

HerrZyme

Enzymkarakterisering og teknologiutvikling for kommersialisering av enzym fra restråstoff av sild

Diana Lindberg, Bjørnar Myrnes, Jan Arne Arnesen og Kersti Øverbø





Nofima er et næringsrettet forskningsinstitutt som driver forskning og utvikling for akvakulturnæringen, fiskerinæringen og matindustrien.

Nofima har om lag 400 ansatte.

Hovedkontoret er i Tromsø, og forskningsvirksomheten foregår på seks ulike steder: Ås, Stavanger, Bergen, Sunndalsøra, Averøy og Tromsø

Hovedkontor Tromsø:

Muninbakken 9–13
Postboks 6122 Langnes
NO-9291 Tromsø

Ås:

Osloveien 1
Postboks 210
NO-1431 ÅS

Stavanger:

Måltidets hus, Richard Johnsensgate 4
Postboks 8034
NO-4068 Stavanger

Bergen:

Kjerreidviken 16
Postboks 1425 Oasen
NO-5828 Bergen

Sunndalsøra:

Sjølseng
NO-6600 Sunndalsøra

Averøy:

Ekkilsøy
NO-6530 Averøy

Felles kontaktinformasjon:

Tlf: 02140

E-post: post@nofima.no

Internett: www.nofima.no

Foretaksnr.:

NO 989 278 835

Rapport

Tittel: HerrZyme - Enzymkarakterisering og teknologiutvikling for kommersialisering av enzym fra restråstoff av sild		ISBN: 978-82-8296-193-6 (trykt) ISBN: 978-82-8296-194-3 (pdf) ISSN 1890-579X
Forfatter(e)/Prosjektleder: Diana Lindberg, Bjørnar Myrnes, Jan Arne Arnesen og Kersti Øverbø		Rapportnr.: 23/2014
Avdeling: Marin bioteknologi		Tilgjengelighet: Åpen
Oppdragsgiver: MABIT-programmet		Dato: 23. april 2014
Stikkord: Esterase, enzym, NVG sild, restråstoff, verdiskaping, marin bioteknologi		Ant. sider og vedlegg: 17
Oppdragsgivers ref.:		Prosjektnr.: 10599
Sammendrag/anbefalinger: <p>Forprosjektet <i>HerrZyme</i> fokuserer på undersøkelser av en delvis rensset esterase fra silderestråstoff med kommersielt formål. Enzymet bryter ned kortkjedede lipider og har så langt vist seg å ha attraktive egenskaper for bl.a. detergentindustrien, herunder høy katalytisk aktivitet ved lave temperaturer. I dette prosjektet skulle avklaringer av enzymets relevante egenskaper for ulike bruksbetingelser og – formål gjennomføres.</p> <p>Esteraseaktivitet er målt med substratet <i>para</i>-nitrofenyl butyrat med mål å påvise pH, temperatur og løsemiddel tåleevne. Undersøkelsene viser på god aktivitet i pH mellom pH 4.8 og pH 12.0. Aktiviteten er også god etter inkubasjon ved 37 °C men ikke ved 45 °C, hvilket viser på kuldeadaptert enzym. Enzymet tåler ikke inkubasjon i 50 % av forskjellige løsemidler, men har 100 % gjenstående aktivitet etter to timers inkubasjon natrium polyfosfat.</p> <p>Innen prosjektet har esteraseaktiviteten blitt fullstendig rensset og analysert med LC-MSMS på Q-TOF, men fullstendig indentifisering var ikke mulig. En vellykket pilot skale rensingsforsøk ble gjennomført. Mye tid ble brukt til å implementere assayer for å finne nye aktiviteter med andre substrater, endo- og eksogene, men ingen ny aktivitet ble funnet under prosjektet hvilket forhindret substrat-, regio-, og enantio-selektivitets-karakterisering. I summing, til tross for mange lovende egenskaper gjenstår indentifisering av enzymet og at finne dess naturlige aktivitet.</p>		
English summary/recommendation: <p>Within the project <i>HerrZyme</i>, a partly purified esterase activity stemming from herring by-products has been investigated from a commercial perspective. The activity shows good durability to prolonged incubations between pH 4.8 and pH 12.0, but not to prolonged incubations at temperatures over 45 °C. 30% of maximum activity is retained at 10°C, suggesting a cold-adapted enzyme. In spite of considerable effort being put into purifying and sequencing the enzyme, together with the establishing of a number of enzyme assays to find activity with natural esterase compounds, the true nature of this esterase activity remains to be solved.</p>		

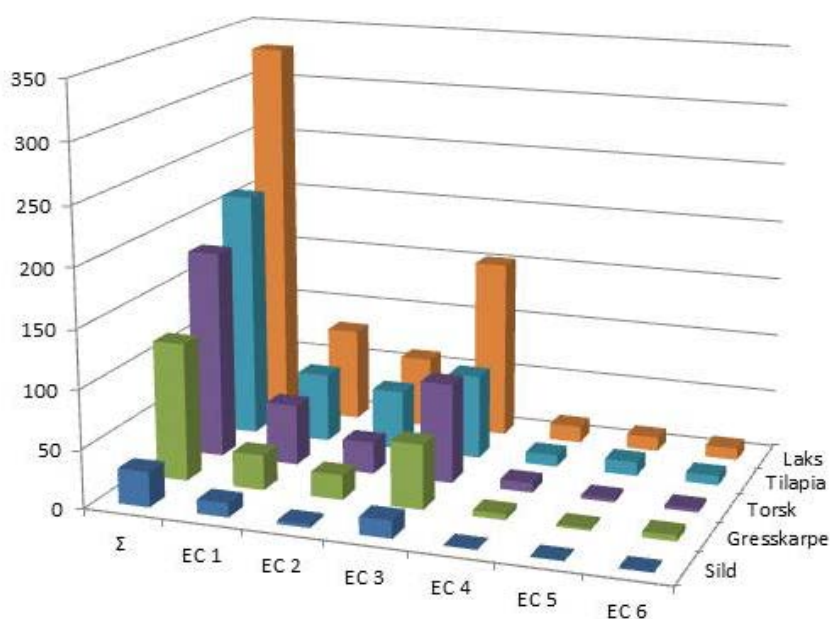
Innhold

1	Introduksjon	1
2	Rensing og isolering av esteraset	3
2.1	Mål.....	3
2.2	Material og metoder	3
2.2.1	Ekstraksjon av silde pasta (SP) ekstrakt og preparering av esterasefraksjon 236	3
2.2.2	Kromatografi.....	3
2.2.3	Rensing av esteraseaktivitet i pilotskala.....	4
2.2.4	Analyse av rensset fraksjon.....	4
2.3	Resultater, første delen.....	4
2.3.1	Rensing av esteraseaktivitet i lab skala	4
2.3.2	Rensing av esteraseaktivitet i pilotskala.....	6
2.3.3	Proteinsekvensering	6
3	Enzymstabilitet og selektivitet.....	8
3.1	Mål.....	8
3.2	Material og metoder	8
3.2.1	Lagringsforsøk	8
3.2.2	Aktivitetmålinger etter inkubasjon ved forskjellige betingelser.....	8
3.2.3	Målinger av substrat-, regio- og enantioselektivitet	8
3.3	Resultater, andre delen	9
3.3.1	Lagringsstabilitet	9
3.3.2	Inkubasjon ved forskjellige betingelser	10
3.3.3	Substrat-, regio- og enantioselektivitet.....	12
4	Diskusjon	14
5	Acknowledgements.....	16
6	Litteratur	17

