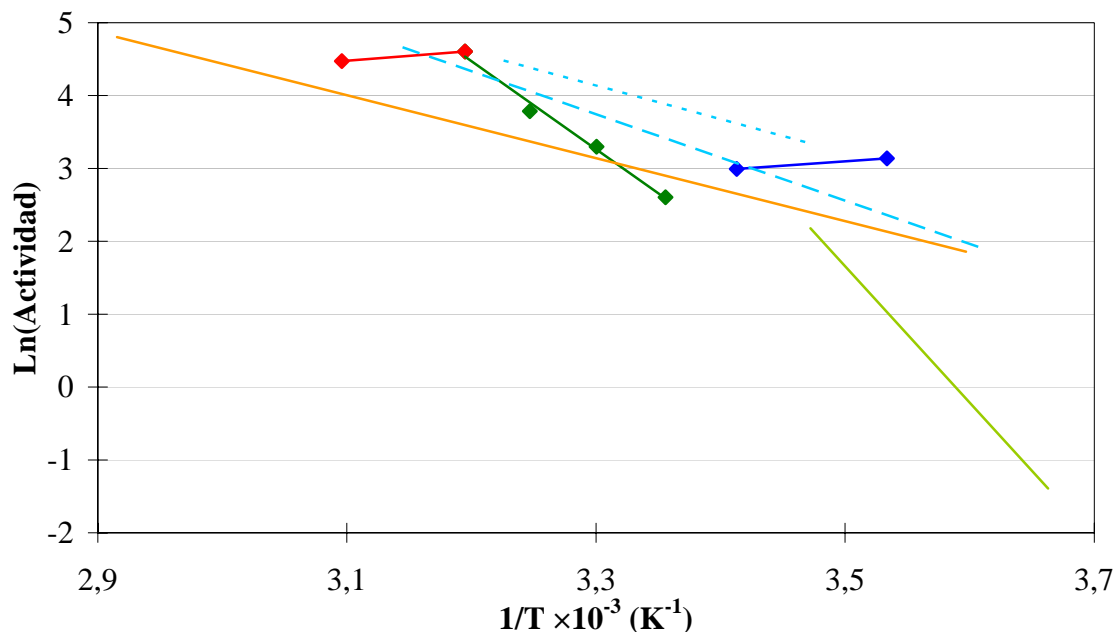


Figura 34. Comportamiento de la actividad lipasa de KL1 en función de la temperatura. La actividad se determinó sobre *p*-nitrofenilpalmitato bajo las condiciones de ensayo estándar (datos para n=3). Los colores representan el tipo de adaptación a la temperatura de lipasas: adaptadas al frío (*Euphausia superba* 10-20°C —◆—, *Euphausia superba* 25-40°C —◆—, *Euphausia superba* 40-50°C —◆—, *Serratia marcescens* —◆— y *Pseudomonas sp.* cepa B11-1 —◆—), mesofílicas (*Burkholderia cepacia* —◆—) y termofílicas (*Bacillus acidocaldarius* —◆—).

Alternativamente, este comportamiento podría estar asociado a un plegamiento incorrecto de la proteína, producto de la etapa desnaturante en su purificación. Esta observación se indicó para el caso de una ribozima termofílica de *Tetrahymena thermophila* [Li *et al.*, 1995], sin embargo, se descartó un mal plegamiento producto de las purificaciones a través de procesos desnaturantes, debido a que se utilizó un método nativo de purificación, en el que se observó el mismo comportamiento. Esto sugiere que se debe buscar un método nativo de purificación para descartar o confirmar el comportamiento observado de KL1. Por otra parte, las lipasas presentan estructuras adicionales al plegamiento α/β -hidrolasa, como son elementos móviles (tapas) que podrían dar cuenta del cambio conformacional [Nardini y Dijkstra, 1999; Beisson *et al.*,

2000; Pleiss *et al.*, 2000]. En el caso de la proteasa neutra activa a bajas temperaturas (vimelisina) de *Vibrio sp.* T1800 [Kunugi *et al.*, 1996], se sugiere la existencia de dos formas activas de la enzima reguladas por un equilibrio desplazado por la temperatura. Desde este punto de vista se ha descrito que las lipasas pueden formar agregados proteicos y se ha observado que la formación de agregados puede llevar a la disminución de la actividad lipasa [Arrese y Wells, 1994; Hiol *et al.*, 1999], comportamiento que se ha descrito también para lipasas de krill antártico [Gutiérrez, 2003]. La formación de agregados se podría descartar utilizando algún detergente, por ejemplo, CHAPS durante la medición de la actividad lipasa en función de la temperatura.

Secuenciación y análisis de las secuencias de las enzimas lipolíticas de krill antártico.

Análisis de las secuencias aminoacídicas de enzimas lipolíticas y diseño de partidores para la amplificación de probables genes de enzimas lipolíticas de krill.

El diseño de partidores para la identificación de genes de lipasas de krill se basó en la identificación de zonas conservadas obtenidas de los alineamientos de las secuencias aminoacídicas de dominios, familias y bloques de lipasas. Posterior a esta selección, las secuencias se examinaron en función de su similitud con enzimas lipolíticas o relacionadas, lo que descartó *ca.* 46% de las secuencias conservadas debido a que no presentaron similitud con lipasas en las bases de datos o presentaron similitud con proteínas no relacionadas con lipasas (*e.g.*, gap junction, tripsina, proteínas de shock térmico, adenilato ciclasa, etc.). El análisis indicó que los aminoácidos conservados pertenecientes al sitio activo o a la cavidad oxianiónica se encuentran dentro de pequeñas zonas conservadas (Figura 27). Similares observaciones se han descrito en la

literatura en la identificación de zonas conservadas de lipasas para el diseño de partidores para la amplificación de genes que codifican para lipasas en muestras ambientales [Bell *et al.*, 2002; Bradner *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2004]. Los autores Bell *et al.*, (2002) y Bradner *et al.*, (2003) describen el diseño de partidores de carácter semi-degenerado utilizando los principios del diseño CODEHOP. Brevemente, el sistema CODEHOP permite el diseño de partidores que contienen una región de consenso que facilita el anclaje sobre la secuencia blanco y una región degenerada que permite cierta variabilidad en la secuencia blanco a reconocer [Rose *et al.*, 1998; Rose *et al.*, 2003]. Estos autores han hecho mención de la dificultad en el reconocimiento y la ausencia de zonas conservadas. Algunas de las razones es la baja similitud existente entre las lipasas a nivel aminoacídico (20%) (Tabla 23), la pequeña longitud de las zonas conservadas (de alrededor de seis aminoácidos), la ausencia de aminoácidos conservados contiguos, así como la presencia de aminoácidos “desfavorables” (serina, arginina, leucina) dentro de las secuencias conservadas. Sin embargo, ambos grupos reportaron la identificación de genes que codifican para probables lipasas.

Se ha indicado como regiones de alta conservación en las lipasas, aquellos residuos involucrados en la formación de puentes salinos, residuos de cisteínas que participan en la formación de puentes disulfuro y aquellos residuos situados en los extremos de los elementos secundarios. En general se observa una mayor conservación de aminoácidos relacionados con la estructura de láminas β y una menor conservación de los residuos relacionados con las hélices α [Cygler *et al.*, 1993].

Tabla 23. Similitud de secuencias entre las lipasas bacterianas. Se indica el porcentaje de similitud de las secuencias aminoacídicas para las diferentes familias y subfamilias de lipasas bacterianas descritas. Para cada familia y subfamilia la secuencia lipasa del primer organismo se utilizó como referencia para la determinación de la similitud.

Familia	Subfamilia	Organismo	Similitud (%)	
			Familia	Subfamilia
I	1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100	
		<i>Pseudomonas fluorescens</i> C9	95	
		<i>Vibrio cholerae</i>	57	
		<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	43	
		<i>Pseudomonas fragi</i>	40	
		<i>Pseudomonas wisconsinensis</i>	39	
		<i>Proteus vulgaris</i>	38	
	2	<i>Burkholderia glumae</i>	35	100
		<i>Chromobacterium viscosum</i>	35	100
		<i>Burkholderia cepacia</i>	33	78
		<i>Pseudomonas luteola</i>	33	77
	3	<i>Pseudomonas fluorescens</i> SIK W1	14	100
		<i>Serratia marcescens</i>	15	51
	4	<i>Bacillus subtilis</i>	16	100
		<i>Bacillus pumilus</i>	13	80
	5	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	15	100
		<i>Bacillus thermocatenulatus</i>	14	94
		<i>Staphylococcus hyicus</i>	15	29
		<i>Staphylococcus aureus</i>	14	28
		<i>Staphylococcus epidermidis</i>	13	26
	6	<i>Propionibacterium acnes</i>	14	100
		<i>Streptomyces cinnamoneus</i>	14	50
	II (GDSL)	<i>Aeromonas hydrophila</i>	100	
		<i>Streptomyces scabies</i>	36	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		35		
<i>Salmonella typhimurium</i>		28		
<i>Photobacterium luminescens</i>		28		
III	<i>Streptomyces exfoliatus</i>	100		
	<i>Streptomyces albus</i>	82		
	<i>Moraxella sp.</i>	33		
IV (HSL)	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	100		
	<i>Pseudomonas sp.</i> B11-1	54		
	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	48		
	<i>Alcaligenes eutrophus</i>	40		
	<i>Escherichia coli</i>	36		
	<i>Moraxella sp.</i>	25		
V		<i>Pseudomonas oleovorans</i>	100	

