

LIPASAS DIGESTIVAS DE CAMARÓN BLANCO: PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA

Crisalejandra Rivera-Pérez, Fernando García-Carreño
CIBNOR, Mar Bermejo No. 195, Col. Playa Palo de Santa Rita; La Paz, BCS 23090.
Tel:(52) (612) 123-8484 Fax:(52) (612) 125-3625. Ext. 3401. E-mail: fgarcia@cibnor.mx

Palabras clave: digestión, lipasas, purificación, *Penaeus vannamei*.

Introducción. Las enzimas lipolíticas de la glándula digestiva de camarones peneidos juegan un papel clave en la hidrólisis de los lípidos del alimento. Las enzimas encargadas de la hidrólisis de triacilglicéridos (TAGs) en la glándula digestiva son las lipasas, que liberan los ácidos grasos del glicerol, para su posterior uso como fuente de energía vía beta-oxidación. Si bien existen amplios conocimientos sobre lipasas de vertebrados y de microorganismos, tanto en proteína como genes, no sucede lo mismo con las lipasas de invertebrados y menos aún de crustáceos. Por lo que el estudio de estas enzimas en crustáceos como peneidos permitirá conocer el papel de las lipasas en la degradación de TAGs como fuente de energía, así mismo el aprovechamiento de las propiedades bioquímicas que presentan las lipasas de crustáceos puede constituir una fuente alterna de enzimas lipolíticas con potencial uso en biotecnología.

Por lo que para este trabajo, se tiene como objetivo aislar y caracterizar las enzimas lipolíticas de la glándula digestiva de camarón blanco *Penaeus vannamei*, así como también la obtención del gen que lo codifica.

Metodología. Se prepararon mezclas homogéneas a partir de muestras de glándula digestiva de camarón blanco. La purificación de la enzima fue realizada mediante dos pasos cromatográficos, una filtración en gel y por intercambio aniónico. La concentración de proteína de las fracciones obtenidas se determinó según Bradford (1976) y la cuantificación de la actividad enzimática se realizó empleando un sustrato fluorogénico, MUF-butirato (Prim et al., 2003). La caracterización de la enzima pura, pH y T° óptima, V_{max}, K_m, inhibidores, especificidad de sustrato, efecto de sales biliares y calcio, se realizó empleando trioleína como sustrato mediante la técnica de pH-stat empleando las condiciones descritas por Gargouri et al., 1984). Así mismo se determinó el punto isoeléctrico, la presencia de glicosilaciones y se obtuvieron péptidos por LC/MS-MS. La obtención del gen que codifica para lipasa de camarón blanco fue obtenido por el método de RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends).

Resultados y discusión. Se identificaron dos proteínas con actividad lipolítica, de las cuales una lipasa, denominada PVL, fue purificada por cromatografía. La secuencia de la enzima incluye la secuencia consenso GXSG, de la superfamilia de las alfa/beta hidrolasas

tanto en la secuencia de aminoácidos como el gen que la codifica (1186 pb). La proteína purificada es una enzima monomérica de 44.8 kDa. Es aniónica a pH alcalinos, hidroliza TAGs y derivados de naftol presentando mayor especificidad por TAGs de cadena larga. La actividad específica es de 1787 U mg⁻¹ y 475 U mg⁻¹ cuando trioleína y tributirina fueron empleados como sustratos; PVL posee un K_m de 3.22 y k_{cat}/K_m de 1.01 empleando trioleína como sustrato. Los resultados obtenidos con tetrahidrolipstatin y sales biliares como inhibidores, sugieren que la enzima es una serino lipasa, además, a diferencia de otras lipasas, esta no requiere calcio como cofactor.

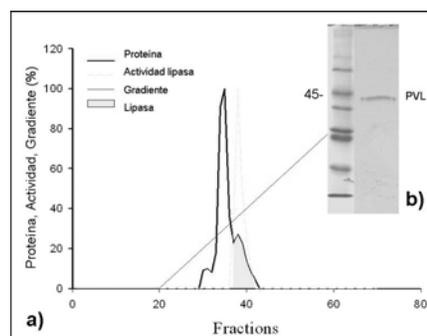


Fig. 1a) Cromatografía de intercambio aniónico, b) fracción 37 evaluada en SDS-PAGE 12%, enzima pura.

Conclusiones. El proceso de purificación empleado permitió el aislamiento de una lipasa de camarón blanco. Las propiedades catalíticas de PVL indican que esta enzima puede jugar un papel importante en la nutrición del camarón proveyendo los ácidos grasos esenciales del alimento o de los lípidos almacenados y dadas las características que presenta podría tener un potencial uso en la industria de tecnología de alimentos

Agradecimiento. CONACYT por beca de doctorado.

Bibliografía.

- Bradford M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding, *Anal Biochem* 72:248-254.
- Gargouri Y., Julien R., Pieroni G., Verger R., Sarda L., 1984. Studies on the inhibition of pancreatic and microbial lipases by soybean proteins, *J Lipid res* 25:1214-1221.
- Prim N., Sánchez M., Ruiz C., Pastor F.I.J., Díaz P., 2003. Use methylumbelliferyl-derivates substrates for lipase activity characterization, *J Mol Catalysis B: Enzymatic* 22:339-346.