1 Introduksjon

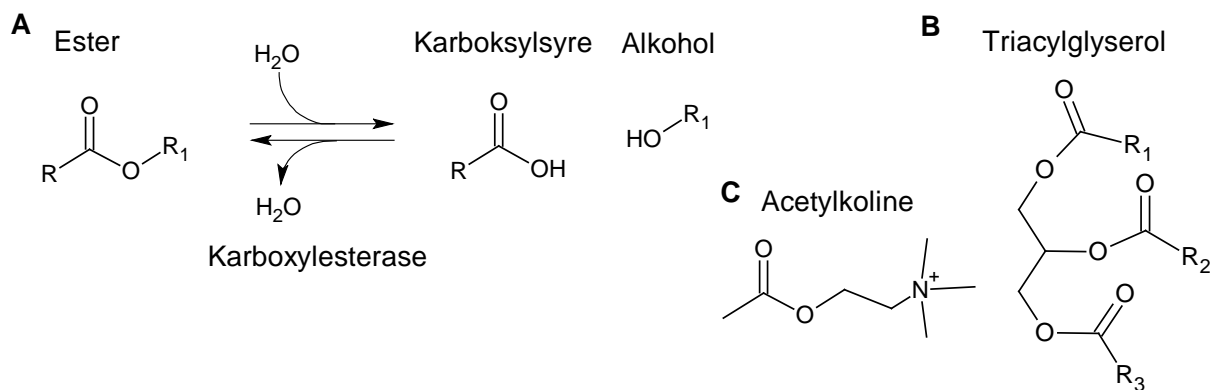
Verdipøkning av restråstoff er en viktig næring og et viktig forskningsområde i Norge i dag. Mye er allerede gjort (RUBIN, 2011). Dette betyr ikke at det fortsatt finns underekspløaterte restråstoff eller nye produkter som kan utvikles fremover, og denne overbevisning ligger til grunn for bland annet Norges forskningsråds satsning på marin bioprospektering (FKD, KD, NHD, DU, 2009). I prosjektet «Gull fra havets sølv», finansiert av UD, FKD, RDA og Nofima, ble silderestråstoff brukt med mål å kartlegge restråstoff fra sild for nye molekyler og bioaktiviteter, for å høyne verdien av restråstoffet og å skape nye samfunnsmessige gevinster av denne og lignende ressurser. En del av prosjektet omhandlet funn av nye enzymer fra restråstoffet. Enzymer for biokatalyse er ansett å ha et stor potensiell fremtidig marked, estimert til 800 milliarder dollar år 2020 (Meyer, 2009).

Hvis man samler informasjon fra databasen BRENDA (Schomburg, 2002) ser man at sild er en litt undersøkt fisk når det gjelder enzymer sammenlignet annen matfisk som laks og torsk (Figur 1). Dette var et godt utgangspunkt for å finne nye enzymer i silderestråstoffet. Et naturlig enzym å lete etter er esteraser. Esteraser er en stor gruppe enzymer som benytter en vannmolekyl for å hydrolysere...



Figur 1 Sammenligning av antall enzym som er publisert i BRENDA, en database som samler funksjonelle data om enzymer, mellom sild og andre vanlige matfisker. På y-akselen antall enzym, på x-akselen summen (Σ) av alle typer av enzym som er publisert på BRENDA oktober 2013, og også en oppdeling i Enzyme Commission (EC) klasser. På z-akselen noen vanlige matfisker.

...en ester til en alkohol og en syre (Figur 2). I et miljø uten vatten kan man snu reaksjonen og syntetisere nye molekyler. Esteraser er viktige i for eksempel fremstilling av kirale legemidler og i syntese (transeserifiseringer) til nye fetter av høyere verdi enn de opprinnelige. De to viktigste klassene av esteraser er lipaser (EC 3.1.1.3) og "sanne" esteraser (EC 3.1.1.1), som også kan deles in i flere ulike sub-klasser, en oppdeling basert på sekvensinformasjon og aktivitet mot bestemte substrater (Bornscheuer, 2002). Som en tommelfingerregel kan man si at «sanne» esteraser katalyserer reaksjoner med fettkjeder med mellom en til ti kull, mens lipaser har en preferanse for lengre substrater selv om de kan bruke kortere substrater også (Casas-Godoy, 2012).



Figur 2 Esterase typereaksjon og forskjellige substrater. I (A) typereaksjonen katalysert av karboksylestaser. En ester med to kjemiske grupper, R og R₁, blir hydrolysert av esteraset på bekostning av et vannmolekyl fra omgivelsen, hvilket gir produktene karboksylsyre og alkohol. Denne reaksjonen kan av visse esteraser katalyseres i den andre retningen i omgivelser med litt vann nærværende, hvilket resulterer i syntese av estere. Estere kan være av mange forskjellige typer, i (B) vises triacylglycerol, oppbygget av trialkoholen glyserol og tre fettsyrer. I (C) vises et annet esterase substrat, acetylkolin. Der består R₁-gruppen i (A) av kolin og R av eddiksyre. Dette substratet katalyseres av acetylkolinesteraser.

Tidligere undersøkelser av esteraser i sild har påvist mange esteraser i sild. Simonarson (Simonarson, 1969) påviste for eksempel to til ti ulike esteraseaktiviteter, beroende på populasjon av sild, etter separasjon av enzymene og målinger utført direkte på gelen etter elektroforese. I «Gull fra havets sølv» har vi påvist fem ulike esteraseaktiviteter, hvorav den som er blitt isolert i fraksjon 236 er den som er mest stabil under rensing.

I dette forprosjektet undersøker vi hvor interessant denne esteraseaktivitet er for kommersielle formål. Enzymet hadde vist attraktive egenskaper for bl.a. detergentindustrien, herunder høy katalytisk aktivitet ved lave temperaturer. Et antall viktige avklaringer av enzymets relevante egenskaper for ulike bruksbetingelser og – formål gjenstod. En fullstendig rensing er viktig for å kunne sekvens-bestemme enzymet for evt. IPR-beskyttelse gjennom patentering eller lignende. Det også bare et fåtall esteraser på markedet med den selektivitet som kjennetegner en riktig god biokatalysator (Faber, 2011), derfor ble regio- og enantioselektivitet et viktig fokus. Esteraser som viser regioselektivitet har en preferanse for en av flere estere i et substrat, og enantioselektivitet betyr at esteraset har preferanse for en av to mulige enantiomerer av et substrat. Enzym som skal brukes til organisk syntese må påvise god stabilitet og gjerne bred, eller «relaksert», substratselektivitet så dette var også et formål med undersøkelsen. Fordi at enzymet viser høy aktivitet ved lave temperaturer ble også aktivitet ved høye pH samt stabilitet i ulike vanlig brukte vaskemiddelstoffer inkludert i prosjektplanen.

2 Rensing og isolering av esteraset

2.1 Mål

Delmålene relatert til denne delen var spesifisert til en fullstendig rensing med henseende på esterase aktiviteten. I prosjektet fantes en ambisjon til å sekvensere det rensede enzymet hvilket inkluderes i dette kapitlet, sammen med en første pilotskalering.

2.2 Material og metoder

2.2.1 Ekstraksjon av silde pasta (SP) ekstrakt og preparering av esterasefraksjon 236

Ekstraksjon av SP ekstrakt ble gjort ved at cirka 1 kg sildemasse homogeniseres i 3 liter 50 mM Tris/HCl buffer (pH 9,0) ved bruk av Waring Blender ved 8 °C. Dette fryses ved -20 °C og kalles SP-ekstrakt pH 9. Tinte 2 liter av dette ekstraktet ved 4 °C og fjernet partikulært materiale i løsningen ved bruk av osteklede etterfulgt av Whatman no. 4 filtrering. Utbytte av partikkelfri løsning var 57 % av total volum. En halv liter av denne løsningen diafiltreres under vakuum i et Millipore Labscale TFF anlegg med 5 kDa Pellicon XL membran mot 5,7 liter 50 mM Tris/HCl buffer (pH 9,0). 475 ml av den diafiltrerte enzymløsningen ble påsatt en 100 ml Q sepharose kolonne og esterase aktivitet eluert ved bruk av 0,5 M NaCl i bufferløsningen med et utbytte på 62,9 % av opprinnelig aktivitet i SP fraksjonen. Denne esterase fraksjonen ble tilsatt NaCl til 2,0 M og deretter påsatt en 120 ml fenyl sepharose 4B kolonne. Esterasefraksjon 236 (200 ml) eluerte ved 0 M NaCl i Tris/HCl buffer pH 9,0 ved et totalt utbytte på 58,1 % av aktivitet i SP fraksjonen.

Esteraseaktivitet følges med bruk av 10 µl enzymløsning, eller en miks av 5 µl enzymløsning og 5 µl 50 mM Tris/HCl pH 9,0, mikset med 190 µl av en til ti miks av 8 mM *para*-nitrofenyl butyrat (pNPB) i DMSO og 0,1 M natrium fosfat, pH 7,4, i triplikat 96 hull mikroplater (prod. nr. 92696, TPP, Sveits). Platen ble målt ved romtemperatur og 405 nm i en plateleser (SpectraMax, Molecular Devices). En unit esterase defineres som den mengde enzym som katalyserer 0,001 økning i absorpsjon per minutt ved 405 nm.