	<i>Haemophilus influenzae</i>	41
	<i>Psychrobacter immobilis</i>	34
	<i>Moraxella sp.</i>	34
	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	32
	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	20
VI	<i>Synechocystis sp.</i>	100
	<i>Spirulina platensis</i>	50
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	24
	<i>Rickettsia prowazekii</i>	20
	<i>Chlamydia trachomatis</i>	16
VII	<i>Arthrobacter oxydans</i>	100
	<i>Bacillus subtilis</i>	48
	<i>Streptomyces coelicolor</i>	45
VIII	<i>Arthrobacter globiformis</i>	100
	<i>Streptomyces chrysomallus</i>	43
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> SIK W1	40

En una primera aproximación a la amplificación de genes de lipasas de krill antártico se utilizaron distintas combinaciones de los partidores OXF/ACR [Bell *et al.*, 2002]. Sin embargo, las secuencias obtenidas no presentaron similitud con enzimas lipolíticas. El análisis de las secuencias amplificadas indicó dificultades en el reconocimiento de la región de unión de los partidores ACR, no así para la zona complementaria a OXF, lo que sugiere que los partidores OXF se unirían con mayor afinidad al cDNA blanco que los partidores ACR. El mismo análisis sugiere también la posibilidad que los partidores OXF se comportarían como partidores reversos (Figura 35).

```

OXF1      CCYGTKGTSYTNGTNCAYGG-----
1 CCCGTTGTGCTAGTGCATGGTCCATGTAT---//---CTTATCCCCACAGCCTCCTGTGGCACACTCCCTGGG 246
ACR1      -----CSNGTRTCRKACCCNCCRGA
OXF1'     -----GGYACNTGNTYSTGKTYCC-----

```

Figura 35. Esquema del reconocimiento de los partidores OXF1/ACR1 y su secuencia amplificada. En el esquema se ilustra la posible interacción del partidore OXF1 como partidore con sentido y como partidore reverso (OXF1') con la secuencia de 246 pb amplificada utilizando los partidores OXF1 y ACR1.

Por otra parte, los inconvenientes observados se deberían a que la amplificación se realizó a partir de cDNA, en cambio, Bell *et al.*, (2002) utilizaron DNA genómico. Sin embargo, los partidores OXF/ACR se utilizaron para la identificación de genes de lipasas en DNA genómico de origen antártico, observándose los mismos inconvenientes.

Se utilizaron entonces los partidores diseñados para la amplificación de genes de lipasas de krill. Las secuencias obtenidas tampoco mostraron similitud con enzimas lipolíticas. La ausencia de similitud se debería a que no se optimizaron las condiciones de amplificación PCR utilizando los partidores diseñados, como se debería también a que en el diseño de los partidores no se consideraron restricciones taxonómicas.

Análisis de las secuencias aminoacídicas/nucleotídicas de enzimas lipolíticas de krill.

Los resultados obtenidos de los análisis de las secuencias no mostraron identidad con lipasas, sino en la mayoría de los casos presentaron una alta similitud con enzimas hipotéticas o de función desconocida. En una búsqueda en la literatura relacionada con lipasas, se encontró que existen innumerables artículos en que enzimas purificadas con alta actividad lipasa no presentan o presentan muy poca identidad con otras lipasas (Tabla 24). Ninguno de los autores discute los motivos de la baja identidad y/o similitud.

Anguita *et al.*, (1993) describen la purificación de una lipasa extracelular de *Aeromonas hydrophila*, en que el análisis de la secuencia completa no muestra identidad con lipasa alguna. Los análisis de las secuencias de los extremos N-terminales de lipasas purificadas de *Cephaloleia presignis* [Arreguín-Espinosa *et al.*, 2000], *Mucor hiemalis f. hiemalis* [Hiol *et al.*, 1999] y *Scorpio maurus* [Zouari *et al.*, 2005] no mostraron similitud con lipasas, ya sea en análisis realizados en bases de datos generales como NCBI, como en bases de datos especializadas en lipasas. Se ha reportado otros casos en

que las secuencias de lipasas no presentan homología con lipasas descritas para organismos del mismo género. Por ejemplo, una lipasa purificada de *Photobacterium lipolyticum sp. nov.*, presenta una similitud de 6-12% con otras lipasas, sin embargo, no presenta homología con lipasas/esterasas presentes en el genoma de *Photobacterium profundum* SS9 [Ryu *et al.*, 2005]. En forma similar a los resultados presentados en que las secuencias obtenidas no presentan identidad con lipasas, la esterasa PsEst1 purificada de *Pseudomonas sp.* B11-1 presenta secuencias que la identifican con el plegamiento α/β -hidrolasa. Sin embargo, el análisis en las bases de datos de su secuencia arrojó que presenta un 57% de identidad con una proteína de función desconocida codificada dentro del operón *trp* [Suzuki *et al.*, 2003].

Tabla 24. Limitaciones en la determinación de la similitud de las secuencias de lipasas. Se señala la longitud de las secuencias, se indica además la región que permitió la identificación como lipasas y se señala el porcentaje de similitud.

Organismo	Similitud/Identidad	Referencia
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Secuencia 2052 pb. Sitio de unión a sustrato.	Anguita <i>et al.</i> , 1993
<i>Pseudomonas fluorescens</i> B52	Secuencia 1428 pb. Sitio de unión a sustrato. 22-24% identidad.	Tan y Miller, 1992
<i>Pseudomonas sp.</i> B11-1	Secuencia 924 pb. Sitio de unión a sustrato. 23-29% homología.	Choo <i>et al.</i> , 1998
<i>Streptomyces cinnamomeus</i>	Secuencia 275 aa. Sitio de unión a sustrato. 29% identidad.	Sommer <i>et al.</i> , 1997
<i>Cephaloleia presignis</i>	Secuencia 28 aa N-terminal. Sin homología.	Arreguín-Espinosa <i>et al.</i> , 2000
<i>Acinetobacter sp.</i> cepa nº6	Secuencia 301 aa. Sitio de unión a sustrato. 17% identidad.	Suzuki <i>et al.</i> , 2002
<i>Mucor hiemalis f. hiemalis</i>	Secuencia 19 aa N-terminal. Sin homología.	Hiol <i>et al.</i> , 1999
<i>Pseudomonas sp.</i> B11-1	Secuencia 1911 pb. Sitio de unión a sustrato. 15% similitud.	Suzuki <i>et al.</i> , 2003
<i>Scorpio maurus</i>	33 aa N-terminal. Sin homología.	Zouari <i>et al.</i> , 2005
<i>Photobacterium lipolyticum sp. nov.</i>	Secuencia 1023 pb. Sitio de unión a sustrato. 6-12% similitud.	Ryu <i>et al.</i> , 2005

Las dificultades en el análisis de las secuencias de las lipasas probablemente es producto de la baja similitud existente entre las lipasas a nivel aminoacídico, la pequeña longitud de las zonas conservadas y la ausencia de aminoácidos conservados contiguos.

Las enzimas lipolíticas de krill podrían exhibir nuevas características y secuencias respecto de las enzimas lipolíticas descritas. Esto podría ser equivalente al caso de proteasas de crustáceos. Los crustáceos poseen proteasas ortólogas a las de vertebrados como tripsina, quimotripsina, carboxipeptidasa, aminopeptidasa como también proteasas que son únicas a crustáceos como astacina [Sainz *et al.*, 2004]. Esto podría basarse en que los partidores diseñados a partir de secuencias consenso no permitieron la amplificación de genes de lipasas. Aunque se debe considerar que no se optimizaron las condiciones de amplificación PCR utilizando los partidores diseñados.

El diseño de los partidores se basó en el uso de secuencias lipolíticas de organismos eucariontes y relacionadas con el proceso de digestión. Eventualmente se podría haber realizado una restricción taxonómica al considerar las secuencias de enzimas lipolíticas de artrópodos. No obstante, no existen en las bases de datos secuencias de lipasas de crustáceos, pero sí secuencias de enzimas lipolíticas de insectos, los artrópodos más cercanos a los crustáceos. Sin embargo, debido a la ausencia de secuencias de lipasas de crustáceos, se desconoce su similitud con lipasas de insectos. Utilizando la clasificación de las enzimas lipolíticas de la base de datos ESTHER se obtuvieron las secuencias aminoacídicas de la familia de lipasas de insectos. En la Figura 36 se muestran las zonas conservadas de la familia de lipasas de insectos determinada a partir de los alineamientos de las secuencias utilizando el algoritmo

CLUSTALW. El análisis de los dominios presentes en CDD mostró que la secuencia consenso contiene parte del dominio lipase y una región similar a la presente en la familia de lipasas pancreáticas. Se examinó la complementariedad de los partidores diseñados con la secuencia consenso de lipasas de insectos por medio de alineamientos, los que no mostraron similitud. Nuevamente esto indicaría que las regiones de reconocimiento de los partidores diseñados no están contenidas en la secuencia consenso de lipasas de insectos. En base a estos antecedentes, se sugiere que a partir de la secuencia consenso se podrían diseñar nuevos partidores que podrían utilizarse para la identificación de probables genes de lipasas de krill. Sin embargo, no debe descartarse el uso de los partidores diseñados en esta tesis optimizando las condiciones de amplificación PCR, considerando que los crustáceos podrían poseer lipasas similares a las de eucariontes, similar a lo que ocurre con las proteasas de crustáceos.

