UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

Y BIOLOGÍA MOLECULAR-A

"Aplicación de α/β hidrolasas en la síntesis y resolución de compuestos de interés farmacéutico"

Silvia Montoro García

2010

Son tantas personas a las cuales debo parte de esta Tesis, que espero no dejarme a nadie por el camino.

En primer lugar, deseo expresar mi más sincero agradecimiento a los Catedráticos Álvaro Sánchez Ferrer y Francisco García Carmona, directores de esta Tesis Doctoral, por su apoyo, consejos, orientación y continua ayuda a lo largo de estos años en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular-A. A Álvaro, su dirección, estímulo personal, correcciones, y brillantes ideas han sido fundamentales en la realización de esta Tesis. Te agradezco profundamente esas charlas en las que me hacías sentir que valía para la investigación y la ilusión que has despertado en mí por este trabajo. A Paco, por aportar su experiencia, esencial para dar consistencia a este trabajo. Vuestras enseñanzas guiarán siempre mi vida profesional y, aún en la distancia, las recordaré con gratitud y mucha nostalgia.

A las Profesoras del Departamento, Mercedes, Juana, Manoli y Pepa, por su agradable trato diario. A José Manuel, recién estrenado Profesor, y Fernando, en breve también lo será, por ayudarme a superar las barreras que nos encontramos los investigadores cada día. A David y Ángel, por responder pacientemente mis interminables preguntas.

A Alejandro, César, Maruja y María Teresa del CAID y SACE, por su amabilidad y contribuir cada uno con su especialidad a esta Tesis.

De mi estancia (mayo-agosto 2007) en la *Jacobs University* de Bremen (Alemania), agradezco al grupo del Profesor Ulrich Schwaneberg, la amabilidad y atención que me dispensaron durante aquellos meses, en los que disfruté de un excelente ambiente para la investigación, en especial a Milan, Jovana y Radivoje.

A todas las personas que conocí en Valencia y que creyeron en nuestra colaboración tanto o más que yo misma. A Vicente Rubio, gracias por su confianza y por poner a mi disposición todo su laboratorio. Y en especial a Fernando, que en el último año a través del teléfono, pero antes en propia persona, me brindó todo su tiempo de la forma más agradable posible, contigo he crecido como investigadora.

A mis amigos del Departamento: Pepe, Inma, Guio, Agustín, María, Pili, Lorena y Sofía. En lo laboral hemos construido una pequeña familia dónde nos interesamos por el trabajo del prójimo e intentamos ayudarnos continua y desinteresadamente. En lo personal, la lista es interminable, no existen palabras para explicaros lo que siento por vosotros. A Pepe, la primera persona que conocí en el laboratorio, por hacer que cada pedazo de tiempo fuera ameno y por sufrir conmigo las angustias del final de la Tesis. A Inma, fuiste un pilar sobre el que me apoyé innumerables veces, y jamás podré agradecértelo suficiente. Guio y Agustín, vuestra llegada supuso un punto de inflexión en mi Tesis (para bien), siempre he encontrado apoyo en vosotros y me es difícil reflejar lo que siento en un papel, supongo que entenderéis esta frase: "*Question of Science, science and progress, do not speak as loud as my heart…*". A Guio, por su amistad, alegría y los inolvidables viajes que hemos hecho juntas, destaco su inteligencia y entusiasmo. A Agustín, por su amistad, eres trabajador y buscas

soluciones con inteligencia, que nadie te haga pensar lo contrario. ¡No decaigáis nunca en el duro mundo de la investigación! A María, por tu compañía, sinceridad y apoyo en el laboratorio. A Sofía, desde que llegaste al Departamento el tiempo cundía más, pero sobre todo por tus buenos consejos. A Pili y Lorena, por contagiar con vuestra alegría y cariño todo el laboratorio. A Antonio, recientemente incorporado a nuestra cantina personal. A Ana, deseo sinceramente que encuentres tu camino y seas feliz. A Esteban y Dani, os recuerdo siempre con una sonrisa. Y a Irene, por ayudarme en los duros comienzos, de ti aprendí a esforzarme cada día un poco más.

A todos mis amigos pasados y presentes; pasados por ayudarme a crecer y madurar como persona, y presentes por estar siempre conmigo, apoyándome en todo momento:

A mis amigas de la carrera, Adri, Carmen, Mar y Tere, mi apoyo durante los cinco largos años de periodo académico. Aunque nos vemos menos de lo que quisiéramos, seguís siendo parte de mi vida y os echo de menos.

A mi amiga Mari, por compartir cada una los momentos clave de nuestras vidas, y los que vendrán.

A mis *zagalicas* de Mula, por permitirme desconectar los fines de semana e intentar entender mis agobios. En especial a Gala, que me ofreció su casa en Valencia y lo más importante, su apoyo incondicional desde los 14 años, es imposible no quererte.

A la familia de Paco, por su cariño, animarme y hacerme sentir como en casa.

A mis padres y hermano, gracias a ellos soy quién soy. Por darme la estabilidad emocional para poder llegar a este punto, que definitivamente no hubiese podido ser realidad sin ellos. Porque siempre estuvisteis ahí, preguntándome por mis *bichitos* y entender mis malos días. A mi madre, por la absoluta dedicación a su familia, de ella he aprendido a no descansar hasta llegar a la meta, y a superarme cada día. A mi padre, por su ayuda todos estos años, por su infinito amor, compresión, y por apoyarme en todas y cada una de mis decisiones. Gracias Papá. Esta Tesis es tanto mía como vuestra.

A mi hermano Alex, que por medio de discusiones y preguntas, me hace ser más culta cada día, aunque nunca como él. Te agradezco profundamente esas noches de largas conversaciones que ahora tanto anhelo. Por todo el cariño que me has dado, te quiero.

A Paco, por compartir casi media vida conmigo, escucharme, soportarme, apoyarme, cuidar de mí y quererme como soy. Eres la persona más importante en mi vida y la que mejor me conoce, no sé cómo agradecerte que tras tantos años sigas ahí cada día. Esta Tesis no hubiera sido posible sin tu apoyo, por eso te la dedico especialmente a ti.

A mis padres y hermano

A Paco

Prólogo

Todas las proteínas, enzimas y sustratos que aparecen en este trabajo de investigación se han nombrado de acuerdo a las recomendaciones de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (I.U.B.M.B.) (http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme), por ejemplo: carboxilesterasas EC 3.1.1.1. Se han utilizado traducciones al castellano siempre que ha sido posible (incluyendo las abreviaturas utilizadas), sin embargo, a lo largo del texto aparecen términos en inglés. Algunos de ellos constituyen palabras clave de esta Tesis y no ha sido posible encontrar su traducción -o bien no está aceptada- (como *Cross-linked enzyme aggregates, MALDI-TOF…*). En otras ocasiones, a pesar de que sí existen traducciones posibles en castellano, el conocimiento de la terminología en inglés resulta vital para cualquier lector que quiera ampliar información sobre las técnicas y resultados presentados en este trabajo de investigación (NSAID, *National Center for Biotechnology Information, Hanging-Drop…*). Los términos en inglés aparecen en cursiva y a menudo entre comillas para llamar la atención del lector sobre este hecho. También se indican en cursiva los nombres de las especies en latín.

Durante la redacción se ha evitado, en la medida de lo posible, el uso de abreviaturas con la finalidad de favorecer la comprensión de los resultados. Sin embargo, la descripción de las abreviaturas aparece siempre en el texto (cuando se utilizan por primera vez durante la redacción) y en la tabla a continuación.

Durante la redacción del texto se hace referencia a numerosos artículos, libros o incluso patentes, la bibliografía de la presente Tesis se encuentra al final del texto, enumerada por orden alfabético. Cuando existe más de una cita al final de una frase, estas se enumeran por orden cronológico. Cuando se citan varios autores que corresponden al mismo año de publicación, su orden dentro del texto se incluirá por orden alfabético según el apellido de los autores. En el caso de que exista más de una cita de un mismo autor y del mismo año, se denotará con una letra después del año de publicación (ejemplo: Takami y col., 2004a y b).

También, se han seguido las recomendaciones de la I.U.B.M.B. a la hora de nombrar los plásmidos utilizados para la clonación de secuencias génicas, se denotan con una "p" minúscula (ejemplo: pET28a).

La numeración de tablas y figuras se ha realizado de forma que el lector pueda identificar rápidamente el capítulo a que corresponde (ejemplo Tabla 3.1 significa que es la primera tabla del capítulo 3).

Abreviaturas

7-ACA	Ácido 7-aminocefalosporámico
7-dACA	Ácido 7-amino-3-desacetilcefalosporámico
AaEst2	Carboxilesterasa Est2 de *Alicyclobacillus acidocaldarius*
AOX1-2	Gen alcohol oxidasa 1-2
AXE	Acetil xilan esterasa
BaCE	Carboxilesterasa de *B. anthracis*
BcCE	Carboxilesterasa de *B. cereus*
BhCE	Carboxilesterasa de *B. halodurans* C125
BLAST	*Basic Local Alignment Search Tool* (alineamiento de secuencias)
BlCE	Carboxilesterasa de *B. licheniformis*
BMGY	Medio tamponado complejo con glicerol, *Buffered Glycerol Complex Medium*
BMMY	Medio tamponado complejo con metanol, *Buffered Methanol Complex Medium*
BpAXE	AXE de *Bacillus pumilus* CECT5072
BpCE	Carboxilesterasa de *B. pumilus*
BtCE	Carboxilesterasa de *B. thurigiensis*
BSA	*Bovine Serum Albumin*, albúmina sérica bovina
BsBEst	Brefeldin B esterasa de *B. subtilis*
CDs	Ciclodextrinas
CE	Carboxilesterasa
CE-	Familia de Carbohidrato Esterasa-
CIP	*Calf Intestinal Phosphatase* (fosfatasa ácida)
CLEAs	*Cross-linked enzyme aggregates*, agregados de enzima entrecruzados.
CPC	Cefalosporina C
CTAB	Hexadeciltrimetilamonium Bromide
CTPB	Hexadecilpiridium Bromide
Da	Dalton
DAAO	D-amino ácido oxidasa
dCPC	Desacetil cefalosporina C
DEP	Dietilfosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO_{600}	Densidad óptica a 600 nm
DPC	Dietilpirocarbonato

E	Ratio enantiómerico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ee_p	Exceso enantiomérico
Evalue	*Expectation value*, valor esperado
FPLC	Cromatografía líquida de proteínas
g	Aceleración de la gravedad
GkCE	Carboxilesterasa de *G. kaustophilus* HTA426
GLA	Glutaril-7-ACA acilasa
GsEst30	Carboxilesterasa Est30 de *G. stearothermophilus*
GtEst30	Carboxilesterasa Est30 de *G. thermodenitrificans*
GtEstA	Carboxilesterasa EstA de *G. thermoleovorans*
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
HP-β-CD	Hidroxipropil-beta-ciclodextrinas
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranósido
k_{cat}	Constante catalítica
K_I	Constante de disociación
k_i	Constante de inhibición irreversible
K_M	Constante de Michaelis-Menten
K_{si}	Constante de inhibición por sustrato
KPME	Ketoprofeno metil ester
kV	Kilovoltio
LB	Luria Bertani
MEB	Microscopía Electrónica de Barrido
MO	Microscopía Óptica
M_r	Masa molecular relativa
m/z	Relación carga/masa
NMR	Resonancia Magnética Nuclear
NSAID	*Non Steroidal Antiinflamatory Drug*, antiinflamatorio no esteroideo
ORF	*Open Reading Frame*, marco abierto de lectura
PAF acetil hidrolasa	Acetil hidrolasa del factor activador de plaquetas
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
PfCE	Carboxilesterasa de *P. fluorescens*
PGO	Fenilglioxal fosfato

PLP	Piridoxal-5´-fosfato
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoride
p-NPA	*p*-Nitrofenil Acetato
RGAE	Ramnogalacturonan acetil esterasa
rmsd	*Root Mean Square Deviation*, desviación de la media cuadrática
SA	Sulfato amónico
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
SeMet	Seleniometionina
TB	*Terrific Broth*
TBHAS	Tetrabutil amonio hidrógeno sulfato
TBME	*Tert*-Butil Metil Eter
TEMED	N,N,N,N´-tetrametilendiamina
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
UE	Unidades enzimáticas
V*max*	Velocidad máxima
YlCE	Carboxilesterasa de *Yarrowia lipolytica* CLIB122
YPD	*Yeast Peptone Dextrose*

Índice General

Capítulo I. Introducción general. **1**

1. **α/β hidrolasas** **3**
   - **1.1. Estructura α/β hidrolasas** **3**
     - 1.1.1. Sándwich α/β/α 3
     - 1.1.2. Centro activo 4
     - 1.1.3. Propiedades catalíticas 5
   - **1.2. Clasificación de las α/β hidrolasas** **8**
   - **1.3. Propiedades de las α/β hidrolasas** **12**
   - **1.4. Producción industrial de las α/β hidrolasas** **13**
     - 1.4.1. Lipasas 13
     - 1.4.2. Proteasas 14
     - 1.4.3. Esterasas 16
2. **Esterasas** **18**
   - **2.1. Clasificación de las esterasas** **18**
   - **2.2. Mecanismo de acción** **19**
   - **2.3. Acetil xilan esterasas** **20**
     - 2.3.1. Estructura 20
     - 2.3.2. Actividad sobre xilano 23
     - 2.3.3. Biocatálisis de antibióticos β-lactámicos 24
   - **2.4. Carboxilesterasas** **26**
     - 2.4.1. Estructura 26
     - 2.4.2. Síntesis de compuestos ópticamente puros 28
     - 2.4.3. Obtención de antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs) 29

Capítulo II. Objetivos. **33**

Capítulo III. Materiales y Métodos. **36**

1. **Microorganismos** **38**
2. **Reactivos y cepas comerciales** **39**
3. **Herramientas bioinformáticas** **40**
4. **Métodos microbiológicos** **41**
   - **4.1. Medios de cultivo, crecimiento y conservación de cepas bacterianas** **41**
   - **4.2. Transformación bacteriana** **42**
   - **4.3. Transformación en *Pichia pastoris* GS115** **42**

5. Amplificación de fragmentos de DNA **44**
5.1. Obtención de BpAXE recombinante de *B. pumilus* **44**
5.2. Obtención de YlCE recombinante de *Y. lipolytica* **46**
5.3. Obtención de GkCE recombinante de *G. kaustophilus* **47**
5.3.1. Clonación de GkCE y su expresión 47
5.3.2. Mutagénesis dirigida de GkCE de *G. kaustophilus* 47
5.4. Obtención de BhCE recombinante *de B. halodurans* **50**

6. Purificación de proteínas **51**
6.1. Ultrafiltración tangencial **51**
6.2. Cromatografía de intercambio iónico **51**
6.3. Cromatografía de afinidad **51**

7. Metodología de proteínas **52**
7.1. Cuantificación de proteínas **52**
7.2. Electroforesis en geles de acrilamida **52**
7.3. Análisis de imagen **53**
7.4. Diálisis y concentración **53**
7.5. Determinación de la masa molecular de las proteínas nativas **54**

8. Ensayos espectrofotométricos **54**
8.1. Medidas de actividad de BpAXE y carboxilesterasas **54**

9. Estabilidad enzimática **55**
9.1. Efecto de la temperatura **55**
9.2. Efecto del pH **55**
9.3. Efecto de los cationes divalentes **55**
9.4. Efecto de diferentes compuestos desnaturalizantes en la actividad **56**
9.5. Efecto de compuestos inhibidores **56**

10. Medida de actividad mediante HPLC **56**
10.1. Actividad sobre 7-ACA y CPC **56**
10.2. Actividad sobre (R, S)-ketoprofeno metil ester **57**

11. Cristalización de AXE de *B. pumilus* **59**
11.1. Introducción a la determinación de estructuras de proteínas mediante difracción de rayos X **59**
11.2. Cristalización de AXE de *B. pumilus* **62**
11.3. Ampliación de los *screenings* **63**
11.4. Producción de BpAXE para cristalización **65**
11.5. Manipulación de los cristales **66**
11.6. Difracción de Rayos X de los cristales **67**

12. CLEAs de AXE de *B. pumilus* **68**
12.1. Introducción a las CLEAs **68**
12.2. Optimización de las condiciones **69**
12.3. Escalado **70**
12.4. Dispersión de las CLEAs y tamaño de las partículas **70**

13. Microscopía **71**
13.1. Microscopía óptica (MO) **71**
13.2. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) **71**

14. Formación de complejos Ketoprofeno metil ester y HP-β-CD **72**

Capítulo IV. Bases moleculares y constantes cinéticas de la inhibición de acetil xilan esterasas por paraoxon. **74**

1. **Introducción** **76**
2. **Resultados** **77**
2.1. Producción y purificación de BpAXE **77**
2.2. Inhibición de BpAXE por paraoxon **79**
2.3. Estructura general de BpAXE **83**
2.4. Unión de paraoxon en BpAXE **86**
2.5. Especificidad de sustrato, función de la Tyr206 **88**

3. **Discusión** **89**

Capítulo V. Una nueva técnica en la producción de CLEAs. Aplicación en la síntesis de intermediarios β-lactámicos. **94**

1. **Introducción** **96**
2. **Resultados** **97**
2.1. Optimización de la producción de CLEAs **97**
2.1.1. Expresión y purificación de BpAXE 97
2.1.2. Ensayos preliminares 97
2.1.3. Estructura de los agregados 100
2.1.4. Efecto de la agitación y el tamaño de partículas 102

2.2. Escalado en la producción **105**
2.3. Estabilidad de las CLEAs **105**
2.4. CLEAs en la síntesis de intermedios β-lactámicos **107**
2.5. Reutilización de las CLEAs en reactor **109**

3. Conclusiones 110

Capítulo VI. Clonación y caracterización de una carboxilesterasa eucariótica de *Yarrowia lipolytica* CLIB122. 112

1. Introducción 114
2. Resultados 115
   - 2.1. Elección del gen de *Yarrowia lipolytica* CLIB122 115
   - 2.2. Clonación del gen XM503610 en diferentes vectores 117
   - 2.3. Expresión de YICE recombinante en diferentes sistemas de expresión 118
     - 2.3.1. Expresión de YICE en *Pichia pastoris* GS115 118
     - 2.3.2. Expresión y purificación de YICE recombinante en *E. coli* Rosetta (DE3)pLys 122
   - 2.4. Caracterización enzimática de la enzima recombinante 123
     - 2.4.1. Actividades en los sistemas de expresión 123
     - 2.4.2. Parámetros cinéticos sobre esteres de *p*-nitrofenilo 125
     - 2.4.3. Parámetros cinéticos sobre sustratos con aplicación industrial 125
     - 2.4.4. Estabilidad enzimática 129
   - 2.5. Estructura de YICE 130
3. Conclusiones 135

Capítulo VII. La caracterización de una carboxilesterasa termoestable de *Geobacillus kaustophilus* HTA426, indica la existencia de una nueva familia de carboxilesterasas. 138

1. Introducción 140
2. Resultados 141
   - 2.1. Secuencia de aminoácidos 141
   - 2.2. Clonación del gen, expresión y purificación enzimática 142
   - 2.3. Caracterización enzimática de la enzima recombinante 146
     - 2.3.1. Parámetros cinéticos 146
       - 2.3.1.1. Ésteres de *p*-nitrofenilo 146
       - 2.3.1.2. Sustratos con aplicación industrial 149
     - 2.3.2. Estabilidad enzimática 149
     - 2.3.3. Estudios de inhibición 153

2.4. Determinación de la estructura molecular 154

3. Discusión 157
4. Conclusiones 160

Capítulo VIII. Propiedades esteroespecíficas de una carboxilesterasa de *Bacillus halodurans* C125. Profundización en las características moleculares de la nueva familia de carboxilesterasas de la familia *Bacillaceae*. 162

1. Introducción 164
2. Resultados 166
   - 2.1. Secuencia de aminoácidos 166
   - 2.2. Expresión y purificación de BhCE recombinante 168
   - 2.3. Caracterización enzimática de la enzima recombinante 170
     - 2.3.1. Parámetros cinéticos 170
     - 2.3.2. Efecto de los iones 175
     - 2.3.3. Efecto de inhibidores 175
     - 2.3.4. Efecto de diferentes compuestos desnaturalizantes 176
   - 2.4. Complejos Ketoprofeno metil ester-Ciclodextrinas 177
   - 2.5. Determinación de la estructura molecular 180
3. Discusión 184
4. Conclusiones 190

Capítulo IX. Discusión general. 192

1. Acetil xilan esterasas: estructura e inhibición 194
2. Inmovilización enzimática de BpAXE 198
3. Compuestos ópticamente puros y carboxilesterasas 200

Capítulo X. Resumen en Inglés- English version. 206

1. Introduction 208
   - 1.1. α/β hydrolases 208
   - 1.2. Classification of α/β hydrolases 210
   - 1.3. Industrial production of α/β hydrolases 211
   - 1.4. Acetyl Xylan Esterases (AXEs) 213
   - 1.5. Carboxylesterases 213

2. Objectives 213
3. Materials and Methods 214
3.1. Biochemicals 214
3.2. Microorganisms and plasmids 214
3.3. Protein expression in *E. coli* 214
3.4. Protein expression in *P. pastoris* 215
3.5. Protein preparation for purification 215
3.6. Enzyme assays 215
3.7. Enzyme stability 216
3.8. HPLC analysis 216
3.9. Protein analysis 217
3.10. Sequence analysis and structure homologies 218
3.11. BpAXE crystallization 218
3.12. CLEAs production 219
3.13. Inclusion complexes of (R, S) ketoprofen methyl ester with HP-β-cyclodextrins 219
220

4. Results and Discussion 220
4.1. Molecular basis for the structural and kinetic acetyl xylan esterases by paraoxon 220
4.2. Cross-linked enzyme aggregates for the production of desacetyl β-lactam antibiotics intermediates 224
4.3. Cloning and characterization of a carboxylesterase from *Yarrowia lipolytica* CLIB122 226
4.4. Characterization of a new *Geobacillus kaustophilus* HTA426 carboxylesterase 228
4.5. New molecular insights in the carboxylesterase family obtained from the characterization of *Bacillus halodurans* C125 carboxylesterase. 231

5. Conclusions 233

Capítulo XI. Bibliografía. **236**

Introducción General

1. α/β hidrolasas

Las α/β hidrolasas constituyen una de las superfamilias más amplias y extendidas de la naturaleza. Todas las proteínas de este grupo comparten una estructura terciaria similar, un plegamiento de hebras β y hélices α común, denominado el "α/β *fold*" o sándwich α/β/α.

En 1992, Ollis y col. definieron esta superfamilia compuesta inicialmente por cinco clases de enzimas hidrolíticas: serin-carboxipeptidasas, acetilcolinesterasas, lipasas, dienelactona hidrolasas y haloalcano dehalogenasas. A pesar de no presentar una homología significativa, estas proteínas compartían una misma estructura molecular y localización del centro activo. Durante la evolución no se conservó la secuencia de aminoácidos, aunque sí que se mantuvo una arquitectura similar, lo cual hizo pensar que estos grupos de proteínas con funciones catalíticas muy diversas podrían derivar de un ancestro común (Ollis y col., 1992).

Desde aquella primera definición de superfamilia α/β hidrolasa, nuevas proteínas de topología similar, aunque con funciones diferentes han sido incluidas. La flexibilidad catalítica de esta estructura terciaria es inmensa, enzimas como carboxilesterasas, tioesterasas, haloperoxidasas, epóxido hidrolasas, acetil xilan esterasas y otras muchas forman parte de la superfamilia de α/β hidrolasas (Renault y col., 2005). En 1994, y debido a la necesidad de clasificar la superfamilia, se creó la base de datos "ESTHER" (EST de esterasas, H de α/β hidrolasas, ER de "*relative enzymes*", enzimas con ese plegamiento α/β y sus parientes, http://bioweb.ensam.inra.fr/esther) donde se publica toda la información relacionada con las α/β hidrolasas (genes, secuencias de proteínas, bioquímica, datos estructurales), y se relaciona para analizar su estructura-función (Hotelier y col., 2004).

1.1. Estructura de las α/β hidrolasas

1.1.1. Sándwich α/β/α

La arquitectura común en todas estas proteínas se denomina "*α/β hydrolase fold*" es decir, plegamiento α/β. Este se compone de una lámina β central compuesta generalmente por 7-8 hebras β, con la primera o la segunda antiparalela al resto, respectivamente (Nardini y Dijkstra, 1999) (Figura 1.1). Esta lámina β central se rodea de hélices α a ambos lados, formando el plegamiento clásico, conocido como sándwich α/β/α (Figura 1.1). Además, el orden de esas hebras β se repite (12435678), y no siempre es una estructura central plana sino

que las hebras pueden ir girando, llegando incluso a formar un ángulo de 90° entre ellas (Figura 1.2 B).

Las enzimas de esta superfamilia presentan masas moleculares entre 25 y 65 kDa, además de una amplia variedad de propiedades fisicoquímicas.

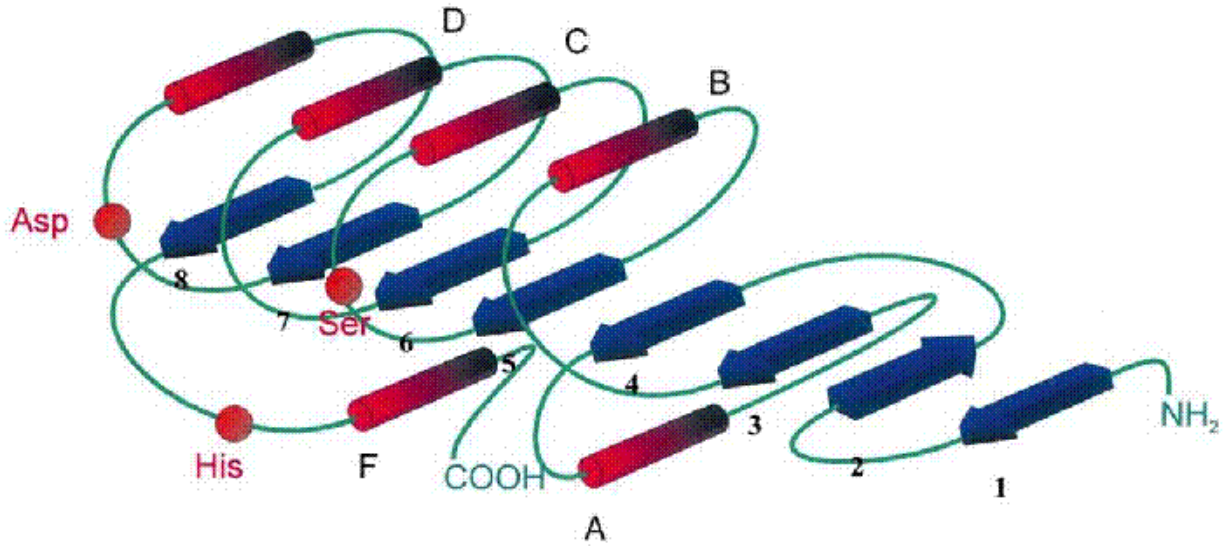


Figura 1.1: Representación esquemática del sándwich α/β/α de la superfamila de α/β hidrolasas. Se representan ocho hebras β en forma de flechas azules con la segunda antiparalela al resto. Los cilindros rojos representan hélices α (A-F). También se muestran los aminoácidos del centro activo de estas enzimas como círculos rojos (Ser-His-Asp), localizados siempre entre hebras β y hélices α (*loops*) (Bornscheuer, 2002a).

1.1.2. Centro activo

Los aminoácidos del centro activo forman una triada catalítica compuesta por un nucleófilo-aminoácido ácido-His (siempre en este orden en la secuencia primaria de la proteína), y se localizan en las zonas más conservadas del sándwich α/β/α, los bucles o *loops* que separan hebras β de hélices α. Generalmente, el nucleófilo (Ser, Cys o Asp) se sitúa después de la hebra β5, el residuo ácido tras la β7 y, la siempre presente histidina, se localiza tras la última hebra β (Figura 1.1 y 1.3).

Se trata generalmente de la triada: Serina-Histidina-Aspártico o Glutámico (Ollis y col., 1992), aunque en las epóxido hidrolasas y haloalcano dehalogenasas, la serina que actúa como nucleófilo, es remplazada por otro aspártico (Bugg, 2004). A su vez, el aspártico (aminoácido ácido) puede reemplazarse por un glutámico en algunas lipasas o esterasas (Mancheño y col., 2003). Este aminoácido ácido se sitúa en el *loop* posterior a la hebra β7 y favorece la formación de puentes de hidrógeno que estabilizan la triada catalítica. La histidina es el único aminoácido de la triada presente en todas las α/β hidrolasas, aunque la longitud del *loop* en el que se encuentra varía mucho entre enzimas.

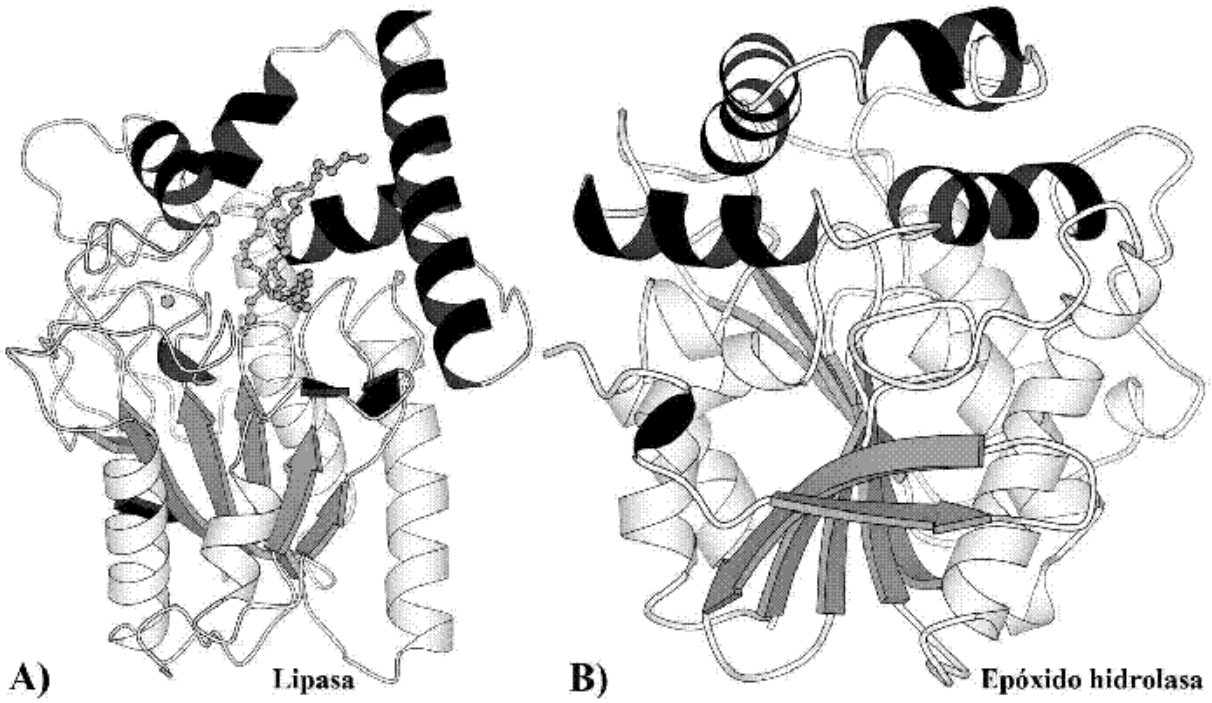


Figura 1.2: Estructura tridimensional de A) Lipasa de *Pseudomonas aeruginosa* (código PDB: 1EX9). B) Epóxido hidrolasa de *Agrobacterium radiobacter* (código PDB: 1EHY). En ambas se representan las hélices α y hebras β del sándwich α/β/α. Las caperuzas se representan en negro (Nardini y Dijkstra, 1999).

Otra característica es la presencia de una secuencia consenso alrededor del aminoácido nucleófilo: Gly-X-Nucleófilo-X-Gly que define la formación de un codo nucleofílico en la estructura, "*nucleophilic elbow*", debido a la formación de un giro β entre la hebra β5 y la siguiente hélice α (Holmquist, 2000). Se ha comentado también que la disposición del codo nucleofílico contribuye a la formación de un sitio de unión para el oxianión, necesario para estabilizar el intermediario con carga negativa que se produce durante la hidrólisis (Nardini y Dijkstra, 1999).

Este centro activo está presente también en otras 3 grandes superfamilias: serin-proteasas, cistein-proteasas y subtilisinas, aunque no presentan la misma estructura terciaria (Holmquist, 2000). Antes de que se definiera la superfamilia de α/β hidrolasas, Brady y col. (1990) llamaron a la triada de una lipasa, "imagen especular" de la triada de las serin-proteasas a pesar de sustituir el aspártico por un glutámico, se trata pues de un centro activo presente también en otras superfamilias, aunque, evidentemente, la topología es muy diferente.

1.1.3. Propiedades catalíticas

El sándwich α/β/α constituye un ejemplo de estructura terciaria básica que ha evolucionado para dar diferentes funciones catalíticas. Se estudió cómo estas enzimas con especificidad tan diversa, poseían los mismos aminoácidos catalíticos en unas posiciones conservadas, y que les permitían atacar eficazmente sustratos de diferente composición química o propiedad fisicoquímica (Heikinheimo y col., 1999), para finalmente deducir que la especificidad no depende de la triada sino de otros dominios estructurales presentes en las enzimas y que definen el sitio de unión a sustrato (Heikinheimo y col., 1999).

Así pues, alrededor de esta triada estable, y generalmente, en el extremo C-terminal de las hebras β3, β4, β6, β7 o β8 (antes o después de la hélice αF) se insertan diversos tipos de estructuras que van desde cortas secuencias de aminoácidos que definen un túnel, a caperuzas con importantes funciones en la especificidad de sustrato o dominios de unión que regulan el acceso al centro activo (Qian y col., 2007). Estos dominios variables se localizan cerca del centro activo de la proteína, a veces forman parte del esqueleto de la enzima y otras forman dominios adicionales. Estas estructuras constituyen la base de la amplia variedad de especificidad de esta superfamilia.

Por ejemplo, las serin-carboxipeptidasas presentan una inserción de dos hebras β entre las β7 y β8, con la primera, β9, antiparalela al resto. La antigua β8 ahora es la β10. Estas nuevas hebras se han insertado durante la evolución en el esqueleto de la proteína, es decir no suponen un dominio nuevo, al menos en este caso, sino una elongación de la lámina β central que pasa de tener 8 a 10 hebras β.

Las lipasas, sin embargo, sí presentan un dominio que rodea la triada catalítica de la proteína, formado por una caperuza hidrofóbica (*lid*), que se relaciona con el fenómeno de activación interfacial cuando actúa sobre lípidos (Aloulou y col., 2006). En las lipasas, la actividad catalítica se encuentra directamente relacionada con el área de contacto de sustrato y no con su concentración (Reis y col., 2009). Existen varias hipótesis que explican este fenómeno, aunque la más apoyada, es la que le otorga esta propiedad al dominio hidrofóbico móvil (*lid* o caperuza) cercano al centro catalítico. Sólo en presencia de una mínima concentración de sustrato o de un disolvente orgánico soluble en agua se produciría el desplazamiento de la caperuza, permitiendo al sustrato acceder al centro activo (Barbe y col., 2009) (Figura 1.2 A). Otras enzimas como las epóxido hidrolasas también presentan una caperuza que rodea el centro activo (Figura 1.2 B).

Otras caperuzas, algo más pequeñas y de estructura variable, están también presentes en algunas carboxilesterasas (CE) sin activación interfacial, como es el caso de la Brefeldina A Esterasa (BFAE) de *B. subtilis* (código PDB: 1JKM), que hidroliza la potente toxina fúngica: Brefeldina A (Wei y col., 1999). Esta caperuza se

compone de cinco hélices α, 2 en el extremo N-terminal de la proteína y 3 que siguen a la hebra β6 (Figura 1.3 A). Otro caso es la CE de *Pseudomonas fluorescens* (código PDB: 1AUO), se compone de cuatro pequeñas hebras β al final de la β2 (Figura 1.3 B y 1.4), donde la caperuza podría estar implicada en la especificidad de sustrato de la enzima (Kim y col., 1997). Sin embargo, en otras α/β hidrolasas como las Acetil Xilan Esterasas (AXEs, EC 3.1.1.72) y cutinasas (EC 3.1.1.74) nunca se ha descrito caperuza alguna (Ghosh y col., 1999), su estructura se compone únicamente del clásico sándwich α/β/α.