2.2.2 Kromatografi

Videre rensing av esterasefraksjon 236 er utført i en Äkta™ Pure kromatografistasjon. Jonebytte kolonner brukt er Resource Q (6 ml), Mono Q 5/5 (1 ml) og Mono Q 5/50 GL (1 ml) i 20 mM Tris/HCl buffer pH 7,4. Protein elueres av gelene ved økende konsentrasjon av NaCl i Tris/HCl buffer pH 7,4. Gelfiltrering ble utført ved bruk av Superose 6 HR 10/30 og Superdex 75 HR kolonner i 20 mM Tris/HCl (pH 7,4), 0,15 M NaCl. Hydroxyapatite kromatografi ble utført ved 3,0 mM kaliumfosfat buffer (pH 7,4) i en (6 ml) kolonne og bundet protein elueres ved økende kalium fosfat til 200 mM ved pH 7,4. Mixed-mode kromatografi basert på hydrofob interaksjon- og jonebytte kromatografi er utført ved bruk av to kolonner (1 ml) AcroSep™ HEA og PPA og PPA hypercel™ ved henholdsvis pH 9,0 og pH 7,4. Bundet protein elueres ved synkende pH i løsningen. All kromatografi er utført ved romtemperatur.

2.2.3 Rensing av esteraseaktivitet i pilotskala

Silde avfall (fra Norway Pelagic) ferskt eller tint frosset råstoff (15 kg) males opp i en Kilia hakke type TK 20 og overføres til en ekstraksjonstank (250 l). Deretter tilsettes kaldt vann og 1,0 M natriumacetat buffer pH 5.0 til final konsentrasjon av 20 mM natriumacetat. Ekstraktet ble omrørt med et røreverk i en time ved 15 °C. Ekstraktet siles deretter gjennom metall rist (0,5 mm lysåpning) og partikulært materiale fjernes ved flokkulering av biologiske løsninger ved 4 °C. Enzymløsningen oppkonsentreres i et GEA Model R Membran Pilot Plant med spiral type membran med cut-off på 10 kDa.

2.2.4 Analyse av rensset fraksjon

En zymografisk metode ble brukt for å bestemme størrelsen på enzymet med esteraseaktivitet i 236 fraksjonen ved å bruke et substrat som gir fluorescerende produkt. En Native Page Nowex BIS-TRIS gel med Native Running Buffer i ytre kammer og Native Running Catode buffer i indre kammeret blev utført med prosedyren fra Nowex. Som markør brukes NativeMark ladder fra Nowex. Etter åpning legges gelen for vask 2 x 5 min. i en petriskål i cirka 10 ml 50 mM natriumfosfat buffer, pH 7.0 + 0,1 % (v/w) gum arabicum + 0,4 % (v/w) Triton X-100.

100 µM MUF-butyrat substrat lages ved å tilsette 40 µl 25 mM MUF-butyrat (i etylen glykol monoetyl eter) i 10 ml 50 mM natriumfosfat buffer, pH 7,0 + 0,1 % (v/w) gum arabicum + 0,4 % (v/w) Triton X-100. Fluorescerende bånd ses ved UV lys.

Nowex NuPage 4–12 % gel med MOPS buffer + antioksidant ble utført. Gelen ble fiksert (50 % MeOH, 10 % HAC, 40 % H₂O) 10 minutter ved RT farges i 0,1 % Coomassie R-250 (i 45 % MeOH, 10 % HAC, 45 % H₂O). Deretter en rask avfarging i 45 % MeOH, 10 % HAC, 45 % H₂O før bilde av gelen (Figur 4B).

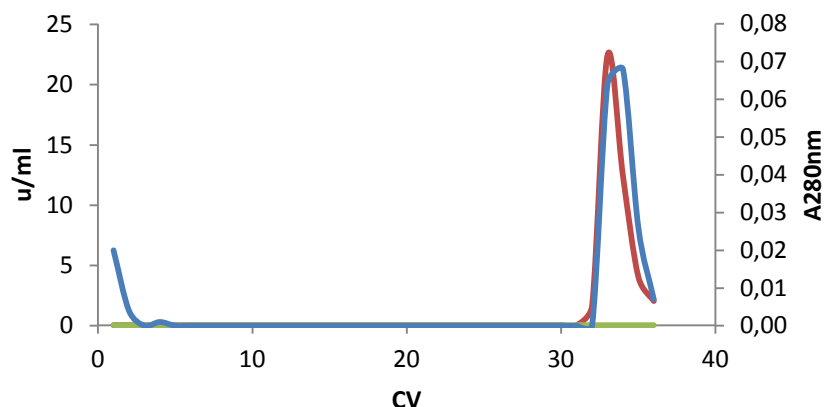
Resten av gelen vaskes i vann og farges over natt i Simply Blue Safe Stain før den igjen vaskes i vann (Figur 1B) Markør er «Mark12 unstained standard». Alle produktene til proteingeler er fra Invitrogen, Carlsbad, CA, USA.

Relevante bånd fra Nowex NuPage gelen ble kuttet ut og fryst før leveranse til Proteomikk kjernefasiliteten, IMB, UiT. Der ble en «in-gel digestion» med trypsin og «de novo sequencing» utført med LC-MSMS på Q-TOF.

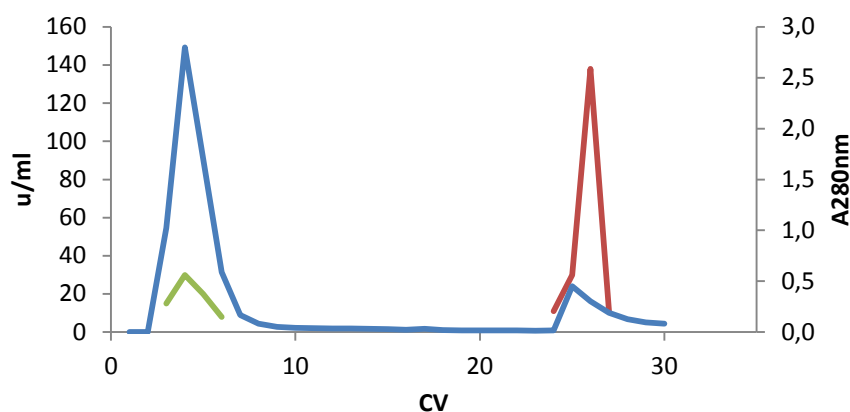
2.3 Resultater, første delen

2.3.1 Rensing av esteraseaktivitet i lab skala

Et omfattende arbeid ble gjort for å oppnå fullstendig isolering av esterase aktiviteten som er til stede i 236-fraksjonen. En ny gel type basert på hydrofob interaksjon- og jonebytte kromatografi ble brukt i rensing av esterase aktiviteten i 236 fraksjonen. Fordi disse mikset-modus kolonner er rapportert for å være vanlig brukt i industriell skala (Buchholz 2012) var vi interessert av å undersøke mulighetene for bruk av disse i eventuell videre rensing av esteraset i større skala. Forsøk med to kolonner, 1 ml AcroSepTM HEA og PPA Hypercel TM, ble utført. Gelene ekvilibrierte med henholdsvis pH 9.0 buffer (HEA gelen) og pH 7.4 buffer (PPA gelen) og bundet protein elueres ved synkende pH i bufferløsningen. Esteraseaktiviteten i 236 fraksjonen forsvinner totalt etter gang gjennom både disse kolonnene (Figur 3) når vi måler med substratet pNPB.



Figur 3 **236 kjørt på AcroSep™ PPA Hypercel™.** Proteinmengden følges med måling ved 280 nm (blå), esteraseaktivitet (grønn) og sur protease aktivitet (rød) angis som u/ml. CV er kolonne volum.