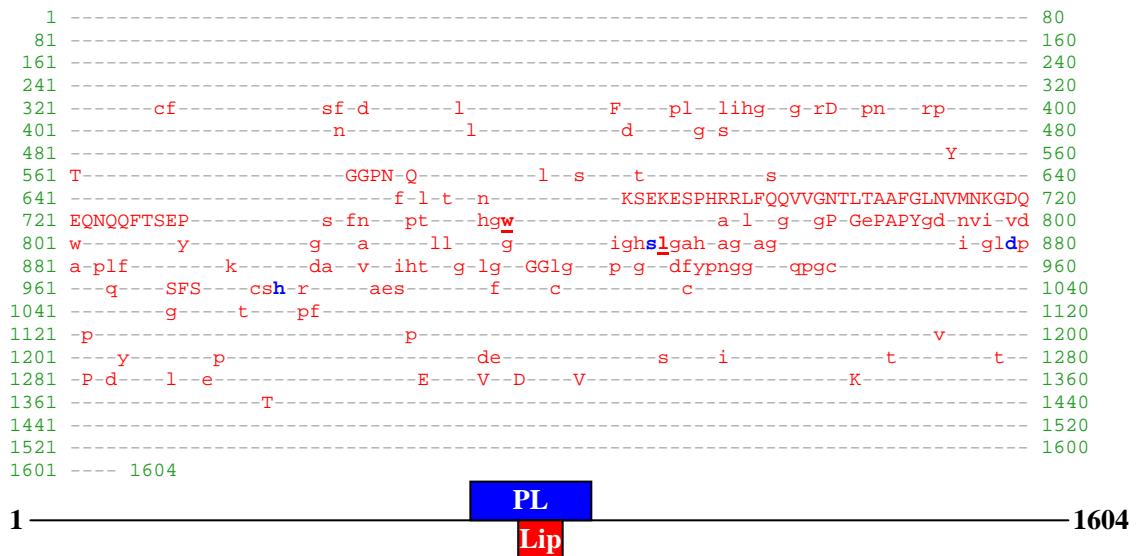


Figura 36. Secuencia consenso determinada para la familia de lipasas de insectos. En el esquema se muestra la secuencia consenso y las zonas conservadas. Además se indican una zona similar a lipasas pancreáticas (PL) y dominio lipase (Lip). En el esquema se señala la longitud aminoacídica completa de la familia de lipasas de insectos.

En forma adicional al estudio de las lipasas, se examinó la amplificación de genes de esterases de krill antártico. Existen varias secuencias de esterases de crustáceos disponibles en las bases de datos. A partir de las secuencias aminoacídicas de las esterases se determinó la secuencia consenso. El análisis en CDD mostró que la secuencia consenso contenía el dominio esterase_lipase. Se alinearon los partidores EL diseñados para el reconocimiento del dominio esterase_lipase con la secuencia determinada para las esterases de crustáceos. Efectivamente la secuencia consenso contenía las regiones de reconocimiento para los partidores EL, confirmando en cierta forma que la estrategia de utilizar información de los dominios de organismos eucariontes es adecuada. Los resultados obtenidos también sugieren la optimización de las condiciones de amplificación.

Enzimas lipolíticas de krill antártico: purificación y caracterización.

Se presentaron varios inconvenientes en la purificación de enzimas lipolíticas de krill antártico. Inicialmente para la purificación se utilizaron diferentes separaciones cromatográficas (cromatografía de intercambio iónico, de interacción hidrofóbica y filtración en gel), las que no proporcionaron una separación adecuada de las enzimas lipolíticas.

En base a algunas de las características determinadas preliminarmente para las enzimas lipolíticas presentes en el extracto de krill, se utilizaron separaciones cromatográficas y electroforéticas con mejor capacidad de separación o de mejor resolución (cromatoenfoco, cromatografía de afinidad e isoelectroenfoco preparativo), sin embargo, no permitieron una adecuada separación de las enzimas lipolíticas.

Uno de los factores que afectó la separación y purificación correspondió a la presencia de lípidos y pigmentos interferentes, siendo los fosfolípidos uno de los principales contaminantes y de mayor dificultad de remoción [Turkiewicz *et al.*, 1985; Ellingsen y Mohr, 1987]. La remoción de las sustancias interferentes y/o contaminantes causó una importante pérdida de actividad lipasa, probablemente debido a una desnaturación de las enzimas producto de los tratamientos, o bien por la remoción de las enzimas por los solventes utilizados. Se suma además que las enzimas lipolíticas de krill se encontrarían asociadas fuertemente a lípidos. Se plantea esto debido a que en estudios previos se estableció que para una mejor separación cromatográfica de las enzimas lipolíticas, se requirió del detergente zwitteriónico CHAPS [Gutiérrez, 2003]. En la literatura se ha descrito que la eliminación de los lípidos presentes en los extractos puede llevar a la inestabilidad de las lipasas a través de las etapas de purificación [Lu y Liska, 1969a]. Se ha descrito también que los procedimientos tradicionales de purificación de lipasas presentan en general inconvenientes, como también, requerir de muchas etapas y finalmente de tener un bajo rendimiento [Saxena *et al.*, 2003; Gupta *et al.*, 2004].

Sobre la base de los diferentes resultados obtenidos en la preparación de extracto enzimático de krill y en la purificación de enzimas lipolíticas de krill, se sugiere el tratamiento del extracto preparado mediante autólisis u homogenización con precipitación con sulfato de amonio a 100% de saturación, que permitiría tanto la concentración de las proteínas como también ayudaría en la eliminación de lípidos y pigmentos. Este procedimiento permitiría la retención de prácticamente toda la proteína y actividad lipasa específica presente en el extracto inicial. En forma alternativa la precipitación con sulfato de amonio a 0-40% de saturación permitiría recuperar una alta actividad lipasa específica libre de actividad proteasa contaminante. Se podría examinar

la pella obtenida o resuspendida para determinar si requiere de tratamiento adicional para la remoción de lípidos y pigmentos contaminantes. El extracto concentrado libre de lípidos y pigmentos estaría en condiciones adecuadas para ser utilizado en la separación de las enzimas lipolíticas presentes. Como primera etapa cromatográfica se sugiere intercambio iónico en Q-sepharose, puesto que entre las diferentes cromatografías empleadas permitió la mejor separación de los picos de actividad lipasa. Como segunda etapa cromatográfica se recomienda la utilización de cromatografía de afinidad en heparina-agarosa. Estas recomendaciones permitirían la adecuada purificación de enzimas lipolíticas de krill antártico. De todas maneras se debe considerar la utilización de nuevos procedimientos de purificación de lipasas descritos en la literatura [Sharma *et al.*, 2001; Saxena *et al.*, 2003; Gupta *et al.*, 2004], como por ejemplo, cromatografía en polietilenglicol-sepharose, sistemas micelares reversos, etc.

Los estudios de comparación de las lipasas purificadas de krill con lipasas adaptadas a diferentes temperaturas no se pudieron realizar. Uno de los motivos correspondió a la limitada disponibilidad de lipasas comerciales puras, como también, que la mayor parte de las lipasas disponibles correspondían a enzimas mesofílicas. El estudio comparativo es importante para determinar las características de las lipasas bajo las mismas condiciones de ensayo y sustrato.

La ausencia de secuencias de lipasas de crustáceos dificultó el diseño de partidores específicos para la búsqueda de lipasas de krill antártico. Sin embargo, la estrategia utilizada en base al análisis de las regiones conservadas de las enzimas lipolíticas eucariontes es una adecuada aproximación, como se corrobora con la

presencia de las regiones de reconocimiento en las secuencias de esterasas de crustáceos para los partidores EL, sugiriéndose la optimización de las condiciones de amplificación por PCR. En forma adicional, se sugiere el diseño de partidores para la identificación/amplificación de genes de enzimas lipolíticas de krill en base a las regiones conservadas de la secuencia consenso de las lipasas de insectos. También se debe tener en cuenta en el análisis de las secuencias de lipasas, la baja similitud existente entre las lipasas a nivel aminoacídico (20%), la pequeña longitud de las zonas conservadas, la ausencia de aminoácidos conservados contiguos, la presencia de aminoácidos “desfavorables” dentro de las secuencias conservadas. En base a los resultados obtenidos en el análisis de secuencias aminoacídicas y nucleotídicas, se recomienda utilizar la herramienta PSI-BLAST en el caso de la ausencia o baja similitud de las secuencias obtenidas. Esta herramienta permite generar un perfil de proteínas similares a la secuencia problema que se utiliza en nuevas búsquedas incorporando nuevas proteínas al perfil, lo que facilitaría la detección de secuencias homólogas lejanas filogenéticamente. Alternativamente, se recomienda la utilización de la herramienta Block searcher de Blocks WWW Server que permite detectar similitudes con regiones o bloques conservados, herramienta que permite detectar regiones solapadas y que puede dificultar la detección de similitud. Los autores que han señalado la no detección de similitud de secuencias con lipasas (Tabla 24), sugieren el reconocimiento “manual” de elementos conservados como es principalmente la identificación de la región que contiene el sitio activo, específicamente la región que contiene al aminoácido nucleófilo del sitio activo (GXSXG).