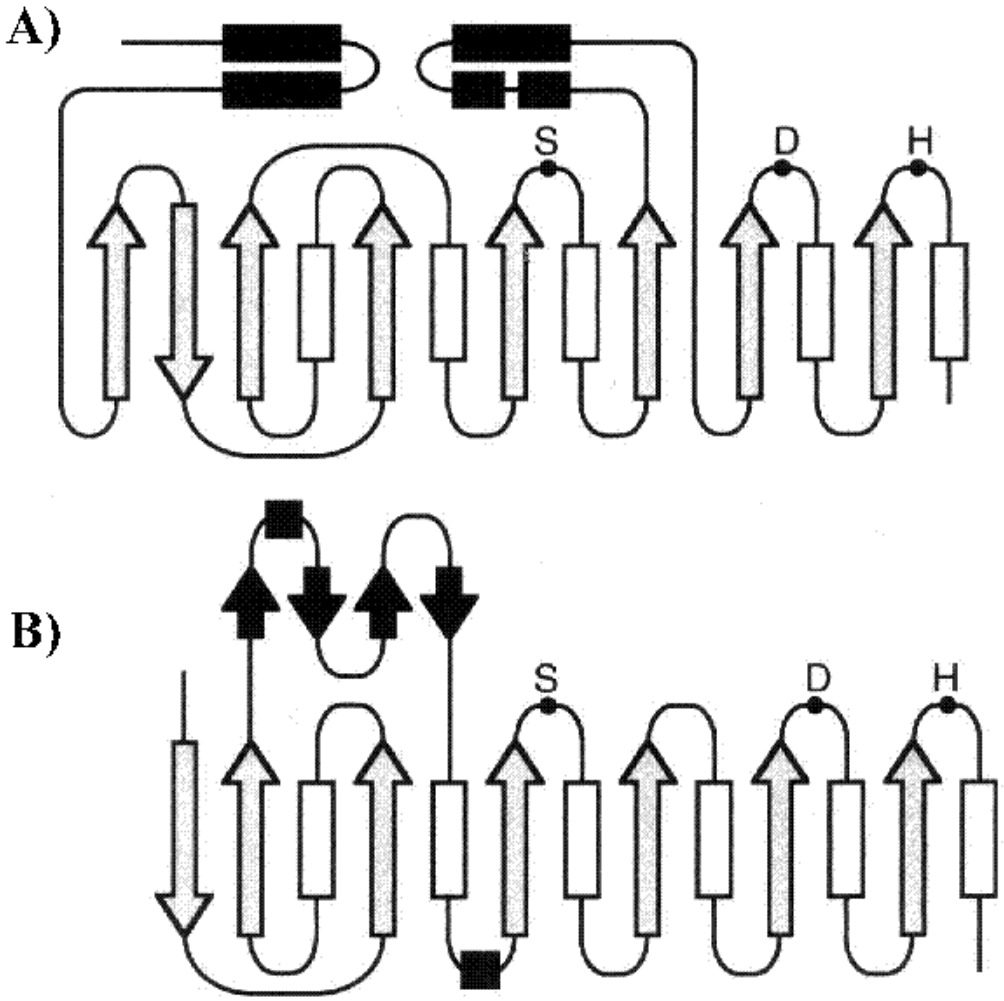


Figura 1.3: Variedad estructural dentro de la superfamilia α/β hidrolasas, y dentro de la subfamilia de las esterasas. Diagramas topológicos de dos carboxilesterasas cristalizadas recientemente. Las hélices α y hebras β adoptan el clásico plegamiento α/β, se representan con rectángulos y flechas blancas, respectivamente. Se señalan además los aminoácidos del centro activo con puntos negros, siempre en los *loops* entre hebras β y hélices α. Las estructuras negras representan hebras β y hélices α que forman las caperuzas. (A) Brefeldin A Esterasa de *B. subtilis*. (B) Carboxilesterasa de *Pseudomonas fluorescens* (Nardini y Dijkstra, 1999).

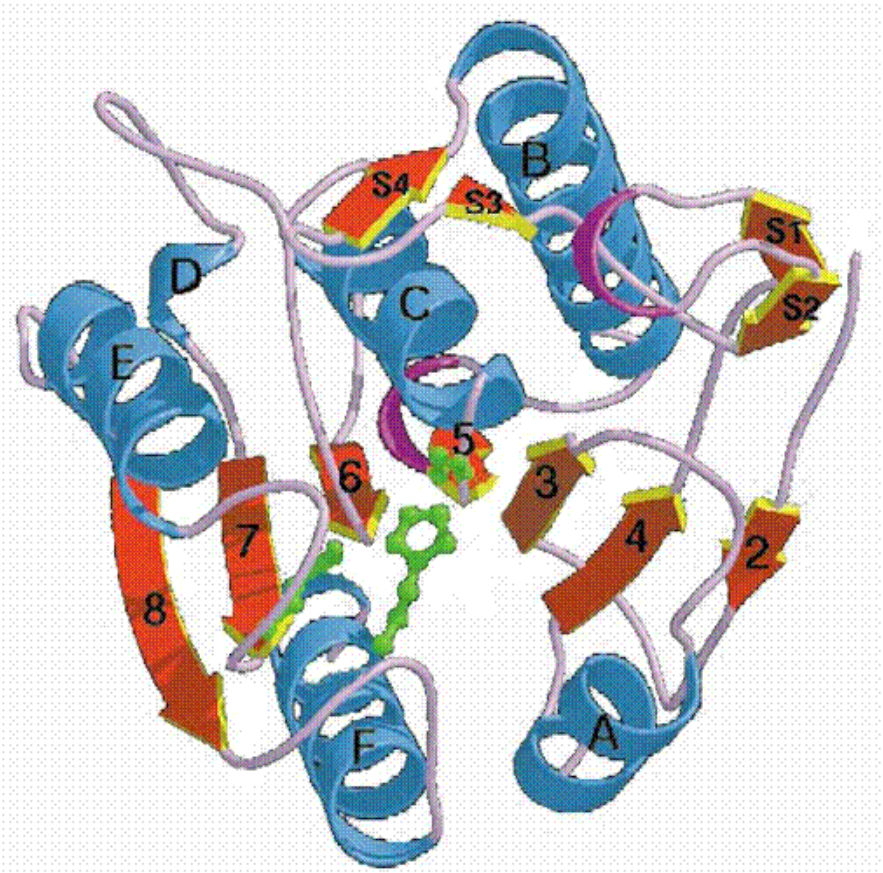


Figura 1.4: Estructura de una subunidad de la carboxilesterasa de *P. fluorescens*. En el centro se observan los aminoácidos del centro activo (verde). Se representan las siete hebras β (ha perdido la primera) del núcleo α/β en forma de flechas, mientras que las hélices α (A-F) se representan en azul. También se observan las cuatro hebras β que forman la pequeña caperuza de esta enzima (S1-S4), en la zona más externa (Kim y col., 1997).

1.2. Clasificación de las α/β hidrolasas

La enorme cantidad de información sobre secuencias génicas, proteicas e incluso la resolución de estructuras tridimensionales tras la cristalización y estudio con rayos X recogidas en la base de datos ESTHER, ha permitido un mayor conocimiento de la relación estructura-función de las α/β hidrolasas. Otras bases de datos recogen también esta estructura básica que define la superfamilia α/β hidrolasas:

- CAZy (*Carbohydrate Active Enzymes*): describe las familias de enzimas implicadas en la degradación o modificaciones de uniones glicosídicas, entre las que se encuentran las acetil xilan esterasas o las Ramnogalacturonan esterasas (RGAEs) (http://www.cazy.org/) (Cantarel y col., 2009).

- SCOP (*Structural Classification of Proteins*): (http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/) incluye una clasificación de α/β hidrolasas similar a la de ESTHER (Andreeva y col., 2004).
- CATH: es una clasificación de dominios estructurales de proteínas: *Class (C), Architecture (A), Topology (T) and Homologous superfamily (H)* (http://www.cathdb.info/) (Cuff y col., 2008).
- LED (*Lipase Engineering Database*): combina secuencias, estructuras y caracterización de lipasas, esterasas y otras enzimas con la misma topología (http://www.led.uni-stuttgart.de/). Agrupa familias en base a su homología identificando "*specific motifs*" para cada una de ellas (Fisher y Pleis, 2003).
- MELDB (*Microbial Esterase and Lipase Database*): agrupa más de 800 secuencias, también en función de la similitud en la secuencia de aminoácidos. Se dividen esterasas verdaderas y lipasas (http://www.gem.re.kr/meldb/inter.html) (Kang y col., 2006).

De acuerdo con ESTHER, la superfamilia de α/β hidrolasas comprende 17653 secuencias que se dividen en tres subclases (C, L y H), clasificadas en función de las secuencias o dominios conservados, también llamados "*specific motifs*".

Además, existe una cuarta subclase que no presenta homología alguna entre sus miembros, pero sus estructuras terciarias pueden superponerse unas con otras, por lo que podrían derivar de ancestros comunes (subclase X) (Renault y col., 2005).

Tabla 1.1: Clasificación de las α/β hidrolasas en cuatro subclases (C, H, L y X), que a su vez se dividen en subfamilias de proteínas con funciones diferentes pero siempre de estructura similar. Se han incluido las más características de entre las 91 subfamilias que existen.

SUBCLASE C	
Carboxilesterasas	Acetilcolinesterasas
Esterasa hormona juvenil	Tiroglobulina
Neuro, Glu y Gliotactina	Neuroligina

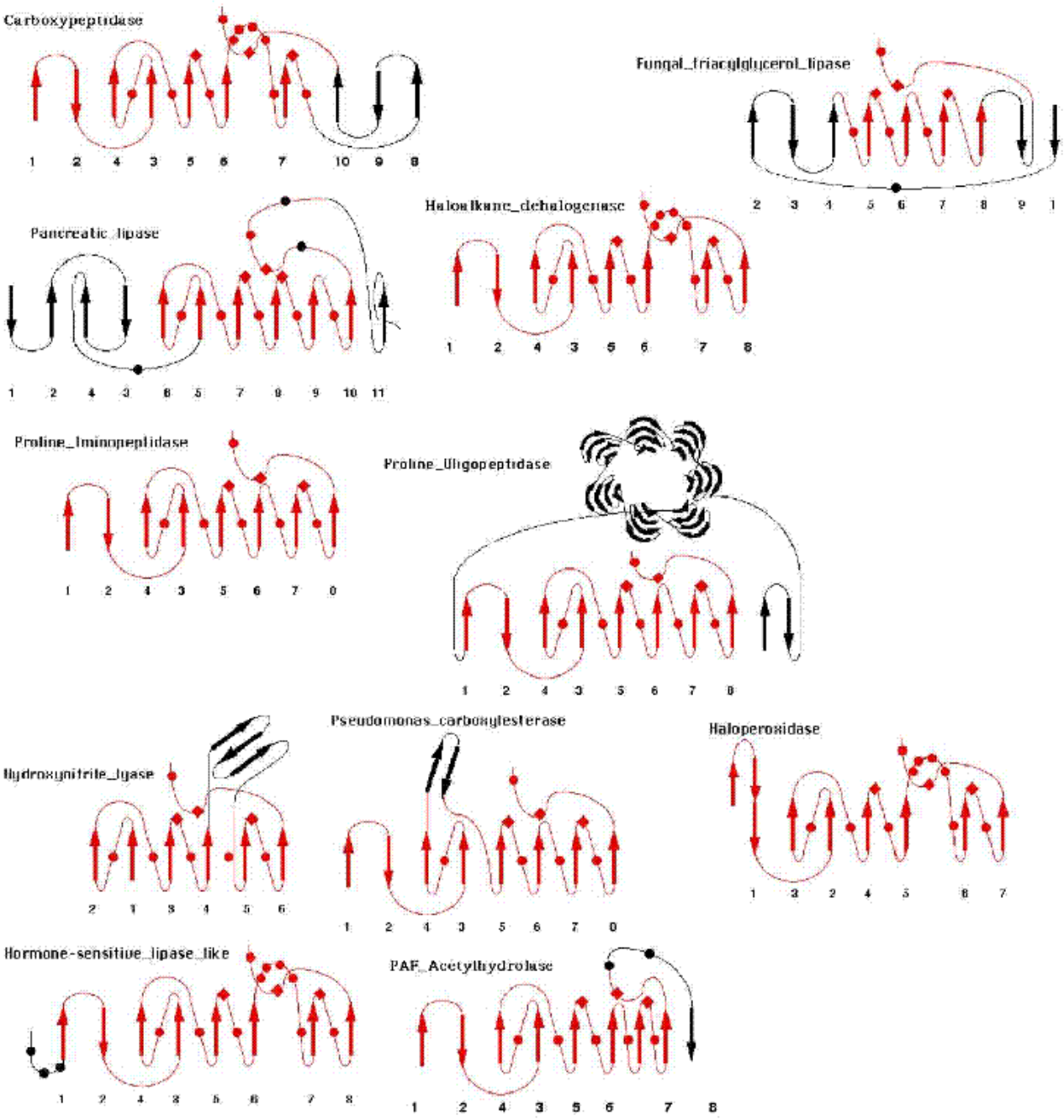
SUBCLASE H
Familia similar a la Lipasa Sensible a Hormonas (HSL)

SUBCLASE L	
Lipasas pancreática y hepática	Fosfolipasas
PAF-acetilhidrolasas	Lipasas tipo 3
Clorofilasas	

SUBCLASE X	
Acetil Xilan Esterasas (AXEs)	Lisofosfolipasas
Lipasas tipo 2	Cutinasas
Tioesterasas	Hidroxinitrilo liasas
Polihidroxibutirato depolimerasas	Antígeno micobacteriano 85C
Cocaína esterasas	Haloperoxidasas
Dienelactona hidrolasas	Epóxido hidrolasas
Haloalcano dehalogenasas	Prolil iminopeptidasas
Serin-carboxipeptidasas	Prolil endopeptidasasas
Proteína BioH (Biosíntesis de biotina)	Homoserina transacetilasas
2-hidroxi-6-oxo-6-fenilhexa-2,4-dienoato hidrolasas (BPHD)	Carboximetilbutenolido-lactonasas

En total se han definido 91 subfamilias compuestas por estas proteínas, de las cuales 227 han sido ya cristalizadas y su estructura tridimensional está disponible en la base de datos, *Protein Data Bank* (http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do). No todas las proteínas de esta superfamilia son enzimas, la neurolignina (relacionada con el autismo), neurotactina, glutactina, gliotactina y tiroglobulina también comparten esta estructura terciaria básica aunque, como es de esperar, han perdido como mínimo la serina del centro activo, y como máximo la triada completa (Soreq y Seidman, 2001).

La Figura 1.5 presenta la topología de 19 de estas 91 subfamilias. Se observa en todas ellas el típico sándwich α/β/α o "α/β *hydrolase fold*" marcado en rojo, además de esa estructura hidrolítica clásica, se añaden a cada tipo de enzima otros dominios (en negro) que determinan las diferentes especificidades.


Carboxypeptidase
1 2 4 3 5 6 7 10 9 8
Fungal_triacylglycerol_lipase
2 3 4 5 6 7 8 9 1
Pancreatic_lipase
1 2 4 3 6 5 7 8 9 10 11
Haloalkane_dehalogenase
1 2 4 3 5 6 7 8
Proline_Iminopeptidase
1 2 4 3 5 6 7 8
Proline_Oligopeptidase
1 2 4 3 5 6 7 8
Pseudomonas_carboxylesterase
1 2 4 3 5 6 7 8
Haloperoxidase
1 3 2 4 5 8 7
Hydroxynitrile_lyase
2 1 3 4 5 6
Hormone-sensitive_lipase_like
1 2 4 3 5 6 7 8
PAF_Acetylhydrolase
1 2 4 3 5 6 7 8

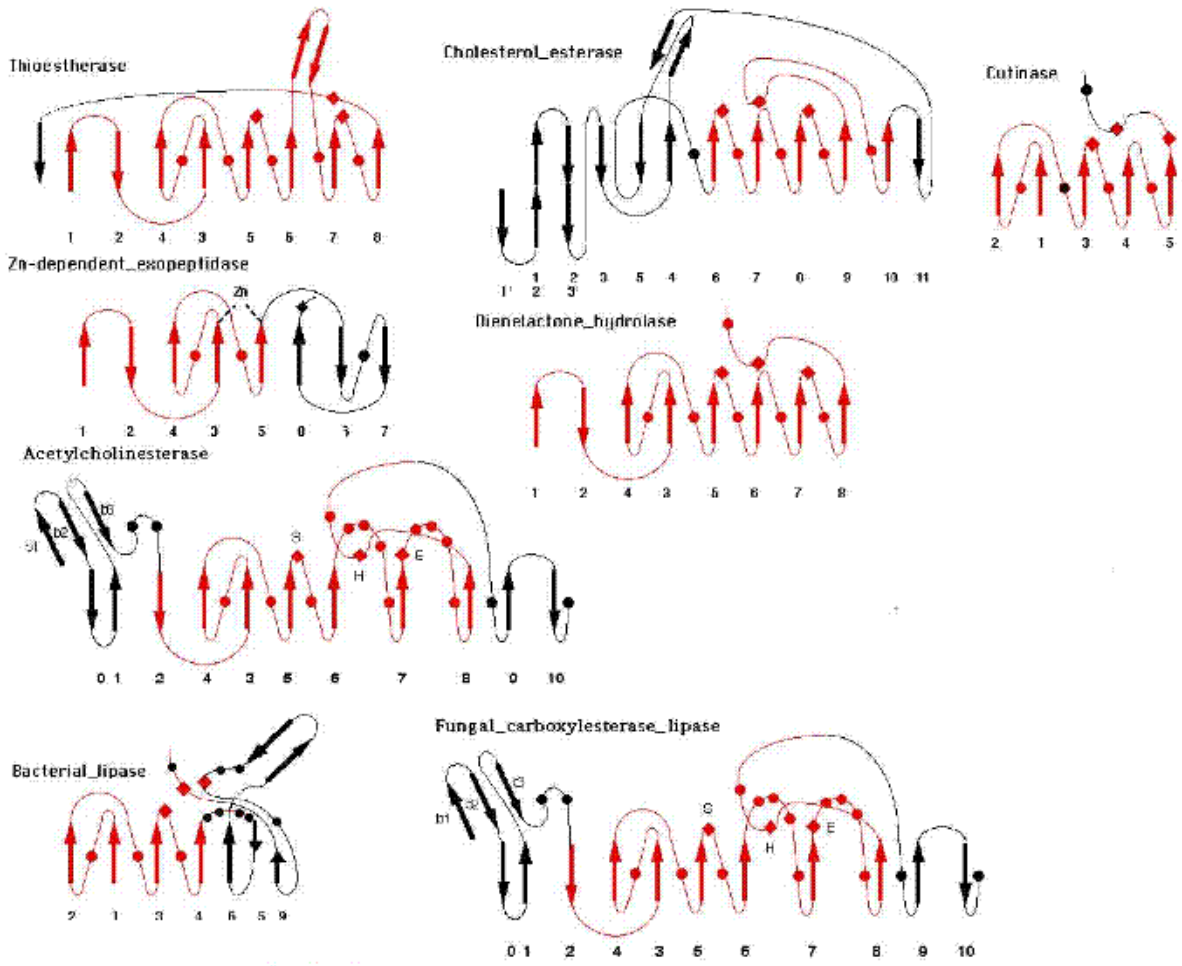


Figura 1.5: Variedad estructural dentro de la superfamilia α/β hidrolasas. Diagramas topológicos de 19 estructuras cristalizadas. Las hélices α y hebras β que siguen el clásico plegamiento α/β, se representan con círculos y flechas rojas, respectivamente. Las estructuras negras representan hebras β y hélices α que forman dominios diferentes para cada proteína. Los cuadraditos rojos representan los aminoácidos de la triada catalítica, siempre en zonas muy conservadas de las estructuras (ESTHER *database*).

1.3. Propiedades de las α/β hidrolasas

Debido a la extensa variedad de proteínas agrupadas en esta superfamilia, las α/β hidrolasas presentan actividades enzimáticas y funciones biológicas muy diversas.

Las haloalcano dehalogenasas (Jesenská y col., 2009) y epóxido hidrolasas (Johansson y col., 2005) son enzimas detoxificantes que presentan un aspártico en el lugar de la serina catalítica, y llevan a cabo el ataque nucleofílico de sustratos haloalcanos y epóxidos, respectivamente. Otras enzimas catalizan la hidrólisis de péptidos, como las prolil oligopeptidasas (Rea y Fülöp, 2006) o las serin-carboxipeptidasas (Korza y Bochtler, 2005). Las dienelactona hidrolasas degradan compuestos aromáticos (Park y col., 2007). Sin embargo, la gran mayoría de los

miembros de esta superfamilia son esterasas o lipasas que catalizan la hidrólisis y síntesis de enlaces éster, dependiendo de la termodinámica del sistema (Figura 1.6). Por ejemplo, las acetilcolinesterasas (AchEs) catalizan la ruptura del neurotransmisor acetilcolina (Ach) en acético y colina (Soreq y Seidman, 2001), mientras que las tioesterasas están implicadas en procesos bioquímicos como la bioluminescencia (Li y col., 2000).

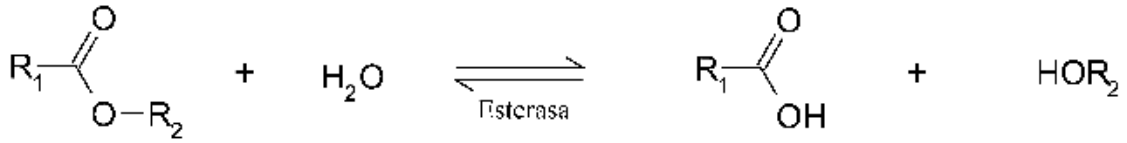


Figura 1.6: Síntesis e hidrólisis enzimática de un enlace éster (unión entre un ácido y un alcohol).

1.4. Producción industrial de α/β hidrolasas

De entre todas las proteínas pertenecientes a la superfamilia α/β hidrolasa, muy pocas han sido expresadas de cara a una producción industrial, entre las que destacan lipasas, proteasas y, en menor medida, esterasas.

1.4.1. Lipasas

Las lipasas (EC 3.1.1.3) constituyen un grupo muy versátil de α/β hidrolasas debido a la gran cantidad de reacciones que catalizan y, por tanto, son potencialmente aplicables en la industria (Tabla 1.2). De forma general, hidrolizan los enlaces éster de los triglicéridos, produciendo ácidos grasos libres, monoglicéridos, diglicéridos y glicerol (Schmid y Verger, 1998; Gupta y col., 2004). La mayoría de estas enzimas son extracelulares, secretadas por los microorganismos con el fin de hidrolizar lípidos y asimilar el producto para su crecimiento. Se han descrito lipasas de diferentes masas moleculares, desde 19 hasta 60 kDa para la lipasa de *Candida rugosa* (Turner y col., 2001) y representan el grupo de enzimas más grande de las α/β hidrolasas (Holmquist, 2000). Cuando el sustrato se encuentra diluido en soluciones acuosas, las lipasas presentan muy baja actividad, sin embargo, conforme aumenta la concentración de sustrato, aumenta la actividad hidrolítica de la enzima. Este fenómeno se conoce como activación interfacial, y está asociado con cambios en la ordenación de la caperuza que protege el centro activo de estas proteínas, permitiendo así el acceso del sustrato. De hecho, recientemente se ha descrito que sólo cuando la caperuza (lid) de la lipasa se encuentra totalmente abierta, los aminoácidos catalíticos adoptan las posiciones adecuadas para la catálisis (Ericsson y col., 2008).

Fueron las primeras α/β hidrolasas en expresarse y comercializarse, y hoy en día, constituyen las principales enzimas comerciales en biotecnología (Tabla 1.3) (Jaeger y col., 1999; Jaeger y Eggert, 2002).

Tabla 1.2: Aplicaciones de lipasas en la industria (Gupta y col., 2004).

Industria	Acción
Detergentes	Eliminar las grasas
Alimentos lácteos	Hidrólisis de grasa de leche, quesos...
Alimentos de panadería	Mejora del sabor
Embutidos	Mejora del aroma
Aderezos	Mejora de la calidad
Alimentos saludables	Transesterificación
Carnes y pescados	Desarrollo del sabor
Grasas y aceites	Transesterificación, hidrólisis, para dar margarinas
Industria farmacéutica	Hidrólisis enantioselectivas, transesterificaciones
Cosmética	Síntesis de emulsificadores, humectantes
Papel	Papel de mejor calidad

Tabla 1.3: Lipasas comerciales (Jaeger y col., 1999).

Lipasa comercial	Fuente	Empresa	Aplicación	Referencia
Lumafast	*Pseudomonas menodocina*	Genencor, USA	Detergentes	Jaeger y col., 1999
Lipomax	*P. alcaligenes*	Gist-Brocades, Holanda	Detergentes	Jaeger y col., 1999
Lipasa AH	*P. cepacia*	Amano Pharmaceuticals, Japón	Síntesis orgánica	Jaeger y col., 1999
Greasex	Desconocido	Novozymes, Dinamarca	Tratamiento de pieles	Godfrey y West, 1996
Combizyme 23P (proteasa y lipasa)	Desconocido	Meito Sankyo, Japón	Tratamiento de deshechos	Godfrey y West, 1996
Lipasa 50P	*Chromobacterium viscosum*	Biocatalysts, UK	Biotransformaciones	Godfrey y West, 1996

1.4.2. Proteasas

Una proteasa (EC. 3.4.-.-) es cualquier enzima capaz de degradar proteínas, es decir que hidroliza los enlaces peptídicos que unen los aminoácidos dentro de una proteína. Se dividen en exopeptidasas (EC 3.4.11-19) y endopeptidasas (EC 3.4.21-99), dependiendo del punto de ruptura de la secuencia de aminoácidos. Estas proteasas se clasifican además en función del aminoácido del centro activo: serin- (EC 3.4.21.-), cisteín- (EC 3.4.22.-), aspártico- (EC 3.4.23.-) y metaloproteasas (EC 3.4.24.-).

Análogamente, la base de datos MEROPS (http://merops.sanger.ac.uk/) contiene información sobre peptidasas incluyendo secuencias, estructura, sustratos e inhibidores (Rawlings y col., 2008). Esta base de datos divide las familias en clanes, no en función de su homología sino por su estructura terciaria. De nuevo, se pensó que las enzimas de un clan derivaban de un ancestro común (Barrett y Rawlings, 2007). Aproximadamente el 2% de las proteínas son peptidasas, entre las cuales un tercio pertenecen a las serin-peptidasas. Las serin-peptidasas se dividen a su vez en 13 clanes entre los cuales, únicamente el clan SC, exhibe una topología propia de las α/β hidrolasas (Rea y Fülop, 2006).

El clan SC comprende serin-carboxipeptidasas (S10-S28), dipeptidil-peptidasas, prolil oligopeptidasas (S9) y prolil aminopeptidasas (S33). Estas enzimas presentan la triada catalítica típica de las α/β hidrolasas Ser-His-Asp, al igual que la quimotripsina (clan SA) y la subtilisina (clan SB), que también son serin-peptidasas pero presentan una topología diferente a las α/β hidrolasas (Rea y Fülop, 2006).

Estas enzimas fueron por primera vez utilizadas como aditivos de detergentes en 1914. Desde entonces, su uso ha crecido hasta suponer el 40% del mercado mundial de enzimas (Gupta y col., 2002). Se usan en el tratamiento de pieles, fabricación de pan, detergentes, para ablandar carne, e incluso síntesis de péptidos con interés farmacéutico (Kumar y Bhalla, 2004; Kumar y col., 2005; Kumar y col., 2008) (Tabla 1.4).

Hoy en día, las grandes multinacionales productoras de enzimas distribuyen esencialmente serin-peptidasas, activas sobre todo a pH neutros-alcalinos, y procedentes del género *Bacillus sp*. (Tabla 1.5), ya que estos microorganismos producen proteasas extracelulares, lo cual facilita su purificación. La proteasa más vendida y estudiada es, sin duda, la subtilisina (Glowacka y col., 2005; Araújo y col., 2009), indispensable en cualquier detergente comercial y patentada por *Novozymes* (Drenth y col., 2005) y *Genencor* (Chan y col., 2005). Estas empresas distribuyen el 95% de las proteasas.

Lo cierto es que sólo las serin-proteasas, alcalófilas, son aplicables a la industria de detergentes, la papaína (una tiolproteasa) y metaloproteasas (como la termolisina), se oxidan o pierden sus cofactores en el agua.

Tabla 1.4: Aplicaciones de proteasas en la industria (Kumar y col., 2008).

Industria	Proteasa	Acción
Panadería	Proteasa neutra	Degrada el gluten del pan
Cárnica	Papaína y otras proteasa	Ablandar la carne
Medicina	Tripsina	Eliminar tejido muerto, limpieza de heridas
Textil	Tripsina y otras	Eliminar revestimientos
Limpieza en seco	Subtilisina	Eliminar manchas
Lavandería	Subtilisina, proteasas alcalinas	Detergentes

Tabla 1.5: Proteasas comerciales (Gupta y col., 2002).

Proteasa comercial	Fuente	Empresa	Aplicación
Novozyme 243 (subtilisina)	*Bacillus licheniformis*	Novozymes, Dinamarca	Detergentes
Ps. proteasa	*Pseudomonas aeruginosa*	Nagase Biochemicals, Japón	Detergentes
Purafact	*Bacillus lentus*	Genencor, USA	Detergentes
Nue	*Bacillus sp.*	Novozymes, Dinamarca	Tratamiento de pieles
Godo-Bap (subtilisina)	*B. licheniformis*	Godo Shusei, Japón	Alimentación
Novozyme 471MP	Desconocido	Novozymes, Dinamarca	Limpieza de dentaduras

Otras serin-carboxipeptidasas ácidas de levaduras también han sido clonadas (Liu y col., 2004a; Ramírez-Zavala y col., 2004; Yoshida y col., 2007), aunque su aplicación industrial es menor.

1.4.3. Esterasas

Entre la extensa lista de α/β hidrolasas, las esterasas (EC 3.1.1.-) serían las siguientes enzimas, tras lipasas y proteasas, con mayor número de aplicaciones industriales. Estas enzimas representan un amplio grupo de hidrolasas que catalizan la ruptura o formación de enlace éster, y se encuentran ampliamente distribuidas en todos los reinos de la naturaleza. Aunque no se conoce siempre su función biológica, parecen estar implicadas en rutas catabólicas que permiten el acceso a fuentes de carbono o rutas de detoxificación (Potter y Wadkins, 2006; Satoh y Hosokawa, 2006). Junto con las lipasas, constituyen el grupo de α/β hidrolasas más importante y más extendido. La variedad de esterasas es inmensa, incluyendo carboxilesterasas, tioesterasas, acetilcolinesterasas, colesterol esterasas…

Las lipasas se diferencian de las esterasas en la especificidad de sustrato, las primeras prefieren sustratos insolubles en agua (por el fenómeno de activación interfacial, ya comentado), con una cadena de ácidos grasos larga (>C_{12}) (Miled y col., 2001). Mientras que las esterasas hidrolizan esteres "simples", generalmente de cadena más corta (por ejemplo: etil acetato), menor de ocho carbonos (Bornscheuer, 2002a). Son enzimas altamente estereoespecíficas, y presentan una gran variedad de sustratos. La mayoría reconocen preferentemente un enantiómero antes que otro en una mezcla racémica de ácidos carboxílicos o ésteres (Bornscheuer y Kazlauskas, 1999; Bornscheuer, 2002b). Si a esto añadimos que no requieren cofactores, que son muy estables o incluso activas en disolventes orgánicos, se entiende por qué en la última década se han publicado más de 55000 artículos sobre ellas (*ScienceDirect*, http://www.sciencedirect.com/). Además en los últimos años, la estructura terciaria de varias de estas proteínas ha sido

dilucidada mediante cristalografía de rayos X, facilitando pues estrategias dirigidas de mutagénesis. Todos estos factores, hacen de las esterasas, enzimas con un gran potencial biotecnológico.

El *screening* de las esterasas se realiza fácilmente en el laboratorio mediante técnicas espectrofotométricas con ésteres de *p*-nitrofenilo, cuya hidrólisis da color amarillo medible a 405 nm. En este caso, las lipasas se distinguirían de las carboxilesterasas (CEs) por su patrón de especificidad de sustrato: mientras una lipasa hidroliza el *p*-NPPalmitato (la CE no lo hace), la CE hidrolizaría el *p*-NPAcetato (es muy raro que una lipasa pueda hidrolizarlo) (Figura 1.7). En la tabla siguiente se resumen las propiedades de ambas enzimas:

Tabla 1.6: Diferencias entre lipasas y esterasas verdaderas (carboxilesterasas).

Propiedades	***Lipasa***	***Esterasa***
Sustratos preferidos	Triacilglicéridos de cadena larga o alcoholes secundarios	Esteres simples y triacilglicéridos de cadena corta
Activación interfacial	Sí	No
Sustratos insolubles	Alta actividad	De baja a alta
Sustratos solubles	Baja	Alta
Enantioselectividad	Generalmente alta	De baja a alta
Estabilidad en solventes orgánicos	Alta	De alta a baja

A pesar de que en los últimos años muchas esterasas han sido clonadas, expresadas y caracterizadas, incluyendo enzimas de organismos extremófilos, como termófilos o alcalófilos (Nishimura y Inouye, 2000; Nicolet y col., 2003; Park y col., 2006; Hummel y col., 2007; Schmidt y col., 2007), estas enzimas siguen sin estar disponibles a nivel industrial. Por ello, profundizaremos más en este tipo de enzimas.

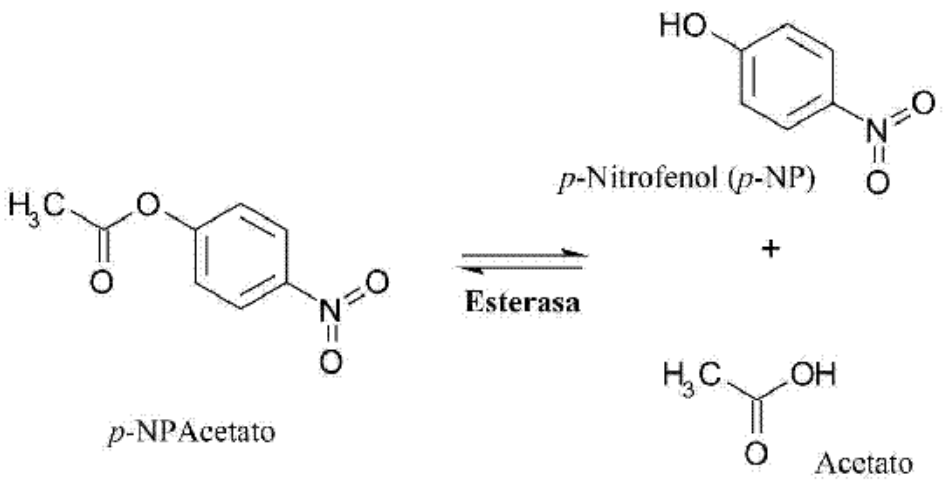


Figura 1.7: Sustrato (*p*-NPA) y productos de una reacción típica catalizada por una esterasa.