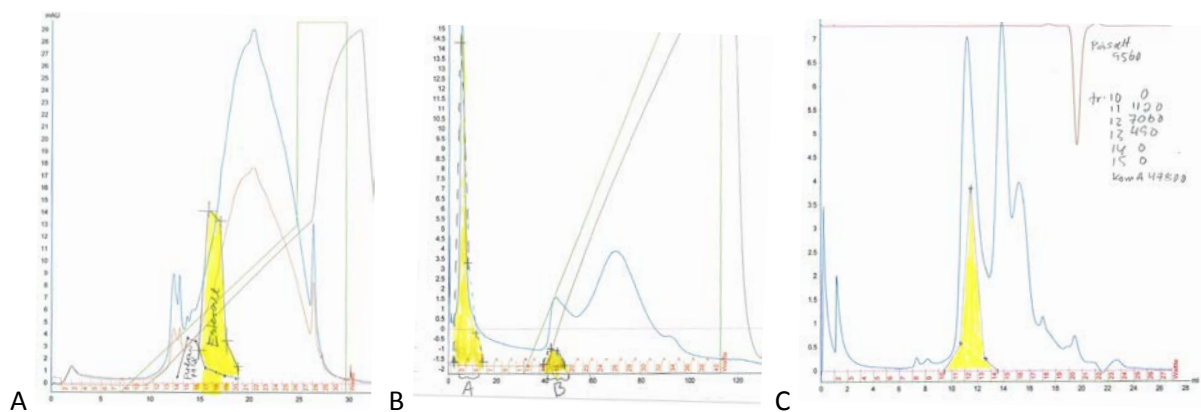


Figur 4 **SP-ekstrakt på AcroSepPPA kolonnen.** Proteinmengden følges med måling ved 280 nm (blå), esterase aktivitet (grønn) og sur protease aktivitet (rød) angis som u/ml. CV er kolonne volum.

I SP-ekstraktet finns det flere esterase aktiviteter (resultat ikke vist) enn den som er gjenstående i 236-fraksjonen. Dette faktum ble brukt for å undersøke hvis andre esterase aktiviteter enn den i 236 kan renses med AcroSep gelene. Positivt resultat på dette spørsmålet er vist i Figur 4.

Vi målte også sur protease aktivitet i fraksjonene fra både mikset-mode kolonnene fra AcroSep, med positivt resultat (Figur 3 og 4).

Når disse to AcroSep kolonnene viste seg å være ubrukbare for videre rensing av esteraseaktiviteten i 236 ble det gjort en omfattende vurdering av andre kromatografitekniker. En kombinasjon av Mono Q og hydroxyapatite kromatografi (Figur 5A & B) og gelfiltrering på Superdex 75 HR ved pH 7,4 (Figur 5C) i en ÄktaPure kromatografistasjon ga en høyrenset fraksjon av esteraset i 236 fraksjonen (Tabell 1).



Figur 5 **Rensing av 236 esterase** ved jonebytte kromatografi (A), hydroxyapatite kromatografi (B) og gelfiltrering (C). De blå toppene representerer proteinkonsentrasjon (målt ved 280 nm), og nærvær av esteraseaktivitet i fraksjonene, målt med pNPB, er avmerket med gult i kromatogramene.

Tabell 1 **Rensing av esteraset fra 236-fraksjonen.** Fraksjonene er navngitt etter kolonnetype som er blitt brukt, angitt volum viser på antall ml som blir brukt i hvert trinn, enzymaktivitet er gitt i U/ml og er målt med pNPB, og utbyttet viser på hvor mye esteraseaktivitet som gjenstår (i units)

Fraksjon	Volum (ml)	Enzym aktivitet (U/ml)	Total aktivitet (U)	Utbytte (%)
236	61	7.000	427.000	100
Mono Q	11,6	19.220	222.952	53,8
HA	0,45	47.800	21.510	5
75 HR	0,45	15.300	6.885	1,6
75 HR rekrom.	0,37	3.200	1.184	0,28

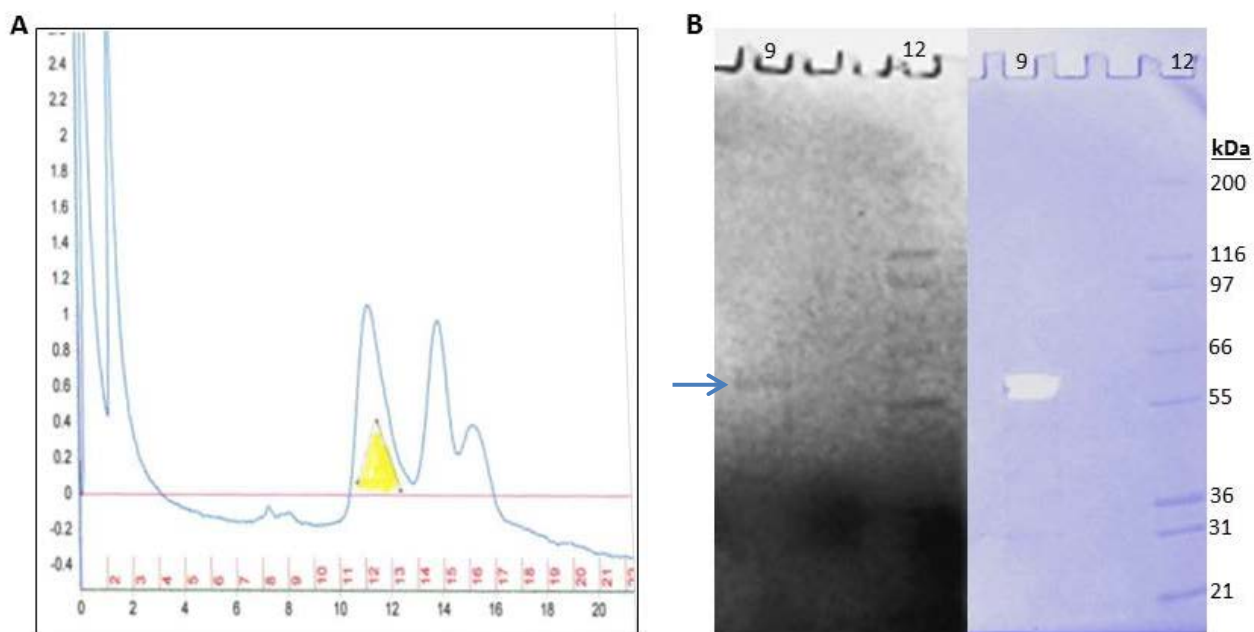
Esterase etter gelfiltrering (Figur 1C) ble re-kromatografert på Superdex 75 kolonna, Figur 6A. Konsentrering og re-kromatografering resulterte i stort tap av enzym aktivitet.

2.3.2 Rensing av esteraseaktivitet i pilotskala

Ett innledende forsøk for å undersøke mulighetene for ekstrahering av esteraser fra både frosset og fersk silde avfall (fra Norway Pelagic) har blitt utført. Etter kverning og omrøring i buffer under en time ved 15 °C i pilot skala blir løsningen silt. Etter flokkulering av ekstraktløsningen ble en videre oppkonsentrering gjennomført (10 x) i ultrafiltreringsanlegg. Utbytte av esterase aktivitet har vært betydelig lavere i pilotskala forsøkene enn i lab skala ultra/diafiltrering av partikkelfri ekstraktløsning (resultat ikke vist).

2.3.3 Proteinsekvensering

Den rekromatograferte esterase fraksjonen (Tabell 1) ble konsentrert med frysetørring og videre ved SDS-PAGE gel elektroforese (se Figur 6). Tidligere Coomassie og sølvfarging av SDS-PAGE geler har vist at esteraseaktiviteten i 236-fraksjonen er vanskelig å farge etter SDS-PAGE (resultat ikke vist) hvilket gjorde at det fantes en viss usikkerhet i hvilken størrelse esteraset hadde.



Figur 6 Renset esteraseaktivitet. I (A) kromatogrammet med den rekromatograferte fraksjonen. Fraksjon 12 inneholder den mest rensede esteraseaktiviteten i prosjektet, topper som viser protein-konsentrasjon i blått, og esteraseaktivitet vises i gult. I (B) to bilder av samme SDS-PAGE gel etter kjøring med endelig renset fraksjon fra (A) i brønn 9. Til høyre ses gelen presis etter avfarging (gelen vannfri og krympet). Pilen viser esterasen i gelen. Til venstre ses gelen etter den har fått ligge i vann (i normal størrelse) med båndet kuttet ut. I brønn 12 er markøren plassert. Molekylvektene på proteiner i markøren er angitt i kDa.