Enzimas lipolíticas de krill antártico: ¿enzimas adaptadas al frío?

Las características de adaptación al frío de una enzima se pueden evaluar en función de tres propiedades: (i) alta eficiencia catalítica [Gianese *et al.*, 2001; Zecchinon *et al.*, 2001; D'Amico *et al.*, 2002; Hoyoux *et al.*, 2004], (ii) temperaturas óptimas desplazadas a bajas temperaturas [Russell, 2000; Zecchinon *et al.*, 2001; Feller y Gerday, 2003] y (iii) termolabilidad a temperaturas moderadas (20-60°C) [Gerday, 1997; Russell, 2000; Zecchinon *et al.*, 2001; Feller y Gerday, 2003].

La alta eficiencia catalítica se asocia a una alta actividad específica, sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, la actividad lipasa es bastante variable y depende entre otros factores del sustrato utilizado, del tipo y condiciones de ensayo enzimático, y del organismo del cual se purificó la lipasa. Las actividades lipasas específicas determinadas para KL1 y KL2 se encuentran dentro del intervalo de actividad lipasa descrita para crustáceos. Sin embargo, ambas lipasas retienen una alta actividad a bajas temperaturas.

Las temperaturas óptimas de las lipasas KL1 y KL2 purificadas se encuentran dentro del intervalo de temperaturas óptimas descritas para la mayoría de las lipasas adaptadas al frío (Tabla 22). Sin embargo, la temperatura óptima no es concluyente respecto de la naturaleza criofílica de las enzimas adaptadas al frío.

En este trabajo no se determinó la estabilidad térmica de las lipasas purificadas, sin embargo, se evaluó la energía de activación de la reacción catalizada por las lipasas KL1 y KL2, parámetro que se correlaciona con la alta eficiencia catalítica, el desplazamiento de las temperaturas óptimas y la termolabilidad. La mayoría de las enzimas adaptadas/activas a bajas temperaturas poseen energías de activación menores a las de sus correspondientes mesófilos. Una menor energía de activación conlleva a una

alta eficiencia catalítica o a una mayor actividad específica, resultante de una más fácil acomodación del sustrato a bajas y moderadas temperaturas, lo que es estructuralmente alcanzado por una disminución en el número de interacciones que han de romperse durante la catálisis [Choo *et al.*, 1998; Lonhienne *et al.*, 2000; D'Amico *et al.*, 2002; Deming, 2002; Feller, 2003; Georlette *et al.*, 2004; Hoyoux *et al.*, 2004]. Esto a su vez es una consecuencia directa de una estructura más flexible (local o global), reduciendo el costo de los cambios conformacionales requeridos para la interacción con el sustrato [Feller *et al.*, 1996; Gianese *et al.*, 2001; Deming, 2002]. Una mayor flexibilidad se relaciona con una menor estabilidad y en particular con una menor estabilidad térmica [Feller *et al.*, 1996; Genicot *et al.*, 1996; Fields, 2001] que se traduce en un desplazamiento de la temperatura óptima a valores más bajos de temperatura [Huston *et al.*, 2000]. El mecanismo exacto por el cual disminuye la energía de activación de cada enzima adaptada al frío parece ser específico de cada enzima.

En vista que la energía de activación correlacionaría varias de las propiedades observadas en las enzimas adaptadas/activas a bajas temperaturas, se comparó la energía de activación determinada para KL1 y KL2 con otras lipasas adaptadas al frío (Tabla 22). La lipasa KL1 exhibe una energía de activación mayor a las descritas para lipasas criofílicas y se encuentra en el intervalo de energías de activación descrito para lipasas mesofílicas, en tanto, KL2 presenta un valor de energía de activación dentro de los descritos para lipasas adaptadas al frío. No obstante, la energía de activación es dependiente del sustrato utilizado, por ejemplo, la lipasa LipP de *Pseudomonas sp.*, cepa B11-1 presenta un valor de E_a de 11,2 kcal/mol para *p*-nitrofenilbutirato (C4) y de 7,7 kcal/mol para *p*-nitrofenillaurato (C12) [Choo *et al.*, 1998]. También se ha reportado el

caso de una lipasa de *Pseudomonas mendocina* 3121-1 que presenta un E_a de 8,4 kcal/mol para *p*-nitrofenilbutirato (C4) y de 1,98 kcal/mol para Tween-80 (polioxietilén sorbitan monooleato) [Surinenaite *et al.*, 2002]. En consecuencia se concluye que una adecuada comparación debe considerar el mismo sustrato y las mismas condiciones de ensayo.

Considerando estos antecedentes, la lipasa KL1 de krill antártico presentó una energía de activación similar al de las lipasas mesofílicas, parámetro que no se correlaciona con la retención de actividad lipasa específica a bajas temperaturas. Sin embargo, se deben examinar métodos alternativos de purificación de KL1, de modo de obtener la enzima en condiciones nativas, con el fin de descartar o corroborar su inusual comportamiento y su adaptación al frío. Por otra parte, la lipasa KL2 de krill antártico presentó una energía de activación comparable a la descrita para enzimas criofílicas, parámetro que se correlaciona con la alta retención de actividad lipasa específica a bajas temperaturas.

CONCLUSIONES

En esta tesis se logró disponer de un adecuado ensayo enzimático para la determinación de la actividad lipasa bajo diferentes condiciones, la purificación y caracterización de enzimas lipolíticas de krill antártico, además de establecer las condiciones más adecuadas para su purificación. Se combinó el trabajo de secuenciación de las lipasas purificadas con la identificación de genes de lipasas de krill antártico, indicándose los problemas que se pueden presentar y las soluciones que se pueden aplicar, y se obtuvieron antecedentes sobre la adaptación al frío de las lipasas de krill antártico. A partir de los resultados obtenidos se concluye que:

- La autólisis, procedimiento utilizado en la preparación del extracto enzimático de krill, puede ser considerado como un proceso de purificación (eliminación de proteínas) y de selección (retención de proteínas), producto del proceso de autodegradación.

Se determinaron como condiciones óptimas de autólisis para la obtención de una alta actividad lipasa específica la preparación del extracto a 40°C durante 24 h.

El tratamiento del autolisado con cloroformo resultó en un procedimiento adecuado de eliminación de lípidos y pigmentos interferentes presentes en el extracto que afectaron el proceso de purificación, sin embargo, se observó una importante pérdida de actividad lipasa.

El fraccionamiento de la actividad lipasa mediante precipitación con sulfato de amonio estableció que la precipitación en el intervalo 0-40% de saturación permite

la preparación de un extracto con alta actividad lipasa (67% de la actividad del autolisado) libre de actividad proteasa contaminante.

- La homogenización se utilizó como un procedimiento mecánico alternativo en la preparación del extracto enzimático de krill.

La homogenización en diferentes tampones y el control del pH del homogenizado no afectaron los patrones electroforéticos de actividad, aunque se observaron diferencias en la obtención de actividad lipasa específica. Sin embargo, la homogenización en agua destilada proporcionó la mayor actividad lipasa específica.

Se determinaron como condiciones óptimas de homogenización para la obtención de una alta actividad lipasa específica la preparación del extracto a 8.300 rpm durante 1-2 min y 4°C (en agua destilada).

El tratamiento del homogenizado con polietilenglicol y etanol permitieron una adecuada remoción de lípidos y pigmentos interferentes, sin embargo, se observó pérdida de la actividad lipasa (52 y 67%, respectivamente).

- La comparación de la preparación del extracto enzimático mediante autólisis u homogenización estableció que ambos procedimientos proporcionan extractos con similar actividad lipasa específica, además de presentar similares patrones electroforéticos de actividad. La ventaja de la homogenización es el menor tiempo de preparación del extracto y su desventaja es la incorporación de mayor proteína al extracto.

- Se dispuso de un adecuado ensayo enzimático adaptado de diferentes ensayos enzimáticos descritos. La incorporación de Triton X-100 y goma arábica y la eliminación de desoxicolato de sodio en el ensayo originalmente utilizado, mejoró la reproducibilidad de las lecturas de absorbancia, minimizó la hidrólisis no enzimática y disminuyó considerablemente la turbidez de la mezcla de reacción.
- La caracterización preliminar de las enzimas lipolíticas presentes en el autolisado indicó la presencia de enzimas con masas moleculares del orden de 30-50 kDa (electroforesis en condiciones nativas y desnaturantes). Es probable la presencia de enzimas lipolíticas de mayor tamaño, aunque posiblemente las enzimas presentes formen agregados del orden de masa molecular de 90-100 kDa (filtración en gel).
La caracterización preliminar de las enzimas lipolíticas presentes en el autolisado indicó la presencia de enzimas con puntos isoelectricos en los intervalos de 5,5-6,0; 6,2-6,4 y 6,6-7,1 (isoelectroenfoque).
- Se purificó una lipasa de krill antártico, KL1, utilizando una estrategia de purificación que consistió de dos etapas electroforéticas, la primera etapa realizada en condiciones nativas y la segunda en condiciones desnaturantes, a partir tanto de un extracto preparado por autólisis, como por homogenización.
La lipasa KL1 presentó una masa molecular de 50 kDa y pI de 6,6, una actividad lipasa específica de $2,9 \times 10^{-3}$ U/mg (autolisado) y $5,7 \times 10^{-3}$ U/mg (homogenizado) sobre *p*-nitrofenilpalmitato a 20°C y pH 8. KL1 presentó una temperatura óptima de actividad a 40°C y un pH óptimo de 9, determinados sobre *p*-

nitrofenilpalmitato. KL1 retuvo un 23% de su actividad lipasa máxima a 10°C. Se determinó una energía de activación de 24,7 kcal/mol para el intervalo de temperaturas de 25-40°C.