2. Esterasas

2.1. Clasificación de las esterasas

Las esterasas se dividen en varios grupos, dependiendo de sus propiedades catalíticas y estructurales. Así la IUBMB (*International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) estableció una clasificación oficial para las esterasas (NC-IUB, 1984), basada en la especificidad de sustrato (Aldridge, 1953; Main, 1960; Walker y Mackness, 1983) y la sensibilidad que presentan estas enzimas frente a determinados inhibidores. Esta clasificación dividió las esterasas en cuatro tipos:

- Aril esterasas (esterasas de tipo A, EC 3.1.1.2), hidrolizan ésteres aromáticos y organofosfatos (insecticidas) como el paraoxon (Figura 1.8), también llamadas paraoxonasas. Estas enzimas suelen requerir cofactores.
- Carboxilesterasas (esterasas de tipo B, serin-esterasas o esterasas verdaderas, EC 3.1.1.1), inhibidas por estos insecticidas pero hidrolizan ésteres aromáticos y alifáticos (amplia variedad de sustratos).
- Acetil esterasas (esterasas de tipo C, EC 3.1.1.6), hidrolizan ésteres de colina y también se inhiben por organofosfatos, además de por la Eserina.
- D-esterasas, resistentes a los organofosfatos pero sensibles a los agentes tioles alquilantes, Hg^{2+}.

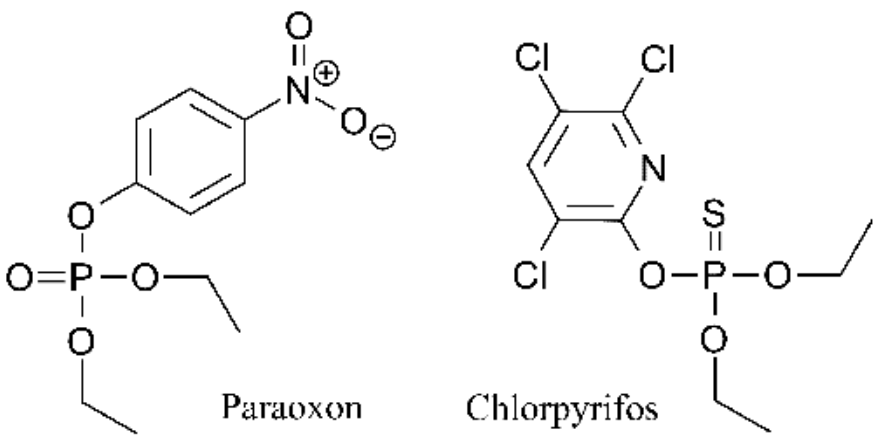


Figura 1.8: Fórmula de dos organofosfatos, paraoxon y chlorpirifos.

Algunos autores no aceptan la sensibilidad a organofosfatos u otros inhibidores como un criterio de clasificación oficial, aunque reconocen que aporta una información muy valiosa sobre el mecanismo de acción (Liederer y Borchardt, 2006).

Actualmente, la IUBMB clasifica las "*carboxilic ester hydrolases*" (esterasas, lipasas y otras enzimas) en más de 50 clases

(http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/0101a.html#311) que incluyen las cuatro clases anteriores más acetilcolinesterasas (EC 3.1.1.7), colinesterasas (EC 3.1.1.8), tropinesterasas (EC 3.1.1.10), pectinesterasas (EC 3.1.1.12), vitamina A esterasas (EC 3.1.1.12), esterol esterasas (EC 3.1.1.13), retinil-palmitato esterasas (EC 3.1.1.21), acetil xilan esterasas (EC 3.1.1.72)... siempre en función de su especificidad de sustrato (Walker, 1989). En la base de datos BRENDA (http://www.brenda-enzymes.info/), se pueden encontrar varios ejemplos de cada clase de esterasas. Sin embargo, también sería necesario clasificar estas enzimas en función de las secuencias de aminoácidos o incluso de la estructura terciaria de la proteína.

En 1999, Arpigny y Jaeger establecieron una nueva clasificación de enzimas lipolíticas entre las que se encuentran las carboxilesterasas. Como resultado, se obtuvieron ocho grandes familias (siempre dentro de la superfamilia α/β hidrolasas). Para esta clasificación, seleccionaron y clasificaron 53 secuencias de esterasas y lipasas, bacterianas y fúngicas, en base a su homología y, si se conocían, sus propiedades biológicas. Esta interesante configuración obedece la nomenclatura oficial establecida por la IUBMB pero separando lipasas de esterasas, y dividiéndolas en subfamilias tras realizar un extenso BLAST (alineamiento de secuencias). Así, Arpigny y Jaeger determinaron tres familias de carboxilesterasas (o esterasas verdaderas): Familia GDSL o familia II; la familia similar a la lipasa sensible a hormonas (HSL) o familia IV; y la familia VI. Sin embargo, en los últimos años han ido apareciendo nuevas familias de carboxilesterasas, no descritas en esta clasificación en base a su secuencia de aminoácidos y especificidad (de Pascale y col., 2008).

En resumen, la superfamilia α/β hidrolasa abarca un amplio grupo de enzimas con una estructura terciaria clásica, el plegamiento α/β hidrolasa, pero con diferencias básicas en especificidad de sustrato y secuencias proteicas. Ello combinado con la continua profundización en estas enzimas hace difícil la existencia de una única clasificación, sobre todo ahora con la secuenciación creciente de nuevos microorganismos y librerías metagenómicas.

2.2. Mecanismo de acción

El mecanismo de acción de las lipasas y esterasas es similar, ya que poseen la misma triada catalítica: serina, histidina y aspártico (o glutámico). La ruptura del enlace éster se realiza en cuatro etapas (Figura 1.9):

1) La serina activa actúa como nucleófilo atacando el carbono carboxílico del sustrato (éster), dando lugar a un intermediario tetraédrico

estabilizado por los residuos histidina y aspártico (o glutámico). Las glicinas del codo nucleofílico estabilizan también el oxianión formado.

2) Se libera el alcohol del compuesto, quedando el grupo ácido unido aún a la serina catalítica (acil enzima).
3) El ataque de una molécula de agua (hidrólisis propiamente dicha) vuelve a formar un nuevo intermediario tetraédrico.
4) La histidina actúa en la liberación de la parte ácida del sustrato, al transferir un protón al átomo de oxígeno de la serina, para dar el ácido. Entonces se libera de nuevo la enzima libre y activa.

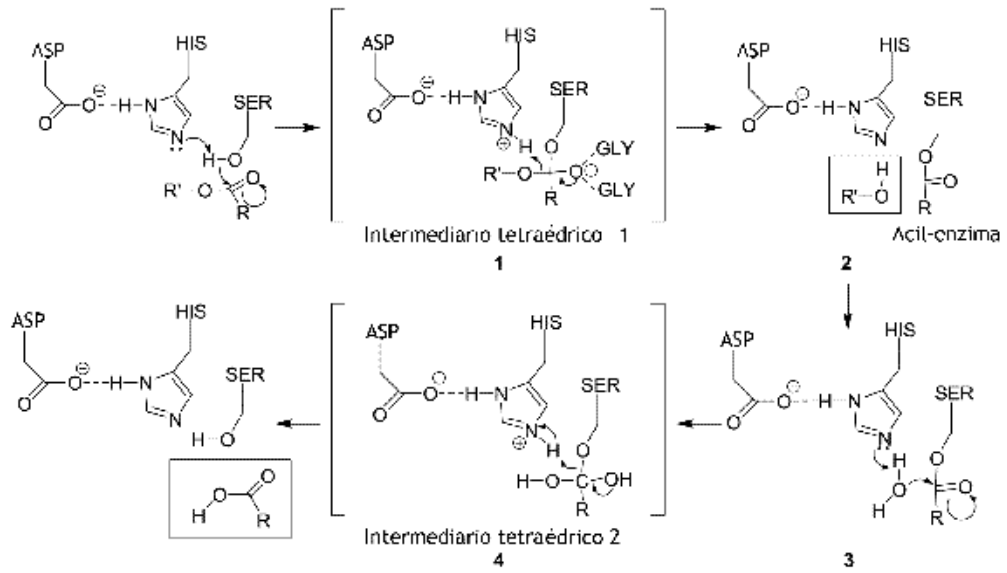


Figura 1.9: Ruptura de un enlace éster por una esterasa y/o lipasa. Se esquematizan las cuatro etapas descritas anteriormente (Bornscheuer, 2002a).

2.3. Acetil xilan esterasas

2.3.1. Estructura

La base de datos CAZy (http://www.cazy.org/) describe familias que degradan, modifican o crean uniones glicosídicas, así como los motivos de unión a carbohidratos de los mismos. La clasificación se ha realizado atendiendo a la homología y estructura de las enzimas o de sus motivos catalíticos. La superfamilia de Carbohidrato Esterasas (CE-) se compone actualmente 16 subfamilias, todas ellas presentan la triada catalítica típica de las esterasas: Ser-His-Asp/Glu. De entre estas 16 familias de carbohidrato esterasas, α/β hidrolasas como las Acetil xilan esterasas (AXEs) y cefalosporin deacetilasas (CAH) pertenecen a 8 de ellas (CE-1 a 7 y CE-12).

Las AXEs, al igual que el resto de las α/β hidrolasas, adoptan también el plegamiento α/β (Figura 1.10) pero, a diferencia de las carboxilesterasas son enzimas mucho más específicas, atacan sustratos más concretos (Liederer y Borchardt, 2005). Este hecho tiene una relación directa con diferencias a nivel del centro activo de la proteína. Comparando una carboxilesterasa y una AXE, la cavidad donde se inserta el sustrato, en esta última es mucho más pequeña y con menor número de aminoácidos hidrofóbicos capaces de interaccionar con él, además de no presentar caperuza que influya en la especificidad de sustrato (Liederer y Borchardt, 2005). Esto repercute en la eficacia catalítica de ambos tipos de esterasas para un mismo sustrato, al tener una garganta (del inglés "*gorge*") tan pequeña, el sustrato no puede moverse en el interior del centro activo, permitiendo entonces una mayor velocidad de liberación de producto en el caso de las AXEs, en comparación con la cavidad de las carboxilesterasas (Figura 1.11) (Correia y col., 2008).

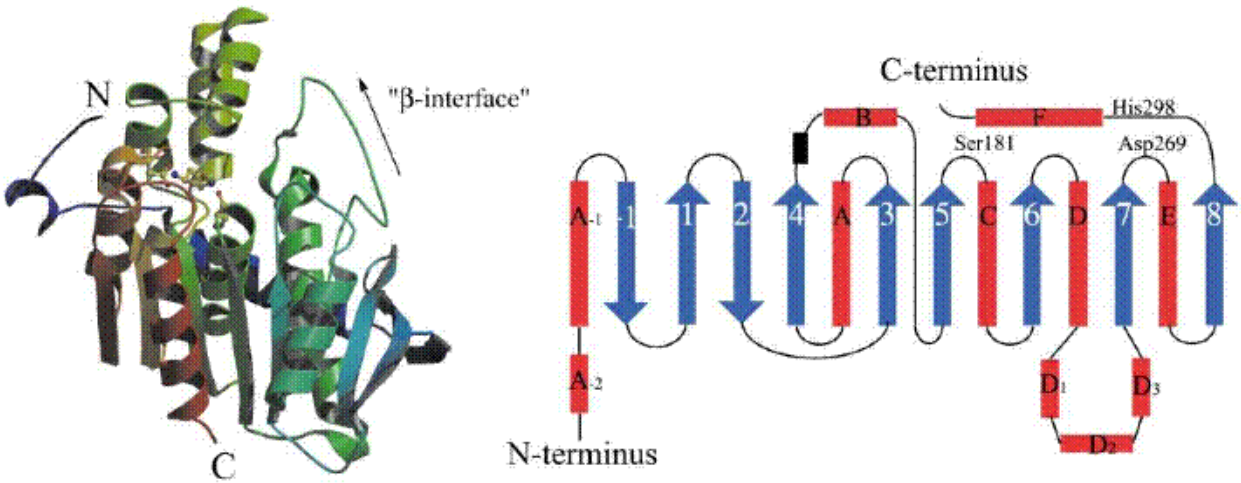


Figura 1.10: Cefalosporin deacetilasa (CAH) de *Bacillus subtilis* (código PDB: 1ODS), pertenece a la familia CE-7. Se representa su estructura terciaria y topología (Vincent y col., 2003). En el centro de la estructura tridimensional se observan los aminoácidos del centro activo. Se representan las nueve hebras β del núcleo α/β en forma de flechas azules, mientras que las hélices α (A-F) se representan en rojo.

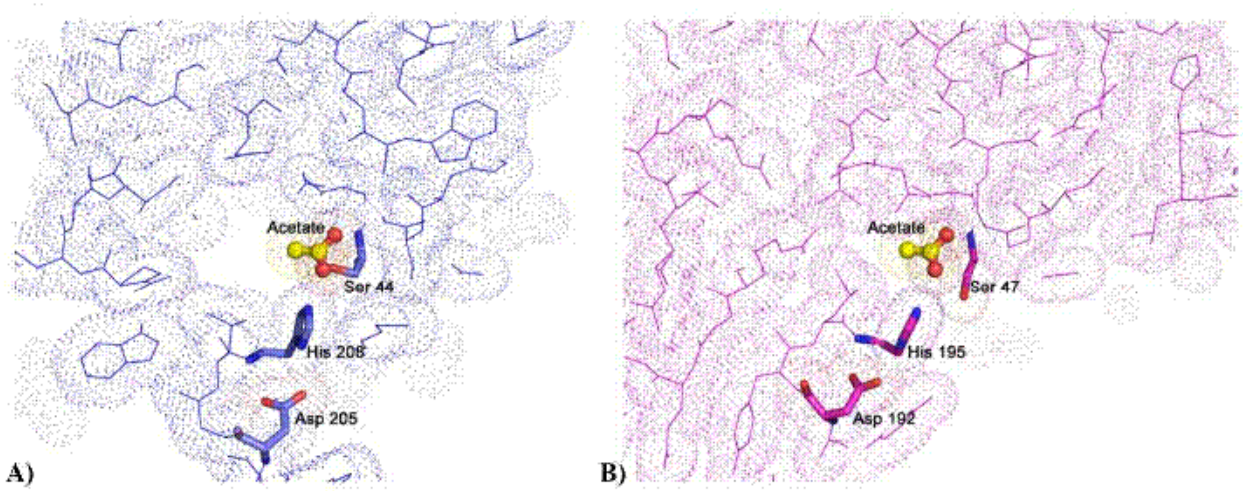


Figura 1.11: Comparativa entre dos centros activos. (A) Carboxilesterasa (código PDB: 1WAB) (B) AXE de la familia CE-3 (código PDB: 2VPT). Ambas enzimas se presentan en la misma orientación, las esferas alrededor de los átomos representan el radio de las fuerzas de van der Waals. En el centro se representa la cavidad catalítica cortada en un plano transversal. El grupo acetato se ha modelado en la posición que debería ocupar durante la catálisis para que interaccione con la triada. Se observa pues que el centro activo de la carboxilesterasa es significativamente más grande que el de la AXE (Correia y col., 2008).

Además estas enzimas se caracterizan por mostrar un elevado estado de oligomerización, con valores de 2 a 4, 6 y 8 (Degrassi y col., 1998; Degrassi y col., 2000; Hakulinen y col., 2000; Altaner y col., 2003; Puchart y col. 2006) (Figura 1.12). La razón para este ensamblaje oligomérico no está todavía clara.

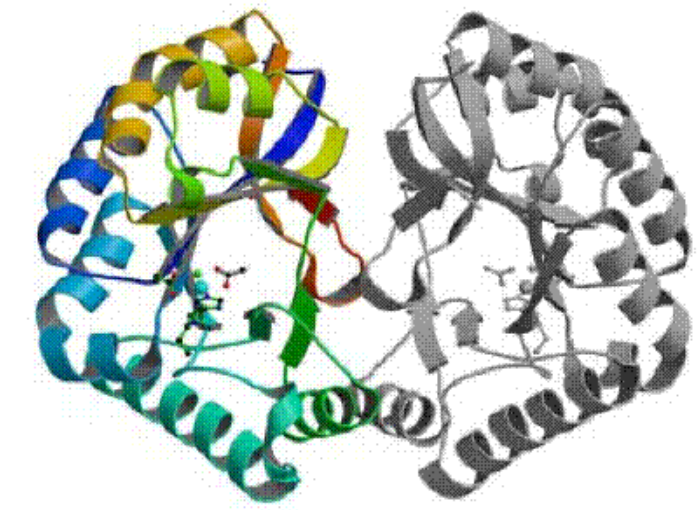


Figura 1.12: Estructura tridimensional de la acetil xilan esterasa de *Streptomyces lividans* (código PDB: 2CCO), representación del dímero con el centro activo en su interior, se representa también una molécula de agua en forma de esfera azul (Puchart y col., 2006).

Dentro de la familia Carbohidrato Esterasa-7 (CE-7) se encuentran enzimas con actividad: acetil xilan esterasa (EC 3.1.1.72) y cefalosporin-C deacetilasa (EC 3.1.1.41), es decir como su nombre indica, desacetilan el xilano y las cefalosporinas (Figura 1.13), siendo esta última aplicación industrial la más importante de estas enzimas, concretamente, en la síntesis de intermedios avanzados de antibióticos β-lactámicos (Elander, 2003).

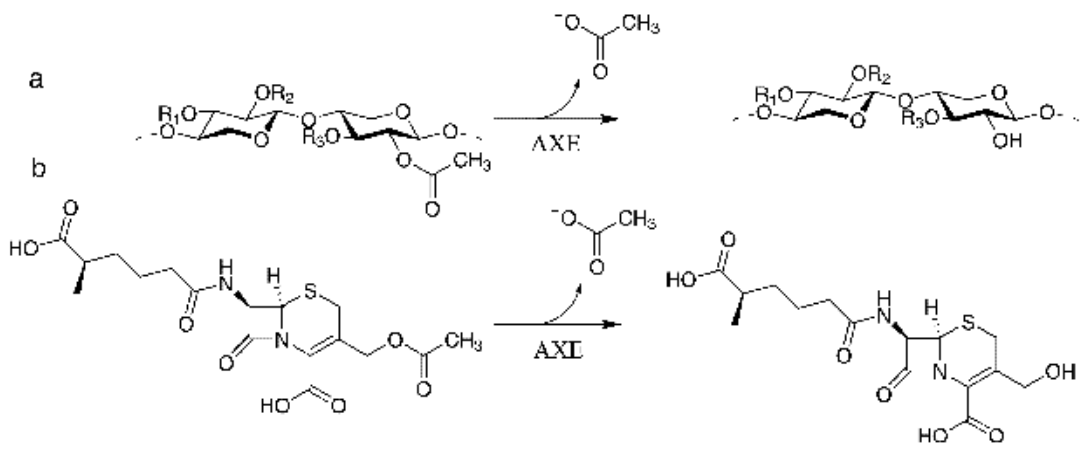


Figura 1.13: Reacciones catalizadas por las AXEs. (a) Desacetilación de xilooligosacáridos cortos implicados en la degradación de la pared vegetal (xilano). (b) Desacetilación de cefalosporina C: elimina el grupo acetilo del C3 para dar el desacetil CPC (d-CPC) (Vincent y col., 2003).

2.3.2. Actividad sobre xilano

El xilano es un heteropolisacárido presente en la pared vegetal, su degradación total para producir xilosa y/o arabinosa es llevada a cabo, como en la celulosa, por un grupo de enzimas que participan sinérgicamente. Las más conocidas son las endo-β-D-xilanasas (EC 3.2.1.8), las cuales rompen al azar los enlaces glicosídicos de la cadena principal de la molécula. La arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55) hidroliza las cadenas laterales de arabinosa, mientras que las acetil xilan esterasas liberan grupos acetatos. Finalmente, la glucuronidasa (EC 3.2.1.139) elimina las cadenas laterales del ácido glucurónico, a partir de unidades de xilosa. Las β-xilosidasas (EC 3.2.1.37) son enzimas activas sobre oligosacáridos cortos, llevando a cabo la hidrólisis de los enlaces β-1,4-aril-xilopiranósido, rindiendo xilosa (Vincent y col., 2003). Se ha descrito además la acción sinérgica entre una esterasa de la familia CE-12 y la xilanasa en la degradación del xilano acetilado (Figura 1.14). Esta reacción sinérgica entre AXEs y xilanasas ha sido ampliamente estudiada, ya que constituye la base de la degradación del xilano acetilado en la naturaleza (Martínez-Martínez y col., 2007; 2008a).

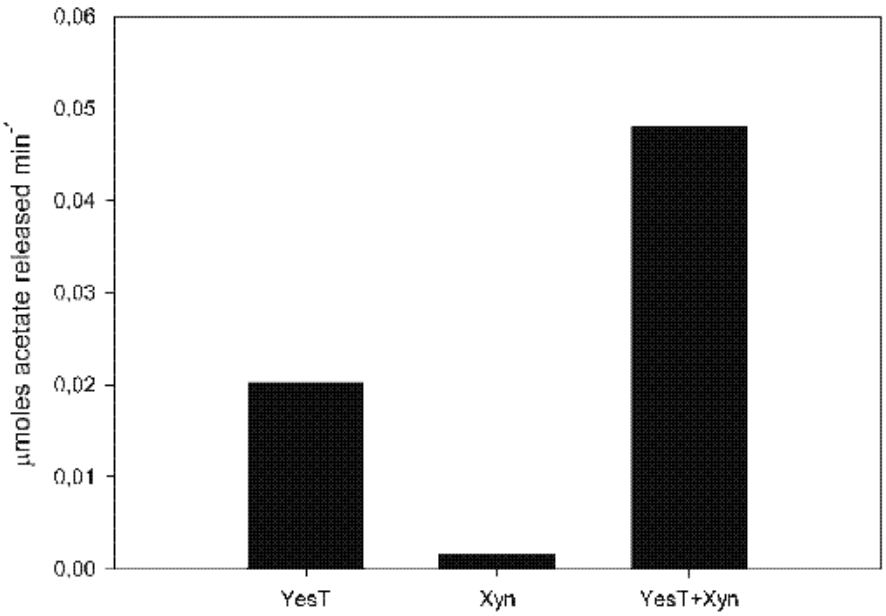


Figura 1.14: Desacetilación de xilano. Efecto de la acetil xilan esterasa YesT (CE-12) y xilanasa (Xyn) por separado y juntas, respectivamente (Martínez-Martínez y col., 2007).

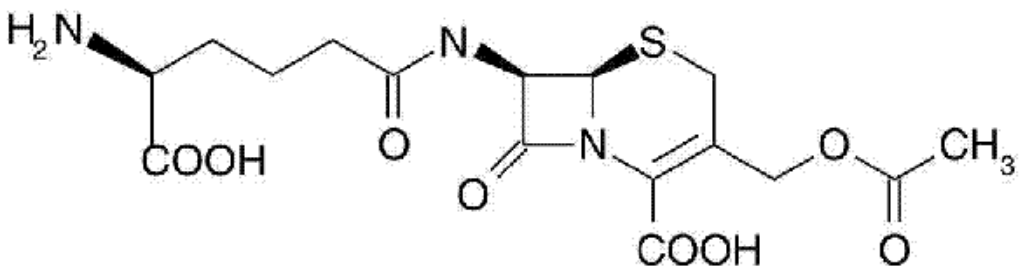
2.3.3. Biocatálisis de antibióticos β-lactámicos

La presencia de un anillo β-lactámico define químicamente a esta familia de antibióticos, de la que se han originado diversos grupos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas, monobactamas e inhibidores de las β-lactamasas. Las penicilinas son un grupo de antibióticos que contienen un anillo β-lactámico y un anillo de tiazolidina, formando el ácido-6-aminopenicilánico, estructura que deriva de la condensación de una molécula de valina y una de cisteína para dar lugar al doble anillo característico. Además, tienen una cadena lateral en la posición 6 del anillo β-lactámico, que varía de unas penicilinas a otras, y que es la que define sus propiedades. Las cefalosporinas son fármacos estructuralmente similares a las penicilinas, cuya estructura básica está constituida por el núcleo cefem, que consiste en la fusión de un anillo dihidrotiacínico (en lugar del anillo tiazolidínico característico de las penicilinas) y un anillo β-lactámico. La introducción de modificaciones en las cadenas laterales origina las diversas cefalosporinas.

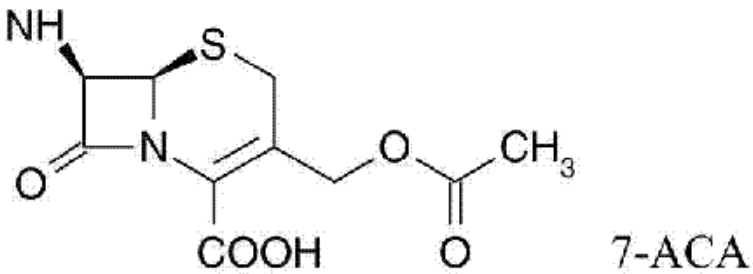
Los antibióticos β-lactámicos (penicilinas y cefalosporinas, esencialmente) actúan bloqueando el centro activo de un grupo de enzimas implicadas en la síntesis de la pared bacteriana, PBPs (*Penicilin Binding Proteins*) (Abraham y Newton, 1923). El uso de esterasas para producir desacetil-cefalosporinas ha sido ampliamente estudiado.

Entre estos antibióticos destacan las cefalosporinas (Figura 1.15), estas presentan un grupo básico, el ácido 7-aminocefalosporánico (7-ACA). Tanto la cefalosporina C (CPC) como el 7-ACA presentan un grupo acetato en el C3 que debe ser eliminado para dar la desacetil-cefalosporina (d-CPC) o el ácido desacetil aminocefalosporánico (7-dACA), respectivamente (Figura 1.15). La desacetilación del C3 del núcleo cefalosporánico de la cefalosporina C o del 7-ACA, supone la generación de otros compuestos de partida de gran importancia comercial en la preparación de antibióticos β-lactámicos semisintéticos (Maladkar, 1994). A estos compuestos activos, mediante procesos químicos o enzimáticos, se añaden las cadenas laterales que determinaran el espectro de acción del antibiótico.

La hidrólisis química del resto acetilo (C3) de las cefalosporinas da un bajo rendimiento ya que, a pH básico, el doble enlace de la posición 3 del anillo β-lactámico migra a la posición 2 (Morin y col., 1969), y a pH ácido, se produce una reacción irreversible de lactonización entre 3-hidroximetil y el grupo 4-carboxilo adyacente (Kukolja, 1968). Por lo tanto, a nivel industrial la hidrólisis enzimática a pH 7.0 se ha convertido en el método más efectivo para preparar estos desacetil derivados con alto rendimiento.



Cefalosporina C



7-ACA

Figura 1.15: Estructura de la cefalosporina C y del 7-ACA.

Finalmente, se agregarán diferentes cadenas laterales al 7-dACA para dar una amplia variedad de derivados semisintéticos con una actividad antimicrobiana mucho mayor que la sustancia de partida, la cefalosporina C. El uso de esterasas

para producir desacetil-cefalosporinas fue inicialmente descrita con la acetil xilan esterasa de la corteza de cítricos (Jeffery y col., 1961). Posteriormente, otras esterasas han sido publicadas con la habilidad de desacetilar compuestos β-lactámicos de varios organismos: AXE de *B. pumilus* (Degrassi y col., 2000), *B. subtilis* ATCC 6633 (Knauseder y col., 1999), *Rhizobium* (Arnold y col., 1969); e incluso alguna ha sido patentada (Imanaka y col., 1982).

El principal interés de obtener nuevas enzimas para la desacetilación de las cefalosporinas es esencialmente económico, ya que los β-lactámicos suponen un ingreso de más del 65% del mercado mundial de antibióticos (Elander, 2003). Actualmente, se utilizan procesos enzimáticos para su síntesis, con un coste relativamente alto: 130 $/kg para el 7-ACA. Así, parece evidente la necesidad de sistemas de fabricación de cefalosporinas competitivos frente a las empresas químicas asiáticas, sobre todo chinas, que en los últimos años suponen una competencia insostenible para las compañías europeas, que no pueden competir en precios por sus elevados costes salariales.

2.4. Carboxilesterasas

2.4.1. Estructura

Las carboxilesterasas (EC 3.1.1.1) han recibido una atención especial debido a su aplicación en la degradación de xenobióticos (como fármacos) o compuestos endógenos (como el palmitoil-CoA) (Redinbo y Potter, 2005). Además, su uso en la resolución racémica de intermediarios éster de fármacos aparece recogido en diversos artículos (Kim y col., 2002; Choi y col., 2003; Kim y col., 2004). La profunda y flexible cavidad formada esencialmente por aminoácidos hidrofóbicos facilita la formación de interacciones (hidrofóbicas, puentes de hidrógeno o fuerzas de van der Waals) con estos compuestos, y parece estar implicada en esa plétora de sustratos que son capaces de transformar (Bencharit y col., 2003).

La estructura de las carboxilesterasas adopta el clásico plegamiento α/β compuesto por 7 u 8 hebras β, con la primera o la segunda antiparalela al resto, respectivamente. Presentan, como buenas α/β hidrolasas, una triada catalítica compuesta por Ser-His-Asp/Glu (Figura 1.16). La gran mayoría de estas enzimas son monómeros (Iperuma y col., 2007), aunque también se han descrito dímeros unidos por dominios específicos (Kim y col., 1997) o tetrámeros (De Simone y col., 2004; Byun y col., 2006).

Algunas de estas enzimas presentan una caperuza (De Simone y col., 2000), pero son excepcionales (Iperuma y col. 2007). Además, y a diferencia de las lipasas, estos dominios que rodean el centro activo no tienen relación con el fenómeno de activación interfacial (Skjøt y col., 2009). En las esterasas, la caperuza cubre la zona

de unión a sustrato ("*acyl binding pocket*"), por lo que se piensa que contribuyen a la especificidad de sustrato (Liu y col., 2004b).

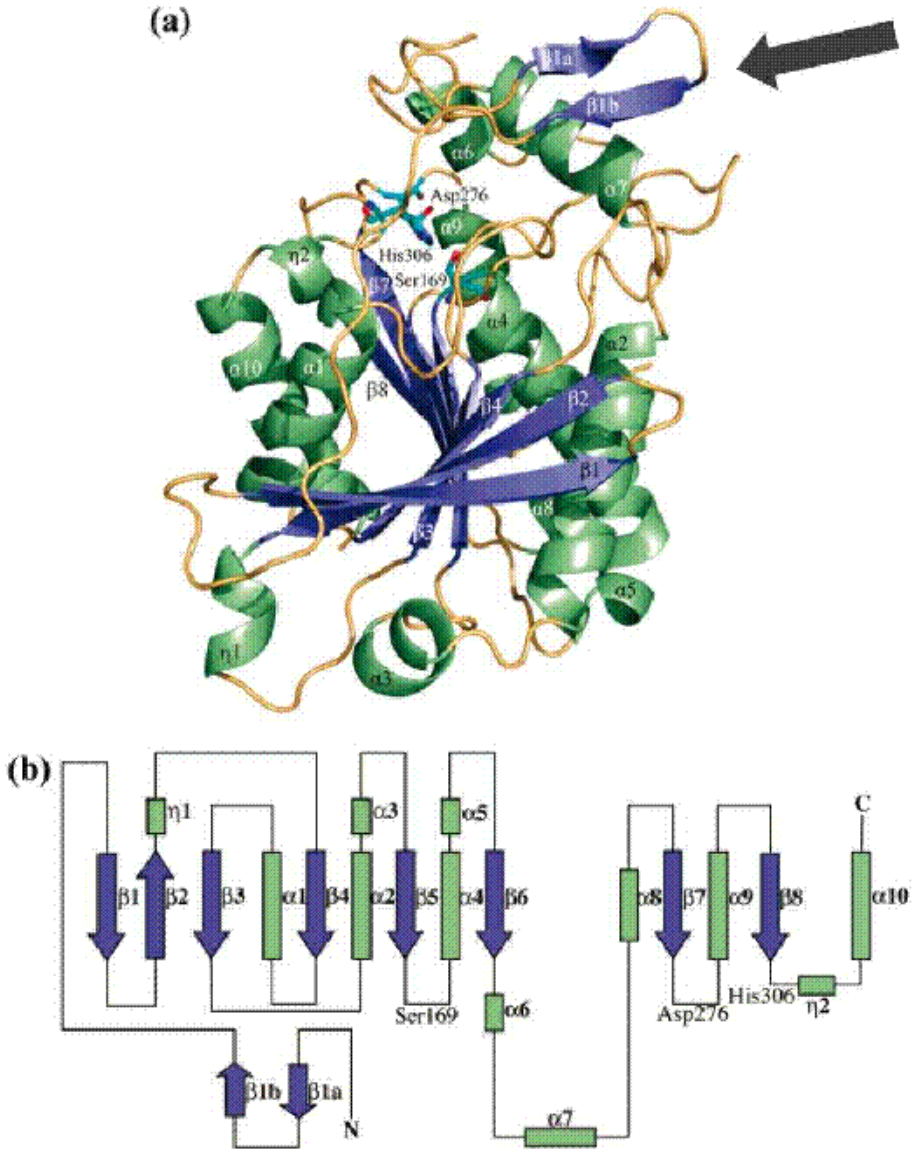


Figura 1.16: Estructura del monómero de la carboxilesterasa de *Actinidia eriantha* (código PDB: 2O7R). En el centro se observan los aminoácidos del centro activo. Tanto en la estructura tridimensional (a) como en la topología (b), se representan las ocho hebras β del sándwich α/β/α en forma de flechas, mientras que las hélices α (1-10) se representan en verde. También se observan dos pequeñas hebras β (β1a-β1b) en la zona más externa que no llegan a formar un dominio independiente, caperuza (señalado por una flecha) (Iperuma y col., 2007).

Aunque los principales motivos del enorme potencial biotecnológico de las CEs ya han sido comentados, su mejor propiedad es sin duda la elevada enantioselectividad por algunos sustratos de interés farmacológico.

2.4.2. Síntesis de compuestos ópticamente puros

Las carboxilesterasas han demostrado su utilidad en la resolución de mezclas racémicas de ésteres (Krebsfänger y col., 1998). La hidrólisis enantioselectiva de ésteres se realiza en medio acuoso (Figura 1.17) y en algunos casos en presencia de una pequeña proporción de disolventes orgánicos miscibles en agua o detergentes, con el fin de solubilizar aquellos sustratos insolubles en agua. Si la enzima es completamente enantioselectiva, la reacción de hidrólisis se detendrá cuando alcance el 50% de conversión y como resultado, se obtienen los isómeros con un 100% de exceso enantiomérico (ee_p). En este caso el ratio enantiomérico E es superior a 100. E se puede definir como la relación existente entre las velocidades de reacción de los dos isómeros. Por lo tanto, también están relacionados con los parámetros de V*max* y K_M de cada uno de ellos (ecuación 1).

$$E = \frac{V_1}{V_2} = \frac{\left(\frac{V_{max}}{K_M}\right)_1}{\left(\frac{V_{max}}{K_M}\right)_2} \qquad 1)$$

En vez de determinar todos los parámetros, característicos de las reacciones correspondientes a cada uno de los enantiómeros, es más sencillo acudir a la expresión matemática propuesta por Sih que relaciona el valor E con la conversión (C) y el exceso enantiomérico del sustrato (ee_p), parámetros más sencillos de determinar (ecuación 2) (Sih y Chen, 1984).

$$E = \frac{\ln[1 - c\,(1 + ee_p)]}{\ln[1 - c\,(1 - ee_p)]} \qquad 2)$$

Si la enzima no es enantioespecífica (ee_p cercano a 0 y E<10), el proceso biocatalítico pierde interés. Esta es la razón que ha impulsado a los investigadores a mejorar la enantioselectividad de estas enzimas al máximo para su posterior aplicación industrial (Bornscheuer y Kazlauskas, 1999; Bornscheuer, 2002b; Jaeger y Eggert, 2004). Aunque la lista de esterasas microbianas clonadas y expresadas es amplia, muy pocas han sido usadas para la síntesis de compuestos ópticamente puros, aplicación más importante de estas enzimas, y menos aún a nivel industrial. Las razones principales de este hecho quizá sea la dificultad que supone el reciclado de la enzima y el hecho de que el 50% del producto deba ser eliminado una vez obtenido el isómero puro que interesa. Aunque ese 50% del producto de la resolución menos activo puede volver a racemizarse para luego someterse a una nueva reacción, y así aprovechar el 100% del sustrato de partida.