For å bekrefte størrelsen på båndet som skulle bli sendt til sekvensering har to andre metoder blitt brukt. Gelfiltrering på Superose 6 med esterase fraksjon fra MonoQ (tabell 1) viser at esteraseaktiviteten eluerer som et 52 kDa protein ved (resultat ikke vist). Zymografi eksperiment med ulike fraksjoner av 236 esterasen har gitt et aktivt protein på ca 60 kDa ved SDS-PAGE (resultat ikke vist).

Figur 6B med høykonsentrert renset esterase vises et protein bånd på 60 kDa ved SDS-PAGE. Dette protein bandet ble kuttet ut og analysert ved Proteomikk kjernefasiliteten, IMB, UiT. Resultatene ble der videre analysert med bioinformatiske metoder mot NCBI/Swissprot/EST vertebrate. Analysen ga sekvensdata uten å få et resultat på hvilket enzym dette er.

Det finns fortsatt bånd kvar fra den siste SDS-PAGE gelen for videre undersøkelser, men disse blir ikke mulig å undersøke videre ved N-terminal protein sequence analyse innenfor de økonomiske rammer som finns for dette prosjektet.

3 Enzymstabilitet og selektivitet

3.1 Mål

Delmålene relatert til denne del var å karakterisere esteraset med henseende til stabilitet og selektivitet. Mer detaljert så omhandler stabilitetstestene målinger av hvor mye av esterase-aktiviteten som finns kvar etter lagring i frys sammenlignet etter frysetørring, etter inkubasjon ved ulike temperaturer og ulike pH, samt etter inkubasjon av forskjellige organiske løsemiddel og spesifiserte emner i vaskemidler. Selektivitetskarakteriseringen inkluderer målinger av substrat, regio- og enantioselektivitet, men før disse kan undersøkes må også assayer for måling av disse egenskaper etableres og dette er derfor en viktig del av oppgaven i prosjektet.

3.2 Material og metoder

3.2.1 Lagringsforsøk

Etter ekstraksjon av vannfasen som beskrevet i 2.2.1 ble to rør med 1 ml hver av pH 9.0 fraksjonen forvart ved 4 °C i et 1,5 ml sentrifugerør. Under en tid ble gjenstående aktivitet målt ved jevnlig mellomrom i en plateleser som beskrevet nedenfor. Ved lagringsforsøk etter frysetørring ble 100 µl av 236 enzymløsningen frysetørret i flere 1,5 ml sentrifugerør og lagret ved -20 °C til måling da 100 µl dobbelt destillert vann ble addert til det frysetørrede røret som ble mikset til all frysetørret materiale var oppløst. Under seks måneder ble gjenstående aktivitet målt i en plateleser som beskrevet nedenfor og sammenlignet med gjenstående aktivitet etter måling av fryst 236-fraksjon.

3.2.2 Aktivitetsmålinger etter inkubasjon ved forskjellige betingelser

Standard målemetodikk for temperatur, pH, organiske løsemiddel og vaskemiddel kjemikalier innebærer at 20 µl 236 enzymløsning (alternativt 10 µl etter inkubasjon ved ulike temperaturer), 100 µl 8mM pNPB, 880 µl assay buffer (890 µl etter inkubasjon ved ulike temperaturer) ble mikset og målt 1 minutt ved 405 nm i plastkyvetter (10 mm) i et fotometer (Shimadzu UV-1700). Disse verdiene ga den «100 %» måling som trengs for relativ aktivitetsmålinger. Alle målinger ble utført i triplikat. Excels Stdev(S) ble brukt for å beregne feilverdier.

Ved inkubasjon ved ulike temperaturer ble 200 µl av 236 fraksjonen in-kubert ved én utvalgt temperatur (37, 45 og 60 °C). Vid selekterte tidspunkter ble 10 µl enzymløsning tatt av prøvene og målt i standard assay. For alle andre av disse målinger ble 100 µl 236-fraksjon og 100 µl buffer, organisk løsemiddel eller vaskemiddel kjemikalie mikset, og løsningen ble in-kubert i romtemperatur til måling. Ved pH-målinger mellom pH 4,0 og pH 5,6 ble 0,1 M natrium acetat/eddiksyre stilt til korrekt pH og brukt, for målinger mellom pH 8,6 og pH 12,0 ble 0,1 M Glycin/NaOH stilt til rett pH og brukt. Organiske løsemiddel som ble brukt er MeOH, DMSO, acetonitril, isopropanol, kloroform, heksan og heptan. Vaskemiddelkjemikalier som ble brukt er 10 % natrium polyfosfat (mikset i vann) og 1 % natrium perborat tetrahydrat (mikset i vann) for å måle stabilitet.

3.2.3 Målinger av substrat-, regio- og enantioselektivitet

Esteraseaktivitet måles med 8 eller 10 mM pNPB (*para*-nitrofenyl butyrat) som substrat i 0,1 M natriumfosfatbuffer pH 7,0 eller pH 7,4. Enzym aktiviteten er målt antigen i 96 brønner mikroplater

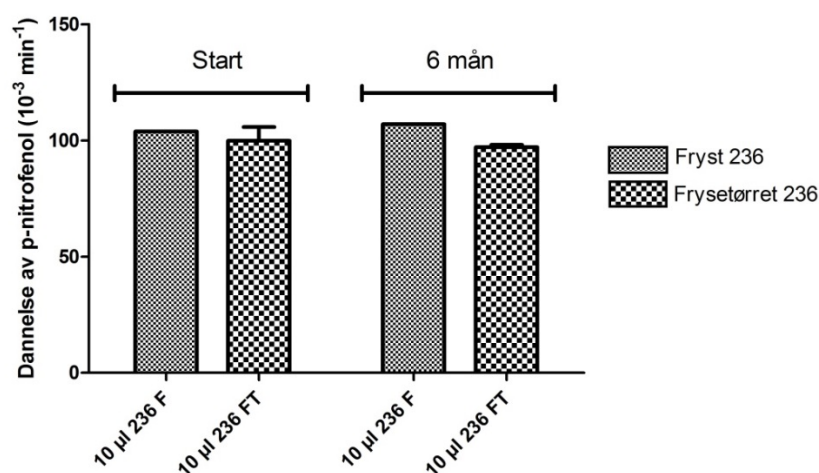
(se 3.2.1) eller i kyvetter (se 3.2.2). En unit esterase aktivitet defineres som den mengde enzym som katalyserer 0.001 økning i absorpsjon per minutt ved 405 nm. Acetylkolinesterase aktivitet måles med metode fra Ellman (Ellman *et al.*, 1961). I korthet ble 2, 5 eller 15 µl ekstrakt mikset med 0,1 M NaPi buffer (pH 8,0) til en volum av 25 µl. Prøvene sattes til mikrotiterplater (prod. nr. 92696, TPP, Sveits) og 125 µl av dithiobisnitrobenzoat, «Ellman reagens», (0.6 mM) og acetylthiokolin jodid (1,25 mM), mikset i samme buffer som tidligere, ble tilsatt. Forendring i absorbans ble følget ved 415 nm i en mikoplateleser (SpectraMax, Mol. Devices). En unit acetylkolinesterase aktivitet defineres som den mengde enzym som katalyserer 0,001 endring i absorpsjon per minutt ved 415 nm. Aktivitet med α-metylbenzyl acetat ble undersøkt med 236 i en assay beskrevet av Böttcher og Bornscheuer (Böttcher & Bornscheuer 2006) ved bruk av «acetic acid kit» fra Boehringer Mannheim. Sur protease aktivitet måles med 2,0 % bovin hemoglobin i 0,06 N HCl løsning som substrat (0,5 ml). Reaksjonen stoppes ved tilsetning av 1 ml 5 % TCA løsning og sentrifugere i 10 minutter ved 14.000 x g. Absorpsjon ved 280 nm måles på reaksjonen supernatant mot blank supernatant. 1 unit protease pH 1.8 defineres som endring av absorpsjon på 0,001 per minutt ved 280 nm. pH-stat måling av enzymaktivitet ble utført i en Radiometer Titrallab TIM 854 pH-stat. En unit enzym aktivitet defineres som den mengde enzym som frigjør 1 µmol titrerbar H⁺ /min i assay systemet. Titrant brukt er en 10 mM NaOH-løsning. Som substrat er benyttet: tributyrin (4:0) i 10 mM natriumfosfat buffer (pH 7,0) og endpoint upscale pH 7,45; pNpB i 10 mM natriumfosfatbuffer (pH 7,4) og endpoint upscale pH 7,8; glyceryl tributyrat i 10 mM Tris/HCl buffer (pH 7,4), 0,1 % Gum Arabic og endpoint upscale pH 7,5 og dimethyl(S)-(-)-malate i 10 mM Tris/HCl buffer (pH 7,4), 0,1 % Gum Arabic og endpoint upscale pH 7,45. Lipase fra bovine pancreas ble brukt som referanse enzyme. Carboxypeptidase A måles med hippurul-(L)-phenylalanine som substrat i 25 mM Tris/HCl buffer (pH 7,5), 0,5 M NaCl (Bergmayer 1974). Carboxypeptidase A fra bovine pancreas er brukt som referanse enzyme. En unit carboxypeptidase defineres som den mengde enzyme som hydrolyserer 1 µ mol hippurul-L-phenylalanine per minutt ved rom temperatur.