La lipasa KL2 previamente purificada presentó una temperatura óptima a 37°C y pH óptimo de 8 determinados sobre *p*-nitrofenilbutirato y retuvo el 46% de su actividad máxima a 10°C. Se determinó una energía de activación de 4,9 kcal/mol para el intervalo de 10-37°C.

- La lipasa KL1 presentó algunas de las características observadas en las enzimas adaptadas al frío, sin embargo, presentó una energía de activación similar al de las lipasas mesofílicas. En cambio, KL2 presentó las características de adaptación a bajas temperaturas, esto es, actividad a bajas temperaturas, desplazamiento de la temperatura óptima a bajas temperaturas y una baja energía de activación.
- El análisis de las secuencias aminoacídicas de dominios, familias y bloques de lipasas eucariontes reveló la ausencia de aminoácidos conservados contiguos y la pequeña longitud de las zonas conservadas, producto probablemente de una baja similitud entre las secuencias aminoacídicas de las lipasas.
- El análisis de las secuencias obtenidas de la amplificación PCR y de la secuenciación parcial de KL2 no indicó similitud significativa con lipasas en las bases de datos examinadas, probablemente debido a que corresponden a nuevas lipasas.

BIBLIOGRAFÍA

Abdou A.M. (2003) "Purification and partial characterization of psychrotrophic *Serratia marcescens* lipase" *J. Dairy Sci.*, 86:127-132

Abramić M., Leščić I., Korica T., Vitale L., Saenger W., Pigac J. (1999) "Purification and properties of extracellular lipase from *Streptomyces rimosus*" *Enzyme Microb. Technol.*, 25:522-529

Alquati C., De Gioia L., Santarossa G., Alberghina L., Fantucci P., Loti M. (2002) "The cold-active lipase of *Pseudomonas fragi*: heterologous expression, biochemical characterization and molecular modeling" *Eur. J. Biochem.*, 269:3321-3328

Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs" *Nucleic Acids Res.*, 25(17):3389-3402

Anguita J., Rodríguez Aparicio L.B., Naharro G. (1993) "Purification, gene cloning, amino acid sequence analysis, and expression of an extracellular lipase from an *Aeromonas hydrophila* human isolate" *Appl. Environ. Microbiol.*, 59(8):2411-2417

Arpigny J.L., Jaeger K-E. (1999) "Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties" *Biochem. J.*, 343:177-183

Arpigny J.L., Lamotte J., Gerday C. (1997) "Molecular adaptation to cold of an antarctic bacterial lipase" *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 3:29-35

Arreguín-Espinosa R., Arreguín B., González C. (2000) "Purification and properties of a lipase from *Cephaloleia presignis* (Coleoptera, Chrysomelidae)" *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 31:239-244

Arrese E.L., Wells M.A. (1994) "Purification and properties of a phosphorylatable triacylglycerol lipase from the fat body of an insect, *Manduca sexta*" *J. Lipid Res.*, 35:1652-1660

Athmer L., Kindrachuk J., Georges F., Napper S. (2002) "The influence of protein structure on the products emerging from succinimide hydrolysis" *J. Biol. Chem.*, 277(34):30502-30507

Barría M.C. (2004) "Purificación de enzimas proteasas de krill antártico (*Euphausia superba*)" Memoria para optar al título de Ingeniero Civil Químico, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad de Chile

Beales N. (2004) "Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review" *Comp. Revs. Food Sci. Food Safety* 3:1-20

- Beisson F., Tiss A., Rivière C., Verger R. (2000) "Methods for lipase detection and assay: a critical review" *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 102(2):133-153
- Bell P.J.L., Sunna A., Gibbs M.D., Curach N.C., Nevalainen H., Bergquist P.L. (2002) "Prospecting for novel lipase genes using PCR" *Microbiology* 148:2283-2291
- Bollag D.M., Rozycki M.D., Edelstein S.J. (1996) "Protein methods" Editorial Wiley-Liss, segunda edición
- Bornscheuer U.T. (2002) "Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis" *FEMS Microbiol. Rev.*, 26:73-81
- Boulter J.M., Wang D.N. (2001) "Purification and characterization of human erythrocyte glucose transporter in decylmaltoside detergent solution" *Protein Expr. Purif.*, 22:337-348
- Bradford M.M. (1976) "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding" *Anal. Biochem.*, 72:248-254
- Bradner J.R., Bell P.J.L., Te'o V.S.J., Helena Nevalainen K.M.H. (2003) "The application of PCR for the isolation of a lipase gene from the genomic DNA of an antarctic microfungus" *Curr. Genet.*, 44:224-230
- Brahimi-Horn M-C., Guglielmino M.L., Gaal A.M., Sparrow L.G. (1991) "Nondenaturing protein electrotransfer of the esterase activity of lipolytic preparations" *Anal. Biochem.*, 196:76-79
- Brennan T.V., Clarke S. (1993) "Spontaneous degradation of polypeptides at aspartyl and asparaginyl residues: effects of the solvent dielectric" *Protein Sci.*, 2:331-338
- Brzozowski A.M., Savage H., Verma C.S., Turkenburg J.P., Lawson D.M., Svendsen A., Patkar S. (2000) "Structural origins of the interfacial activation in *Thermomyces (Humicola) lanuginosa* lipase" *Biochemistry* 39:15071-15082
- Buchholz F., Saborowski R. (2000) "Metabolic and enzymatic adaptations in northern krill, *Meganyctiphanes norvegica*, and antarctic krill, *Euphausia superba*" *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 57(S3):115-129
- Casillas-Hernández R., Magallón F., Portillo G., Carrillo O., Nolasco H., Vega-Villasante F. (2002) "La actividad de proteasa, amilasa y lipasa durante los estadios de muda del camarón azul *Litopenaeus stylirostris*" *Rev. Invest. Mar.*, 23(1):35-40
- Castro A.R., Morrill W.E., Pope V. (2000) "Lipid removal from human serum samples" *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 7(2):197-199

Cavicchioli R., Siddiqui K.S., Andrews D., Sowers K.R. (2002) "Low-temperature extremophiles and their applications" *Curr. Opin. Biotechnol.*, 13:1-9

Chen B-Y., Janes H.W., Chen S. (2002) "Computer programs for PCR primer design and analysis" En "PCR Cloning Protocols" (Methods in Molecular Biology, volumen 192), editado por Chen B-Y. y Janes H.W., Humana Press Inc., segunda edición, pp.19-29

Choo D-W., Kurihara T., Suzuki T., Soda K., Esaki N. (1998) "A cold-adapted lipase of an alaskan psychrotroph, *Pseudomonas sp.* strain B11-1: gene cloning and enzyme purification and characterization" *Appl. Environ. Microbiol.*, 64(2):486-491

Cripps G.C., Atkinson A. (2000) "Fatty acid composition as an indicator of carnivory in antarctic krill, *Euphausia superba*" *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 57(S3):31-37

Cygler M., Schrag J.D., Sussman J.L., Harel M., Silman I., Gentry M.K., Doctor B.P. (1993) "Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases, and related proteins" *Protein Sci.*, 2:366-382

D'Amico S., Claverie P., Collins T., Georlette D., Gratia E., Hoyoux A., Meuwis M-A., Feller G., Gerday C. (2002) "Molecular basis of cold adaptation" *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 357:917-925

Deming J.W. (2002) "Psychrophiles and polar regions" *Curr. Opin. Microbiol.*, 5:301-309

Derewenda U., Brzozowski A.M., Lawson D.M., Derewenda Z.S. (1992) "Catalysis at the interface: the anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase" *Biochemistry* 31:1532-1541

Ellingsen T.E., Mohr V. (1987) "Biochemistry of the autolytic processes in antarctic krill post mortem: autoproteolysis" *Biochem. J.*, 246:295-305

Falk-Petersen S., Hagen W., Kattner G., Clarke A., Sargent J. (2000) "Lipids, trophic relationships, and biodiversity in arctic and antarctic krill" *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 57(S3):178-191

Farooqui A.A., Horrocks L.A. (1999) "Purification of lipases and phospholipases by heparin-sepharose chromatography" En "Lipase and phospholipase protocols" (Methods in Molecular Biology, volumen 109), editado por Doolittle M.H. y Reue K., Humana Press Inc., pp.133-143

Farooqui A.A., Taylor W.A., Pendley C.E., Cox J.W., Horrocks L.A. (1984) "Spectrophotometric determination of lipases, lysophospholipases, and phospholipases" *J. Lipid Res.*, 25:1555-1562