El avance en el conocimiento de los mecanismos de acción de los fármacos a nivel molecular ha permitido descubrir la eficacia terapéutica de cada uno de los enantiómeros. En muchos casos, sólo uno de los enantiómeros del fármaco es farmacológicamente activo, mientras que el otro es inactivo o incluso tóxico (Turner, 2004). En la actualidad se deben hacer ensayos clínicos de los isómeros de un fármaco racémico antes de su comercialización. Este hecho ha forzado a muchas compañías a sintetizar isómeros puros de nuevos fármacos, en vez de mezclas racémicas. La síntesis asimétrica de compuestos quirales mediante procesos biocatalizados por esterasas ha demostrado ser más rentable y ecológica que mediante procesos químicos (Margolin, 1993). En la tabla siguiente se presentan los fármacos más vendidos del 2005, entre los que destacan varios enantiómeros puros.

Tabla 1.7: Relación de los compuestos más vendidos en 2005.

Droga	*Laboratorio*	*Actividad terapeutica*
Enalapril (en)	Roemmers	Antihipertensivo, vasodilatador
Captopril (en)	Bristol-Myers Squibb	Antihipertensivo, vasodilatador
Atenolol (en)	Gador	β-bloqueante
Alprazolam (aq)	Gador	Antiansiolítico, antidepresivo
Ranitidina (aq)	GlaxoSmithKline	Antiulceroso
Amoxicilina (aq)	Roemmers	Antibiótico de amplio espectro
Ibuprofeno (en)	Pfizer	Antiinflamatorio no esteroideo (NSAID)
Clonazepam (aq)	Roche	Antiansiolítico, antidepresivo
Cefalexina (en)	Roemmers	Antibiótico de amplio espectro
Naproxeno (en)	Pfizer	NSAID
Cimetidina (aq)	GlaxoSmithKline	Antiulceroso

(aq): aquirales; (en): enantiómeros puros

Fuentes IMS, periodo (1/2005 a 6/2005).

2.4.3. Obtención de antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs)

Los ácidos 2-aril propiónicos como el ibuprofeno (Neobrufen®), ketoprofeno (Fastum®), naproxeno (Antalgin®) y el flurbiprofeno (Clinadol®) son compuestos de uso muy común, y cuya actividad antiinflamatoria reside en el isómero S-. Todos sus efectos se relacionan con la inhibición de las ciclooxigenasas 1 y 2, y con ello la inhibición de la producción de prostaglandinas.

El ibuprofeno es utilizado frecuentemente en el alivio sintomático del dolor de cabeza (cefalea), dolor dental (odontalgia), dolor muscular (mialgia), molestias de

la menstruación (dismenorrea), dolor neurológico de carácter leve, síndrome febril y dolor tras cirugía (postquirúrgicos). De forma parecida, el fármaco naproxeno está indicado para el tratamiento de los procesos inflamatorios y dolorosos de las articulaciones (artritis reumatoide), músculos, tendones y ligamentos, tales como artrosis y espondolitis anquilosante. También está indicado para el tratamiento de los ataques agudos de gota, síndromes reumatoides y para los dolores menstruales. Finalmente, los compuestos activos ketoprofeno y flurbiprofeno se utilizan en el tratamiento de la artritis reumatoide, osteoartrosis, espondilitis anquilosante y episodios agudos de gota. El ketoprofen es uno de NSAIDs más usados actualmente, hace dos décadas se descubrió su actividad antiinflamatoria, hasta 160 veces más potente que la aspirina (Haris y Vavra, 1985).

La resolución enzimática de las mezclas racémicas de estos ácidos se puede realizar mediante el uso de esterasas microbianas (Choi y col., 2003; Ong y col., 2005; Kim y col., 2006). Los enantiómeros puros de estos antiinflamatorios no esteroideos se han conseguido sintetizar mediante la hidrólisis enantiomérica selectiva de sus ésteres racémicos en medio acuoso (Figura 1.17).

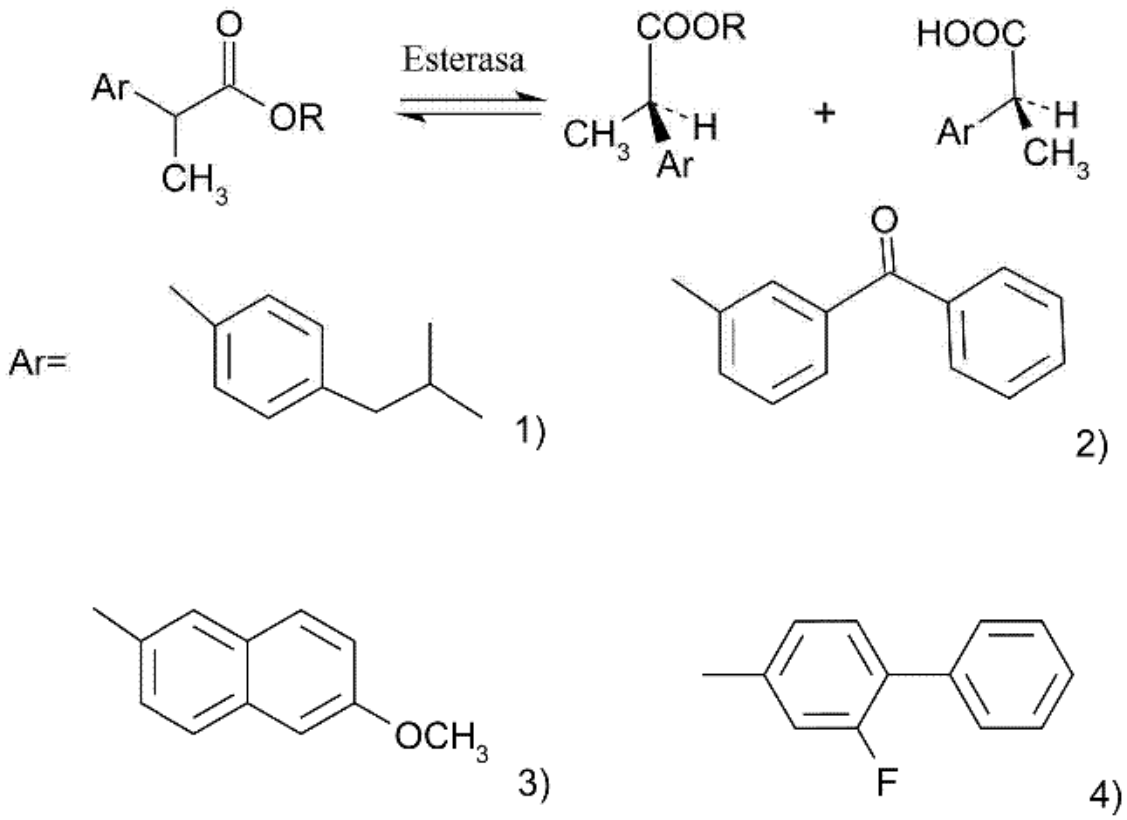


Figura 1.17: Resolución de NSAIDs tras la hidrólisis por una esterasa. Dependiendo del compuesto Ar (aril) será (1): ibuprofeno, (2): ketoprofeno, (3): naproxeno y (4): flurbiprofeno.

Probablemente, una de las esterasas mejor estudiadas es la carboxilesterasa NP de *Bacillus subtilis* (NP de Naproxeno) (Quax y Broekhuien, 1994). La carboxilesterasa NP tiene una masa molecular relativa (M_r) de 32 kDa, un pH y temperatura de óptimos de 8.5 y 35 °C, respectivamente. Su estructura molecular ha sido resuelta (código PDB: 2R11), siendo un dímero (van der Laan y col., 1993) (http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2R11). A pequeña escala, esta enzima es capaz de hidrolizar el naproxeno-metil ester en presencia de Tween 80 hasta el (S)-naproxeno (forma ácida) (Steenkamp y Brady, 2008).

Objetivos

En la presente Tesis Doctoral se plantea la clonación, expresión, purificación y estudio de la estructura de α/β hidrolasas con aplicación industrial, bien sobre cefalosporinas acetiladas, bien sobre ésteres de antiinflamatorios no esteroideos, como son las acetil xilan esterasas y las carboxilesterasas, respectivamente. Este objetivo general se subdivide en los siguientes objetivos parciales:

- La caracterización cinética de una acetil xilan esterasa (AXE) microbiana, como punto de partida para la obtención de biocatalizadores activos sobre moléculas de interés farmacológico.

- La caracterización cinética de una carboxilesterasa de origen eucariótico. Estudio de su estereospecificidad sobre compuestos de interés farmacológico.

- La caracterización cinética de una carboxilesterasa de ambiente de alta presión y temperatura. Estudio de su estereospecificidad sobre compuestos de interés farmacológico.

- La caracterización de una carboxilesterasa de ambiente alcalino. Estudio de su estereospecificidad sobre compuestos de interés farmacológico.

Materiales y Métodos

1. Microorganismos

Las diferentes fuentes enzimáticas empleadas en la presente Tesis fueron obtenidas de:

a) *Bacillus pumilus* CECT 5072 (Colección Española de Cultivos Tipo), como fuente de Acetil Xilan Esterasa (AXE). El microorganismo se cultivó en el medio Luria-Bertani-agar (LB-agar) durante 24 horas a 37 °C, la composición del medio se describe posteriormente. Tras el aislamiento de una colonia, el microorganismo se inoculó en el mismo medio pero en forma líquida (sin agar). Una vez que el cultivo adquirió la densidad óptima (DO_{600}) adecuada, se procedió a la extracción de su ADN genómico mediante el kit *DNeasy Blood and Tissue* (Qiagen, Hilden, Alemania).

b) *Yarrowia lipolytica* CLIB122, como fuente de la carboxilesterasa YlCE. El microorganismo se obtuvo a través del CIRM (*Centre International de Ressources Microbiennes, Francia*), ubicado en Grignon. Se cultivó la cepa original en medio rico YPD (*Yeast Peptone Dextrose*) y se aisló el genoma de esta levadura mediante el kit comercial *DNeasy Blood and Tissue Kit* de Qiagen, modificado para la ruptura de la pared celular de levaduras. La pared celular de los eucariotas dificulta la extracción del DNA, es por ello que se modificó el protocolo original con la adición de liticasa, una enzima que rompe la pared de levaduras para producir esferoplastos (células sin pared celular). Finalmente, estos esferoplastos fueron procesados siguiendo el protocolo del kit comercial.

YPD:	Peptona de carne	20 g/L
	Extracto de levadura	10 g/L
	Dextrosa	20%

c) *Geobacillus kaustophilus* HTA426, como fuente de la carboxilesterasa GkCE. El microorganismo fue aislado en la Fosa de las Marianas, a una profundidad de 10,897 m por el grupo del Profesor Hideto Takami (Japón) (Takami y col., 1997, 2004a). El Prof. Takami (*Microbial Genome Research Group, Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology*) determinó este microorganismo como el primer bacilo termófilo (Takami y col., 2004b), y cedió su genómico a nuestro laboratorio. El genoma se encuentra completamente secuenciado y se compone de un cromosoma de 3.54 Mb y un plásmido de 47.9 kb.

d) *Bacillus halodurans* C125, como fuente de la carboxilesterasa BhCE. El genoma del microorganismo fue secuenciado por el Prof. Takami (Takami y col., 2000a), y cedió el genómico a nuestro laboratorio. Este microorganismo es el

segundo bacilo cuyo genoma se ha secuenciado totalmente. Este alcalófilo puede crecer entre pH 7.0 y 10.5 (Takami y col, 1999a, 1999b), incluso tolera el 12% de NaCl (Takami y col., 2000b).

2. Reactivos y cepas comerciales

Los sustratos para esterasas (*p*-nitrofenil acetato, butirato, caprilato, laurato, miristato, palmitato, α/β naftil acetato), inhibidores de proteínas (DPC, PMSF, PLP y PGO), iones divalentes en sales ($CaCl_2$, $CuSO_4$, $FeSO_4$, $MnCl_2$, $MgCl_2$ y $ZnSO_4$), EDTA, isopropil-β-D-tiogalactopiranósido (IPTG), antibióticos (kanamicina, ampicilina, cloranfenicol, tetraciclina), marcadores de masa molecular para experimentos de filtración en gel, albúmina de suero bovino (BSA) para cuantificación de proteínas y bromuro de etidio fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (Madrid, España). El ketoprofeno se adquirió también a Sigma, y posteriormente, se esterificó en nuestro laboratorio (Kim y Lee, 2004). Las ciclodextrinas se obtuvieron de Roquette Corporation (Francia). Otros sustratos de acetil xilan esterasas como el ácido 7-aminocefalosporánico, la cefalosporina C y sus correspondientes patrones desacetilados, se obtuvieron de Bioferma S.A. (Murcia, España). El glutaraldehído (99.9% pureza) utilizado y el sulfato amónico (ambos de calidad BioUltra), para la obtención de CLEAs, se obtuvieron de Fluka (Buchs, Suiza).

Las sales y tampones inorgánicos se obtuvieron de Fluka. Reactivos para electroforesis y cuantificación de proteínas (Bradford) se obtuvieron de BioRad (Hercules, EEUU). Disolventes orgánicos de calidad HPLC fueron servidos por Análisis Vínicos S.L. (Tomelloso, España). El agua purificada se obtuvo gracias a un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, EEUU). Los medios de cultivo fueron adquiridos a Pronadisa (Condalab, Madrid, España).

Las enzimas de restricción, fosfatasa alcalina (CIP), desoxinucleótidos (DNTPs) y Taq polimerasa se obtuvieron de New England Biolabs (Beverly, MA, EEUU). La *Pfu* Turbo® polimerasa se compró a Stratagene (Amsterdam, Holanda) y la T_4 DNA ligasa utilizada en las clonaciones se obtuvo de Roche (Manhein, Alemania). Los oligodesoxirribonucleótidos específicamente diseñados para cada uno de los genes se encargaron a Isogen Life Science (Darmstadt, Alemania). Los vectores de clonación y expresión, así como las cepas bacterianas de *Escherichia coli* se obtuvieron de Novagen (Darmstadt, Alemania) (Tablas 3.1 y 3.2). La cepa de clonación (DH5α) y cepa de levadura *Pichia pastoris* GS115 se obtuvieron de Invitrogen (Frederick, EEUU), y por último, la cepa utilizada en la mutagénesis *E. coli* XL1-Blue se obtuvo de Stratagene (Agilent Technologies, EEUU).

Tabla 3.1: Cepas comerciales utilizadas en la presente Tesis doctoral.

Cepa	Utilidad
E. coli DH5α (Invitrogen)	Clonación
E. coli XL1-Blue (Stratagene)	Clonación y mutagénesis
E. coli Rosetta (DE3) (Novagen)	Expresión
E. coli Rosetta (DE3)pLys (Novagen)	Expresión
Pichia pastoris GS115 (Invitrogen)	Expresión en levaduras

Tabla 3.2: Vectores comerciales utilizados en la presente Tesis doctoral.

Plásmido	Marcador	Utilidad
pET28a (+) (Novagen)	Kan^R	Vector de expresión
pET24b (+) (Novagen)	Kan^R	Vector de expresión
pPIC9K (Invitrogen)	Amp^R	Vector de expresión

Los kits de biología molecular empleados en la purificación de fragmentos de DNA: tras amplificación o digestión, extracción de geles de agarosa, minipreps se adquirieron a Qiagen (Hilden, Alemania). Para la concentración del DNA, se utilizó un evaporador Concentrator 5301 (Eppendorf, Alemania). La cuantificación de DNA y su pureza se determinaron espectrofotométricamente en una cubeta, TrayCell (Hellma, Müllheim, Alemania), esta última mediante la relación A_{260}/A_{280}.

3. Herramientas bioinformáticas

Las secuencias de genes fueron obtenidas de la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). El alineamiento de la secuencia de proteínas clonada y la secuencia original se realizó mediante un BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) en la misma página del NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) (Altschul y col., 1990). Los estudios de homología entre secuencias se llevaron a cabo mediante el programa Clustal-W (http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html) (Thompson y col., 1994) y posteriormente, se realizó el alineamiento múltiple junto con la predicción de las estructuras secundarias de las proteínas con el programa ESPript (Gouet y col., 1999). La predicción de las estructuras secundarias se hizo mediante los distintos métodos disponibles en *Expert Protein Analysis System Proteomics Server* (http://www.expasy.ch/). Las secuencias de aminoácidos de las distintas enzimas se enviaron a las páginas http://swissmodel.expasy.org/ (Guex y col., 1997;

Schwede y col., 2003; Arnold y col., 2006) y http://geno3d-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/geno3d_automat.pl?page=/GENO3D/geno3d_home.html (Geourjon y col., 2001; Combet y col., 2002), ambas modelan proteínas en función de otras cristalizadas, pero la última compara la calidad del modelado con el programa PROCHECK (Laskowski y col., 1993). Los modelos tridimensionales de la estructura terciaria de la proteína se visualizaron mediante los programas Swiss-Pdb Viewer (GlaxoSmithKline y *Swiss Institute of Bioinformatics*, Basel, Suiza) y PyMOL (DeLano, 2002) (http://pymol.sourceforge.net/). Se realizaron *dockings* mediante la página (http://www.dockingserver.com/web/docking/) (Bikadi y Hazai, 2009). Los diagramas de topología se construyeron a través del programa TOPS (http://www.tops.leeds.ac.uk/) (Michalopolous y col., 2004). El volumen de las cavidades de las proteínas se cuantificó mediante el programa AutoDock 4.0 (http://autodock.scripps.edu/) (Morris y col., 1998). Los árboles filogenéticos se construyeron con el programa TreeView y el programa Mega4 (Kumar y col., 2008), mediante el "*Neighbor-joining method*" (Saitou y Nei, 1987).

4. Métodos microbiológicos

4.1. Medios de cultivo, crecimiento y conservación de cepas bacterianas

E. coli fue crecida a 37 °C con agitación en el medio rico Luria-Bertani (LB) líquido, o en placa en el mismo medio solidificado con 16 g/L de agar (Pronadisa, Condalab, España). Cuando se necesitaba llegar a mayores densidades ópticas en cultivo líquido, se utilizó Terrific-Broth (TB) (Pronadisa, Condalab, España). Se añadieron en su caso, los siguientes antibióticos: kanamicina (50 µg/mL), cloranfenicol (34 µg/mL), amplicilina (50 µg/mL) y tetraciclina (34 µg/mL). Se añadió a los cultivos isopropil-β-D-tiogalactopiranósido (IPTG) hasta una concentración de 0.5 mM para la inducción del promotor *lac*I. La composición de los medios de crecimiento se describe a continuación:

Luria-Bertani (LB)	Triptona	10 g/L
	Extracto de levadura	5 g/L
	NaCl	10 g/L
Terrific-Broth (TB)	Triptona	12 g/L
	Extracto de levadura	24 g/L
	Fosfato monopotásico	2.3 g/L
	Fosfato dipotásico	12.5 g/L
	Glicerol (v/v)	4 mL/L

El medio se disuelve en agua destilada, es esterilizado mediante autoclave a 121 °C durante 20 minutos, y conservado a 4 °C hasta su uso.

El crecimiento de los cultivos se siguió midiendo la densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) en un espectrofotómetro UV-2401PC (Shimadzu Corporation, Japón).

Las células de *E. coli* se conservaron durante largos periodos de tiempo a -80 °C (Glicerol-*stocks*) en un ultracongelador (UltraLow MDFU3086, Sanyo Electric, Japón), en medio de crecimiento con glicerol 40% (v/v) como crioprotector.

4.2 Transformación bacteriana

Las transformaciones de células competentes de *E. coli* se llevaron a cabo mediante la técnica de electroporación (Dower y col., 1988), con un electroporador BioRad (Hercules, EEUU). Tras la transformación, en todos los casos se incubaron células en medio líquido a 37 °C, el tiempo necesario para la expresión de los genes de resistencia al antibiótico.

4.3 Transformación en *Pichia pastoris* GS115

La transformación en *Pichia pastoris* se realizó con el vector pPIC9K. Este vector incorpora un origen de replicación bacteriano y un gen de resistencia a ampicilina para seleccionar los clones con el vector en *E. coli*. Se realizó la clonación de la YICE en *E. coli* DH5α, y tras la cual se amplificaron unos 10 µg de vector, que se linealizaron con las enzimas de restricción *Bgl*II y *Pme*I, por separado. Las diferentes digestiones se purificaron mediante gel de agarosa. Este plásmido lineal se utilizó para transformar competentes de la levadura *Pichia pastoris* GS115 mediante entrecruzamiento (*cross-over*) entre el genoma de la levadura y el vector, las electrocompetentes se prepararon en el mismo momento de la transformación (Scorer y col., 1994).

Pichia pastoris es una levadura metilotrofa, es decir que puede utilizar el metanol como fuente de carbono, para ello utiliza los genes: AOX1 y AOX2, que codifican dos alcohol oxidasas. Además esta cepa es His , por lo que necesita que el aminoácido histidina esté presente en el medio de cultivo para crecer.

Al digerir pPIC9K con *Bgl*II, el entrecruzamiento tendrá lugar a nivel del locus AOX1 (se necesita un doble *cross-over*), produciendo un único fenotipo: $His^{+}Mut^{S}$. Al digerir pPIC9K con *Pme*I, el entrecruzamiento producirá el siguiente fenotipo: $His^{+}Mut^{+}$. La abreviación Mut^{S} se refiere a *"Methanol Utilization Slow"*, que se debe a la alteración del fenotipo tras la recombinación del vector pPIC9K en el genoma de la levadura, más concretamente en el locus AOX1. Con la integración del vector, se introducirá el gen HIS4, que permite a la levadura crecer incluso en ausencia de histidina y seleccionar los clones con el casete (Figura 3.1).

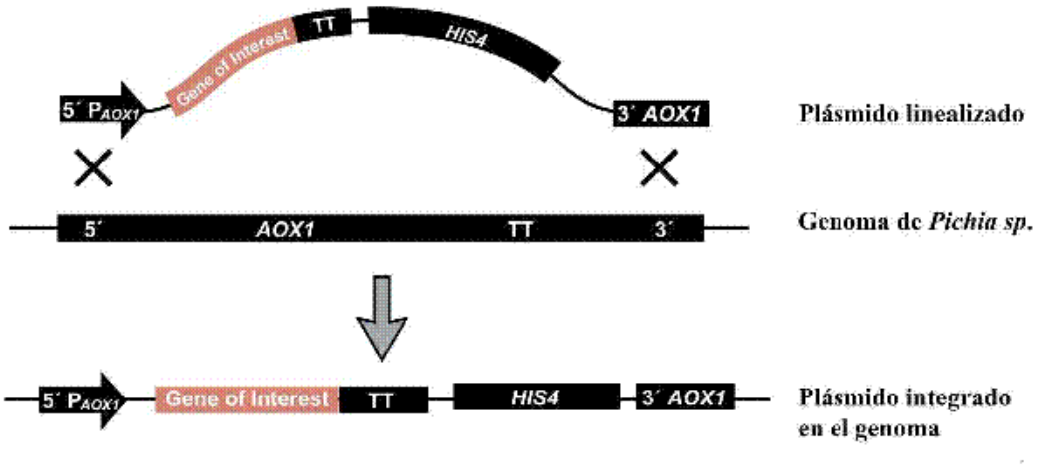


Figura 3.1: Entrecruzamiento (*cross-over*) del vector pPIC9K en el genoma de *Pichia sp.*, este entrecruzamiento da lugar a clones $His^{+}Mut^{S}$.

La cepa Mut^{+}, conserva tanto el gen AOX1 como el gen AOX2, por lo que utilizará de forma normal el metanol del medio como fuente de carbono. Además, al incorporara el gen HIS4, recupera el fenotipo de la cepa silvestre. La cepa Mut^{S} tiene el gen AOX1 interrumpido (ha tenido lugar ahí la recombinación) pero aún conserva el gen AOX2 intacto, por lo que podrá utilizar el metanol del medio como fuente de carbono, aunque más lentamente que los Mut^{+}.

Se transformaron esferoplastos de *P. pastoris* mediante electroporación (Scorer y col., 1994). En una cubeta de electroporación de 0.2 cm, se colocaron 80 µL de células resuspendidas en sorbitol 1 M, 10 µL del casete de expresión linealizado (con 8 µg de DNA). Después del pulso se adicionó inmediatamente 1 mL de sorbitol 1 M frío. Con esta mezcla de células electroporadas y transformadas se inocularon placas con medio mínimo con dextrosa (MD) sólido. Se incubaron las placas a 30 °C durante 4 días, para finalmente determinar los fenotipos Mut^{+} y Mut^{S}.

	Minimal Dextrose Medium (MD)	*Minimal Methanol Medium* (MM)
Yeast Nitrogen Base (sin aminoácidos)	13.4 g/L	13.44 g/L
Biotina	$4x\ 10^{4}$ g/L	$4x\ 10^{4}$ g/L
Dextrosa	20 g/L	-
Metanol	-	0.5 %

En este punto habrá que seleccionar los clones His^+Mut^S y His^+Mut^+ de las placas con *P. pastoris* recién transformadas con vector linealizado con *Bgl*II y *Pme*I. Para ello se realizan réplicas de las colonias que han crecido en MD (tras la transformación) en placas nuevas con medio sólido MM y MD, con palillos estériles. Los clones Mut^S crecen bien en MD pero no tanto en MM, por lo que se podrán distinguir al cabo de 2 días a 30 °C. Los clones Mut^+ crecen bien en ambos medios.

Para la expresión de la proteína, se cultivaron los clones, primero, en BMGY (medio tamponado complejo con glicerol), y luego, tras centrifugar las células, en BMMY para su inducción (medio tamponado complejo con metanol).

	BMGY (*Buffered Glycerol Complex Medium)*	BMMY (*Buffered Methanol Complex Medium)*
Extracto de levadura	10 g/L	10 g/L
Peptona	20 g/L	20 g/L
Fosfato potásico pH 6.0	100 mM	100 mM
Yeast Nitrogen Base	13.4 g/L	13.4 g/L
Biotina	$4x\ 10^{-4}$ g/L	$4x\ 10^{-4}$ g/L
Glicerol	1%	-
Metanol	-	0.5 %

5. Amplificación de fragmentos de DNA

La amplificación de fragmentos de DNA se realizó mediante PCR empleando el termociclador TGradient Biometra (MJ Research, EEUU). En la reacción de PCR se utilizaron oligonucleótidos específicos para cada gen (100 µM) complementarios a los extremos 5´ y 3´ de los genes. Dichos cebadores fueron utilizados para clonar el gen bajo el promotor T7 del sistema pET, inducible por IPTG. Las condiciones de la reacción de PCR dependen de cada gen y oligos.

5.1. Obtención de BpAXE recombinante de *B. pumilus*

El gen AXE de *Bacillus pumilus* CECT 5072 se amplificó mediante las técnicas clásicas de biología molecular (Sambrook y col., 1989), a partir de genómico del microorganismo, molde en la reacción de PCR. Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos para la amplificación, en el extremo 5´ del gen se incluyó la secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción *Eco*RI, y *Xho*I en el 3´:

- AXE-up (5´-GGAATTCGTTATGTTGATAGAAGCAAATG-3´) derivado del extremo 5´ de la secuencia del gen.
- AXE-down (5´-GCTCGAGTTATGTTGATAGAAGCAAATGCT-3´) derivado del extremo 3´ de la secuencia del gen.

Las condiciones de PCR fueron las siguientes:

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	95	1 min 30 seg
2	95	45 seg
3	56	30 seg
4	72	1 min
5	Repetición de los pasos 2-4 (x2)	
6	95	45 seg
7	58	30 seg
8	72	1 min
9	Repetición de los pasos 6-8 (x2)	
10	95	45 seg
11	60	30 seg
12	72	1 min
13	Repetición de los pasos 10-12 (x2)	
14	95	45 seg
15	62	30 seg
16	72	1 min
17	Repetición de los pasos 14-16 (x29)	
18	72	10 min

El producto de PCR amplificado se digirió con *EcoR*I, purificado mediante kit de purificación de PCR (Qiagen), digerido seguidamente con *Xho*I, y de nuevo purificado con el mismo kit. Se realizó la clonación en pET28a, previamente digerido con las mismas enzimas de restricción y fosfataseado 15 min con CIP de New England Biolabs (Beverly, MA, EEUU), y finalmente purificado mediante su aislamiento en gel de agarosa. La reacción de ligación entre vector e inserto se realizó durante 14 horas a 16 °C con la relación 3:1 (inserto:vector) constante, teniendo en cuenta la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{ng de vector} \times \text{Kb inserto}}{\text{Kb vector}} \times \text{relación molar} \left(\frac{\text{inserto}}{\text{vector}}\right) = \text{ng inserto a añadir}$$

El plásmido producto de dicha ligación fue transformado en *Escherichia coli* DH5α, mediante la electroporación anteriormente descrita. Las colonias se seleccionaron en base a su resistencia a kanamicina, se extrajo el DNA plasmídico mediante un kit comercial (Miniprep, Qiagen). Para comprobar la presencia del gen fue necesaria una digestión analítica, en la cual el plásmido es digerido con *EcoR*I y *Xho*I, durante 1 hora. Estas enzimas cortan el gen por sus extremos. Por lo que en el gel de agarosa se observarán el gen y vector por separado. A continuación, se secuenciaron los plásmidos con el inserto en busca de la secuencia de nucleótidos correcta.

Finalmente, el plásmido seleccionado es transformado en la cepa de expresión *E. coli* Rosetta (DE3)pLys para poder llevar a cabo la expresión de la proteína recombinante. Las células transformadas fueron cultivadas en LB y pasadas a TB hasta la DO_{600} adecuada para su inducción (DO_{600}=5) a 0.5 mM de IPTG, 30 °C durante 16 horas. Si se tratara de enzima para la cristalización, el medio de crecimiento sería M9, en presencia de seleniometiona, descrito posteriormente.

5.2. Obtención de YICE recombinante de *Y. lipolytica*

El locus *tag* XM503610, de 1431 pb se amplificó a partir de genómico *de Yarrowia lipolytica* CLIB122, mediante PCR. Los oligonucleótidos específicos para la clonación de este gen en pPIC9K y pET28a fueron:

- YICE-up (5´-GGAATTCATGACTACAATTAACTCGAAAGCACTC-3´) derivado del extremo 5´ de la secuencia del gen.
- YICE-down (5´-CGCGGCCGCCTACATAGCCCACTCTCCA-3´) derivado del extremo 3´ de la secuencia del gen.

Los oligonucleótidos específicos para la clonación de este gen en pET24b fueron:

- YICE-up en pET24b: (5´-GGAATTCCATGACTACAATTAACTCGAAAGCACTC-3´) derivado del extremo 5´ de la secuencia del gen.
- YICE-down en pET24b: (5´-CGCGGCCGCCAACATAGCCCACTCTCCA-3´) derivado del extremo 3´ de la secuencia del gen.

Estos cuatro cebadores derivados de la secuencia del gen y complementarios a los extremos 5´ y 3´, respectivamente, contienen las secuencias reconocidas por las enzimas de restricción *EcoR*I y *Not*I. Las condiciones de reacción de PCR fueron las mismas que las descritas para la amplificación de BpAXE pero dejando 2 min de tiempo para la amplificación del gen en cada ciclo (72 °C) y a 65 °C de temperatura

de alineamiento. El producto de amplificación fue purificado, digerido y ligado al vector pPIC9K, pET28a y pET24b. Se comprobó en los tres casos la ausencia de mutaciones (por secuenciación) en el gen y se transformó con los vectores en *E. coli* DH5α para proceder a la amplificación del plásmido recombinante.

5.3. Obtención de GkCE recombinante de *G. kaustophilus*

5.3.1. Clonación de GkCE y su expresión

El locus *tag* GK3045 (Gen ID: 3185723) se amplificó por PCR a partir del genómico de *G. kaustophilus* HTA426. Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos:

- GkCE-up (5´-GGAATTCATGAAAATTGTTCCGCCGAAGCCG-3´) derivado del extremo 5´ de la secuencia del gen.
- GkCE-down (5´-GGCGGCCGCTTACCAATCTAACGATTCAAGAAATGCATAAAT-3´) derivado del extremo 3´ de la secuencia del gen.

Estos cebadores derivados de la secuencia del gen y complementarios a los extremos 5´ y 3´, contienen las secuencias reconocidas por las enzimas de restricción *Eco*RI y *Not*I, respectivamente. Las condiciones de la reacción de PCR fueron las mismas que para el gen BpAXE excepto que la temperatura de alineamiento de los cebadores fue de 65 °C. El producto de amplificación fue purificado, digerido y ligado al vector pET28a, de igual forma a lo descrito anteriormente para el gen BpAXE. Se seleccionaron como en el caso anterior, mediante digestión analítica, los clones que incorporaron el gen y se secuenciaron.

Finalmente, el plásmido seleccionado es transformado en la cepa de expresión *E. coli* Rosetta (DE3) para poder llevar a cabo la expresión de la proteína recombinante. Las células transformadas fueron cultivadas en LB y pasadas a TB hasta la DO_{600} adecuada para su inducción (DO_{600}=5) a 0.5 mM de IPTG, 30 °C durante 6 horas.

5.3.2. Mutagénesis dirigida de GkCE de *G. kaustophilus*

Para llevar a cabo la mutagénesis dirigida de los aminoácidos Ser93, Asp192 y His222 (aminoácidos del centro activo) se diseñaron los siguientes oligonucleótidos cebadores:

- S93G-up (5´-GGCTGGATTGGGGCTTGGAGGCGTAT-3´) derivado del extremo 5´.
- S93G-down (5´-ATACGCCTCCAAGCCCCAATCCAGCC-3´) derivado del extremo 3´.

- D192V-up (5´-CAAGCGCGCCATGATGAGATGATCAATCC-3´) derivado del extremo 5´.
- D192V-down (5´-GGATTGATCATCTCATCATGGCGCGCTTG-3´) derivado del extremo 3´.
- H222L-up (5´-ATGAGCAATCAGGCCTTGTGATTACGCTTGAT-3´) derivado del extremo 5´.
- H222L-down (5´-ATCAAGCGTAATCACAAGGCCTGATTGCTCAT-3´) derivado del extremo 3´.

Para llevar a cabo la mutagénesis dirigida del aminoácido Lys212 se diseñaron los siguientes oligonucleótidos cebadores:

- K212Stop-*up* (5´-AAATTGAATCGCCGGTCTAACAAATCAAATGGTAT-3´) derivado del extremo 5´.
- K212Stop-*down* (5´-ATACCATTTGATTTGTTAGACCGGCGATTCAATTT-3´) derivado del extremo 3´.
- K212R-*up* (5´-TGAATCGCCGGTCAGACAAATCAAATGGT-3´) derivado del extremo 5´.
- K212R-*down* (5´-ACCATTTGATTTGTCTGACCGGCGATTCA-3´) derivado del extremo 3´.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo con una ADN polimerasa de alta fidelidad (BIO-X-ACT Long, Bioline, EEUU) apta para fragmentos largos, para asegurar la amplificación de todo el plásmido molde de forma correcta. Este método permite introducir mutaciones en el DNA bicatenario, eliminándose el paso de desnaturalización del plásmido. Las condiciones de PCR fueron las siguientes:

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	95	1 min 30 seg
2	95	45 seg
3	65	30 seg
4	72	7 min
5	Repetición de los pasos 2-4 (x2)	
6	95	45 seg
7	65	30 seg
8	72	8 min
9	Repetición de los pasos 6-8 (x2)	
10	95	45 seg
11	65	30 seg
12	72	9 min
13	Repetición de los pasos 10-12 (x2)	
14	95	45 seg
15	65	30 seg
16	72	12 min
17	Repetición de los pasos 14-16 (x7)	
18	72	10 min

Una vez obtenido el producto de amplificación y purificado por el mismo procedimiento descrito anteriormente, se digiere durante una hora este DNA metilado o hemimetilado (parental/molde) con la endonucleasa *Dpn*I de New England Biolabs (Beverly, MA, EEUU). *E. coli* metila el DNA durante la replicación del plasmídico transformado, y al extraerse estará por lo tanto marcado. La enzima *Dpn*I digiere el ADN molde (sin las mutaciones) y metilado quedando únicamente el DNA amplificado (con las mutaciones). Dicho plásmido es transformado en una cepa de clonación *E. coli* XL1-Blue con alta electrocompetencia (capacidad de una cepa de captar el DNA externo mediante electroporación). Tras su selección y comprobación de la incorporación de la mutación (por secuenciación), se transformó en una cepa de expresión, *E coli* Rosetta (DE3) y se llevó a cabo la expresión de la proteína recombinante de forma similar al clon parental.