3.3 Resultater, andre delen

3.3.1 Lagringsstabilitet

Lagringsforsøk med SP ekstraktet, som er det opprinnelig ekstrakt som 236 er rensset ur, viser en fraksjon på 80 % kvarværende aktivitet målt med pNPB etter 27 dager og den andre 64 % gjenstående aktivitet etter 12 dager ved 4 °C (resultat ikke vist). Årsaken til den store spredningen i resultater er ikke kjent.

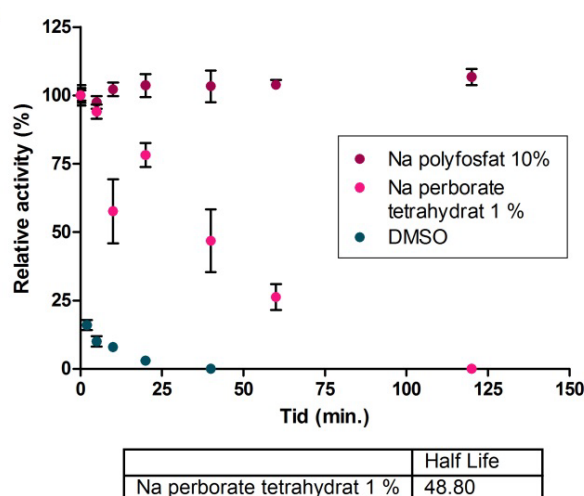
Vi sjekket lagringsstabiliteten i en fryst frysetørret 236-fraksjonen og sammenlignet dette med lagringsstabilitet i en 236-fraksjon som bare vært fryst (Figur 7). Direkte etter frysetørring er aktiviteten i den frysetørrede 236-fraksjonen 100 % av aktiviteten før frysetørring. Etter seks måneders lagring ved -20 °C er den gjenstående aktiviteten i den direkte fryste fraksjonen fortsatt 100 % mens den er minsket i de frysetørrede fraksjonene. Dette viser på at det er mulig og frysetørre 236-fraksjonen med 100 % av opprinnelig aktivitet etter frysetørring, men også at for langsiktig lagring ved -20 °C er det bedre å fryse fraksjonen uten at ha frysetørret den først.



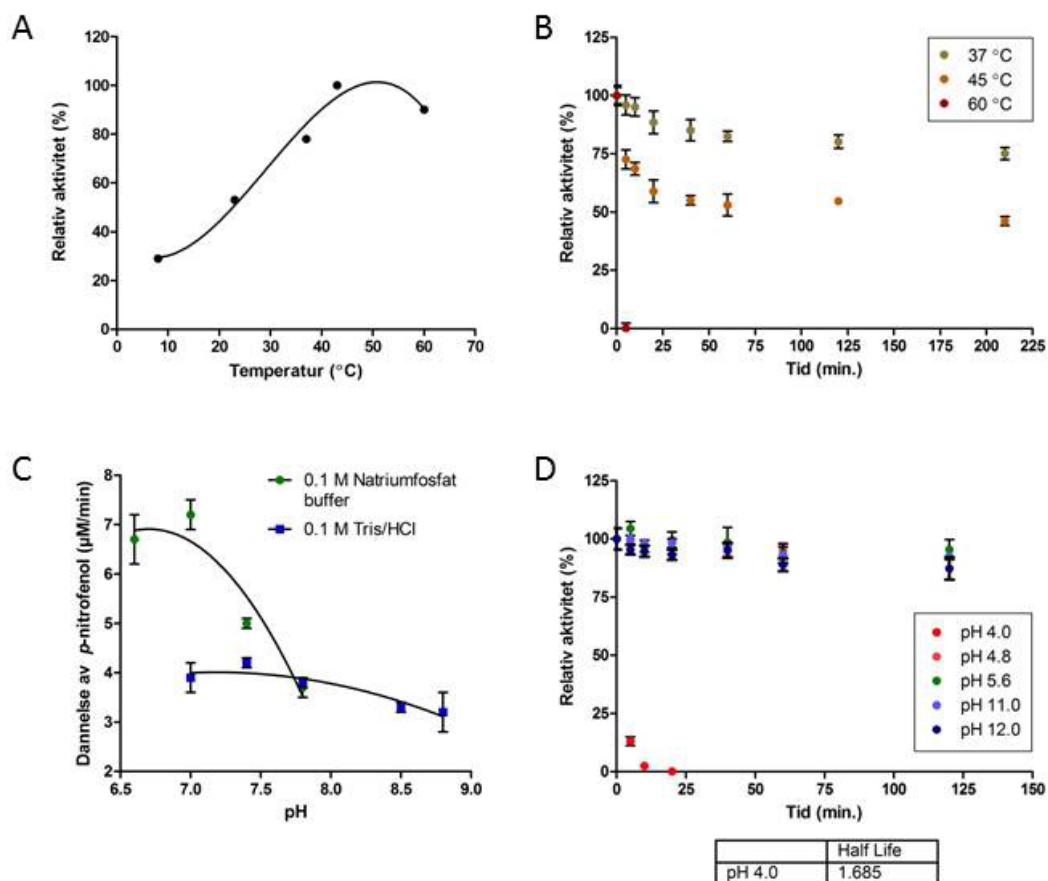
Figur 7 **Sammenligning lagringsstabilitet frysetørret 236 med fryst 236.** Under «start» ser man at direkte etter frysetørring er aktiviteten med pNPB substratet samme, uansett volum. Etter seks måneders lagring ved -20 °C har den frysetørrede fraksjonen lavere aktivitet målt med pNPB enn den fraksjon som bare blitt fryst.

3.3.2 Inkubasjon ved forskjellige betingelser

En viktig del av prosjektet var å undersøke hvor tålig enzymaktiviteten i 236 fraksjonen er i løsemiddel og andre forhold som er assosiert til industrielle applikasjoner. I søknaden har vi angitt at det hovedsakelige formålet var å undersøke enzymaktiviteten i 236 med hensikt at gjøre organisk syntese, hvilket krever stabilitet i organiske løsemiddel, og i vaskemidler. Resultatene etter forsøk presenteres i Figur 8. Esteraseaktiviteten i vaskemiddelsstoff ble først uttestet ved litt lavere konsentrasjoner en normalt. En vanlig brukt konsentrasjon av vannmyknere natrium polyfosfat (NaPF) er 38 % og oksidanten natrium perborat tetrahydrat (NaPTH) 25 % (Bommarius, 2004). Esteraseaktiviteten gjenstod uten problem i over to timer ved 10 % NaPF, men allerede ved 1 % av NaPTH var aktiviteten nede på 50 % etter cirka 50 minutter. Denne lave aktivitet i veldig lave konsentrasjoner av NaPTH gjorde at vi ikke gikk videre i disse undersøkelser.



Figur 8 **Halvtid og plotter på aktivitetsforandring med tid** etter inkubasjon av 236-fraksjonen med 50 % DMSO og med to ulike vaskemiddel kjemikalier. Aktivitetsforandring er angitt i relativ aktivitet, der 100 % aktivitet er aktivitet ved tid = 0 minutt. Feil angis i SD.