- Feller G. (2003) "Molecular adaptations to cold in psychrophilic enzymes" *Cell. Mol. Life Sci.*, 60:648-662
- Feller G., Gerday C. (1997) "Psychrophilic enzymes: molecular basis of cold adaptation" *Cell. Mol. Life Sci.*, 53:830-841
- Feller G., Gerday C. (2003) "Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation" *Nat. Rev. Microbiol.*, 1(3):200-208
- Feller G., Narinx E., Arpigny J.L., Aittaleb M., Baise E., Genicot S., Gerday C. (1996) "Enzymes from psychrophilic organisms" *FEMS Microbiol. Rev.*, 18:189-202
- Fields P.A. (2001) "Protein function at thermal extremes: balancing stability and flexibility" *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, 129:417-431
- Figueiredo M.S.R.B., Krickler J.A., Anderson A.J. (2001) "Digestive enzyme activities in the alimentary tract of redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae)" *J. Crust. Biol.*, 21(2):334-344
- Fischer M., Pleiss J. (2003) "The lipase engineering database: a navigation and analysis tool for protein families" *Nucleic Acids Res.*, 31(1):319-321
- Fojan P., Jonson P.H., Petersen M.T.N., Petersen S.B. (2000) "What distinguishes an esterase from a lipase: a novel structural approach" *Biochimie* 82:1033-1041
- Gálvez M.C. (2002) "Identificación y clonamiento de cDNA que codifica para proteasas de krill antártico (*Euphausia superba*)" Memoria para optar al título de Ingeniero Civil en Biotecnología e Ingeniero Civil Químico, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad de Chile
- Garavito R.M., Ferguson-Miller S. (2001) "Detergents as tools in membrane biochemistry" *J. Biol. Chem.*, 276(35):32403-32406
- Geiger T., Clark D. (1987) "Deamidation, isomerization, and racemization at asparaginylyl and aspartyl residues in peptides. Succinimide-linked reactions that contribute to protein degradation" *J. Biol. Chem.*, 262(2):785-794
- Genicot S., Rentier-Delrue F., Edwards D., VanBeeumen J., Gerday C. (1996) "Trypsin and trypsinogen from an antarctic fish: molecular basis of cold adaptation" *Biochim. Biophys. Acta* 1298:45-47
- Gennaro A.R. (1998) "Remington: farmacia" Editorial Médica Panamericana, décimonovena edición, pp.1335-1336
- Georlette D., Blaise V., Collins T., D'Amico S., Gratia E., Hoyoux A., Marx J-C., Sonan G., Feller G., Gerday C. (2004) "Some like it cold: biocatalysis at low temperatures" *FEMS Microbiol. Rev.*, 28:25-42

Gerday C., Aittaleb M., Arpigny J.L., Baise E., Chessa J-P., Garsoux G., Petrescu I., Feller G. (1997) "Psychrophilic enzymes: a thermodynamic challenge" *Biochim. Biophys. Acta* 1342:119-131

Gerday C., Aittaleb M., Bentahir M., Chessa J-P., Claverie P., Collins T., D'Amico S., Dumont J., Garsoux G., Georlette D., Hoyoux A., Lonhienne T., Meuwis M-A., Feller G. (2000) "Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology" *Trends Biotechnol.*, 18:103-107

Gerike U., Danson M.J., Russell N.J., Hough D.W. (1997) "Sequencing and expression of the gene encoding a cold-active citrate synthase from an antarctic bacterium, strain DS2-3R" *Eur. J. Biochem.*, 248:49-57

Gianese G., Argos P., Pascarella S. (2001) "Structural adaptation of enzymes to low temperatures" *Protein Eng.*, 14(3):141-148

Gomes J., Steiner W. (2004) "The biocatalytic potential of extremophiles and extremozymes" *Food Technol. Biotechnol.*, 42(4):223-235

González-Baró M.R., Heras H., Pollero R.J. (2000) "Enzyme activities involved in lipid metabolism during embryonic development of *Macrobrachium borellii*" *J. Exp. Zool.*, 286(3):231-237

Grognux J., Wahler D., Nyfeler E., Reymond J-L. (2004) "Universal chromogenic substrates for lipases and esterases" *Tetrahedron Asymm.*, 15(18):2981-2989

Gupta R., Gupta N., Rathi P. (2004) "Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties" *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 64:763-781

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

Gutiérrez A. (2003) "Purificación y caracterización de lipasas de krill" Memoria para optar al título de Ingeniero Civil en Biotecnología, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad de Chile

Guzmán C., Gaxiola G., Rosa C., Torre-Blanco A. (2001) "The effect of dietary protein and total energy content on digestive enzyme activities, growth and survival of *Litopenaeus setiferus* (Linnaeus 1767) postlarvae" *Aquacult. Nutr.*, 7:113-122

Haas M.J., Cichowics, D.J., Bailey D.G. (1992) "Purification and characterization of an extracellular lipase from the fungus *Rhizopus delemar*" *Lipids* 27(8):571-576

Hagen W., Kattner G., Terbrüggen A., Van Vleet E.S. (2001) "Lipid metabolism of the antarctic krill *Euphausia superba* and its ecological implications" *Mar. Biol.*, 139:95-104

- Hammer H.S., Bishop C.D., Watts S.A. (2000) "Activities of three digestive enzymes during development in the crayfish *Procambarus clarkii* (Decapoda)" *J. Crust. Biol.*, 20(4):614-620
- Hamner W.M., Hamner P.P., Strand S.W., Gilner R.W. (1983) "Behavior of antarctic krill, *Euphausia superba*: chemoreception, feeding, schooling, and molting" *Science* 220:433-435
- Hanahan D. (1983) "Studies on the transformation of *Escherichia coli* with plasmids" *J. Mol. Biol.*, 166:557-580
- Hasona A., York S.W., Yomano L.P., Ingram L.O., Shanmugam K.T. (2002) "Decreasing the level of ethyl acetate in ethanolic fermentation broths of *Escherichia coli* KO11 by expression of *Pseudomonas putida* estZ esterase" *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(6):2651-2659
- Henikoff J.G., Greene E.A., Pietrokovski S., Henikoff S. (2000) "Increased coverage of protein families with the blocks database servers" *Nucleic Acids Res.*, 28(1):228-230
- Henikoff J.G., Henikoff S., Pietrokovski S. (1999) "New features of the blocks database servers" *Nucleic Acids Res.*, 27(1):226-228
- Henikoff S., Henikoff J.G. (1994) "Protein family classification based on searching a database of blocks" *Genomics* 19:97-107
- Hide W.A., Chan L., Li W-H. (1992) "Structure and evolution of the lipase superfamily" *J. Lipid Res.*, 33:167-178
- Hiol A., Jonzo M.D., Druet D., Comeau L. (1999) "Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis f. hiemalis*" *Enzyme Microb. Technol.*, 25:80-87
- Hou W-C., Chen H-J., Chang C-F., Lin Y-H. (1999) "Purification and properties of fatty acid esterases from yam (*Dioscorea batatas* Decne) tuber" *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 40:305-310
- Hough D.W., Danson M.J. (1999) "Extremozymes" *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 3:39-46
- Hoyoux A., Blaise V., Collins T., D'Amico S., Gratia E., Huston A.L., Marx J-C., Sonan G., Zeng Y., Feller G., Gerday C. (2004) "Extreme catalysts from low-temperature environments" *J. Biosci. Bioeng.*, 98(5):317-330
- Huston A.L., Krieger-Brockett B.B., Deming J.W. (2000) "Remarkably low temperature optima for extracellular enzyme activity from arctic bacteria and sea ice" *Environ. Microbiol.*, 2(4):383-388

- Hyndman D.L., Mitsuhashi M. (2003) "PCR primer design" En "PCR protocols" (Methods in Molecular Biology, volumen 226), editado por Bartlett J.M.S. y Stirling D., Humana Press Inc., segunda edición, pp.81-88
- Jaeger K-E., Dijkstra B.W., Reetz M.T. (1999) "Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases" *Annu. Rev. Microbiol.*, 53(1):315-351
- Jaeger K-E., Eggert T. (2002) "Lipases for biotechnology" *Curr. Opin. Biotechnol.*, 13:390-397
- Jaeger K-E., Ransac S., Dijkstra B.W., Colson C., van Heuvel M., Misset O. (1994) "Bacterial lipases" *FEMS Microbiol. Rev.*, 15:29-63
- Jaeger K-E., Ransac S., Koch H.B., Ferrato F., Dijkstra B.W. (1993) "Topological characterization and modeling of the 3D structure of lipase from *Pseudomonas aeruginosa*" *FEBS Lett.*, 332(1-2):143-149
- Jaenicke R. (1991) "Protein stability and molecular adaptation to extreme conditions" *Eur. J. Biochem.*, 202:715-728
- Jaenicke R., Böhm G. (1998) "The stability of proteins in extreme environments" *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 8:738-748
- Jaenicke R., Závodszky P. (1990) "Proteins under extreme physical conditions" *FEBS Lett.*, 268(2):344-349
- Jarman S., Elliot N., Nicol S., McMinni A., Newman S. (1999) "The base composition of the krill genome and its potential susceptibility to damage by UV-B" *Antarct. Sci.*, 11(1):23-26
- Jarman S.N., Elliott N.G., Nicol S., McMinn A. (2000) "Molecular phylogenetics of circumglobal *Euphausia* species (Euphausiacea: Crustacea)" *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 57(S3):51-58
- Johnston D., Ritar A., Thomas C., Jeffs A. (2004) "Digestive enzyme profiles of spiny lobster *Jasus edwardsii* phyllosoma larvae" *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 275:219-230
- Johnston I.A. (1990) "Cold adaptation in marine organisms" *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 326:655-667
- Ju S-J., Harvey H.R. (2004) "Lipids as markers of nutritional condition and diet in the antarctic krill *Euphausia superba* and *Euphausia crystallorophias* during austral winter" *Deep-sea Res. II* 51:2199-2214

Kim H.K., Jung Y-J., Choi W-C., Ryu H.S., Oh T-K., Lee J-K. (2004) "Sequence-based approach to finding functional lipases from microbial genome databases" *FEMS Microbiol. Lett.*, 235:349-355

Korf I., Yandell M., Bedell J. (2003) "An essential guide to the basic local alignment search tool BLAST" Editorial O'Reilly & Associates, Inc.