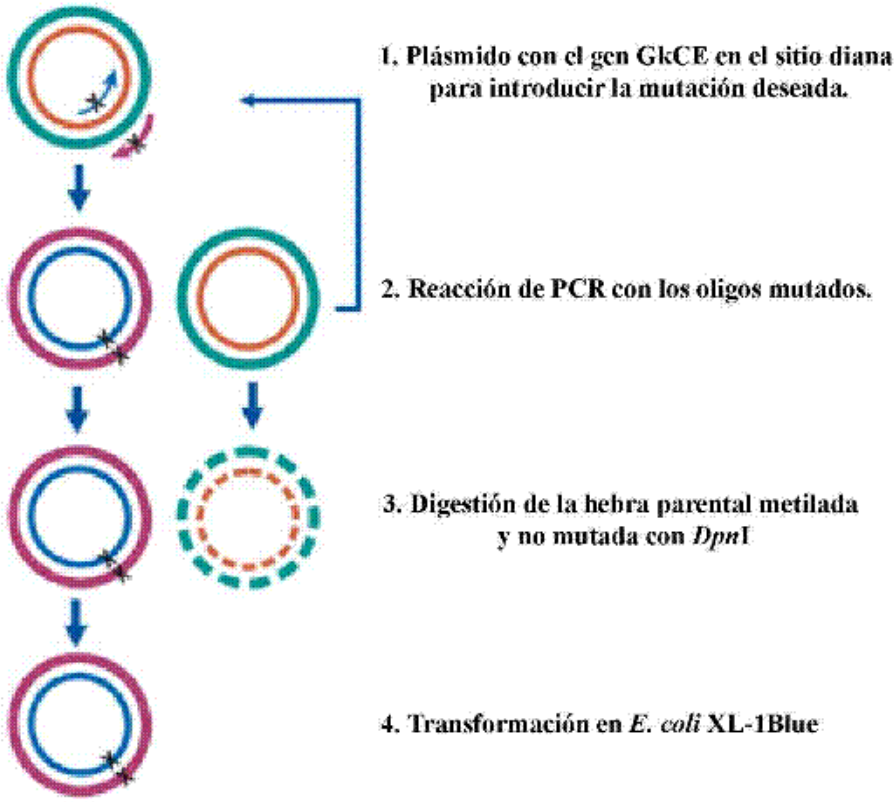


Figura 3.2: Descripción de la técnica de mutagénesis dirigida empleada para incorporar mutaciones en DNA bicatenario.

5.4. Obtención de BhCE recombinante de *B. halodurans*

El locus *tag* BH3554, de 747 pb, se amplificó a partir de genómico de *Bacillus halodurans* C125 mediante PCR. Los oligonucleótidos específicos para este gen fueron:

- BhCE-up (5´-GGAATTCATGAAGCTCGTCGCACCAAAGCC-3´) derivado del extremo 5´ de la secuencia del gen.
- BhCE-down (5´-GGCGGCCGCTTACTCGGACCAATTCAGCCCTT-3´) derivado del extremo 3´ de la secuencia del gen.

Estos cebadores derivados de la secuencia del gen y complementarios con los extremos 5´ y 3´, contienen las secuencias reconocidas por las enzimas de restricción *Eco*RI y *Not*I, respectivamente. Las condiciones de reacción de PCR fueron las mismas que las descritas para la amplificación del gen BpAXE pero con 65 °C de temperatura de alineamiento. El producto de amplificación fue purificado, digerido y ligado al vector pET28a, al igual que en el caso anterior. Se comprobó también la presencia del gen sin mutaciones, y se transformó con el vector en *E.*

coli Rosetta (DE3)pLys para proceder a la expresión de la proteína recombinante, mediante inducción a 0.5 mM, 30 °C, durante 14 horas.

6. Purificación de proteínas

6.1. Ultrafiltración tangencial

Inicialmente y antes de la ultrafiltración tangencial, las células del cultivo de un litro de TB se rompieron en un homogeneizador (MiniZetaII, Netzsch, Germany) con bolas de vidrio (0.5 mm). Los ácidos nucléicos del extracto enzimático resultante se eliminaron mediante 30 min de incubación a temperatura ambiente, con 3 U/mL de DNasa (Sigma, Madrid), y posterior centrifugación durante 15 min a 6000*g*, 4 °C.

La técnica de ultrafiltración tangencial se utilizó en la purificación de los diferentes extractos enzimáticos (BpAXE, YlCE, GkCE y BhCE), de esta forma se eliminaron las moléculas de baja masa molecular, siendo además útil en la concentración (reducción de volumen) del extracto. Se utilizaron diferentes filtros de tamaño de poro variable, dependiendo de la masa molecular de las proteínas (100 kDa para BpAXE-GkCE y 30 kDa para YlCE-BhCE), conectadas a un equipo QuixStand Benchtop system (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia). Los extractos obtenidos de la fermentación de un litro de bacterias recombinantes se concentraron hasta reducirlos unas cinco veces el volumen inicial.

6.2. Cromatografía de intercambio iónico

Como segundo paso de purificación para BpAXE, BhCE y YlCE, se utilizó la columna de intercambio aniónico CaptoQ 5 mL (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia), conectada a un ÄKTA Prime Plus Purifier (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia). Este equipo permite conectar hasta 3 columnas de 5 mL en serie, por lo que la muestra inyectada será mayor. Se equilibró la columna con Tris-HCl 50 mM pH 8.0, (para BpAXE y BhCE) o tampón fosfato 50 mM, pH 7.5 para YlCE. Se eluyó con los mismos tampones, respectivamente, pero con NaCl 1M a un flujo de 10 mL/min., BpAXE y BhCE se eluyeron mediante un escalón de 25% de NaCl 1 M, y YlCE con 20% de NaCl 1 M.

6.3. Cromatografía de afinidad

Los extractos enzimáticos parcialmente purificados de BpAXE, YlCE y BhCE, y directamente de la ultrafiltración tangencial en el caso de GkCE, se purificaron por

cromatografía de afinidad (IMAC) en el mismo ÄKTA Prime Plus Purifier (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia). Estas cuatro enzimas poseen una cola de seis histidinas en el extremo N-terminal (GkCE, BhCE, AXE) o C-terminal (YICE) que les permitirá unirse a los cationes Ni^{2+} presentes en la sepharosa de la columna HisTrap FF 5mL (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) (Crowe y col., 1994). Se utilizaron hasta 3 columnas HisTrap FF 5mL en serie. La muestra se inyectó en la columna (aproximadamente 40 mg de proteína en cada pinchazo), y se llevaron a cabo diferentes métodos a 10 mL/min dependiendo de la proteína. BpAXE, YICE y BhCE se eluyeron en un gradiente lineal de 40 a 60 mM de imidazol, mientras que GkCE se eluyó en un escalón de 50-65 mM de imidazol. Las fracciones con actividad se seleccionaron y se dializaron en columnas PD-10 pre-empaquetadas con Sephadex (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) para eliminar el imidazol y el NaCl del extracto purificado. Se comprobó la pureza de la proteína mediante gel SDS-PAGE. Las muestras dializadas se alicuotaron y congelaron a -80 °C en presencia de 5% de glicerol (v/v).

7. Metodología de proteínas

7.1. Cuantificación de proteínas

La determinación de la concentración de proteínas se llevó a cabo mediante el método Bradford (Bradford, 1976), empleando albúmina de suero bovino (BSA) como patrón, para realizar la correspondiente curva de calibrado.

7.2. Electroforesis en geles de acrilamida

Para la resolución electroforética de proteínas se siguió el método de electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) en presencia del detergente aniónico dodecilsulfato sódico (SDS), descrito por Laemmli en 1970. Los geles separadores utilizados, 1.5 mm de espesor, estaban constituidos por acrilamida al 12% (p/v) en tampón Tris-HCl 375 mM, pH 8.8 con SDS 0.1% (p/v), persulfato amónico 0.05% (p/v) y TEMED 0.07% (v/v), estos dos últimos para iniciar la reacción de polimerización. Las muestras se aplicaron a un gel concentrador compuesto por acrilamida al 4% (p/v) en tampón Tris-HCl 125 mM, pH 6.8 conteniendo SDS al 0.1% (p/v), persulfato amónico 0.05% (p/v) y TEMED 0.07% (v/v).

Las muestras (15 µL) se mezclaron con 5 µL de tampón de carga 4X desnaturalizante compuesto por glicerol 15% (v/v), SDS 3% (p/v), azul de bromofenol 0.015% (p/v) y β-mercaptoetanol 7.5% (v/v) en tampón Tris-HCl 100

mM, pH 6.8. Las muestras se calentaron 4 min a 100 °C antes de cargarse en el gel concentrador.

El tampón de recorrido también lleva SDS, al 0.1% (p/v), se compone de Tris 25 mM y glicina 200 mM, pH 8.3. Las muestras se corrieron en un equipo Mini-Protean III de BioRad (Hercules, EEUU) a una diferencia de potencial de 200 V durante aproximadamente 45 min. Se utilizó una fuente de electroforesis Power Pac 300 de BioRad (Hercules, EEUU).

La visualización directa de proteínas se realizó mediante la tinción con Azul Coomassie (Brillant Blue, Sigma, EEUU) durante aproximadamente 30 min. Los geles se destiñeron y conservaron en una solución compuesta por 30% metanol-10% ácido acético.

Para determinar la masa molecular de las proteínas desnaturalizadas en los geles SDS-PAGE, se utilizó el marcador de masa molecular P7708S de New England Biolabs, que comprende proteínas entre 6.5 y 175 kDa (Weber y col., 1972).

La masa molecular del monómero de las proteínas GkCE de *G. kaustophilus* HTA426 y BhCE de *B. halodurans* C125 se determinó también por espectrometría de MALDI-TOF o electrospray para una mayor precisión. El procedimiento se basa en la separación previa de la muestra en un HPLC HP/1100 LC/MSD Ion Trap System (Agilent Technologies, EEUU). El acoplamiento de dicho HPLC a un espectrómetro de masas tipo ESI-Trap (*Trap XCT Plus* de Agilent Technologies, EEUU) permite finalmente el cálculo preciso de la masa molecular. Con esta técnica se obtienen masas moleculares de hasta 1 Da de precisión (Pearcy y col., 2001; Williams y col., 2001). Los análisis de espectrometría de masas por electrospray fueron realizados por el Servicio de Proteómica del Centro de Ayuda a la Investigación y Desarrollo (CAID) de la Universidad de Murcia.

7.3. Análisis de imagen

La cuantificación del porcentaje de proteína recombinante expresada se determinó mediante el análisis de la imagen obtenida de los geles de electroforesis en el equipo Image Quant TL (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) del Servicio de Apoyo a las Ciencias Experimentales (SACE).

7.4. Diálisis y concentración

La proteína BpAXE purificada se dializó frente a Tris-HCl 50 mM pH 8.0 durante toda una noche a 4 °C. Posteriormente, las muestras dializadas se concentraron hasta alcanzar concentraciones de 9 mg/mL mediante el uso de concentradores centrífugos Amicon Ultra de 30 kDa (Millipore Corporation, Billerica, EEUU) para llevar a cabo ensayos de cristalización.

7.5. Determinación de la masa molecular de las proteínas nativas

El cálculo de las masas moleculares de las proteínas nativas se realizó por filtración en gel. Para ello se usó la columna Superdex 200 10/300 GL (Amersham Biosciences, Uppsala Suecia) equilibrada con tampón fosfato potásico 50 mM pH 8.0 conteniendo 150 mM NaCl. Los experimentos se realizaron en un equipo ÄKTA Purifier (Amersham Biosciences, Uppsala Suecia) a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min. Los cálculos se hicieron comparando la recta de calibrado elaborada con el kit de marcadores de masa molecular (Sigma, Madrid). Los marcadores utilizados fueron alcohol deshidrogenasa (160 kDa), albúmina de suero bovino (66.2 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa) y citocromo C (13 kDa). Las diferentes proteínas recombinantes, previamente purificadas, se dializaron frente al tampón de equilibrado y seguidamente se introdujeron 200 µg de proteína en la columna.

8. Ensayos espectrofotométricos

8.1. Medidas de actividad de BpAXE y carboxilesterasas

Las actividades enzimáticas fueron determinadas en un espectrofotómetro Shimadzu UV-2401PC (Shimadzu Corporation, Japón), con control de temperatura. La actividad enzimática para esteres de *p*-nitrofenilo como *p*-NPAcetato (C_2), *p*-NPButirato (C_4), *p*-NPCaprilato (C_8) *p*-NPLaurato (C_{12}) y *p*-NPMiristato (C_{14}), fue determinada a 405 nm, a pH 8.0 y pH 7.5 (para YICE). El coeficiente de extinción molar del *p*-nitrofenol se calculó a pH 8.0 (ε=16980 $M^{-1}\cdot cm^{-1}$) y a pH 7.5 (9964 $M^{-1}\cdot cm^{-1}$).

El medio de reacción estándar (1 mL) contenía tampón Tris-HCl 50 mM, pH 8.0 (tampón fosfato 50 mM, pH 7.5 para YICE), 50 µl de extracto enzimático a la concentración adecuada y 20 µl de sustrato (2 mM *p*-NPAcetato, 2 mM *p*-NPButirato y 0.8 mM *p*-NPCaprilato en cubeta). Una unidad de actividad se define como la cantidad de enzima requerida para la producción de 1 µmol de producto por minuto a 25 °C.

La determinación de los parámetros cinéticos se llevó a cabo mediante el ajuste a las ecuaciones cinéticas adecuadas empleando el programa SigmaPlot versión 10.0 (Systat Software Inc., USA).

9. Estabilidad enzimática

9.1. Efecto de la temperatura

Con el fin de observar la estabilidad de las enzimas frente a la temperatura, se incubaron a temperaturas entre 30-80 °C durante diferentes tiempos, desde 1 min hasta 16 horas. Tras esto, se midió la actividad espectrofotométricamente en el medio de reacción estándar con *p*-NPCaprilato (para GkCE y BhCE), *p*-NPButirato (para YICE) y *p*-NPAcetato (para BpAXE) a 25 °C.

9.2. Efecto del pH

Con el fin de determinar la estabilidad de las enzimas frente al pH, se incubaron las diferentes enzimas a 30 °C en los siguientes tampones (50 mM) durante 24 h (BpAXE, YICE y GkCE) y 48 h (BhCE): acetato sódico (pH 4.0-5.5), fosfato potásico (pH 6.0-8.0), Tris-HCl (pH 8.0-9.0), ácido bórico (pH 9.5-11) y se midió la actividad espectrofotométricamente en el medio de reacción estándar con *p*-NPCaprilato (para GkCE y BhCE), *p*-NPButirato (para YICE) y *p*-NPAcetato (para BpAXE) a 25 °C. Para determinar el pH óptimo de las enzimas, se midió en los mismos tampones pero entre pH 6.5-9.0 debido a la estabilidad de los ésteres de *p*-nitrofenilo: con *p*-NPCaprilato para GkCE y BhCE, *p*-NPButirato para YICE y *p*-NPA para BpAXE. También, la variación del coeficiente de extinción molar (ε) del *p*-nitrofenol con el pH se tuvo en cuenta para el cálculo de la actividad (Tabla 3.3).

Tabla 3.3: Variación del coeficiente de extinción molar del *p*-nitrofenol (producto de la reacción) con el pH.

pH	ε (M^{-1}·cm^{-1})
6.5	4720
7	6225
7.5	9964
8	16980
8.5	18180
9	19576

9.3. Efecto de los cationes divalentes

Con el fin de determinar si las esterasas requieren cofactores, se incubaron las diferentes enzimas en presencia de 5 mM cationes (Mg^{2+}, Cu^{2+}, Co^{2+}, Ca^{2+}, Zn^{2+}, Mn^{2+} y Fe^{2+}), durante 30 min a 30 °C. Seguidamente, se midió actividad con el medio de reacción estándar para determinar el efecto. Se añadió EDTA 10 mM, a

modo de quelante, durante una hora más a la solución y de nuevo se midió actividad.

9.4. Efecto de diferentes compuestos desnaturalizantes en la actividad

La estabilidad de las enzimas frente a agentes desnaturalizantes, como detergentes (iónicos y no iónicos), disolventes orgánicos y urea, se determinó. Cada experimento se llevó a cabo con dos concentraciones diferentes de los compuestos: 0.1% y 0.5% (p/v) para los detergentes; 40% y 90% (v/v) para los disolventes orgánicos; 1 M y 8 M para la urea. Se incubaron las enzimas durante 1 hora a 30 °C (y 60 °C para GkCE) y se midió actividad con el medio de reacción estándar para determinar el efecto.

9.5. Efecto de compuestos inhibidores

Compuestos inhibidores de aminoácidos como piridoxal-5´-fostato (PLP) que se une específicamente a la lisina, fenilglioxal (PGO) que se une a la arginina, fenilmetilsulfonil fluoride (PMSF) que se une a la serina, y dietilpirocarbonato (DPC) que se une a la histidina, fueron utilizados con las diferentes enzimas. Se incubaron las enzimas en presencia de 0.5 y 5 mM de estos compuestos durante 30 min a 30 °C y se midió actividad en el medio de reacción estándar.

Paraoxon y Eserina, que ayudan a conocer el mecanismo de acción de las esterasas, se estudiaron también en las mismas condiciones.

10. Medida de actividad mediante HPLC

10.1. Actividad sobre 7-ACA y CPC

La actividad sobre 7-ACA y CPC se siguió mediante HPLC, en un sistema Shimadzu (Shimadzu Corporation, Japón), equipado con un detector de diodos, muestreador automático termostatizado, una pre-columna y una columna Kromasil C_8 de 5 µm de dimensiones 150 x 4.6 mm (Análisis Vínicos S.L., Tomelloso, España). La fase móvil utilizada fue 10 mM tetrabutil amonio hidrógeno sulfato (TBHAS), 10 mM KH_2PO_4 y 30% metanol a pH 6.5. El volumen de inyección para cada pinchazo, incluyendo las rectas patrón, fue 20 µL. Para un flujo de 1 mL/min, los tiempos de retención a 254 nm fueron los siguientes: 3.5 min y 5.4 min para desacetil 7-ACA y 7-ACA, respectivamente, 2.6 min y 4.5 min para desacetil-CPC y CPC, respectivamente (Figura 3.3).

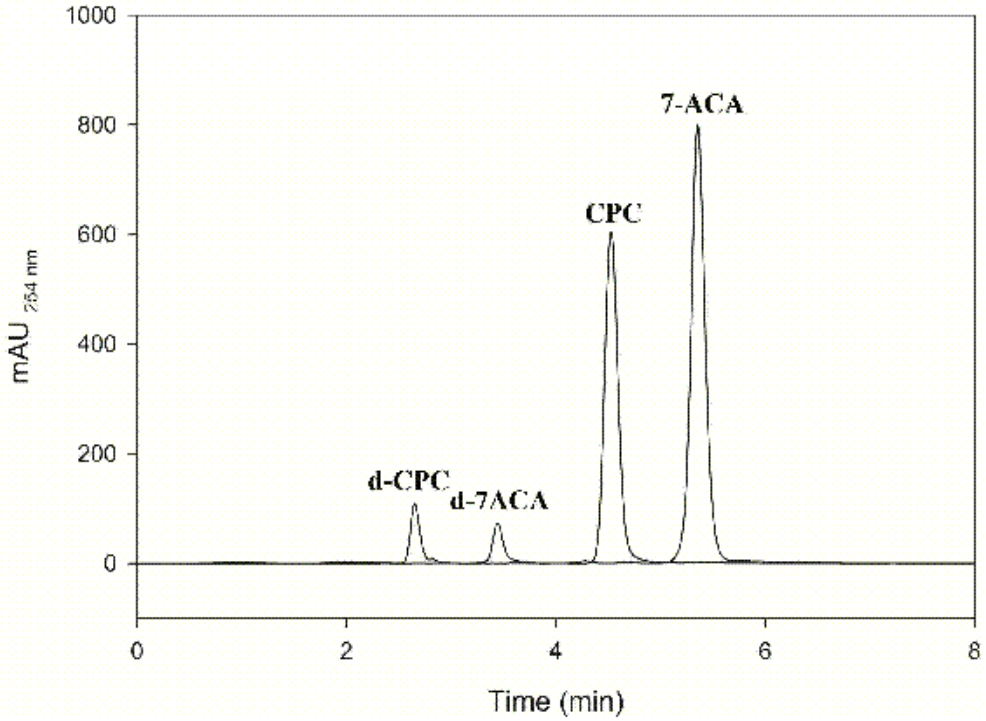


Figura 3.3: Cromatograma con desacetil-CPC, desacetil-7ACA, CPC y 7-ACA.

Se incubaron a 20 °C en presencia de 100 mM de estos sustratos (7-ACA o CPC) en 150 mM tampón fosfato potásico, pH 7.5, las diferentes enzimas, con hasta 200 µg de proteína (GkCE, BhCE y YlCE) y apenas 20 µg de BpAXE. Para la enzima soluble, la reacción se pinchaba en el HPLC de inmediato, tras diluir en fase móvil (dilución 1/100). En el caso de CLEAs (generalmente 40 µg), la reacción se paraba mediante simple centrifugación (2 min a 16000*g*), y el sobrenadante se diluía en la fase móvil (dilución 1/100), para ser a continuación, pinchado en el HPLC.

10.2. Actividad sobre (R, S)-ketoprofeno metil ester

Para seguir la hidrólisis del (R, S)-ketoprofeno metil ester, se utilizó el mismo HPLC, pero equipado con la columna quiral Chirex 3005 (Phenomenex) de 250 x 4.6 mm y su respectiva precolumna. Se utilizó la columna en fase reversa con 30 mM de acetato amónico en metanol, y 0.2 % de ácido acético para permitir una mejor separación de los enantiómeros (ácidos del ketoprofeno). Para un flujo de 0.8 mL/min y 254 nm, los tiempos de retención fueron 5.51 min para el (R, S)-ketoprofeno metil ester, 16.0 y 18.74 min para el (R)-ketoprofeno y (S)-ketoprofeno, respectivamente (Figura 3.4). Mediante la siguiente fórmula, se

calculó el exceso enantiomérico (ee_p) de YICE de *Yarrowia lipolytica*, GkCE de *G. kaustophilus* HTA426 y BhCE de *B. halodurans* C125.

$$\text{Exceso enantiomérico } (ee_p) = \frac{[P - Q]}{[P + Q]} \times 100$$

$$C = \frac{(\%\ P + \%\ Q)}{100}$$

Dónde, P es la especie ácida de mayor proporción y Q la de menor proporción. Se obtuvieron los datos de ee_p para un determinado grado de conversión (C), y con estos valores se pudo calcular el ratio enantiomérico (E) para cada enzima, mediante la ecuación de Sih y Chen, 1984:

$$E = \frac{\ln\left(1 - C(1 + ee_p)\right)}{\ln\left(1 - C(1 - ee_p)\right)}$$

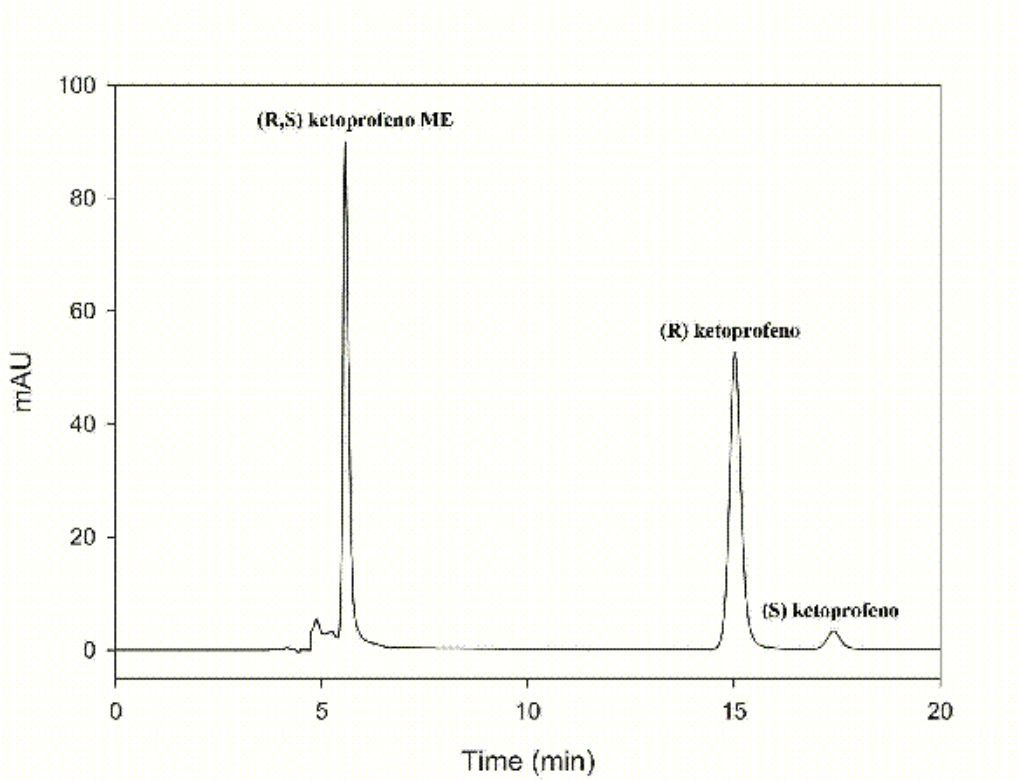


Figura 3.4: Cromatograma de (R, S) ketoprofeno metil ester y sus respectivos ácidos.

Para determinar los parámetros cinéticos, se incubaron 3 mL de reacción con 200 µg de las diferentes enzimas purificadas en Tris-HCl 50 mM pH 8.0 (tampón fosfato 50 mM, pH 7.5 para YICE), 0.5% Triton X-100 y (R, S)-ketoprofeno metil

ester hasta 5 mM durante 90 min a 30 °C. La reacción se paraba con la adición de la fase móvil (dilución 1/10) y centrifugando (2 min, 16000*g*).

11. Cristalización de la AXE de *B. pumilus*

11.1. Introducción a la determinación de estructuras de proteínas mediante difracción de rayos X

La cristalografía de rayos X es un área de investigación importante dentro del estudio de las proteínas ya que nos proporciona información sobre las propiedades estructurales de éstas. Sin embargo, existen varios inconvenientes que hay que superar antes de poder determinar esa estructura tridimensional por rayos X.

Uno de los primeros inconvenientes es que la proteína de estudio tiene que ser cristalizada, y los cristales deben ser únicos y de buena calidad, entendiendo como cristal la repetición de la celda unidad de átomos o iones en tres dimensiones. La presencia de impurezas, el núcleo de cristalización y otros factores desconocidos juegan un papel muy importante en el proceso.

La cristalización es básicamente un proceso de ensayo-error, en el cual las proteínas son lentamente precipitadas en su solución. Los experimentos de cristalización se realizan a bajas temperaturas, y en un sistema cerrado bajo condiciones controladas. El disolvente, normalmente, es una solución acuosa tamponada con algún agente precipitante, pero a una concentración a la cual la precipitación no tiene lugar. Y como regla general, la proteína debe estar lo más pura posible y concentrada, entre 5 y 20 mg/mL, en un tampón en el que sea estable y soluble.

Existen diferentes técnicas de cristalización de proteínas: "*hanging drop*", "*sitting drop*" y diálisis, aunque el método más empleado es el "*hanging drop*" o "gota colgante" (Figura 3.5). Se basa en la difusión de vapor entre la gota, formada por mezcla de volúmenes iguales de disolvente y proteína, y la disolución que se encuentra en el pocillo (al doble de concentración que la gota colgante). De esta forma, las concentraciones del agente precipitante y de la proteína aumentan de forma gradual, hasta que finalmente esta última precipita, y ahí se forman los cristales. El tiempo de formación de estos cristales es muy variable, puede tardar días, semanas, meses o incluso no formarse nunca. En nuestro caso, se observaron pequeñas estructuras amorfas desde la primera semana y los cristales de buena calidad fueron recolectados a las dos semanas después de poner las ampliaciones de los *screenings*.

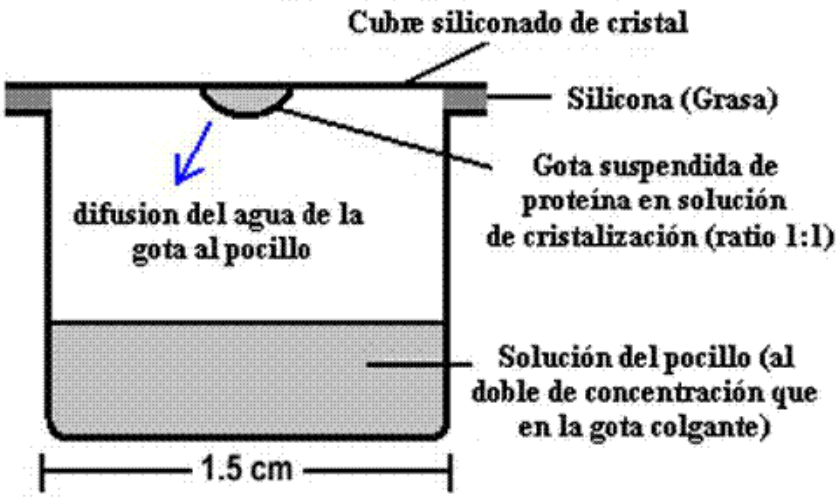


Figura 3.5: Descripción de la técnica de cristalización por difusión de vapor, "*Hanging drop*".

Una vez se ha conseguido el cristal, éste se somete a difracción de rayos X, los cuales consisten en una radiación electromagnética cuya longitud de onda se encuentra comprendida entre 10^{7} y 10^{11} (100 Å-0.1 Å). Se producen por el bombardeo de un metal (generalmente cobre o molibdeno), con los electrones obtenidos a causa del calentamiento de un filamento y de la aceleración ejercida por un campo eléctrico. Estos electrones, con un alto nivel de energía, colisionan y desplazan a los electrones del orbital más interno del metal. Entonces, electrones de los orbitales más altos ocupan posiciones disponibles en los orbitales más internos, produciéndose la liberación de energía en forma de fotones de rayos X, los cuales inciden sobre el cristal. La longitud de onda a la cual los rayos X son emitidos depende del material del metal, y su intensidad es proporcional a la velocidad a la cual el calor es dispersado por éste.

En la actualidad, existen tres tipos de fuentes de rayos X: los tubos de rayos X, los tubos de ánodo rotatorio y los aceleradores de partículas. La fuente más potente de ellas es esta última, la cual se emplea para la obtención de radiación sincrotrónica, no obstante requiere de instalaciones tan especiales, como los aceleradores de partículas.

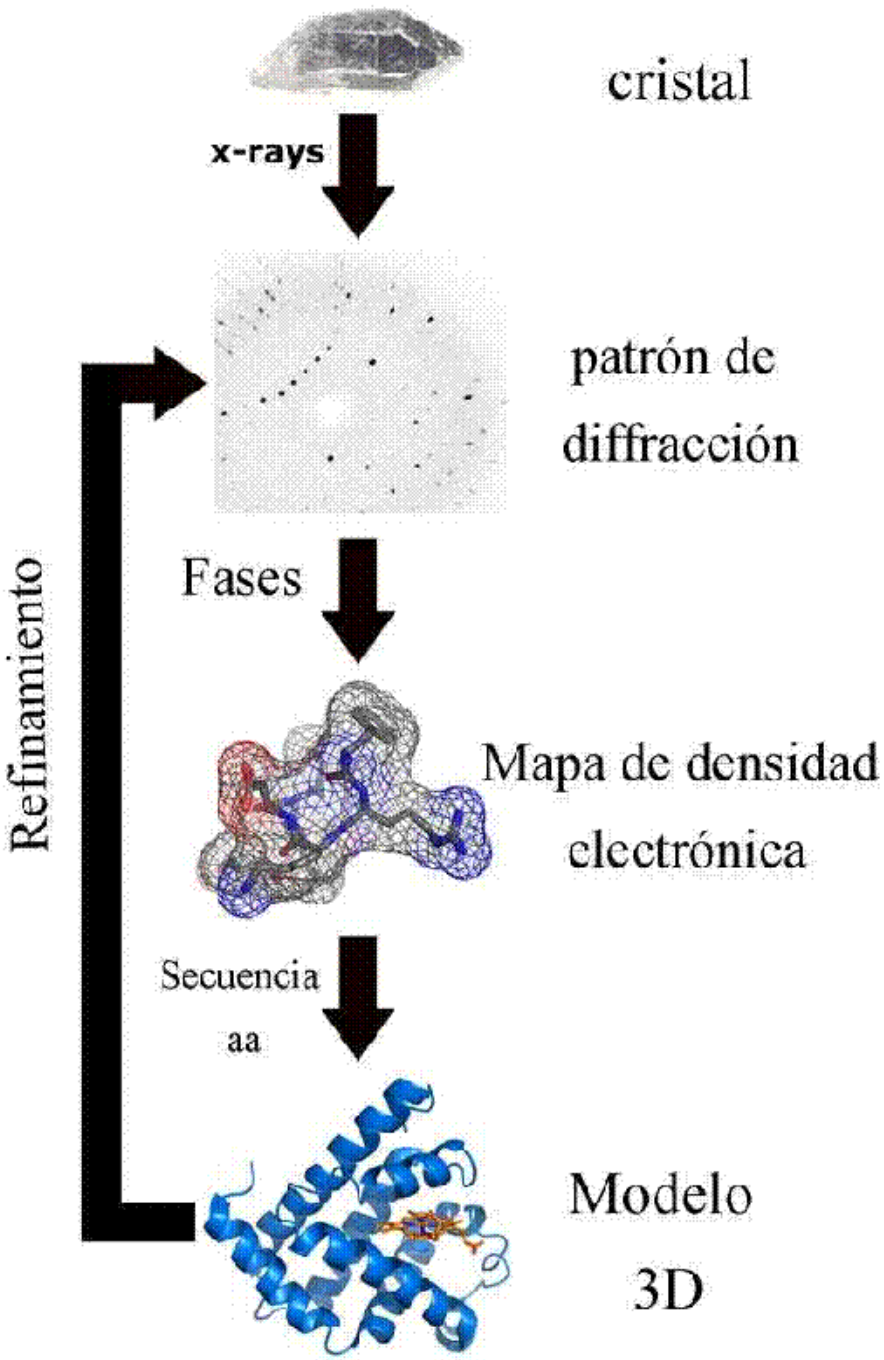


Figura 3.6. Esquema del proceso de determinación de la estructura molecular de una proteína.

Cuando un cristal se somete a difracción de rayos X, el resultado obtenido es un patrón de difracción, el cual consiste en millones de señales que constituyen el dato en crudo. Cada una de las señales está determinada por tres parámetros que son necesarios para obtener el mapa de densidad electrónica. Dichos parámetros son la posición, la intensidad y la fase de ondas que forman cada señal. Los dos

primeros son relativamente fáciles de determinar, sin embargo, la resolución de la fase constituye otro de los grandes inconvenientes de la cristalografía de rayos X. Con el fin de solventar este problema, frecuentemente se emplea la técnica de reemplazamiento isomorfo. Este método se basa en la incorporación de metales pesados en la proteína cristalizada, sin modificar su estructura. Pero este objetivo no siempre se consigue, ya que en algunas ocasiones sí que existen modificaciones. En estos casos se recurre a otra técnica, en la cual los metales pesados se incorporan directamente en las proteínas recombinantes. Para ello se sustituye el aminoácido metionina por seleniometionina, sin variar prácticamente la estructura de la proteína, sin embargo, se trata de una técnica bastante tediosa ya que requiere el uso de medios de crecimiento e inducción de proteína diferentes a los comunes, y el rendimiento proteico suele ser muy bajo.