Figur 9 **Aktivitet målt med pNPB ved forskjellige pH og temperaturer.** I (A) er 0,8 mM pNPB, 10 % DMSO i 0,1M NaPi (pH 7,4) brukt for å måle esteraseaktivitet i 236-fraksjonen direkte ved ulike temperaturer for å etablere ved hvilken temperatur esteraseaktiviteten er høyest. I (B) har 236-fraksjonen først blitt inkubert ved angitt temperatur før måling ved bestemte tidspunkter i RT på samme måte som i (A) for å etablere hvor lange aktiviteten gjenstår i forhøyet temperatur. I (C) har to ulike buffersalter blitt brukt for direktemåling av esteraseaktivitet i RT ved forskjellige pH for å etablere ved hvilket pH-aktiviteten er høyest. I (D) har 236-fraksjonen blitt inkubert over tid i forskjellige pH før måling på samme måte som i (B) for å etablere esteraseaktivitetens tåleevne til forvaring i lang tid ved ulike pH.

Når det kommer til tåleevne til esteraseaktiviteten i 236-fraksjonen til organiske løsemidler var DMSO det eneste løsemidlet der en målbar aktivitet gjenstod etter 10 minutter, men også denne er svært lav sammenlignet andre mer tålige esteraser. Dette gjorde at våres muligheter til å undersøke hvor god 236-esteraseaktiviteten er for syntese av tributyrin ble umulig, da denne transesterifisering krever aktivitet i 100 % organisk løsemiddel.

Vi skulle også undersøke hvor tålige esteraseaktiviteten i 236-fraksjonen var for langvarig inkubasjon ved ulike pH og temperaturer (Figur 9). Tidligere undersøkelser (Figur 9A) har vist at optimal aktivitet ved direkte måling av nedbryting av pNPB ved forskjellige temperaturer ligger mellom 50 til 60 °C. Det viser seg fra disse undersøkelser at ved forhøyde temperaturer er tåleevnen for esteraseaktiviteten i 236-fraksjonen lav til svært lav (Figur 9B). Ved 37 °C gjenstår aktiviteten til 75 % etter inkubasjon i 3,5 h, ved 45 °C gjenstår cirka 50 % av aktiviteten etter samme tid, mens ved 60 °C er aktiviteten null allerede etter 5 minutter. Dette betyr at vil man oppnå så god aktivitet som mulig så lenge som mulig med denne esteraseaktivitet skal man bruke litt lavere enn optimal temperatur. Med tanke på at esteraseaktiviteten i 236 fraksjonen ved 10 °C er 30 % av høyest målt aktivitet samt lav tåleevne ved

forhøyde temperaturer, såkalt termolabilitet, peker dette på at 236-fraksjonen inneholder et kuldeadaptert enzym (Siddiqi 2006).

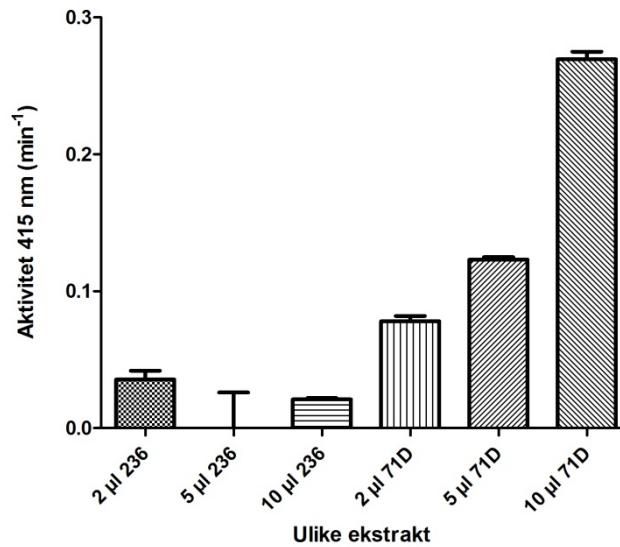
Når det gjelder bufferpreferanse har vi ved tidligere målinger fastslått at esteraseaktiviteten er høyest ved pH 7,0, uansett hvis man måler i natriumfosfat (NaPi) eller Tris/HCl (Figur 9C). Man kan notere at aktiviteten er høyere ved samme pH hvis man måler i NaPi sammenlignet i Tris/HCl, hvilket ikke er uvanlig for enzym. Vi har i denne undersøkelsen fulgt hvordan esteraseaktiviteten påvirkes av langtids forvaring ved ulike pH (Figur 9D) og aktiviteten er påvist stabil over tid i RT når den blir inkubert over et bredt pH intervall. Grensen mot surt pH går mellom pH 4,0, der aktiviteten er tapt på mindre enn 20 minutter, og pH 4,8 der 93 % av aktiviteten gjenstår etter to timer. I basisk pH skjer ikke mye tap i aktivitet mellom 60 min (89 % gjenstående aktivitet) og 120 minutter (87 % gjenstående aktivitet).

3.3.3 Substrat-, regio- og enantioselektivitet

Tidligere undersøkelser med derivater av *p*-nitrofenyl med ulikt antall C-atom i kjeden viser på at esteraseaktiviteten i 236 har en preferanse for substrater med kortere kjedelengder, med et aktivitetsoptimum med substrater på mellom fire (*p*-nitrofenyl butyrat) og seks (*p*-nitrofenyl heksanoat) karbon i kjeden. I korthet kan man si at denne preferanse for korte substrater og et fravær av aktivering med gallesalter viser at dette er et esterase og ikke en type av lipase.

236 esterase fraksjonen ble testet med substrat som tributyrin, glyceryl tributyrat og dimethyl (S)-(-)-malate uten spor av aktivitet i pH-stat assay. Referanse lipase/esterase enzym viste god katalytisk aktivitet med disse substratene (resultat ikke vist). 236 preparasjonen katalyserer titerbart H^+ fra pNpB substratet.

Undersøkelser for å påvise nedbryting av acetylkolin ble gjennomført for å undersøke hvis esteraseaktiviteten i 236-fraksjonen er et acetylkolinesterase. Ettersom det er påvist flere ulike esteraseaktiviteter i det opprinnelige ekstraktet (før videre rensing) så brukte vi også det i målingene for å undersøke nærvær av denne enzymaktivitet i silderestråstoffet. Det ble påvist nærvær av acetylkolinesterase aktivitet i 71D (motsvarer SP-ekstrakt pH 9,0, kapittel 2.3.1) der man ser en fin økning av aktivitet med økt mengde ekstrakt, derimot så vi ikke noen aktivitet med acetylkolin med 236-fraksjonen (Figur 10).



Figur 10 236-fraksjonen og 71D, det opprinnelige pH 9,0 ekstraktet, ble brukt for å etablere hvis det skjer nedbryting av acetylkolin ved tilsats av respektive ekstrakt. Tre ulike mengder av hvert ekstrakt ble brukt.

Ettersom det er vanlig at proteaser katalyserer enantioselektive esteraseaktiviteter (Bommarius & Riebel, 2004), så ble karboksypeptidase aktivitet i 236 fraksjonen forsøkt målt med hippurul-L-fenylalanine som substrat. Referanseenzymet karboksypeptidase A fra bovine pankreas ga god aktivitet i denne assayen, men det ble ikke påvist karboksypeptidase A aktivitet i 236-fraksjonen (resultat ikke vist). Andre proteaser som opprinnelig var til stede i 236-fraksjonen ble fjernet under den fullstendige rensingen av esteraseaktiviteten som beskrevet i kapittel 2.3.1, så vi har ingen grunn til å tru at enzymet som påviser god aktivitet med pNPB og MUF-butytrat er noe annet enn et esterase som vi med disse undersøkelser ikke har etablert den naturlige aktiviteten på, og dermed ikke heller etablert hvilken EC klass det tilhører.

4 Diskusjon

Med tanke på at fokus i dette forprosjektet har vært å undersøke esteraseaktiviteten i 236-fraksjonen for kommersielle formål blir fokus i diskusjonen å se hvis dette prosjektet har gitt godt nok grunnlag for å si noe om dette.

For å kunne klassifisere enzymet etter EC-nummer, som baseres på type av reaksjon som enzymet katalyserer, og for å kunne IP beskytte enzymet er det viktig at indentifisere enzym man arbeider med. Vanligvis bruker man en kombinasjon av sekvensering og karakterisering med henseende på substrater som enzymet bruker for å utføre denne klassifisering. Når man vet hvilket enzym man arbeider med kan man sammenligne dette med andre enzymer fra andre kilder. I dette prosjektet var det ment at vi skulle kunne nå i mål med bruk av proteinsekvensering og bruk av ulike endogene substrater. Dette innefattet rensing av enzymet, implementering av måleassayer samt måling av enzymaktiviteter.