Kulakova L., Galkin A., Nakayama T., Nishino T., Esaki N. (2004) "Cold-active esterase from *Psychrobacter sp.* Ant300: gene cloning, characterization, and the effects of Gly→Pro substitution near the active site on its catalytic activity and stability" *Biochim. Biophys. Acta* 1696:59-65

Kunugi S., Koyasu A., Kitayaki M., Takahashi S., Oda K. (1996) "Kinetic characterization of the neutral protease vimelysin from *Vibrio sp.* T1800" *Eur. J. Biochem.*, 241:368-373

Lee H-K., Ahn M-J., Kwak S-H., Song W-H., Jeong B-C. (2003) "Purification and characterization of cold active lipase from psychrotrophic *Aeromonas sp.* LPB 4" *J. Microbiol.*, 41(1):22-27

Lehner R., Verger R. (1997) "Purification and characterization of a porcine liver microsomal triacylglycerol hydrolase" *Biochemistry* 36:1861-1868

Li Y., Bevilacqua P.C., Mathews D., Turner D.H. (1995) "Thermodynamic and activation parameters for binding of a pyrene-labeled substrate by the *Tetrahymena* ribozyme: docking is not diffusion-controlled and is driven by a favorable entropy change" *Biochemistry* 34:14394-14399

Lonhienne T., Gerday C., Feller G. (2000) "Psychrophilic enzymes: revisiting the thermodynamic parameters of activation may explain local flexibility" *Biochim. Biophys. Acta* 1543:1-10

López-López S., Nolasco H., Vega-Villasante F. (2003) "Characterization of digestive gland esterase-lipase activity of juvenile redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*" *Comp. Biochem. Physiol. B* 135:337-347

Lu J.Y., Liska B.J. (1969a) "Lipase from *Pseudomonas fragi*. I. Purification of the enzyme" *Appl. Microbiol.*, 18(1):104-107

Lu J.Y., Liska B.J. (1969b) "Lipase from *Pseudomonas fragi*. II. Properties of the enzyme" *Appl. Microbiol.*, 18(1):108-113

Lund S., Orłowski S., de Foresta B., Champeil P., le Maire M., Møller J.V. (1989) "Detergent structure and associated lipid as determinants in the stabilization of solubilized Ca²⁺-ATPase from sarcoplasmic reticulum" *J. Biol. Chem.*, 264(9):4907-4915

Macrae A.R. (1983) "Extracellular microbial lipases" En "Microbial enzymes and biotechnology" Editado por Fogarty W.M., Applied Science Publishers, pp.225-250

Mahn A. (2004) Informe de avance proyecto FONDEF 01-1031 "Investigación, desarrollo y producción de proteasas y lipasas criofílica comerciales de fuentes marinas"

Maia M.M.D., Heasley A., Camargo de Morais M.M., Melo E.H.M., Morais Jr.M.A., Ledingham W.M., Lima Filho J.L. (2001) "Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation" *Bioresour. Technol.*, 76:23-27

Manco G., Adinolfi E., Pisani F.M., Ottolina G., Carrea G., Rossi M. (1998) "Overexpression and properties of a new thermophilic and thermostable esterase from *Bacillus acidocaldarius* with sequence similarity to hormone-sensitive lipase subfamily" *Biochem. J.*, 332:203-212

Marchler-Bauer A., Anderson J.B., Cherukuri P.F., DeWeese-Scott C., Geer L.Y., Gwadz M., He S., Hurwitz D.I., Jackson J.D., Ke Z., Lanczycki C.J., Liebert C.A., Liu C., Lu F., Marchler G.H., Mullokandov M., Shoemaker B.A., Simonyan V., Song J.S., Thiessen P.A., Yamashita R.A., Yin J.J., Zhang D., Bryant S.H. (2005) "CDD: a conserved domain database for protein classification" *Nucleic Acids Res.*, 33:D192-D196

Marchler-Bauer A., Panchenko A.R., Shoemaker B.A., Thiessen P.A., Geer L.Y., Bryant S.H. (2002) "CDD: a database of conserved domain alignments with links to domain three-dimensional structure" *Nucleic Acids Res.*, 30(1):281-283

Marshall C.J. (1997) "Cold-adapted enzymes" *Trends Biotechnol.*, 15:359-364

Mayordomo I., Rande-Gil F., Prieto J.A. (2000) "Isolation, purification, and characterization of a cold-active lipase from *Aspergillus nidulans*" *J. Agric. Food Chem.*, 48:105-109

Mayzaud P., Albessard E., Virtue P., Boutoute M. (2000) "Environmental constraints on the lipid composition and metabolism of euphausiids: the case of *Euphausia superba* and *Meganyctiphanes norvegica*" *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 57(S3):91-103

Meyer B., Saborowski R., Atkinson A., Buchholz F., Bathmann U. (2002) "Seasonal differences in citrate synthase and digestive enzyme activity in larval and postlarval antarctic krill, *Euphausia superba*" *Mar. Biol.*, 141:855-862

Morrissey J.H. (1981) "Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity" *Anal. Biochem.*, 117:307-310

Nardini M., Dijkstra B.W. (1999) " α/β hydrolase fold enzymes: the family keeps growing" *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 9:732-737

- Narinx E., Baise E., Gerday C. (1997) "Subtilisin from psychrophilic antarctic bacteria: characterization and site-directed mutagenesis of residues possibly involved in the adaptation to cold" *Protein Eng.*, 10(11):1271-1279
- Newman S.J., Dunlap W.C., Nicol S., Ritz D. (2000) "Antarctic krill (*Euphausia superba*) acquire a UV-absorbing mycosporine-like amino acid from dietary algae" *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 255:93-110
- Nicol S., Endo Y. (1997) "Krill fisheries of the world" FAO Fisheries Technical Paper 367
- Niehaus F., Bertoldo C., Kähler M., Antranikian G. (1999) "Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application" *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51:711-729
- Oh B-C., Kim H-K., Lee J-K., Kang S-C., Oh T-K. (1999) "*Staphylococcus haemolyticus* lipase: biochemical properties, substrate specificity and gene cloning" *FEMS Microbiol. Lett.*, 179:385-392
- Osnes K.K., Mohr V. (1985) "Peptide hydrolases of antarctic krill, *Euphausia superba*" *Biochem. Physiol.*, 82B(4):599-606
- Oterholm A., Ordal Z.J., Witter L.D. (1970) "Purification and properties of a glycerol ester hydrolase (lipase) from *Propionibacterium shermanii*" *Appl. Microbiol.*, 20(1):16-22
- Pandey A., Benjamin S., Soccol C.R., Nigam P., Krieger N., Soccol V.T. (1999) "The realm of microbial lipases in biotechnology" *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 29:119-131
- Pearson W.R. (1990) "Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA" En "Computer analysis of protein and nucleic acid sequences" (Methods in Enzymology, volumen 183), editado por Doolittle R.F., Academic Press Inc., pp.63-98
- Pearson W.R., Lipman D.J. (1988) "Improved tools for biological sequence comparison" *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 85:2444-2448
- Peters G., Saborowski R., Mentlein R., Buchholz F. (1998) "Isoforms of an N-acetyl- β -D-glucosaminidase from the antarctic krill, *Euphausia superba*: purification and antibody production" *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 120:743-751
- Peters K.P., Fauck J., Frömmel C. (1996) "The automatic search for ligand binding sites in proteins of known three-dimensional structure using only geometric criteria" *J. Mol. Biol.*, 256:201-213
- Pleiss J., Fischer M., Peiker M., Thiele C., Schmid R.D. (2000) "Lipase engineering database. Understanding and exploiting sequence-structure-function relationships" *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 10:491-508

Pleiss J., Fischer M., Schmid R.D. (1998) "Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site" *Chem. Phys. Lipids* 93(1-2):67-80

Poulsen K.R., Snabe T., Petersen E.I., Fojan P., Neves-Petersen M.T., Wimmer R., Petersen S.B. (2005) "Quantization of pH: evidence for acidic activity of triglyceride lipases" *Biochemistry* 44:11574-11580

Rashid N., Shimada Y., Ezaki S., Atomi H., Imanaka T. (2001) "Low-temperature lipase from psychrotrophic *Pseudomonas sp.* strain KB700A" *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(9):4064-4069