El resultado de una buena cristalización y determinación de la fase es una imagen tridimensional formada por nubes de electrones de la proteína, que se conoce con el nombre de mapa de densidad electrónica (Figura 3.6). A partir de este mapa y con la secuencia de aminoácidos, se construye un modelo inicial de la estructura de la proteína, el cual da lugar a un modelo final, tras ser sometido a una serie de refinamientos. Este último modelo de la estructura de la proteína consiste en las coordenadas cartesianas de cada uno de los átomos de la molécula, excepto de los átomos de hidrógeno. Una propiedad importante del modelo final es su resolución, es decir, la mínima distancia que puede ser definida. La unidad de éste parámetro es el Amstrong (Å), y cuanto menor sea su valor, mayor será la resolución, es decir, el mapa de densidad electrónica será de mayor calidad.

11.2. Cristalización de AXE de *B. pumilus*

La cristalización, difracción y procesamiento de datos se realizó en colaboración con el grupo de investigación del Prof. D. Vicente Rubio (Instituto de Biomedicina y Enfermedades Raras, CSIC, Valencia).

Para la cristalización de la AXE de *B. pumilus*, se necesitaron grandes cantidades de enzima de alta pureza (>99%), a dos concentraciones, 5 mg/mL y 9 mg/mL. Los ensayos preliminares de cristalización de la enzima libre se llevaron a cabo empleando todas las soluciones que se encuentran en los kits comerciales de Hampton (Hampton Research, EEUU): *Crystallization Screen I, Screen II, Index, Custom 5, Custom 101 y JCSG*. Los ensayos se realizaron a 4 °C y a 21 °C mediante la técnica de "*hanging drop*" o gota colgante (Figura 3.5). También se realizaron ensayos de cristalización con el complejo BpAXE-Paraoxon, dónde se añadió paraoxon 5 mM a la enzima purificada.

11.3. Ampliación de los *screenings*

En base a los ensayos preliminares de cristalización para la AXE de *B. pumilus*, se realizaron diferentes ampliaciones de las soluciones de *screenings*. Numerosos pocillos produjeron partículas amorfas (no cristales), y merecieron ampliar las concentraciones de los agregantes y los precipitantes. A modo de ejemplo:

- Pocillo D5 de CUSTOM 101 (contiene 0.5 M tampón fosfato, 15% PEG 3350 y 0.05 M acetato pH 5.0), aparecen unas extrañas estructuras alargadas que no llegan a tener una estructura repetida similar a un cristal (Figura 3.7). En una nueva placa y conservando la temperatura y concentración de enzima del ensayo anterior, se realizan las siguientes variaciones:

PEG 3350	10	12	14	16	18	20
0.2	9 mg/mL BpAXE					
0.3	21 °C					
0.4	1 µL solución + 1 µL enzima en la gota					
0.5	50 mM acetato pH 5.0					
(M) Fosfato						

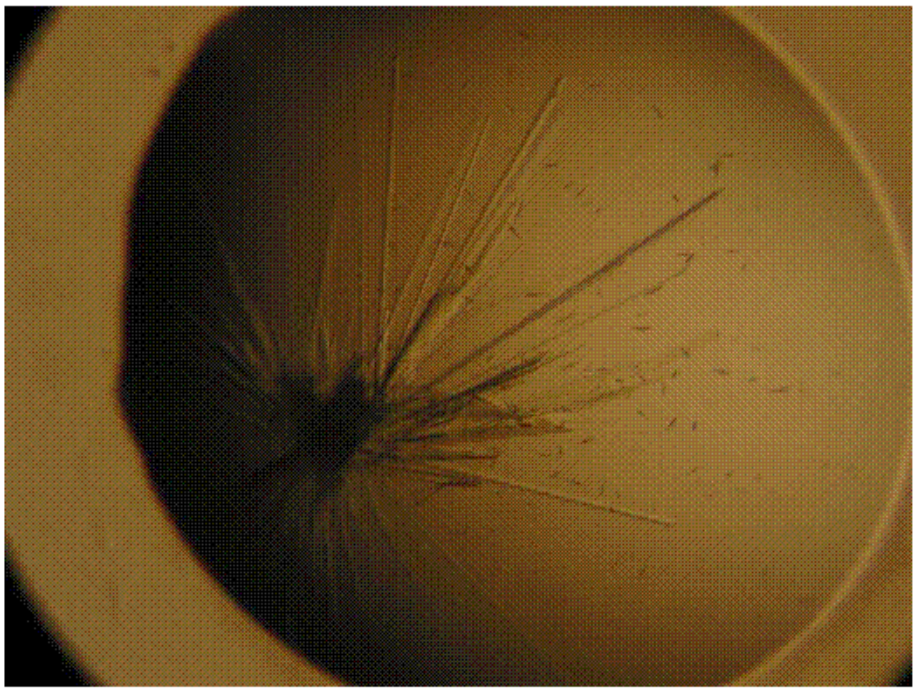


Figura 3.7: Estructuras alargadas que no llegan a considerarse cristales, pero que requerirían una ampliación de las condiciones para obtener cristales más definidos.

Así pues, se realizaron ampliaciones de los pocillos de los *screenings* comerciales de la Tabla 3.4.

Tabla 3.4: Pocillos con estructuras amorfas a 4 o 21 °C, se ampliaron esas condiciones en busca de la aparición de cristales bien definidos.

Screening	Pocillo
CUSTOM 101	B7 (4 °C)
	D5
	E9 (4 °C)
JCSG	B11
	D7 (4 °C)
	G7
	G8
INDEX	B7 (4 °C)
	F3
	F8
	F9
	G4
	G5
	H2
	H3
	H7
CUSTOM 1	B2
	C1
	D12
	E9 (4 °C)
	H1
CRYSTAL SCREEN I-II	B2
	B11
	D4
	D5

Se obtuvieron finalmente cristales de buena calidad en varias condiciones (Figura 4.7). Las mejores de ellas fueron las siguientes:

- INDEX H7 (0.15 M ácido-DL-málico pH 7.0, 20% PEG 3350)
- JCSG B11 (1.6 M citrato trisódico)
- JCSG G7 (0.1 M ácido succínico pH 7.0, 15% PEG 3350)
- Crystal Screen I B2 (0.1 M Hepes pH 7.5, 0.2 M $CaCl_2$, 28% PEG 400)
- Crystal Screen I B11 (0.1 M Hepes pH 7.5, 0.2 M $MgCl_2$, 30% PEG 400)

- Crystal Screen II D4 (0.2 M NH_4 acetato, 0.1 M Bis-Tris pH 5.5 y 45% 2-metill-2,4-pentanediol) para el complejo BpAXE-paraoxon.

11.4. Producción de BpAXE para cristalización

El uso de seleniometionina como herramienta para la resolución de las fases se remonta a 1990. De hecho, es la técnica más comúnmente utilizada en estudios de difracción. Permite la expresión y purificación tanto de proteínas procarióticas como eucarióticas, además en proteínas ricas en metionina se ha observado incluso mayor estabilidad. En casos extremos, cuando ni con la seleniometionina se resuelven las fases de la proteína, se puede combinar su uso con el reemplazamiento de fase inicial.

Existen diferentes formas de reemplazar la metionina por la seleniometionina en una proteína, en nuestro caso inhibimos la vía de síntesis de la metionina en *E. coli* con el medio M9 y le suplementamos seleniometionina al medio para que las bacterias la asimilaran. Elevadas concentraciones de isoleucina, lisina y treonina bloquean la biosíntesis de metionina en *E. coli*, ya que se inhibe la aspartokinasa (primera enzima en la biosíntesis). Además la leucina, valina y fenilalanina actúan sinérgicamente con la lisina. Así pues, tras la optimización de las condiciones de cristalización, se realizó lo siguiente:

- Cultivar el clon productor de BpAXE (*E. coli* con pET28a-AXE) toda la noche en LB (1 mL).
- Centrifugar las células en condiciones estériles y resuspender en 1 mL de medio M9 con una fuente de carbono (preferentemente glucosa) a 4 g/L.
- Pasar este cultivo a 1 L de M9 con glucosa
- Crecer hasta DO_{600}= 0.4-0.6 (importante no superar la etapa *mid-log* de crecimiento) y entonces añadir L-Lys, L-Phe, L-Thr a 100 mg/mL, L-Ile, L-Leu, L-Val a 50 mg/mL y L-SeMet a 60 mg/mL.
- 15 minutos después inducir con 0.5 mM IPTG a 30 °C durante 16 horas (igual que la proteína original).
- Procesar y purificar la proteína normalmente.

Esta técnica es tediosa ya que las densidades ópticas son mucho más bajas que con TB, y por lo tanto el rendimiento proteico mucho más bajo. Por lo que requiere de mayor trabajo para obtener la misma cantidad de proteína que con la inducción clásica. El medio M9 se compone de:

Medio 9 (por L):	200 mL M9 5X 2 mL 1M $MgSO_4$ (2 mM) 20 mL 20% Glucosa (0.4%) Antibióticos 10 mL elementos traza Tiamina, niacinamida, piridoxina y Riboflavina al 0.1% (esterilizadas por filtración)	
M9 5X (por L):	Na_2HPO_4	30 g
	KH_2PO_4	15 g
	NH_4Cl	5 g
	NaCl	2.5 g

11.5. Manipulación de los cristales

Los cristales una vez producidos deben ser recolectados para ser transportados al Sincrotrón y allí ser difractados. Estos se recogen mediante un lazo de hilo de nylon muy fino (Figura 3.8) montado sobre un terminal metálico, el cual está unido a un tapón especial con una pieza de material férrico que permite insertarlo en viales especiales. Estos dispositivos se llenan de nitrógeno líquido, en el cual se sumergen y congelan los cristales para su transporte.

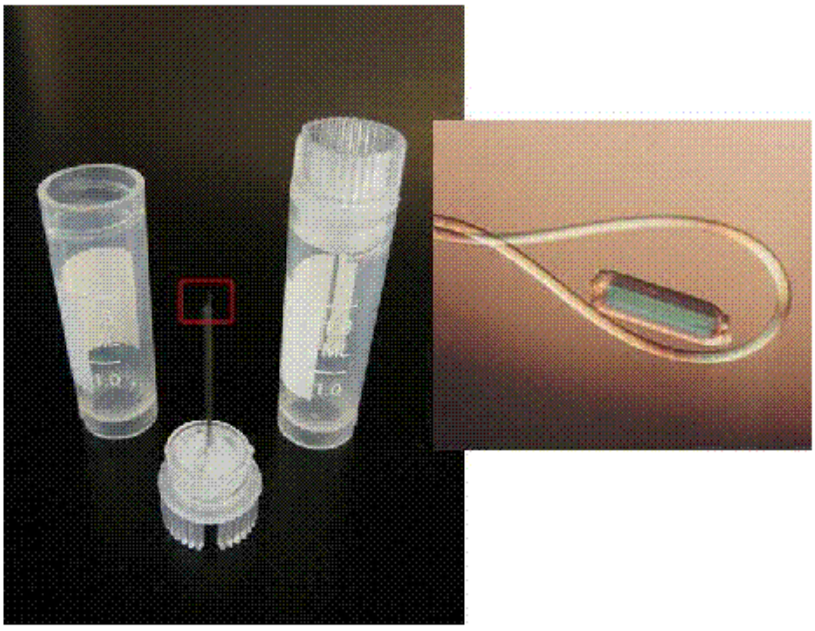


Figura 3.8: Lazos de nylon empleados en la recolección de cristales.

11.6. Difracción de Rayos X de los cristales

La difracción de rayos X y el procesamiento de datos fueron realizados por el grupo de investigación del Prof. D. Vicente Rubio (Instituto de Biomedicina y Enfermedades Raras, CSIC, Valencia).

La difracción de los cristales se realizó en el ESRF de Grenoble (*European Synchrotron Radiation Facility*). Se trata de una instalación sincrotrónica que contiene un anillo de 844 m de circunferencia, por el que se hacen circular electrones a altísima velocidad en el interior de canales rectilíneos, que de vez en cuando quiebran para adaptarse a la curvatura del anillo (Figura 3.9). A estos electrones, se les hace cambiar de dirección para pasar de un canal a otro usando campos magnéticos de gran energía. Y es en ese momento, en el cambio de dirección, cuando los electrones emiten una radiación muy energética denominada: radiación sincrotrónica. Los rayos X que se obtienen en las instalaciones de sincrotrón tienen un brillo un billón de veces (10^{12}) superior a la de los rayos X convencionales.

El procesamiento de los patrones de difracción fue recogido y procesado por cristalógrafos expertos en el Centro de Biomedicina de Valencia.

Figura 3.9: Vista aérea del Sincrotrón ESRF de Grenoble *(European Synchrotron Radiation Facility).*

12. CLEAs de AXE de *B. pumilus*

12.1. Introducción a las CLEAs

Existen varias razones por las que inmovilizar una enzima puede tener interés industrial, entre ellas, la fácil separación producto-enzima y la mayor estabilidad de esta última. Las enzimas son moléculas delicadas, pueden fácilmente perder su estructura tridimensional, perdiendo así su actividad. Es pues necesario, aumentar la estabilidad enzimática frente a cambios de pH, temperatura, tolerancia a disolventes orgánicos y además, aumentar el número de re-usos de la enzima con el fin de aumentar la cantidad de producto final, lo que se traduce en una disminución de los costes por kg de producto.

Se distinguen básicamente tres métodos de inmovilización enzimática: inmovilización sobre soporte (generalmente resina), entrampamiento y entrecruzamiento ("*cross-linking*"). La inmovilización sobre soporte suele ser química (iónica o covalente). Sin embargo, para mantener la enzima unida en condiciones industriales (elevadas concentraciones de reactivos y fuerza iónica) esta unión química debe ser fuerte, y no siempre es el caso. El entrampamiento implica capturar la enzima en una red de polímero. La última categoría inmoviliza la enzima sobre sí misma, no necesita de ningún soporte.

El uso de un soporte supone inevitablemente una "dilución de la actividad", es decir, un menor rendimiento espacio-tiempo, y por lo tanto, de la productividad. De este modo, en los últimos años ha aumentado el interés por enzimas libres de soporte "*carrier-free immobilized enzymes*", como los "*cross-linked enzymes crystals*" (CLECs) o "*cross-linked enzymes aggregates*" (CLEAs), que ofrecen generalmente una mayor estabilidad operacional, alta actividad porque sólo hay enzima (no se "diluye" la actividad), y bajo coste de producción ya que no requiere el uso de caros soportes.

Las CLEAs (agregados de partículas enzimáticas entrecruzadas) son agregados de enzimas precipitadas mediante sales, disolventes orgánicos o polímeros no iónicos. Estos precipitados pueden, a continuación ser "entrecruzados" químicamente mediante la adición de "*cross-linkers*", como el glutaraldehído que es un dialdehído seguro, barato y fácil de manejar. Este compuesto forma enlaces covalentes entre los grupos amino ($-NH_2$) de los residuos de lisina (Figura 3.10). Este entrecruzamiento estabiliza la estructura de estos agregados haciendo más fácil su manejo físico y volviendo generalmente la enzima más resistente a cambios de temperatura, pH, disolventes orgánicos o incluso proteólisis.

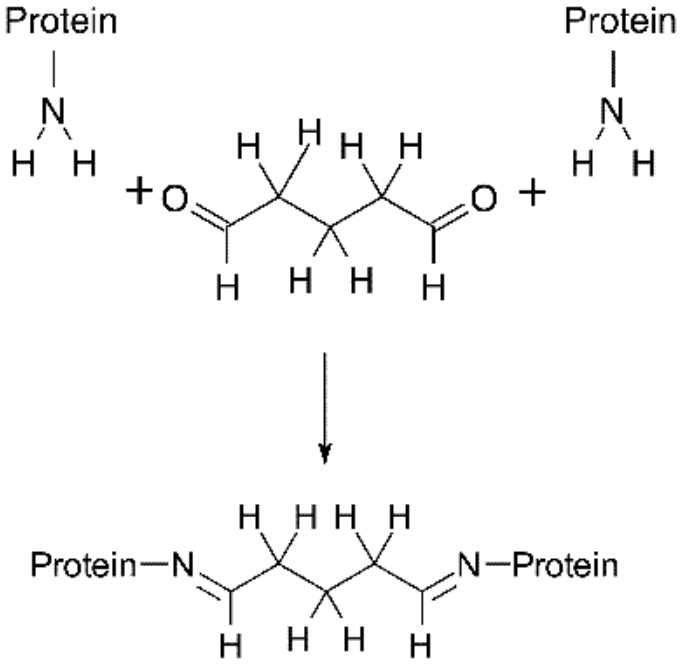


Figura 3.10: Entrecruzamiento de agregados de proteína precipitada mediante la adición de glutaraldehído. Esta unión tiene lugar entre los grupos amino de las lisinas de la enzima y el *cross-linker*, dando enlaces de tipo base de Schiff.

12.2. Optimización de las condiciones

La producción de CLEAs de BpAXE se llevó a cabo en todos los casos a 4 °C, en agitación suave. Se realizó inicialmente una optimización de las condiciones de producción de CLEAs (tipo de precipitante, concentración de precipitante, concentración de glutaraldehído y tiempo de entrecruzamiento). Tras esto, y en las condiciones óptimas, se escaló el proceso para obtener una mayor cantidad de CLEAs y caracterizarlas.

Los ensayos preliminares se realizaron con BpAXE purificada a 1 mg/mL en Tris-HCl 50 mM pH 8.0. Se añadieron por separado a tres soluciones enzimáticas idénticas, tres precipitantes diferentes: sulfato amónico (hasta el 90% de saturación), *tert*-butanol y acetonitrilo a concentraciones finales de 90% (v/v) (atemperados a 4 °C, excepto el *tert*-butanol). Tras una hora en agitación suave a 4 °C, diferentes concentraciones finales de glutaraldehído fresco al 25% fueron añadidas al 0.2, 0.5, 1 y 2% (v/v). Tras esto, alícuotas de 100 µL se cogieron cada media hora, y se diluyeron en 900 µL de tampón fosfato 150 mM, pH 7.5. Se centrifugaron las muestras (2 min, 16000*g*) y se midió actividad (pellet y sobrenadante por separado), a cada tiempo de entrecruzamiento. Se midió actividad con *p*-NPA utilizando el medio de reacción estándar. De este ensayo se

seleccionó el mejor precipitante, la mejor concentración de glutaraldehído y el tiempo óptimo de entrecruzamiento, condiciones para las cuales se recuperaba la mayor actividad específica (UE/mg).

Los extractos fueron lavados con 3 volúmenes de tampón 150 mM fosfato potásico pH 7.5, para ser a continuación, centrifugados (2 min, 16000*g*). Este lavado se repitió hasta tres veces, con el fin de eliminar los restos de precipitante y *crosslinker*.

Una vez determinado el precipitante más adecuado para nuestra enzima, a continuación se estableció, la concentración óptima de precipitación. Para ello se mezcló la solución enzimática (1 mg/mL) con sulfato amónico al 20, 40, 60, 80 y 90% de saturación. Tras una hora en agitación, se centrifugaron las soluciones, se lavaron los pellets, para medir actividad de nuevo, tanto en el sobrenadante (enzima libre) como en el pellet (enzima precipitada).

12.3. Escalado

Los ensayos preliminares produjeron CLEAs con elevado rendimiento usando sulfato amónico al 80% de saturación y 1% de glutaraldehído (v/v) durante tres horas de entrecruzamiento. Se escaló la producción de CLEAs usando una solución enzimática a 5.3 mg/mL. Al final del proceso, las CLEAs fueron centrifugadas (20 min, 6000*g*), lavadas tres veces con tampón fosfato 150 mM pH 7.5 y guardadas en esa disolución a 4 °C, siendo estables durante varias semanas.

12.4. Dispersión de las CLEAs y tamaño de las partículas

Dos sistemas fueron usados para la dispersión de los agregados, el vortex a velocidad media (es el sistema más comúnmente usado en la dispersión de CLEAs), y por primera vez en la bibliografía, se utilizó un disruptor celular para dispersar los agregados de las CLEAs obtenidas, el FastPrep-24 (M.P. Biomedicals, CA, USA) a 6.0 m/s, durante 30 segundos. Este novedoso sistema incorpora un movimiento de vaivén en muchas direcciones a la vez, y que permite la extracción de RNA y DNA de muestras biológicas (Dana y col., 1995), cuando se añaden perlas de vidrio para romper las células.

13. Microscopía

13.1. Microscopía óptica (MO)

Para el estudio del tamaño de las partículas de CLEAs creadas por los diferentes procedimientos anteriormente descritos, se utilizó un microscopio óptico a un aumento de 40X. Este microscopio se encuentra acoplado a un sistema de análisis de las imágenes tomadas (MIP 4.5 image analysis software, Digital Image System, Barcelona, Spain), con el que se calcularon las áreas de cada una de las más de 100 partículas seleccionadas por tratamiento.

13.2. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

Para el estudio de la estructura externa de las CLEAs producidas en los diferentes tratamientos, se utilizó esta microscopía debido a su alta resolución (24 veces mayor que la MO). No fue necesaria la fijación previa de las muestras debido al tratamiento con glutaraldehído (1%) del entrecruzamiento. La preparación del material para la MEB requiere de una metodología laboriosa. Las muestras han de deshidratarse completamente, desecarse y metalizarse con el fin de poder ser estudiadas en un ambiente de alto vacío (10^{5} Torr), donde se puede controlar el haz de electrones.

La deshidratación completa de las CLEAs se llevó a cabo mediante un gradiente de concentraciones ascendentes de acetona (v/v) (30%, 50%, 70%, 90% y 100%), permaneciendo la muestra 10 min en cada concentración. La desecación de las muestras es el siguiente paso en la preparación de las CLEAs, este paso es tremendamente importante, ya que de él depende la conservación de la forma y la estructura de las partículas. Se utilizó la técnica del "punto crítico" (Anderson, 1951), dónde el último compuesto de la deshidratación (líquido intermediario) es desplazado sucesivamente por CO_2 líquido (líquido de transición), que a una temperatura de 31 °C y a una presión de 73.8 Bar, sublima rápidamente sin producir tensión superficial manteniendo así, la estructura tridimensional de las partículas. El CO_2 líquido es soluble en acetona, por lo que esta última será desplazada. Para la desecación por punto crítico se utilizó al aparato Balzer UNION CPD 020 (Balzer Union Ltd, EEUU). Tanto la deshidratación como la técnica de punto crítico se realizaron en el Servicio de Microscopía (SACE, Universidad de Murcia).

Tras la desecación, las partículas se van colocando en pedestales ("*stubs*") de aluminio bajo una lupa binocular. Los pedestales están provistos de una cinta adhesiva conductora de doble cara, colocamos con la ayuda de un micromanipulador las partículas en forma de polvillo. Estos pedestales se colocan,

a continuación, en un metalizador, con el fin de recubrir las CLEAs con una fina capa de oro, técnica llamada "*Sputtering*". El metalizador (BIO-RAD Polaron Division Sputter Coat (EEUU) recubrió las muestras con una capa de oro de 200 Å.

Las muestras ya procesadas, fueron observadas en el MEB Jeol (Japón), modelo JSM 6.100 del SACE, a un voltaje de aceleración de los electrones de 15 KV. Las imágenes del MEB fueron capturadas en formato digital.

14. Formación de complejos (R, S)-ketoprofeno metil ester y HP-β-CD

El diagrama de fases para el (R, S)-ketoprofeno metil ester (KPME) y las 2-hidroxipropil-β-ciclodextrinas, CDs (Roquette Corporation, Francia) se realizó mezclando concentraciones crecientes de CDs a una concentración fija de KPME (Higuchi y Connors, 1965) en tampón pirofosfato potásico 100 mM, pH 8.0. Se mezclaron las soluciones durante 5 días a 25 °C hasta llegar al equilibrio. Tras esto se pasaron por filtros de 0.22 µm (retiene el KPME insoluble) y se diluyeron las muestras en 80% etanol-agua para romper los complejos CD-KPME. Se determinó la concentración de KPME a 256 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-2401PC (Shimadzu Corporation, Japón), con un coeficiente de extinción molar calculado en las mismas condiciones, ε_{256}= 17300 $M^{-1}\cdot cm^{-1}$.

Capítulo IV

Bases moleculares y constantes cinéticas de la inhibición de acetil xilan esterasas por paraoxon.

1. Introducción

Una de las clasificaciones de esterasas ordena estas enzimas de acuerdo con su especificidad de sustrato y susceptibilidad para pesticidas organofosforados como el paraoxon (Park y col., 2006). Sin embargo, esta clasificación las agrupa solamente en cuatro grandes grupos, arilesterasas, carboxilesterasas, acetilesterasas y D-esterasas, por lo está muy limitada y no abarca enzimas como las acetil xilan esterasas (AXEs).

Los plaguicidas permiten ahorrar dinero a los agricultores, ya que previenen las pérdidas de cosechas por insectos y otras epidemias. En concreto, compuestos organofosforados, como el paraoxon y el clorpirifós, han sido ampliamente usados durante décadas para controlar las plagas agrícolas (Eto, 1974). Los invernaderos son más vulnerables a las plagas, son sitios cerrados, con la humedad y la temperatura controlada, lo cual favorece el crecimiento de hongos e insectos, destrozando así la producción de las cosechas (Roldán-Tapia y col., 2005). Es por ello que en estos ambientes aislados, el uso de organofosfatos se concentra, y los organismos que viven en él se ven continuamente expuestos a este veneno, incluidos el hombre y los microorganismos. El mecanismo de toxicidad de estos insecticidas en el hombre ha sido ampliamente estudiado, se trata de la fosforilación de la serina activa de la acetilcolinesterasa (AchE, EC 3.1.1.7). Esta enzima, presente en tejido nervioso, hidroliza el neurotransmisor acetilcolina, al inactivarse la enzima, éste se acumula produciendo efectos nerviosos como la contracción muscular en todo el cuerpo, llegando incluso a producir la muerte por asfixia (Hernández y col., 2005).

Como buenas α/β hidrolasas, las acetilcolinesterasas presentan similitud estructural con otras enzimas de la superfamilia, aunque no en la secuencia de aminoácidos. Al igual que ocurre con estas enzimas, las carboxilesterasas han sido irreversiblemente inhibidas por paraoxon (dietil-*p*-nitrofenilfosfato) (Figura 1.8), mediante un mecanismo de acción muy similar al de las acetilcolinesterasas (Febbraio y col., 2008; Levisson y col., 2009). Sin embargo, es curioso que en otros miembros de la superfamilia α/β hidrolasa, como las acetil xilan esterasas (AXEs) nunca se haya descrito esta inhibición, a pesar de presentar el clásico plegamiento α/β, compuesto por 8-9 hebras β rodeadas de hélices α y la típica triada catalítica, Ser-His-Asp (Ollis y col., 1992). Como se comentó anteriormente y de acuerdo a la base de datos CAZy (Coutinho y Henrissat, 1999), estas enzimas pertenecen a las familias de carbohidrato esterasas (CE-) 1 a 7 y 12.

En concreto, las AXEs de la familia CE-7, también denominadas cefalosporin deacetilasas, eliminan el grupo acetato del C3 de la cefalosporina C (CPC) y el ácido 7-aminocefalosporánico (7-ACA) (Takimoto y col., 1994; Martínez-Martínez y col., 2007), pero aún no se ha comprobado su inhibición por insecticidas

organofosforados. La estructura molecular de únicamente dos AXEs de la familia CE-7, AXE de *Thermotoga maritima* (código PDB: 1VLQ) y de *B. subtilis* (código PDB: 1ODS) ha sido estudiada. Otras familias de carbohidrato esterasas, CE-1 (Gordillo y col., 2006), CE-5 (Margolles y col., 1996) y CE-12 (Navarro-Fernández y col., 2008), han sido inhibidas por un compuesto diferente, que también se une a la serina activa, el PMSF, pero sin llegar a describir el mecanismo de acción.

Atendiendo a este vacío, en el presente capítulo se describe por primera vez en la bibliografía, la inhibición de una AXE de la familia CE-7 por un organofosfato, la esterasa fue clonada a partir de una cepa de *B. pumilus* aislada en un invernadero. Así, con la cristalización y estudio de la estructura molecular de la enzima unida al paraoxon se describe el mecanismo de acción de esta inhibición, además de aportar los parámetros cinéticos de esta unión irreversible, calculados mediante un método más preciso que los habituales, en el que se mantiene constante la relación entre concentraciones de enzima e inhibidor (Tudela y col., 1986). Por último, las bases moleculares que podrían explicar y prever la resistencia o sensibilidad de las α/β hidrolasas en general, frente a este compuesto, se discuten a continuación.

2. Resultados

2.1. Producción y purificación de BpAXE

El gen AXE fue clonado y expresado a partir de genómico de *B. pumilus* CECT5072 en *E. coli* (DE3)pLys (Materiales y Métodos, apartado 5.1), obteniendo una enzima soluble, BpAXE. La secuencia proteica se obtuvo de la secuenciación, ya que el genómico de esta cepa de *B. pumilus* no ha sido secuenciado, y codificaba para una proteína de 320 aminoácidos y 36 kDa de masa molecular.

La secuencia clonada tenía un 89% de homología con la AXE de *B. pumilus* PS213, 76% con la cefalosporin deacetilasa de *B. subtilis* (código PDB: 1ODS) y menos de 41% con otras AXEs de *Thermoanaerobacterium sp.* y *Thermotoga maritima* (código PDB: 1VLQ). Todas estas enzimas pertenecen a la familia 7 de las carbohidrato esterasas (CE-7), de acuerdo con la base de datos CAZy (http://www.cazy.org/fam/CE7.html). A continuación, y a pesar de la baja identidad con alguna de estas secuencias, se realizó el alineamiento mediante el programa ESPript (Gouet y col., 1999), para determinar los dominios más conservados de la familia CE-7 (Figura 4.1). Así, las zonas más conservadas fueron la secuencia RGQ (al final de la hebra β5), GXSXG (que forma el codo nucleofílico entre la hebra β6 y la hélice α5) y HE (con la histidina del centro activo en el extremo C-terminal de la hebra β9).

A continuación, la proteína fue expresada en presencia de seleniometionina, de acuerdo con lo explicado en Materiales y Métodos (apartado 11.2), y purificada a

gran escala mediante un sistema de tres pasos, ultrafiltración tangencial en columna de 100 kDa, cromatografía de intercambio aniónico (CaptoQ) y cromatografía de afinidad (HisTrap FF), para obtener enzima de alta pureza (>99%) (Materiales y Métodos, apartado 6). Las fracciones recolectadas y desaladas tras la HisTrap se cargaron en gel SDS-PAGE para comprobar su pureza, se observó una única banda de alrededor 39 kDa (Figura 4.2, calle 3), masa molecular monomérica deducida de la secuencia proteica más la cola de histidinas. Mediante exclusión molecular se determinó que la forma enzimática activa era un hexámero, de aproximadamente 210 kDa.

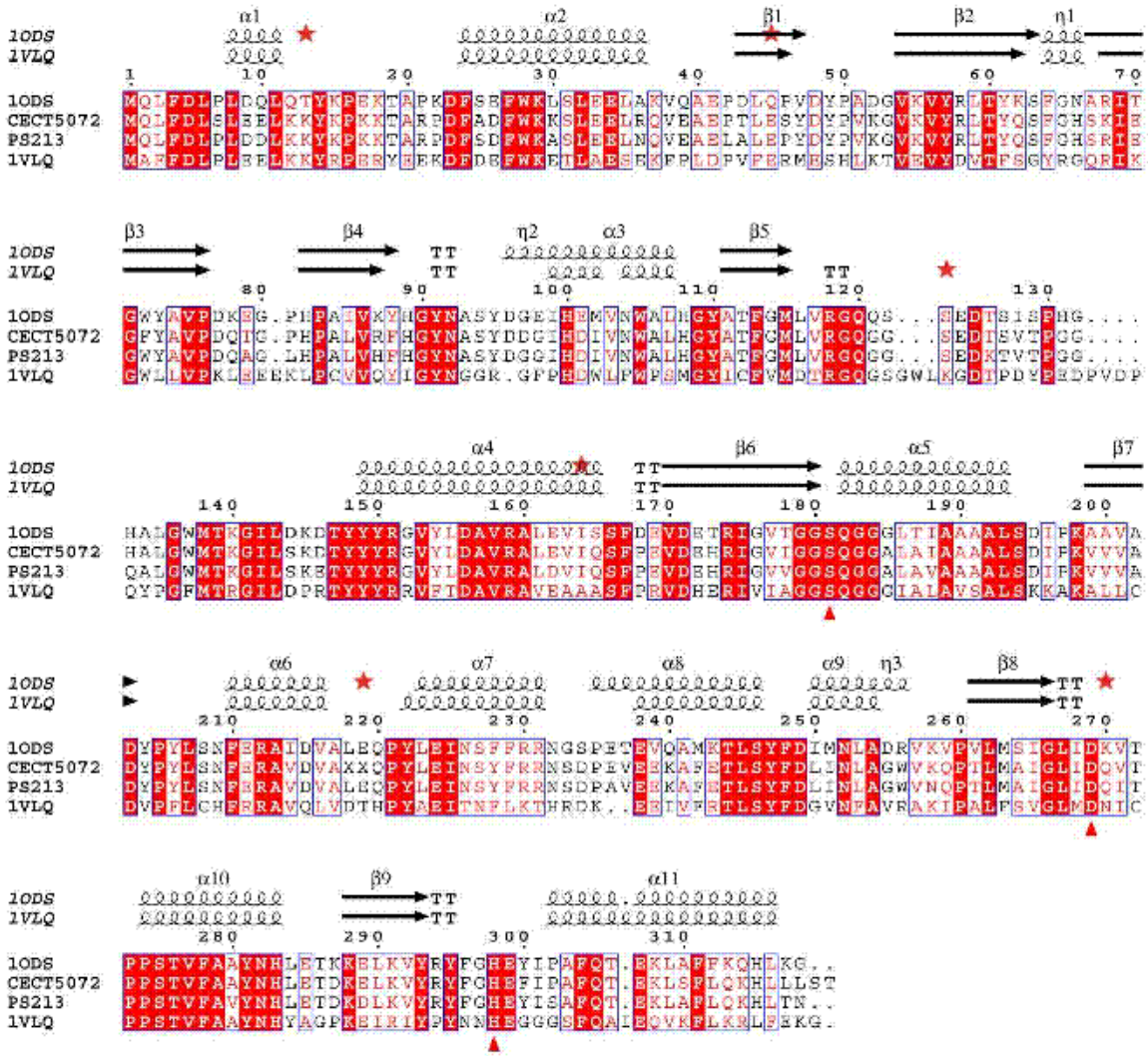


Figura 4.1: Alineamiento de múltiples secuencias de AXEs de la familia CE-7. Las secuencias se alinearon mediante el programa CLUSTAL-W (Thompson y col., 1994). La estructura primaria de BpAXE (CECT5072) se obtuvo de la secuenciación. Esta figura se realizó con el programa ESPript (Gouet y col., 1999). Los residuos más conservados se sobreiluminan en rojo. Los símbolos sobre estos bloques muestran la estructura secundaria, dónde los muelles representan las hélices α y las flechas, las hebras β. Los triángulos representan los aminoácidos del centro activo. Los residuos que forman la cavidad hidrofóbica de la proteína se marcan con estrellas rojas.