Gjennom anvendelse av en rekke tradisjonelle kolonnematerial ble esteraseaktiviteten i 236-fraksjonen fullstendig rensert og sendt til proteinsekvensering. Man kan akkurat bestemme og karakterisere fragment fra peptider og protein som dannes i prosessen når man kjører Q-TOF LC-MS/MS. Utfordringen med dette er at uten et referansegen er det veldig utfordrende å bestemme sekvensen og identiteten på aminosyrene da det finns flere kombinasjoner som kan gi samme molekylvekt. Svarene fra sekvenseringen ble sammenlignet med allerede kjente proteinsekvenser fra esteraser og lignende protein, men dette var ikke tilstrekkelig for å kunne gi svar på hvilken type av enzym vi jobber med her.

Det andre, og komplementere, alternativet for fastleggelse av enzyms identitet er bruk av assayer som viser på enzymet evne til å bruke substrater som er unike for en enzydtype. Til tross for at målet med enzyommålingene var å etablere selektivitet, er det også et godt alternativ for å finne frem hvilket enzym man arbeider med når ikke sekvensering fungerer. Mye tid er blitt brukt for å etablere en rekke assayer (mere enn det som er blitt rapportert) for å finne andre substrater enn de som allerede var og som enzymet i 236-fraksjonen katalyserer. Så langt har vi ikke funnet et enda alternativ substrat til tross for bruk av både endo- og eksogene substrater. Listen på sub-typer av enzym som hydrolyserer karboksyl ester bindinger (EC 3.1.1.) er dog lang og inkluderer cirka 90 ulike typer (Enzyme Nomenclature 1992), alle med et eget oppsett av substrater de kan bruke. Mange av disse katalyserer nedbryting av det syntetiske substratet pNPB, hvilket gjør at det fortsatt gjenstår en del arbeid innen man kan identifisere enzymet hvis man bare bruker assayer for å løse denne gåte. En alternativ måte for å nå identifisering er å gjøre en cDNA-kloning. Med bruk av de sekvenser vi har fått fra proteinsekvenseringen kan man designe og bruke degenererte primers på ekstrahert mRNA (se eksempelvis Nilsen *et al.*, 1999). Disse DNA sekvenser kan senere brukes for å få fullstendige sekvenser til identifisering av enzymet og for videre kloning av enzymet til andre vertsorganismer, hvis man ser for seg å uttrykke enzymet rekombinant.

At vi ikke har kunnet finne aktivitet med andre substrater enn pNPB, og andre derivater, samt MUF-butyrat har også ført til at vi ikke har kunnet etablere regio- og enantioselektivitet. I alle fall uten med acetic acid assayen har dog aktivitet med bruk av andre enzym kunne påvises. Når det gjelder «acetic acid» assay'en var det i stedet assayen som er vanskelig å bruke med dette ekstraktet som fortsatt inneholder mye annet enn det som gir esteraseaktivitet fra silderestråstoffet: Denne assay'en er en multistep assay der substrat og produkter fra assayen, samt de tre ekstra enzymene,

også kan være nærværende i 236-fraksjonen hvilket trolig bidrar til at den var vanskelig å bruke. En assay som faktisk ga positivt resultat med et ekstrakt fra sild var acetylkolinesterase assayen, men da med det opprinnelige ekstraktet direkte etter ekstrahering fra sild. Dette betyr at en av de fire andre esteraseaktivitetene som er funnet med MUF-butytrat i zymografiske målinger på Native PAGE gel med det opprinnelige SP pH 9,0 ekstraktet har acetylkolinesterase (EC 3.1.1.7) aktivitet. Dette er en aktivitet som har målt i sild før (McHenery, 1991).

Det substrat vi har brukt for å måle på esteraseaktiviteten i 236-fraksjonen i undersøkelser relatert til fysikalske parameterer er pNPB. Målingene har etablert tåleevne til forskjellige kjemiske stoff, forhøyet temperatur over tid og ulike pH, samt foretrukket pH, temperatur og antall kull i pNP-derivater. Dessuten vet vi noe om størrelse av enzymet fra geler som er kjørt og lagringsstabilitet. Enzymaktiviteten er stabil i breitt spektra av pH, har god lagringsevne og er sannsynligvis kuldeadaptert. Men selv om disse undersøkelser er langt fra avsluttet så viser de at dette enzym ikke i nativ form er egnet for de applikasjoner som vi så for oss i søknaden, det vil si organisk syntese eller i detergenter for husholdningsapplikasjoner. Det kan fortsatt være ett interessant enzym, men fastsettende av identiteten er av fundamental betydelse for eventuelle fortsatte undersøkelser.

For å summere, dette er et interessant, kuldeadaptert og stabilt enzym men når det gjelder identifisering og karakterisering av 236-fraksjonen så gjenstår fortsatt mye for å sikre identitet og spesifisitet. Veien videre, hvis man velger å ta denne, går via cDNA-kloning. Dette tillater enzymets identitet til å bli kjent og dermed kan man også etablere de assayer som er relevante for undersøkelser med rett substrater.

5 Acknowledgements

Vi vil takke Nofima og Mabit for finansiering av prosjektet, samt Bernt Hansen på Norway Pelagic på Sommarøy for rikelig tilgang på sildrestråstoff.

6 Litteratur

- Bergmayer, H.U., K. Gawehn & M. Grassel (1974). *Methods in Enzymatic Analysis*, **1**, (2nd ed.), pp 436–437.
- Bommarius, A.S. & B.R. Riebel (2004). *Biocatalysis: Fundamentals and applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA Weinheim, pp. 136–137.
- Bornscheuer, U.T. (2002). Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiol Rev*, **26**, pp. 73–81.
- Böttcher, D. & U.T. Bornscheuer (2006). High-throughput screening of activity and enantioselectivity of esterases. *Nat. Protoc.*, **1**, pp. 2340–2343.
- Buchholz, K., V. Kasche & U.T. Bornscheuer (2012). *Biocatalysts and enzyme technology* (2nd ed.). John Wiley & Sons, p. 257.
- Casas-Godoy, L., S. Duquesne, F. Bordes, G. Sandoval & A. Marty (2012). Lipases and Phospholipases: Methods and Protocols. *Methods Mol Biol.*, **861**, pp. 3–30.
- Ellman, G.L., D. Courtney, V. Andres & R.M. Featherstone (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, **7**, pp. 88–95.
- Enzyme Nomenclature (1992) pluss supplement tilgjengelig på <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>
- Faber, K. (2011). *Biotransformations in organic chemistry: A textbook* 6th ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 60–61.
- FKD, KD, NHD, UD (2009). Marin bioprospektering – en kilde til ny og bærekraftig verdiskaping, Nasjonal strategi 2009 (K-0712 B).
- McHenery, J.G., D. Saward & D.D. Seaton (1991). Lethal and sub-lethal effects of the salmon delousing agent dichlorvos on the larvae of the lobster (*Homarus gammarus* L.) and herring (*Clupea harengus* L.) *Aquaculture*, **98**, pp. 331–347.
- Meyer, H.-P. & N.J. Turner (2009). Biotechnological manufacturing options for organic chemistry. *Mini Rev Org Chem.*, **6**, pp. 300–306.
- Nilsen, I.W., K. Øverbø, E. Sandsdalen, E. Sandaker, K. Sletten & B. Myrnes (1999). Protein purification and gene isolation of chlamysin, a cold active lysozyme-like enzyme with antibacterial activity FEBS Lett 464, pp. 153–158.
- RUBIN (2011). Rapport nr. 210. Internasjonal markeds- og industrianalyse for marine ingredienser. Oppdatering av november 2011. Trondheim: Stiftelsen RUBIN.
- Schomburg, I., A. Chang & D. Schomburg (2002). BRENDA, enzyme data and metabolic information. *Nucleic Acids Res.*, **30**, pp. 47–49; www.brenda-enzymes.org.
- Siddiqui, K.S. & R. Cavicchioli (2006). Cold-adapted enzymes. *Annu Rev Biochem.*, **75**, pp. 403–433.
- Simonarson, B. & D.C. Watts (1969). Some fish muscle esterases and their variation in stocks of the herring (*Clupea harengus* L.). The nature of esterase variation. *Comp Biochem Physiol.*, **31**, pp. 309–318.