Rhee J-K., Ahn D-G., Kim Y-G., Oh J-W. (2005) "New thermophilic and thermostable esterase with sequence similarity to the hormone-sensitive lipase family, cloned from a metagenomic library" *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(2):817-825

Robertson E.F., Dannelly H.K., Malloy P.J., Reeves H.C. (1987) "Rapid isoelectric focusing in a vertical polyacrylamide minigel system" *Anal. Biochem.*, 167:290-294

Rose T.M., Henikoff J.G., Henikoff S. (2003) "CODEHOP (consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primer) PCR primer design" *Nucleic Acids Res.*, 31(13):3763-3766

Rose T.M., Schultz E.R., Henikoff J.G., Pietrokovski S., McCallum C.M., Henikoff S. (1998) "Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences" *Nucleic Acids Res.*, 26(7):1628-1635

Rossi M., Ciaramella M., Cannio R., Pisani F.M., Moracci M., Bartolucci S. (2003) "Extremophiles 2002" *J. Bacteriol.*, 185(13):3683-3689

Russell N.J. (2000) "Toward a molecular understanding of cold activity of enzymes from psychrophiles" *Extremophiles* 4:83-90

Rychlik W. (1993) "Selection of primers for polymerase chain reaction" En "PCR protocols: current methods and applications" (Methods in Molecular Biology, volumen 15), editado por White B.A., Humana Press Inc., pp.31-40

Ryu H.S., Kim H.K., Choi W.C., Kim M.H., Park S.Y., Han N.S., Oh T.K., Lee J.K. (2006) "New cold-adapted lipase from *Photobacterium lipolyticum sp. nov.* that is closely related to filamentous fungal lipases" *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 70:321-326

Saborowski R., Buchholz F. (1999) "A laboratory study on digestive processes in the antarctic krill, *Euphausia superba*, with special regard to chitinolytic enzymes" *Polar Biol.*, 21:295-304

Saether O., Ellingsen T.E., Mohr V. (1986) "Lipids of north atlantic krill" *J. Lipid Res.*, 27:274-285

Sainz J.C., García-Carreño F., Sierra-Beltrán A., Hernández-Cortés P. (2004) "Trypsin synthesis and storage as zymogen in the midgut gland of the shrimp *Litopenaeus vannamei*" *J. Crust. Biol.*, 24(2):266-273

Salamanca M. (2002) "Separación, purificación y caracterización de proteasas criofílicas de *Euphausia superba*" Memoria para optar al grado de Doctor en Ciencias de la Ingeniería mención Química, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad de Chile

Salamanca M.H., Barría C., Asenjo J.A., Andrews B.A. (2002) "Isolation, purification and preliminary characterization of cryophilic proteases of marine origin" *Bioseparation* 10:237-241

Sands M., Nicol S., McMinn A. (1998) "Fluoride in antarctic marine crustaceans" *Mar. Biol.*, 132:591-598

Saxena R.K., Sheoran A., Giri B., Davidson W.S. (2003) "Purification strategies for microbial lipases" *J. Microbiol. Methods* 52:1-18

Schmidt M., Bornscheuer U.T. (2005) "High-throughput assays for lipases and esterases" *Biomol. Eng.*, 22(1-3):51-56

Sharma R., Chisti Y., Banerjee U.C. (2001) "Production, purification, characterization, and applications of lipases" *Biotechnol. Adv.*, 19:627-662

Sheridan P.P., Panasik N., Coombs J.M., Brenchley J.E. (2000) "Approaches for deciphering the structural basis of low temperature enzyme activity" *Biochim. Biophys. Acta* 1543:417-433

Shilnikov G.V., Sarvazyan A.P., Okon M., Zakrzewska J., Hranisavljevic J., Vucelic D. (1987) "Interaction of fatty acid sodium salts with sodium deoxycholate" *J. Lipid Res.*, 28:1259-1262

Sjödahl J., Emmer Å., Vincent J., Roeraade J. (2002) "Characterization of proteinases from antarctic krill (*Euphausia superba*)" *Protein Expr. Purif.*, 26:153-161

Sommer P., Bormann C., Götz F. (1997) "Genetic and biochemical characterization of a new extracellular lipase from *Streptomyces cinnamomeus*" *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(9):3553-3560

Studier F.W., Moffatt B.A. (1986) "Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes" *J. Mol. Biol.*, 189(1):113-130

Suoniemi A., Tynkkynen S. (2002) "Cloning and characterization of an esterase from *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*" *Lait* 82:81-89

- Surinenaite B., Bendikiene V., Juodka B., Bachmatova I., Marcinkevichiene L. (2002) "Characterization and physicochemical properties of a lipase from *Pseudomonas mendocina* 3121-1" *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 36:47-55
- Suzuki T., Nakayama T., Choo D.W., Hirano Y., Kurihara T., Nishino T., Esaki N. (2003) "Cloning, heterologous expression, renaturation, and characterization of a cold-adapted esterase with unique primary structure from a psychrotroph *Pseudomonas* sp. strain B11-1" *Protein Expr. Purif.*, 30:171-178
- Suzuki T., Nakayama T., Kurihara T., Nishino T., Esaki N. (2001) "Cold-active lipolytic activity of psychrotrophic *Acinetobacter* sp. strain no. 6" *J. Biosci. Bioeng.*, 92(2):144-148
- Suzuki T., Nakayama T., Kurihara T., Nishino T., Esaki N. (2002) "Primary structure and catalytic properties of a cold-active esterase from a psychrotroph, *Acinetobacter* sp. strain no. 6. isolated from Siberian soil" *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66(8):1682-1690
- Svendsen A. (2000) "Lipase protein engineering" *Biochim. Biophys. Acta* 1543:223-238
- Taipa M.A., Aires-Barros M.R., Cabral J.M.S. (1992) "Purification of lipases" *J. Biotechnol.*, 26:111-142
- Tan Y., Miller K.J. (1992) "Cloning, expression, and nucleotide sequence of a lipase gene from *Pseudomonas fluorescens* B52" *Appl. Environ. Microbiol.*, 58(4):1402-1407
- Tiss A., Carrière F., Verger R. (2001) "Effects of gum arabic on lipase interfacial binding and activity" *Anal. Biochem.*, 294:36-43
- Turkiewics M., Galas E., Kalinowska H., Romanowska I., Zielińska M. (1986) "Purification and characterization of a proteinase from *Euphausia superba* Dana (antarctic krill)" *Acta Biochim. Polon.*, 33(2):87-99
- Turkiewics M., Galas E., Zielińska M. (1985) "Purification and partial characterization of an endo-(1→3)-β-D-glucanase from *Euphausia superba* Dana (antarctic krill)" *Polar Biol.*, 4:203-211
- Vajda T. (1999) "Cryo-bioorganic chemistry: molecular interactions at low temperature" *Cell. Mol. Life Sci.*, 56:398-414
- van den Burg B. (2003) "Extremophiles as a source for novel enzymes" *Curr. Opin. Microbiol.*, 6:213-218
- Verger R. (1997) "Interfacial activation of lipases: facts and artifacts" *Trends Biotechnol.*, 15:32-38

- Villeneuve P., Muderhwa J.M., Graille J., Haas M.J. (2000) "Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches" *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 9:113-148
- Virtue P., Nichols P.D., Nicol S., McMinn A., Sikes E.L. (1993) "The lipid composition of *Euphausia superba* Dana in relation to the nutritional value of *Phaeocystis pouchetii* (Hariot) Lagerheim" *Antarct. Sci.*, 5(2):169-177
- Westermeyer R., Görg A. (1998) "Protein mapping by two-dimensional polyacrylamide electrophoresis" En "Protein purification: principles, high resolution methods, and applications" Editado por Janson J-C., Rydén L. Wiley-Liss, segunda edición, pp.557-586
- Winkler U.K., Stuckmann M. (1979) "Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*" *J. Bacteriol.*, 138(3):663-670
- Wintrode P.L., Miyazaki K., Arnold F.H. (2000) "Cold adaptation of a mesophilic subtilisin-like protease by laboratory evolution" *J. Biol. Chem.*, 275(41):31635-31640
- Wong H., Schotz M.C. (2002) "The lipase gene family" *J. Lipid Res.*, 43:993-999
- Yao J-J., Zhao Y-L., Qun W., Zhou Z-L., Hu X-C., Duan X-W., An C-G. (2005) "Biochemical compositions and digestive enzyme activities during the embryonic development of prawn, *Macrobrachium rosenbergii*" *Aquaculture* 253:573-582
- Zecchinon L., Claverie P., Collins T., D'Amico S., Delille D., Feller G., Georgette D., Gratia E., Hoyoux A., Meuwis M-A., Sonan G., Gerday C. (2001) "Did psychrophilic enzymes really win the challenge?" *Extremophiles* 5:313-321
- Ziaei-Nejad S., Habibi Rezaei M., Azari Takami G., Lovett D.L., Mirvaghefi A-R., Shakouri M. (2006) "The effect of *Bacillus spp.* bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*" *Aquaculture* 252:516-524
- Zouari N., Miled N., Cherif S., Mejdoub H., Gargouri Y. (2005) "Purification and characterization of a novel lipase from the digestive glands of a primitive animal: the scorpion" *Biochim. Biophys. Acta* 1726:67-74