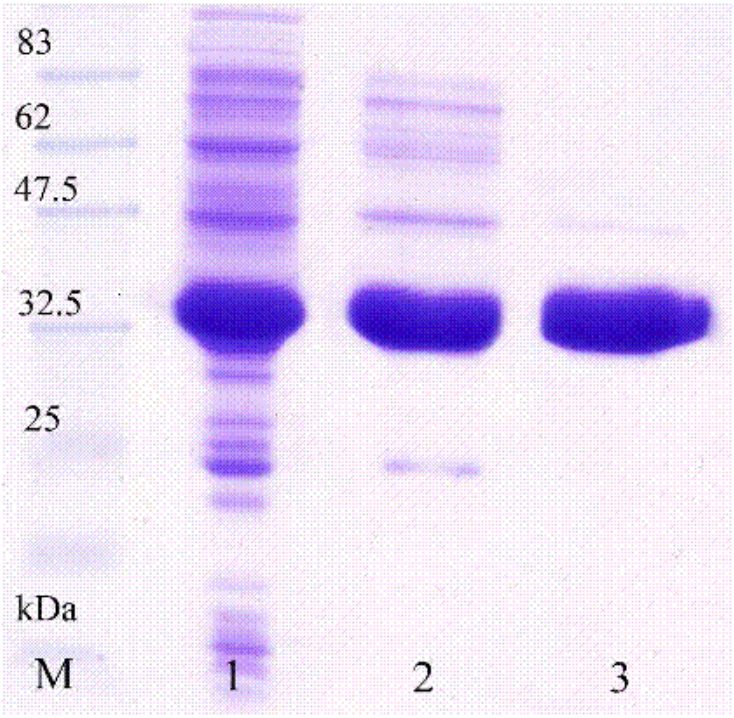


Figura 4.2: Gel SDS-PAGE de la enzima BpAXE recombinante y purificada. Cada calle contiene 20 µg de proteína total. M: marcadores de masa molecular (NEB: P7708S). Calle 1: extracto crudo tras concentrar por ultrafiltración. Calle 2: Extracto tras pasar por CaptoQ. Calle 3: Fracciones recolectadas tras pasar por HisTrap.

2.2. Inhibición de BpAXE por paraoxon

La inhibición por el paraoxon, un insecticida organofosforado, ha sido descrita para numerosas carboxilesterasas, de hecho algunos autores usan este compuesto como indicador en la clasificación de esterasas (Park y col., 2006; Iperuma y col., 2007). Sin embargo, este compuesto, curiosamente, no ha sido usado para inhibir otra familia de α/β hidrolasas, las acetil xilan esterasas (AXEs). Por ello, se midió actividad mediante el medio de medida estándar, en presencia de BpAXE, paraoxon y *p*-NPA y, se observó una curva asintótica (Figura 4.3), típica una inhibición irreversible (Tian y Tsou, 1982). Los inhibidores irreversibles compiten con el sustrato en la unión al centro activo, al principio esa asociación es reversible (definido por K_I), pero luego se produce una inhibición irreversible al fosforilar covalentemente la serina activa (definido por k_i) (Figura 4.4).

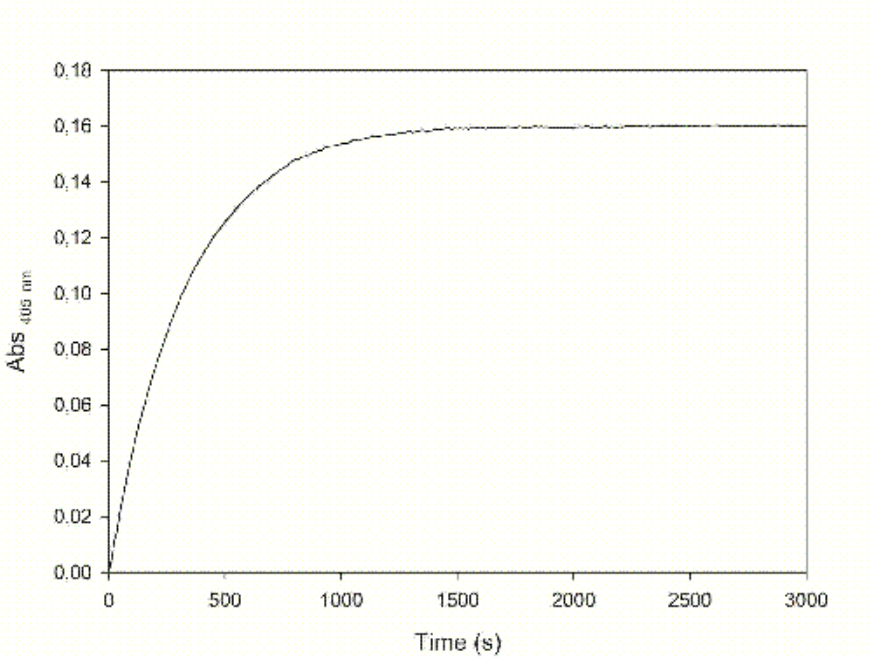


Figura 4.3: Inhibición de BpAXE en presencia de paraoxon. En el medio de reacción estándar se añadieron, enzima, paraoxon y sustrato (2 mM *p*-NPA), hasta inhibir totalmente la actividad.

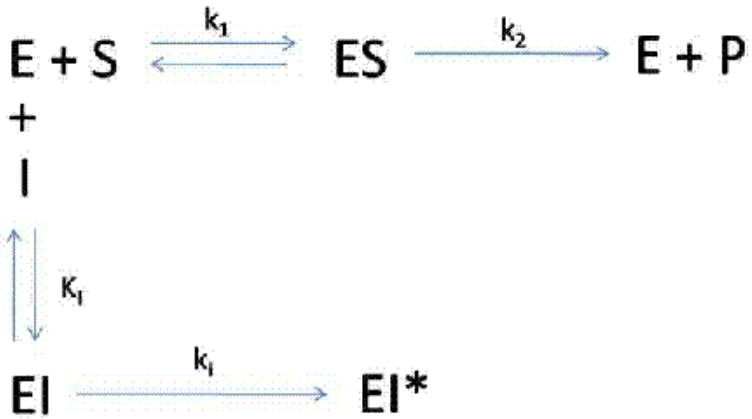


Figura 4.4: Mecanismo general de la inhibición irreversible de BpAXE por paraoxon. E, S, P, I, EI y EI* representan enzima, sustrato, producto, inhibidor, complejo reversible y enzima con la serina del centro activo fosforilada (complejo irreversible), respectivamente.

Numerosos artículos hacen referencia al cálculo de las constantes de una inhibición irreversible (Main, 1969; Leytus y col., 1984; Liu y Tsou, 1986), dónde se mezclan enzima e inhibidor en el medio de reacción. En estos casos, al igual que en éste, la curva de formación de producto es asintótica, definida por la siguiente ecuación:

$$[P] = [P_\infty]\left(1 - e^{-\lambda t}\right) \quad 1)$$

Dónde [P] y $[P_\infty]$ representan la concentración de producto en el tiempo *t* y cuando *t* se aproxima al infinito, respectivamente. La constante aparente de inactivación de pseudo-primer orden es λ. Para el cálculo de las constantes de inhibición, las técnicas anteriores mantenian fija la concentración de enzima $[E]_o$ y de sustrato $[S]_o$ en todas las reacciones, y alteraban únicamente la concentración de inhibidor $[I]_o$, por lo que la relación $[E]_o/[I]_o$ no era constante (Tian y Tsou, 1982). Por el contrario, en la presente técnica de medida, la relación entre la concentración de enzima y de inhibidor se mantiene constante en todas las medidas, siendo un requisito esencial que $[I]_o >> [E]_o$ (Tudela y col., 1986). El problema que plantean los anteriores métodos de inhibición es que producen, para cada $[I]_o$, pero mismo $[E]_o$, diferentes concentraciones de producto cuando t_∞, producto que podía llegar a variar hasta en un 30% entre cada una de las medidas (Tian y Tsou, 1982). La variación de $[P]_\infty$ afecta los valores de k_i y K_I (ecuaciones 2 y 3), por lo que se crea un error entre cada medida. Tudela y col. (1986) interpretaron que al mantener la $[P]_\infty$ constante, este error se solucionaría, y, publicaron una técnica para la inhibición irreversible de la TLCK por la tripsina, en la que al mantener la relación $[E]_o/[I]_o$ constante, siempre se consume la misma cantidad de sustrato en cada medida (Figura 4.5). De acuerdo con las ecuaciones 2) y 3), esta técnica es más correcta para el cálculo de los parámetros de inhibición:

$$[P_\infty] = \frac{k_2 \, K_I \, [S]_o}{k_i K_M} \left([E]_o/[I]_o\right) \quad 2)$$

$$\lambda = \frac{k_i \, K_I \, [I]_o}{1 + \frac{[S]_o}{K_M} + [I]_o/K_I} \quad 3)$$

Se calculó entonces la K_M de BpAXE para el sustrato utilizado en la inhibición, el *p*-NPAcetato en el método de medida estándar pero sin inhibidor, siendo la K_M igual a 1.64 mM. Este dato es necesario para el cálculo de la constante aparente de inactivación λ.

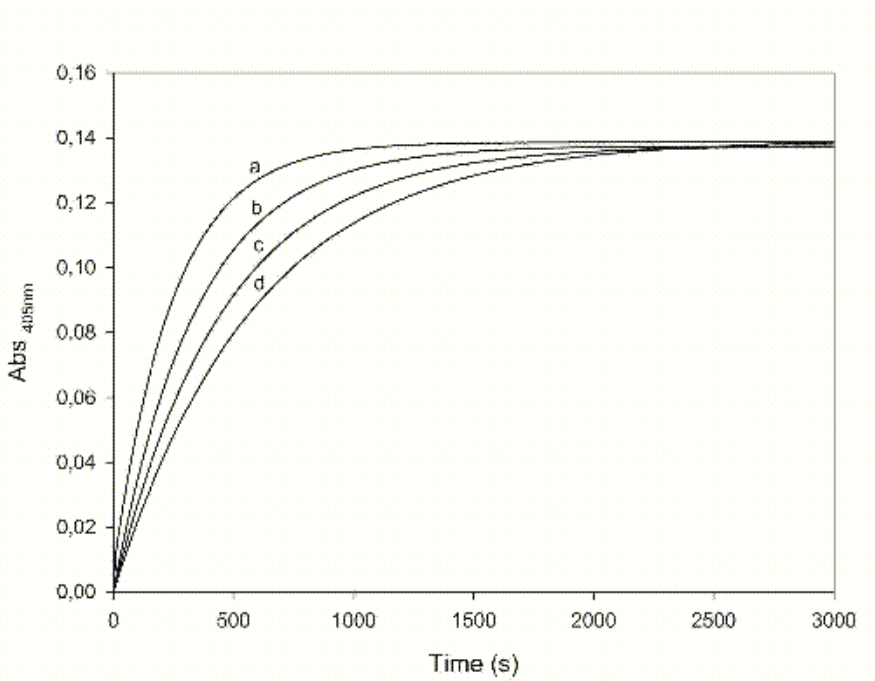


Figura 4.5: Curvas para el cálculo de los parámetros de inhibición irreversible de BpAXE por paraoxon. Las reacciones se realizaron en tampón fosfato 50 mM, pH 7.0, 2 mM *p*-NPA, y con concentraciones decrecientes de inhibidor, 0.17, 0.12, 0.085 y 0.056 µg de enzima purificada, (a, b, c y d, respectivamente). La relación [BpAXE]/[Paraoxon] se mantuvo constante en todas las reacciones, 1.18×10^{-7}.

Los valores de K_I (5.6 mM) y k_i (0.012 s^{-1}) se obtuvieron mediante regresión no lineal (ecuación 3) entre la constante de inactivación aparente, λ, y la concentración de $[I]_o$, como muestra la Figura 4.6. La k_i obtenida fue hasta 30 veces inferior a la de una carboxilesterasa EST2 de *Alicyclobacillus acidocaldarius* (Febbraio y col., 2008), y al de una acetilcolinesterasa de anguila eléctrica (Forsberg y Puu, 1984), ambas calculadas mediante la técnica de Tian y Tsou (1982).

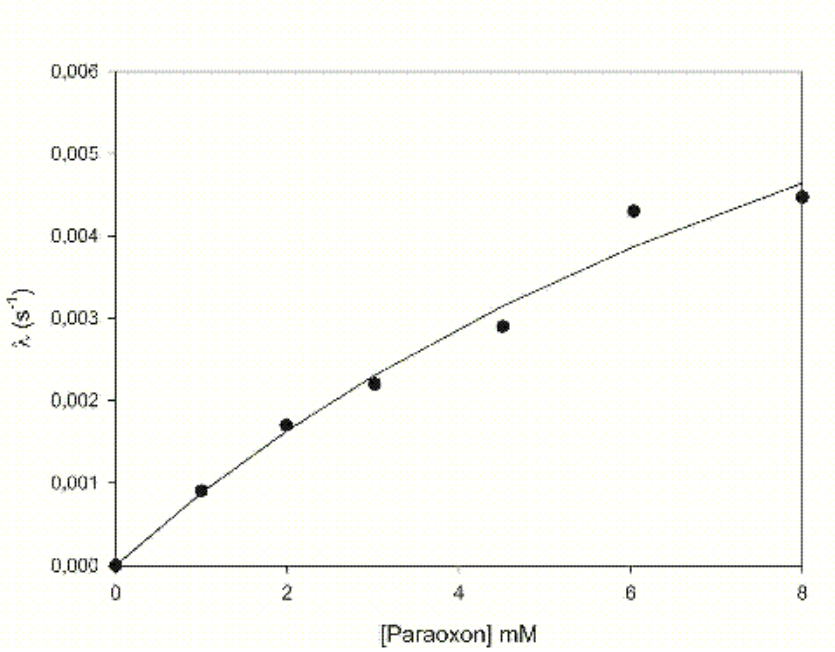


Figura 4.6: Determinación de las constantes cinéticas de inhibición de BpAXE por paraoxon. Para cada medida (concentración de paraoxon), se obtuvo una constante de inhibición aparente, λ, calculada mediante la ecuación 1). Esta constante fue utilizada para el cálculo de K_I y k_i, mediante la ecuación 3 y con los valores de $[S]_o$= 2 mM y K_M 1.64 mM.

2.3. Estructura general de BpAXE

La acetil xilan esterasa de *Bacillus pumilus* CECT5072 (BpAXE) fue cristalizada en presencia y ausencia de paraoxon, complejo BpAXE-paraoxon y BpAXE libre, respectivamente, de acuerdo con lo explicado en Materiales y Métodos (apartado 11.3 y 11.4). Se obtuvieron una gran variedad de cristales de elevada calidad y resistencia (Figura 4.7).

La difracción de rayos X y refinamiento de los modelos fueron realizados por el grupo del Prof. D. Vicente Rubio (Instituto de Biomedicina y Enfermedades Raras, CSIC, Valencia). El refinamiento del modelo tridimensional de la enzima libre se realizó mediante la, ya cristalizada, cefalosporin deacetilasa de *B. subtilis* (código PDB: 1ODS) (Vincent y col., 2003), con 76% de homología. De igual manera, una vez obtenida la estructura de la forma libre, se utilizó esta para refinar el propio complejo BpAXE-paraoxon mediante reemplazamiento molecular. De esta forma, las estructuras de ambas se obtuvieron con una resolución de 1.9 y 2.7 Å, respectivamente. La densidad electrónica para todos los residuos fue buena, excepto para el extremo N-terminal de la proteína (los tres primeros aminoácidos) que no pudieron incluirse en las estructuras.

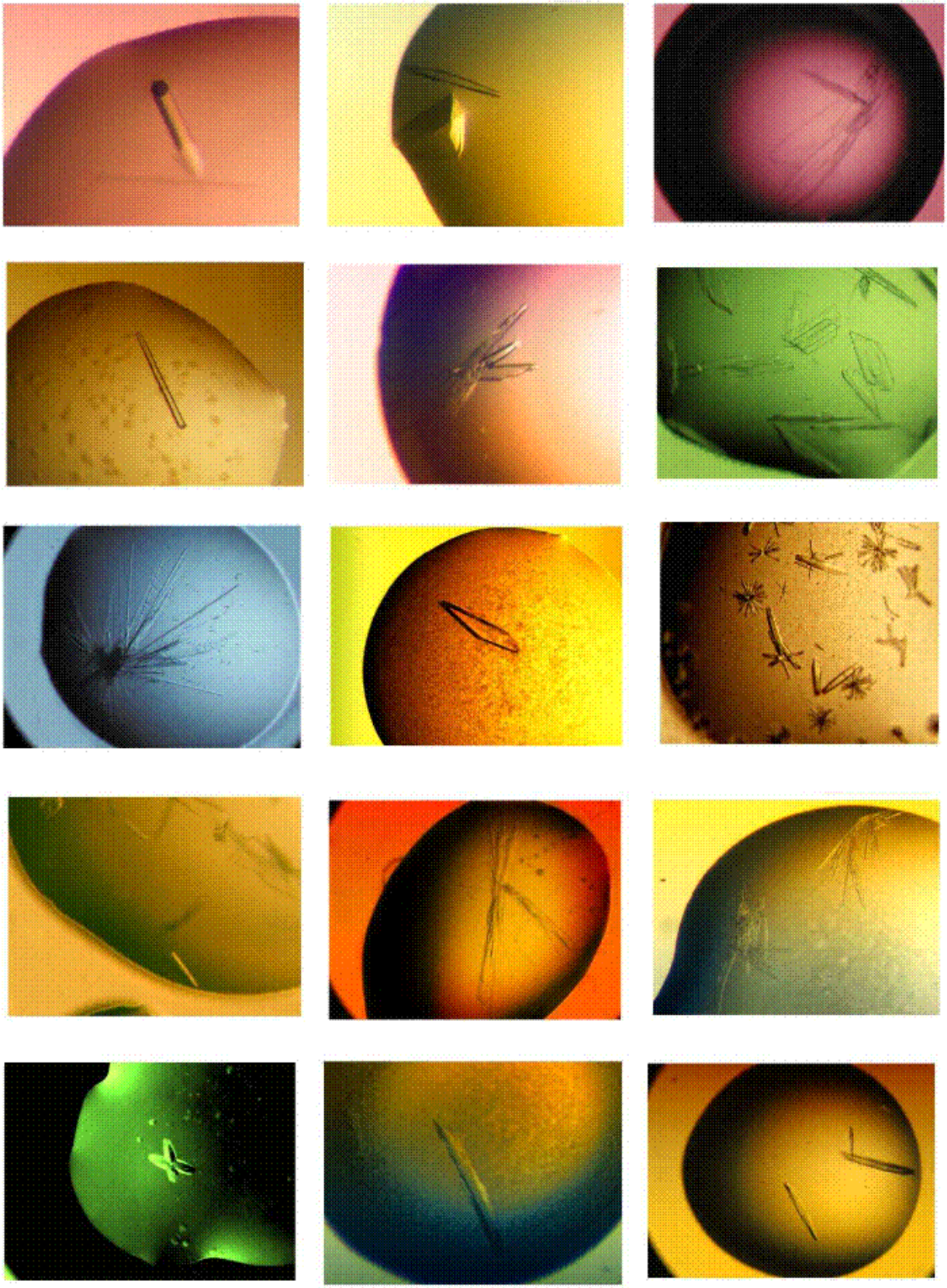


Figura 4.7: Diferentes cristales de BpAXE obtenidos en los *screenings* y ampliaciones.

Mediante cristalografía, se comprobó entonces que la forma enzimática activa era, como se previó por exclusión molecular, un hexámero, compuesto por un trímero de dímeros (Figura 4.8 A). Los 320 aminoácidos de la proteína se ordenan formando el clásico plegamiento de las α/β hidrolasas, se trata de una lámina β central compuesta por 9 hebras β, rodeadas a ambos lados por hélices α. Como dominios no incluidos en la estructura clásica (α/β *fold*) se añaden tres hélices α entre la hélice α6 y hebra β8. La triada catalítica se compone de los residuos Ser181-Asp269-His298, los seis centros activos del hexámero se sitúan mirando al interior de una cavidad central (Figura 4.8 A). BpAXE presenta la misma estructura polimérica que el hexámero de la cefalosporin deacetilasa de *B. subtilis* (Vincent y col., 2003), con pocas diferencias ya que el *rmsd* es de 0.37 Å para los 317 residuos comparados.

De igual manera, al superponer las formas libre e inhibida, la diferencia fue muy pequeña, con un *rmsd* de 0.2 Å ya que sólo se observaron movimientos de apenas 0.8 Å en las cadenas de los residuos adyacentes al dietil fosfato (DEP), es decir en el centro activo de la proteína, pero no en el resto de la estructura hexamérica de la proteína. Ello indica que la adherencia del paraoxon al centro activo no induce cambios conformacionales en la estructura, como ya se describió para la carboxilesterasa de *Actinidia eriantha* (Iperuma y col., 2008), únicamente un leve desplazamiento de las cadenas laterales de los aminoácidos implicados en la unión al paraoxon.

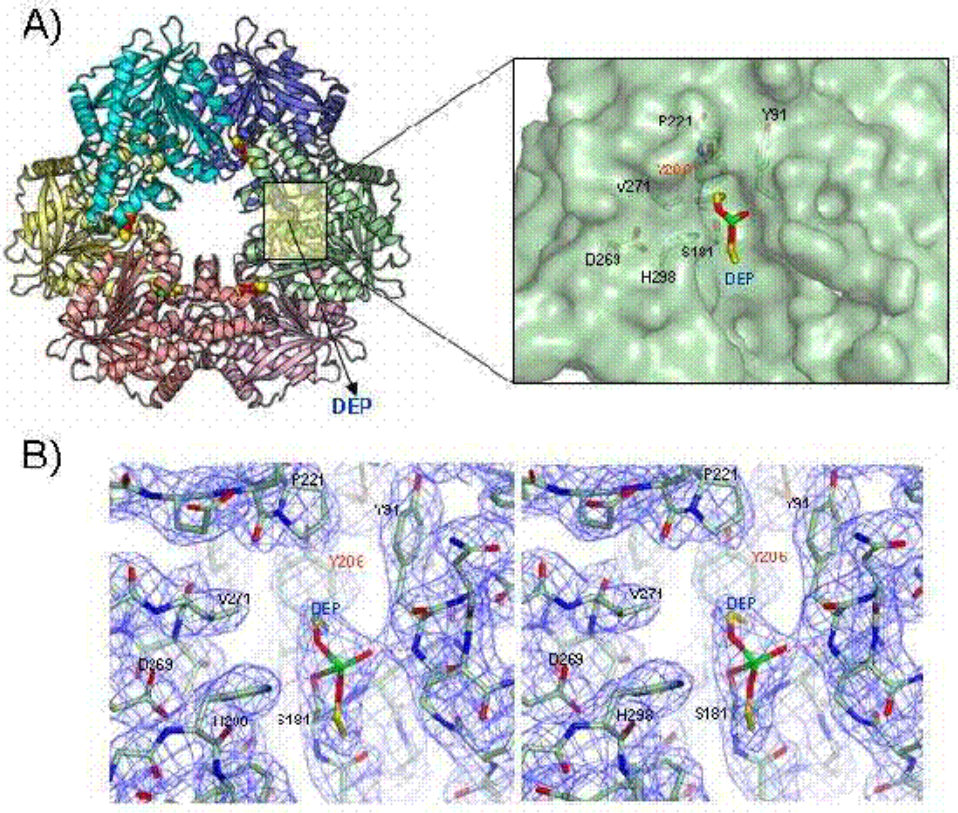


Figura 4.8: A) Estructura tridimensional del hexámero de BpAXE, cada monómero se representa en un color, los centros activos se sitúan en el interior de la cavidad formada por el polímero. Uno de los centros activos con el DEP unido se ha agrandado y se representa en forma de mapa de densidad electrónica. Se observa una cavidad en la superficie de la estructura dónde se aloja el DEP. B) Estereovisión del centro catalítico de BpAXE, con el DEP del paraoxon unido covalentemente a la Ser181, los aminoácidos cercanos al DEP se encuentran rodeados del mapa de densidad electrónica 2fo-fc (en azul).

2.4. Unión de paraoxon en BpAXE

Como ya se ha visto, BpAXE mostró una fuerte inhibición en presencia de paraoxon (Figura 4.3). Los mapas de densidad electrónica del monómero inhibido por paraoxon mostraron una cavidad con el DEP en su interior (Figura 4.8 B). Al igual que ocurría con otras esterasas inhibidas por el mismo compuesto, la enzima ha hidrolizado el grupo *p*-nitrofenilo separándolo del resto de la molécula, y dejando sólo el fosfato principal (DEP) unido covalentemente al Oγ de la serina catalítica, Ser181 (Uttamkumar y Bahnson, 2008). Además el O3 del paraoxon se encuentra correctamente situado en el interior del hoyo o agujero oxianión (*oxyanion hole*) definido por el codo nucleofílico GXSXG. Esta serina catalítica, como en el resto de α/β hidrolasas, se sitúa en una región desfavorable del

diagrama de Ramachandran, es decir, presenta una conformación limitada por impedimentos estéricos con las cadenas laterales de aminoácidos cercanos. Cuando la molécula de paraoxon se une a la enzima, se produce un giro en los ángulos phi (ϕ) y psi (ψ), respectivamente, de 54° y -109°, es decir se produce un movimiento de la cadena lateral de la Ser181 para unir el DEP, siempre dentro de esa limitada región del diagrama de Ramachandran. El DEP posee dos extremos etilos, uno de ellos se sitúa en el exterior de la proteína (superficie), mientras que el otro se encuentra embebido en el interior de la estructura, mirando a la cavidad de la enzima, en frente de la Tyr206 (Figura 4.8 A-B).

En cuatro de los monómeros se observa un puente de hidrógeno entre el O3 del DEP y la amida N de la Tyr91, a una distancia de 2.20 Å, este residuo se sitúa al final de la hebra β4. Sin embargo, en los monómeros A y C, este puente se produce con el átomo N del Gln182, a 2.86 Å. Esto significa que el paraoxon puede unirse de dos formas ligeramente diferentes, dependiendo de si el O3 se une con más fuerza a la Tyr91 o el Gln182. De forma similar, la His298 también interacciona con el oxígeno de la cadena lateral de la Ser181, pero sólo en las cadenas B, C y F. Así, los extremos etilos del paraoxon se estabilizan por las cadenas laterales de los residuos Tyr91, Tyr206, Pro221 y Val 271, que podrían indicar una alta afinidad por el paraoxon (Figura 4.8 B).

El modo de unión del paraoxon al centro activo de BpAXE es muy similar al de otras esterasas también inhibidas y cristalizadas, como la CE AeCXE1 (EC 3.1.1.1) de *Actinidia erianthia* (código PDB: 2O7V) (Iperuma y col., 2008) y la CE EstA de *Thermotoga maritima* (código PDB: 3DOI) (Levisson y col., 2009). De hecho, el DEP en ambas estructuras establece las mismas interacciones que en BpAXE, modificando los aminoácidos del centro activo, como por ejemplo, en 3DOI el O3 del DEP no contacta con la Tyr91 al final de la β4, sino con la Ala198. En AeCXE1 también se observan pequeños cambios, el O3 contacta con el N de dos residuos de Gly, al estar la hebra β4 y la hélice α3 más separadas. La distancia entre el O3 y las Gly92 y 93 de AeCXE1 es de 2.94 y 2.75 Å, respectivamente, mientras que en la EstA es de 2.73 Å con la Ala198, por lo que esta unión está algo más relajada en ambas estructuras que en BpAXE dónde la distancia entre el O3 y la Tyr91 era de 2.20 Å. Esta fuerte conexión entre el DEP podría explicar el bajo valor de la tasa de inactivación, k_i para BpAXE, comparado con las otras CEs (Forsberg y Puu, 1984; Febbraio y col., 2008). Por otra parte, también se ha visto que el DEP en BpAXE está rotado alrededor de 60°, en comparación con ambas CEs, AeCXE1 y EstA, con una distancia máxima de 6 Å entre el C4 del paraoxon en BpAXE y estas CEs. Una vez más, esto se debe a los residuos que contactan con el DEP, en este caso, a la Tyr206 de BpAXE que limita la profundidad de la cavidad dónde se une el sustrato (aquí inhibidor), forzando al DEP a situarse algo más externamente en la estructura de BpAXE (Figura 4.8 A).

Al comparar las estructuras de otras α/β hidrolasas unidas al paraoxon, una acetil hidrolasa del factor activador de plaquetas (PAF hidrolasa) de cerebro o plasma, una esterasa, o incluso una cutinasa (códigos PDB: 3DT6, 3D5E, 3DOI y 2DUT, respectivamente), con la BpAXE se observó de nuevo el mismo mecanismo de unión, aunque siempre con pequeñas diferencias. De esto se podría deducir que, en las enzimas de la superfamilia α/β hidrolasa, el paraoxon se une covalentemente a la serina catalítica, y esa interacción es estabilizada por enlaces entre su O3 y átomos N de residuos localizados al final una hebra β cercana (β4 en estos casos), de igual forma, la disposición del DEP en la cavidad depende pues de estos aminoácidos, que lo orientan en su interior o exterior.

2.5. Especificidad de sustrato, función de la Tyr206

La presencia de la Tyr206 en la cavidad de BpAXE, probablemente, ayuda a explicar la preferencia de esta enzima por sustratos de pequeño tamaño, en comparación con la especificidad de las CEs. Como se ha explicado anteriormente, la carboxilesterasas son capaces de hidrolizar ésteres de longitud moderada, llegando incluso a atacar al palmitato de 16 carbonos (Iperuma y col., 2008), sin embargo, las acetil xilan esterasas atacan ésteres más pequeños, como su nombre indica, hidrolizan grupos acetilos unidos por enlaces éster (Degrassi y col., 2000; Vincent y col., 2003). Al comparar los centros activos de AeCXE1 y BpAXE, la profundidad de la cavidad de BpAXE era aproximadamente 4 Å menor, debido a la presencia de la Tyr206. Así, la distancia de separación entre la serina activa y el final de la cavidad disminuía de 10 Å en AeCX1 (Iperuma y col., 2008) a 6 Å en BpAXE, lo cual evidentemente, limita el tamaño del sustrato que puede introducirse y ser hidrolizado por la enzima. Al superponer el palmitato unido de una CE humana cristalizada (código PDB 2DQY) con BpAXE (Figura 4.9), se observa que el grupo carboxílico del palmitato está encima de la Tyr206, además el residuo Pro221 en la base de la hélice α6, también choca con el C4 de la cadena ácida del palmitato, e incluso se observa que esta cavidad no presenta aminoácidos hidrofóbicos como en la mayoría de CEs sino residuos polares y cargados. Así pues, parece muy difícil que la BpAXE sea capaz de hidrolizar ésteres de cadena moderadamente larga.

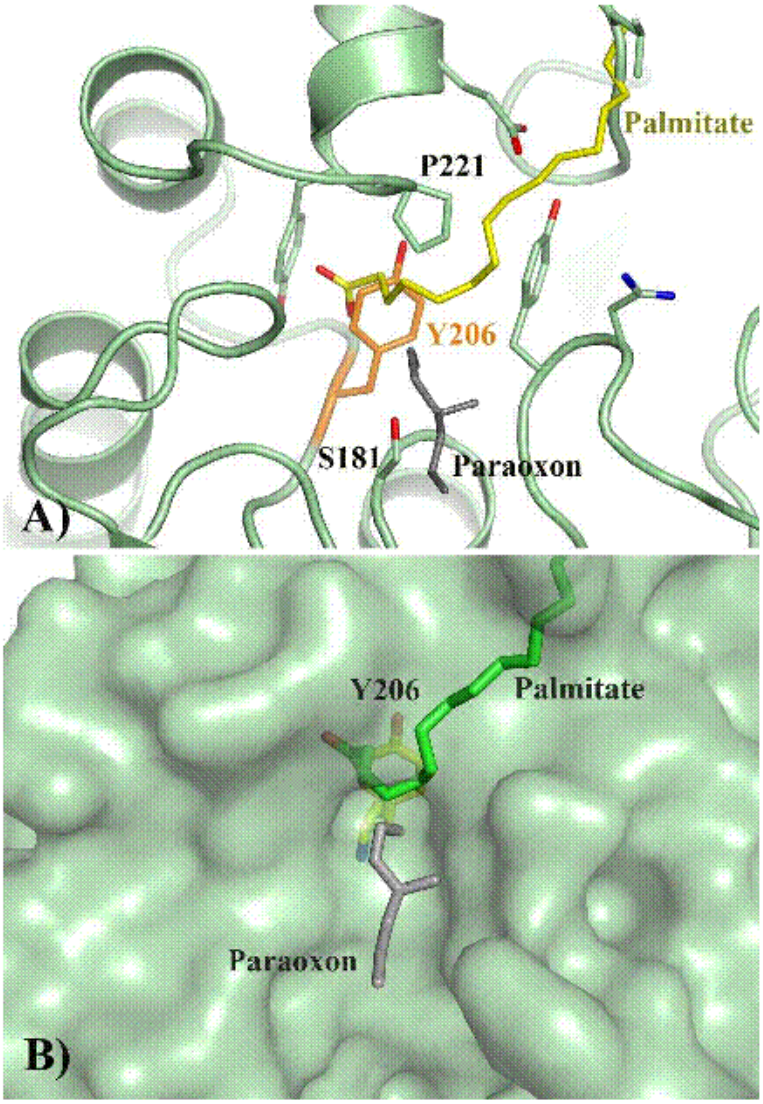


Figura 4.9: Centro activo de la AXE de *B. pumilus*, al cual se ha modelado una molécula de palmitato procedente del PDB 2DQY, mostrando que la Y206 dificultaría su unión, así como otros residuos como la P221. Así mismo, se muestra la cavidad con tendencia polar. A) Estructura secundaria de la proteína. B) Densidad electrónica del centro activo.

3. Discusión

Numerosos estudios de inhibición de α/β hidrolasas con paraoxon han sido publicados, sin embargo, nunca antes se había hablado de la inhibición de AXEs por este compuesto. Como ya se ha comentado en la presente Tesis, las esterasas pueden clasificarse en cuatro grandes grupos (Park y col., 2006; Iperuma y col., 2008), en función de la especificidad de sustrato y el patrón de inhibición frente a paraoxon y Eserina. Las arilesterasas (A-esterasas o paraoxonasas, EC 3.1.1.2) son capaces de hidrolizar el paraoxon e hidrolizan ésteres aromáticos, las carboxilesterasas (B-esterasa o CEs verdaderas, EC 3.1.1.1), sí se inhiben por organofosfatos pero no por Eserina y presentan una amplia variedad de sustratos,

las acetil esterasas (C-esterasas, EC 3.1.1.6) se inhiben por ambos compuestos e hidrolizan ésteres de colina. Por último, las esterasas de tipo D-, originalmente definidas por Main (1960), no se inhiben por organofosfatos, pero se inhiben en presencia de Hg^{2+}. De esta forma, las AXEs (EC 3.1.1.72) no se incluyen en esta limitada clasificación.

Entre las α/β hidrolasas que sí se han visto inhibidas por el paraoxon se encuentran acetilcolinesterasas, fosfolipasas o incluso la γ-quimotripsina (a pesar de no ser una α/β hidrolasa, su centro activo es muy similar). Al igual que ocurría con las CEs ya comentadas, las estructuras de estas enzimas no mostraron cambios bruscos conformacionales con la inhibición, con *rmsd* desde 0.16 Å para la γ-quimotripsina (Harel y col., 1991) hasta 0.4 Å para la EstA de *Thermotoga maritima* (Levisson y col., 2009). Todas estas serin hidrolasas inhibidas presentan puentes de hidrógeno entre el DEP y los residuos de la cavidad a distancias máximas de 4 Å. Los N de los aminoácidos hidrofóbicos Phe274 y Leu153 establecen puentes de hidrógeno con el O3 del DEP en la acetil hidrolasa del factor activador de plaquetas de plasma (PAF hidrolasa de plasma, código PDB: 3D5E) a distancias de 2.65 y 2.9 Å, respectivamente (Uttamkumar y Bahnson, 2008). Sin embargo, en el caso de BpAXE, esta distancia es menor dependiendo de si los enlaces se producen entre la Tyr91 o el Gln182, 2.2 y 2.86 Å, respectivamente. Las diferentes formas de unión podrían implicar ligeras variaciones en las constantes de inhibición, que no pueden ser distinguidas mediante métodos cinéticos.

Así pues, estos pequeños cambios en el mecanismo de unión del DEP al centro activo no explican las bases de la inhibición de las α/β hidrolasas, es decir porqué determinadas enzimas son sensibles, otras menos y otras resistentes a este organofosfato. Un trabajo reciente aportó la primera pista sobre los fundamentos moleculares de esta susceptibilidad, una S-Formilglutatión hidrolasa (SFGH, D-esterasa) era resistente a la inhibición por paraoxon (Cummins y col., 2006). El hecho de que la serina activa de la SFGH de *Arabidopsis thaliana* estuviera protegida por el residuo Trp186, que bloqueaba la entrada de la molécula de paraoxon al centro activo, proporcionaba una explicación para la resistencia de las D-esterasas al paraoxon.

Al superponer la SFGH de *Saccharomyces cerevisiae* (código PDB: 1PV1) con el DEP y BpAXE, se observó una exclusión molecular para este compuesto en la SFGH (Figura 4.10), ya que se producía un choque entre los orbitales Phi del Trp197 (homólogo al Tyr186 de *A. thaliana*) y el DEP (Legler y col., 2008). Además, se observa que en la SFGH, el DEP no unido se encuentra orientado de manera diferente a BpAXE, con los etilos mirando hacia abajo, de nuevo, la disposición de los residuos de la cavidad determinan la localización del DEP. Sin embargo, no

parecía haber impedimentos estéricos en el centro catalítico de BpAXE, y menos aún sin la presencia de un grupo indol (W197) que proteja la serina activa.

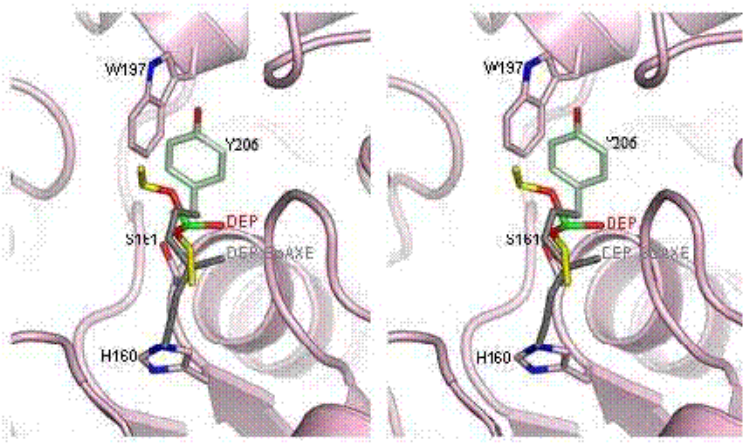


Figura 4.10: Estereovisión de la superposición del centro activo de la SFGH de *S. cerevisiae* (código PDB: 1PV1) con el DEP. Se muestra el W197, responsable probablemente de la resistencia de esta enzima a la inhibición por paraoxon. También se representan la Tyr206 y el DEP de la BpAXE en verde claro y gris, respectivamente.

Legler y col. (2008) mutaron el Trp197 de la SFGH de *S. cerevisiae* por una isoleucina (mucho más pequeña) con el fin de alterar esa resistencia al paraoxon. La sustitución W197I (código PDB: 3C6B) aumentó la tasa de inhibición por paraoxon en tres órdenes de magnitud, ya que agrandó la bolsa hidrofóbica dónde se introducen los sustratos, y el DEP (Figura 4.11), corroborando la implicación del Trp197 en la resistencia de las SFGH al paraoxon.

Por otro lado, la acetilcolinesterasa de *Lucidia cuprina* también se mutó pero en un residuo de la bolsa hidrofóbica, Gly137Asp, produciendo una actividad hidrolítica sobre el organofosfato, una actividad paraoxonasa (Newcomb y col., 1997). El modelado de esta enzima mutada sugirió que este nuevo aminoácido actúa como una base que orienta una molécula de agua hacia el interior de la cavidad para que tenga lugar la correcta hidrólisis de la enzima fosforilada, liberando el DEP y recuperando la enzima libre y activa. Esto se debe a que el paraoxon se introduce en el interior de esa cavidad a modo de sustrato, se une covalentemente a la serina activa, formando un intermediario fosforilado homólogo a la acil-enzima de la hidrólisis de un sustrato. Sin embargo, el fosfato del DEP no es accesible al ataque nucleofílico del agua, que escindiría el DEP de la enzima. Esta nueva susceptibilidad al paraoxon ocurre en enzimas con una bolsa hidrofóbica y "secas" que impiden la defosforilación al dificultar la entrada del agua hacia el fosfato del intermediario.

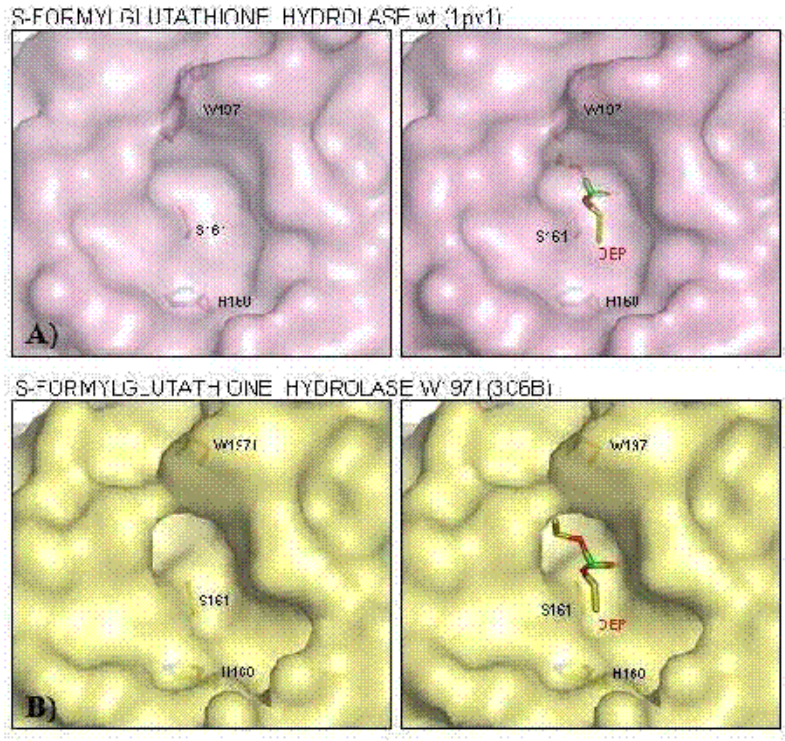


Figura 4.11: A) Mapa de densidad electrónica de la cavidad hidrofóbica de la SFGH de *S. cerevisiae* (código PDB: 1PV1) en ausencia y presencia de DEP, respectivamente. El DEP roza con los orbitales phi del W197. B) Mapa de densidad electrónica de la cavidad hidrofóbica de la SFGH de *S. cerevisiae* con la mutación W197I (código PDB: 3C6B) en ausencia y presencia de DEP, respectivamente. El DEP ya no roza con los orbitales de la W197I.

Basándonos en los requisitos estructurales de una α/β hidrolasa para ser susceptible o no al paraoxon, ya definidos, las ramnogalacturonan acetil esterasas (RGAE), carbohidrato esterasas pero de la familia CE-12 (http://www.cazy.org/fam/CE12.html) parecen ser también candidatas idóneas de inhibición. Al igual que ocurría con las AXEs, aún no se ha descrito en la bibliografía su sensibilidad a estos compuestos organofosforados. Cuando, la RGAE de *B. halodurans* C125 (BhRGAE), clonada en nuestro laboratorio, se expuso a paraoxon, se obtuvo una inhibición del 60% en presencia de 5 mM, lo que preveía la ausencia de residuos que bloqueen la entrada del compuesto al centro activo. Esta BhRGAE posee un 45% de sustituciones conservadas con la RGAE de *B. subtilis* (BsRGAE, código PDB: 2O14; Mølgaard y col., 2000), la Figura 4.12 representa la superficie del centro activo de la RGAE cristalizada con la triada catalítica. Puesto que el centro activo de estas enzimas se encuentra expuesto al exterior y no se observaron impedimentos estéricos que dificultaran esa unión, era probable que se inhibieran en presencia de estos compuestos, como demostró el anterior ensayo enzimático.

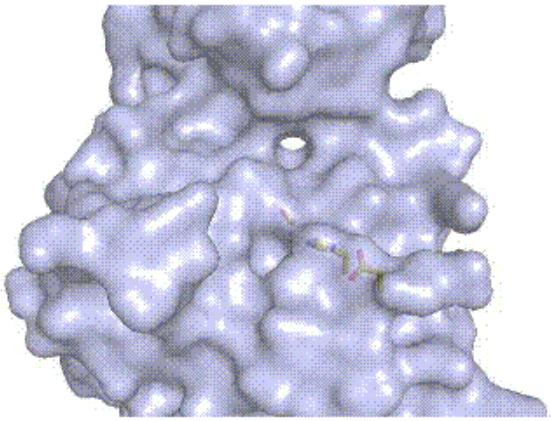


Figura 4.12: Centro activo de RGAE de *B. subtilis* (código PDB 2O14) expuesto al exterior en la superficie de la proteína, y por lo tanto accesible al acceso del inhibidor.

Finalmente, el presente trabajo describe por primera vez una clase de α/β hidrolasas, las carbohidrato esterasas, sensibles a la inhibición por paraoxon, incluyendo BpAXE (CE-7), BhRGAE y BsRGAE (CE-12). La combinación de datos estructurales y cinéticos indica que la unión del paraoxon al centro activo es muy exigente, ya que depende de la topografía de la garganta y de su composición en residuos hidrofóbicos, siendo la tasa de inactivación de BpAXE menor que en otras carboxilesterasas o acetilcolinesterasas. Estos resultados originarán nuevos estudios sobre la inhibición de compuestos organofosforados en las carbohidrato esterasas, siempre teniendo en cuenta datos estructurales y cinéticos.

Capítulo V

Una nueva técnica en la producción de CLEAs. Aplicación en la síntesis de intermedios β-lactámicos.

1. Introducción

Las enzimas son potentes herramientas para la industria, muchas de ellas se han intentado inmovilizar uniéndolas a soportes sólidos, con el fin de estabilizarlas y facilitar su uso en procesos industriales (Hartmeier, 1988). Sin embargo, en la inmovilización, se mezclan enzima y soporte inerte, diluyendo inevitablemente la actividad y produciendo, entonces, un menor rendimiento espacio-tiempo de reacción y menor productividad final (Tisher y Kasche, 1999). Se han desarrollado otras técnicas de inmovilización que no requieren soportes, como la agregación de moléculas proteicas mediante sales (sulfato amónico, cloruro de magnesio…) o disolventes orgánicos (acetonitrilo, isopropanol, acetona…) (Brown y Glatz, 1986). Tras esta precipitación, se añade un dialdehído (glutaraldehído principalmente) a modo de "agente entrecruzante" (o agente cross-linkeador), para producir enlaces base de Schiff entre las partículas, formando una malla estable e insoluble con las partículas de proteína (Clair y Navia, 1992; Fernandes y col., 2005) (Figura 3.10).

Las nuevas partículas enzimáticas obtenidas se denominan: "*Cross-linked enzyme aggregates*" (CLEAs), es decir agregados de enzima entrecruzados. En esta última década, se han comenzado a estudiar las aplicaciones de estos biocatalizadores ya que son mecánicamente estables, activos y, como se ha comentado antes, no necesitan soportes sólidos para su producción. Al tratarse de la propia enzima la que forma la malla, no se diluye la actividad enzimática. Por otro lado, esta inmovilización es económicamente más rentable al no incluir soporte y utilizar reactivos relativamente económicos (sulfato amónico, dialdehídos). Por último, se ha visto que las CLEAs son generalmente, al igual que otras enzimas inmovilizadas, más estables que la forma nativa, incluso en condiciones extremas, pudiéndose reciclar y ser usadas en reactores enzimáticos. Así pues, se trata de sistemas potencialmente útiles desde el punto de vista industrial (Roberge y col., 2009) para la síntesis orgánica o aplicaciones farmacéuticas (Wong y Whitesites, 1994; Kim y col., 2008).

Al inicio de esta Tesis, se han comentado las características y ventajas de las esterasas desde el punto de vista industrial. Las AXEs eliminan el grupo acetilo (-CH_3) del carbono C_3 de la cefalosporina C (CPC) y del ácido 7-amino cefalosporámico (7-ACA), dando como productos unos intermedios directos de la obtención de antibióticos β-lactámicos semisintéticos, el desacetil-CPC (d-CPC) y el desacetil 7-ACA (7-dACA). La expresión de la AXE de *Bacillus pumilus* CECT5072, BpAXE, se optimizó para producir grandes cantidades de enzima purificada, y en una previa caracterización, realizada por nuestro grupo (Martínez-Martínez y col., 2007), se observó su actividad frente al CPC y 7-ACA. Por estas razones, se planteó la posibilidad de elaborar CLEAs a partir de BpAXE. En el presente capítulo, se describe la optimización de estas CLEAs con elevado rendimiento y altamente

estables frente a condiciones de temperatura, pH, o estrés mecánico. Además, se establece una nueva metodología, nunca antes descrita, para dispersar este tipo de biocatalizadores de bajo coste y alto rendimiento de actividad.

2. Resultados

2.1. Optimización de la producción de CLEAs

2.1.1. Expresión y purificación de BpAXE

Se expresó AXE de *B. pumilus*, BpAXE, en *E. coli* Rosetta (DE3)pLys en TB con los antibióticos kanamicina y cloranfenicol. Se purificó la fracción soluble en tres etapas, ultrafiltración tangencial (pasando por una columna de 100kDa), columna de intercambio aniónico (CaptoQ) y columna de cromatografía de afinidad (HisTrap) (Materiales y Métodos, apartado 6). Al igual que en el capítulo anterior (Figura 4.2), se obtuvo la proteína BpAXE con elevada pureza.

2.1.2. Ensayos preliminares

Se realizaron varios ensayos preliminares en busca de las mejores condiciones, por un lado se determinó el mejor precipitante, su concentración idónea y el tiempo de precipitación.

Como agentes agregantes se usaron por separado:

- Sulfato amónico ($(NH_4)_2SO_4$) al 90% de saturación
- Acetonitrilo (90% v/v)
- *Tert*-butanol (90% v/v)

La enzima, previamente purificada (1 mg/mL), fue incubada en presencia de estos agentes durante una hora a 4 °C en Tris-HCl 50 mM pH 8.0, en agitación suave.

A esas diferentes soluciones se añadió una concentración constante de glutaraldehído (1%) (v/v), y se incubó a 4 °C hasta no observar actividad en el sobrenadante. Con cualquiera de los precipitantes, 3 h de incubación en presencia de glutaraldehído fueron suficientes para que no se observara actividad en el sobrenadante.

Las CLEAs obtenidas con sulfato amónico presentaron el 72% de la actividad inicialmente introducida tras agitar con vortex durante 1h. Sin embargo, con el *tert*-butanol o el acetonitrilo, el rendimiento de actividad de los pellets fue muy bajo, 15 y 3%, respectivamente. De este modo, el precipitante que mayor actividad

relativa con respecto a la enzima soluble fue el sulfato amónico al 90% saturación. Los solventes orgánicos utilizados pueden desnaturalizar proteínas, una hora de precipitación y otras 3 horas de "*cross-linking*" (un total de 4 horas en presencia de estos agentes), afectaron fuertemente a la actividad de BpAXE. En la bibliografía, CLEAs de otras enzimas han sido producidas también con sulfato amónico, obteniendo mayores rendimientos que con disolventes orgánicos (Sangeetha y col., 2008; Gupta y col., 2009). Aunque también se han encontrado CLEAs de lipasas producidas con disolventes orgánicos, obteniendo actividades relativas cercanas al 100% (López-Serrano y col., 2002; Schoevaart y col., 2004). Este dato podría deberse a la conocida resistencia de las lipasas a disolventes orgánicos, y que favorecen el fenómeno de activación interfacial, provocando el movimiento de la caperuza en las lipasas y así un aumento en la actividad enzimática (López-Serrano y col., 2002). Sin embargo, en las esterasas no se produce este favorable cambio conformacional, la BpAXE no fue estable en presencia de disolventes y las CLEAs resultantes presentaron menores actividades.

A continuación, se comparó la eficacia de las CLEAs producidas a concentraciones crecientes de sulfato amónico (20-90% saturación). El porcentaje de actividad recuperada aumentó con la concentración de este precipitante (Figura 5.1 A), pasando de un 11% de recuperación para el 20% de saturación al 72% para el 80%. A concentraciones de saturación superiores al 80% de sulfato amónico ya no aumentaba la actividad retenida, por lo que con 80% de saturación se obtiene una precipitación con actividad máxima de 72 %.

Con las tres horas siguientes de entrecruzamiento, se previene la resolubilización de los agregados mediante la formación de enlaces tipo base de Schiff. Se optimizó entonces la concentración de glutaraldehído óptima para el 80% de sulfato amónico, 1 o 2% (v/v) produjeron resultados similares de actividad, por lo que se tomó 1% (v/v) del dialdehído para el escalado.

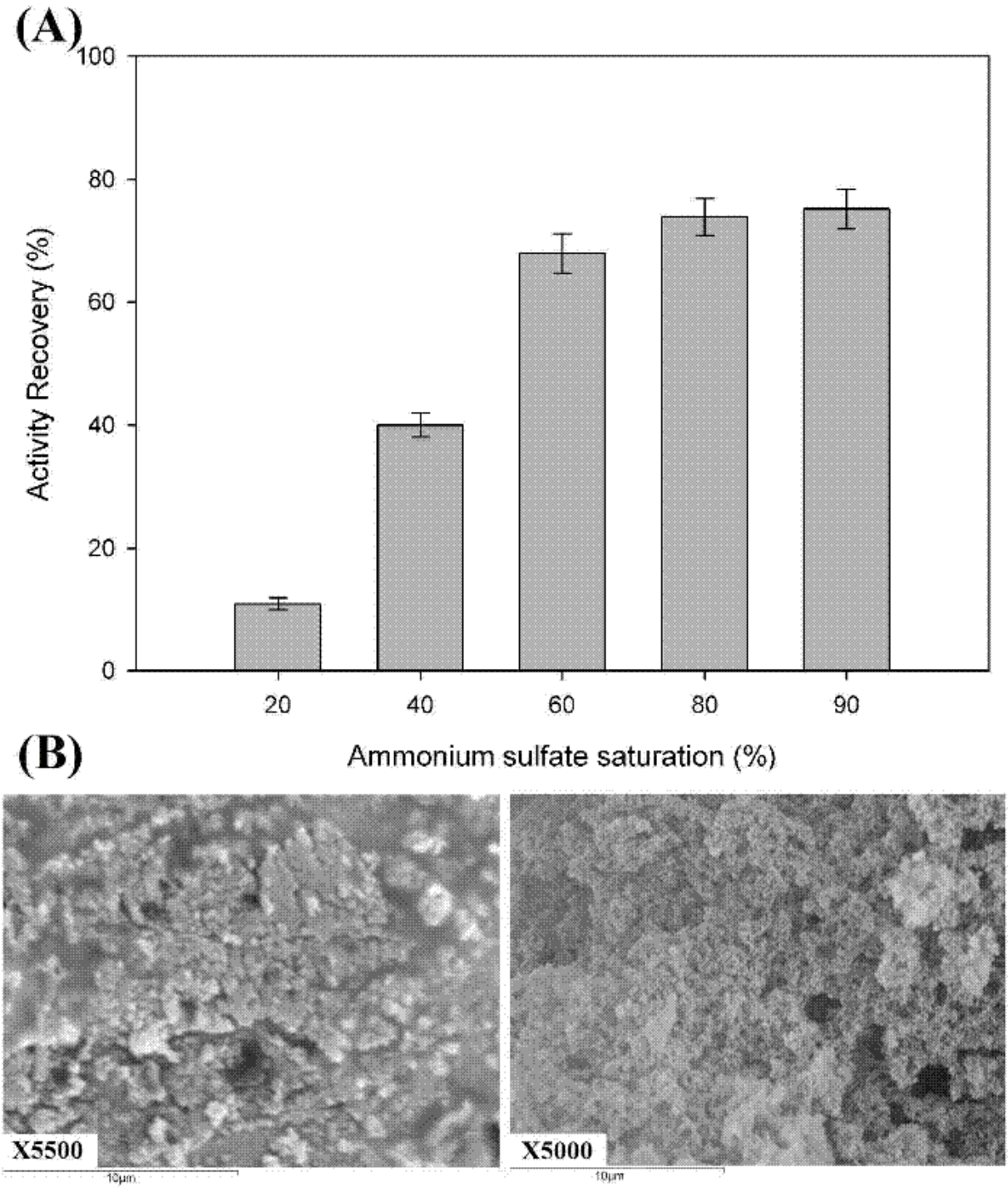


Figura 5.1: Efecto de la concentración de sulfato amónico en la producción de CLEAs. (A) Actividad relativa (%) con diferente saturación de sulfato amónico. (B) MEB de CLEAs con 40% y 80% de sulfato amónico, izquierda y derecha, respectivamente. En ambos casos se usaron 1 mg/mL de enzima purificada y 1% de glutaraldehído.

2.1.3. Estructura de los agregados

Con el fin de encontrar diferencias morfológicas que permitieran explicar las actividades frente a los distintos precipitantes utilizados, se tomaron imágenes al microscopio electrónico de barrido (MEB) de estos ensayos de optimización. Se observaron estructuras amorfas, no definidas en los tres casos (Figura 5.2 A-C). La Figura 5.2 A muestra las CLEAs obtenidas con sulfato amónico (SA-CLEAs) de mayor actividad relativa (72%); se observan partículas con un tamaño de poro bastante uniforme (alrededor de 0.1 µm). Con los otros precipitantes, acetonitrilo y *tert*-butanol, la superficie presentaba menor número de agujeros, de alrededor 1 µm (Figura 5.2 B-C, respectivamente), por lo que no sólo la desnaturalización enzimática por el efecto de los disolventes orgánicos, sino también la porosidad influía en la actividad final de estos agregados, al presentar menor zona de contacto con el sustrato. Schoevaart y col. (2004) describieron que estos cambios en la apariencia podrían deberse a cambios en la distribución de los aminoácidos hidrofóbicos de las proteínas por el efecto negativo de los disolventes orgánicos.

Paralelamente, se realizaron estudios estructurales de los agregados obtenidos con el 40 y 80% de saturación de sulfato amónico (Figura 5.1 B). La superficie fue más porosa a mayor concentración de sal (80% saturación), al igual que aumentó la actividad recuperada respecto de la inicial (introducida en la solución). Esta mayor superficie de contacto para el 80% saturación significaría una mayor facilidad de entrada del sustrato a los centros catalíticos, y explicaría así, la mayor actividad en los agregados obtenidos.

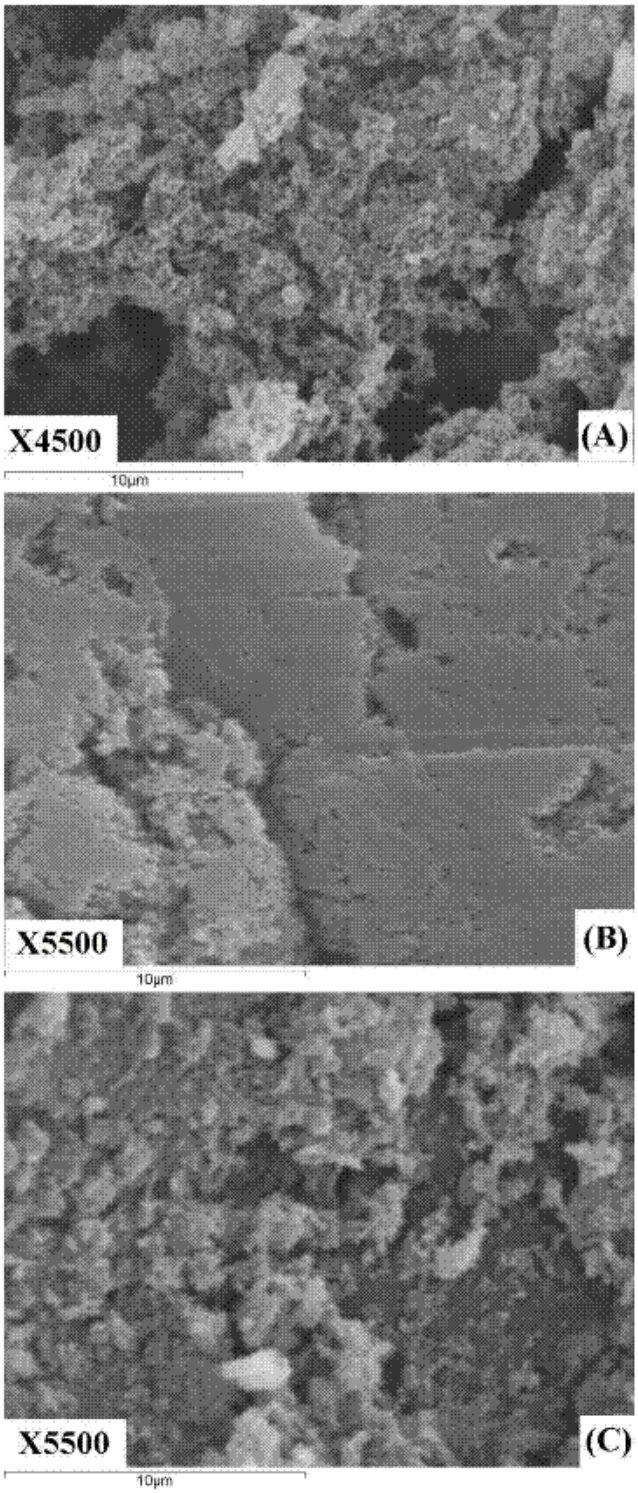


Figura 5.2: Imágenes al MEB. (A) CLEAs preparadas con sulfato amónico, 90% de saturación (B) acetonitrilo al 90% (v/v), y (C) *tert*-butanol al 90% (v/v). En los tres casos se usó 1 mg/mL de enzima purificada y 1% de glutaraldehído.

2.1.4. Efecto de la agitación y el tamaño de partículas

Como se puede deducir de los ensayos preliminares y del estudio morfológico, la superficie de contacto con el medio es un factor muy importante para la actividad, ya que el transporte de sustrato/producto hacia los centros activos embebidos en el interior del agregado depende de esta superficie. Esto crea limitaciones difusionales, pues aunque esos centros catalíticos sean activos no están accesibles y no serían realmente funcionales, lo que explicaría la disminución de la actividad final obtenida. De ahí la importancia de dispersar correctamente los agregados.

Comúnmente, se ha usado el vortex como mecanismo clásico de dispersión de CLEAs, de hecho la mayoría de los artículos agitan las muestras durante unos 30 s con este aparato (Aytar y Bakir, 2008; Hara y col., 2008).

Siguiendo esta clásica metodología, se agitó la muestra de CLEAs de BpAXE, mediante vortex, a velocidad media durante 30 s para las primeras medidas enzimáticas, pero sólo se obtuvo el 35% de la actividad inicial en el pellet para el 90% de saturación de sulfato amónico. Sin embargo, tras 60-90 min de agitación se obtuvo el máximo de actividad recuperada, 72% (Tabla 5.1). Otros estudios también observaron que a mayores periodos de agitación en vortex aumentaban la recuperación de actividad (Aytar y Bakir, 2008; Hara y col., 2008). Estos resultados apoyan la hipótesis anterior, las moléculas se disponen de forma poco accesible para la correcta difusión de los sustratos, lo cual limita la actividad obtenida, pero se pueden dispersar más con un mayor tiempo de agitación. Así pues, parecía evidente que la dispersión mediante vortex era esencial y fuertemente dependiente del tiempo de agitación, sin embargo existiría un límite de tamaño de partículas por debajo del cual este no disminuye, ni siquiera aumentando el tiempo de agitación con vortex (Tabla 5.1).

Por ello, se planteó la utilización de un nuevo sistema de agitación de partículas, pero que fuera, evidentemente, más agresivo que el vortex. El FastPrep es un disruptor celular que dispersa partículas gracias a la sucesión de movimientos en varias direcciones a la vez. Nuestro grupo utilizó este instrumento con el propósito de dispersar CLEAs, lo cual supuso la primera vez que se utilizó esta técnica de dispersión en la bibliografía. Sorprendentemente, se recuperó toda la actividad inicial (109%) tras sólo 30 s de agitación con este homogeneizador comercial. Por lo tanto, el FastPrep produce en menor tiempo (30 s vs 90 min), un mayor rendimiento que el vortex (109% vs 72%).

Tabla 5.1: Actividad recuperada (%) de las CLEAs dependiendo del sistema de agitación utilizado.

Aparato	Periodo de agitación (min)	Actividad recuperada (%)
Vortex	0.5¶	35 ± 1.5
	60¶	69 ± 0.9
	90¶	72 ± 1.2
FastPrep	0.5*	109 ± 2.2
	1*	112 ± 3.5

En todos los casos, las CLEAs se obtuvieron con 90% saturación de SA y 1% glutaraldehído.

¶ Agitación realizada con vortex, a media velocidad.

*Agitación realizada con FastPrep, a 6.0 m/s de velocidad.

La clave del rendimiento es el movimiento que produce en varias direcciones a la vez (movimiento vertical y angular). Este novedoso sistema nos permite dispersar los agregados de las CLEAs haciéndolos colisionar los unos con los otros, sin necesidad de añadir bolas de vidrio.

Con esta nueva metodología, se habrían pulverizado los agregados, grandes y pequeños, en partículas de mínimo tamaño posible, disminuyendo así la barrera limitante de la máxima eficiencia catalítica: el tamaño de partículas, lo cual habría solucionado el problema de la limitación de transporte de sustratos hacia los centros activos de las CLEAs.

A continuación, con el fin de verificar el tamaño de partículas con el tipo y tiempo de agitación, se realizó un estudio del tamaño de estas al microscopio óptico (Figura 5.3). Para ello se dispusieron soluciones de CLEAs tras diferentes agitaciones: 30 s y 60 min de vortex y FastPrep en portas con el fin de observar diferencias en el área/tamaño de las partículas tras la agitación. Se determinó el área de 120, 119 y 278 agregados de 30 s vortex, 60 min vortex y 30 s FastPrep, respectivamente, y se clasificaron estos en cinco clases de tamaño: 0-149 μm^2, 150-499 μm^2, 500-999 μm^2, 1000-4999 μm^2 y >5000 μm^2 (Figura 5.3 A).

Cuando se usó Fastprep para la dispersión o una hora de vortex, la mayoría de las partículas se encontraron en la clase de menor tamaño (0-149 μm^2), de hecho más del 95% de los agregados obtenidos con Fastprep tienen menos de 499 μm^2. Estos agregados (Vortex-FastPrep) correspondían con actividades máximas de recuperación, 72 y 109%, respectivamente. Sin embargo, cuando se disperso con 30 s de vortex, la distribución fue más homogénea, observándose incluso un 10% de partículas de >5000 μm^2. Esto implica evidentemente limitaciones en el transporte de sustratos y disminución de la actividad (35%).

Este efecto se observa más claramente en las imágenes de microscopio óptico para cada tipo de agitación (Figura 5.3 B), dónde las partículas de FastPrep

(derecha) fueron menores que el mismo tiempo en vortex (izquierda) o incluso tras 60 min (centro).

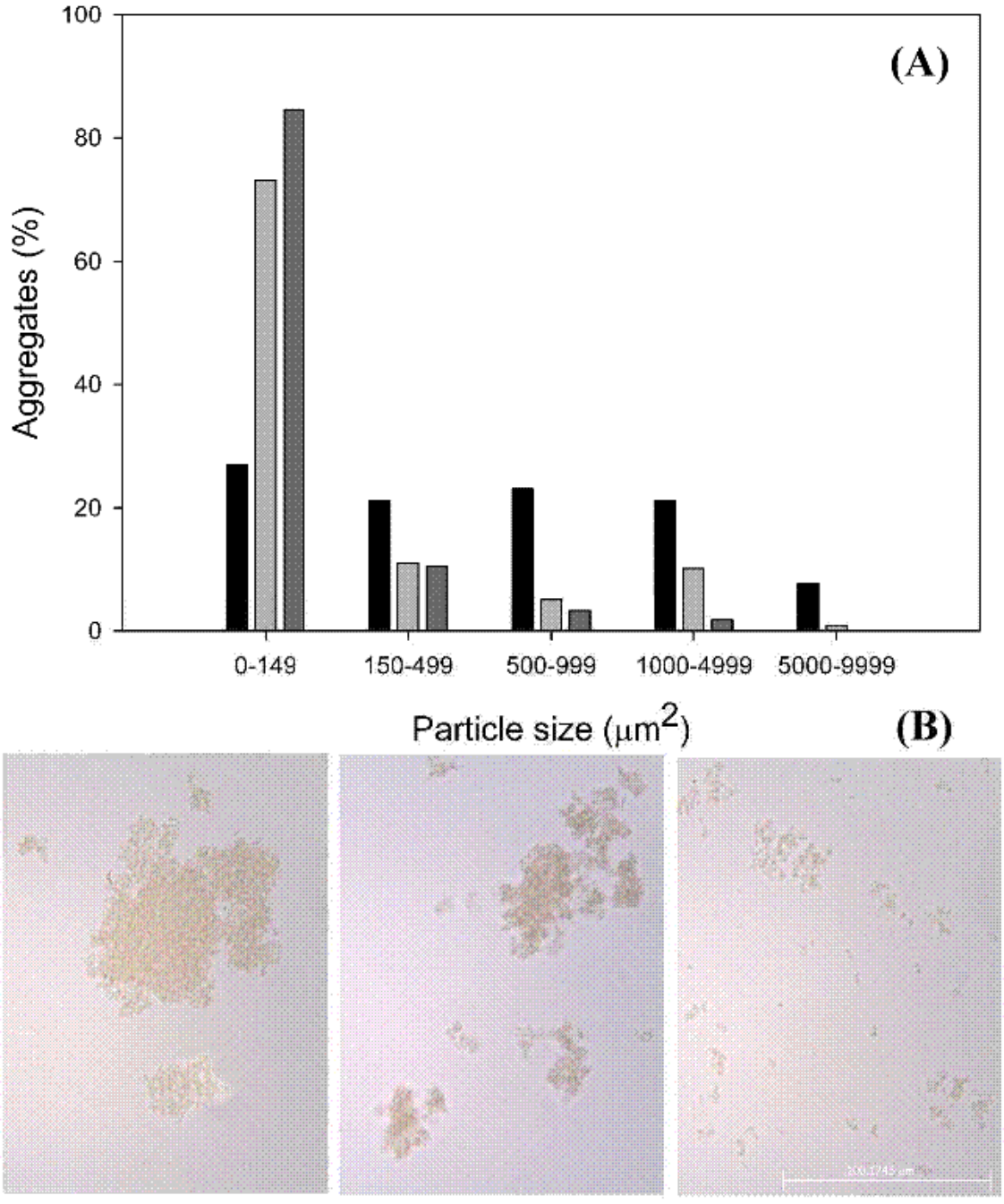


Figura 5.3: (A) Tamaño de las partículas de las CLEAs tras diferentes periodos de agitación y sistemas utilizados. Vortex aparece en negro (tras 30 s de agitación) y gris claro (tras 60 min). Fastprep (30 s) aparece en gris oscuro. (B) Microscopía óptica (40X) de CLEAs en solución tras diferentes agitaciones: 30 s vortex (izquierda), 60 min vortex (centro) y 30 s FastPrep (derecha).

2.2. Escalado en la producción

En la Tabla 5.2 se resumen las condiciones óptimas para la obtención de CLEAs con máxima eficiencia, condiciones por lo tanto necesarias para la producción de este biocatalizador inmovilizado a escala. Para su escalado, se aumentó la concentración inicial de BpAXE soluble a 5.3 mg/mL, pero el resto de condiciones fueron las optimizadas anteriormente.

Tabla 5.2: Condiciones óptimas para la producción de CLEAs a partir de AXE de *B. pumilus* purificada.

Concentración enzimática	5.3 mg/mL en 50 mM Tris-HCl pH 8.0
Concentración sulfato amónico	80% saturación
Reacción de precipitación	1 h en agitación suave a 4 °C
Concentración glutaraldehído	1% (v/v)
Reacción de entrecruzamiento	3 h en agitación suave a 4 °C
Método de lavado	Diluir 1/3, centrifugar 20 min, 6000*g* (x3)
Mecanismo de reducción de tamaño de partículas	30 segundos FastPrep

2.3. Estabilidad de las CLEAs

Las enzimas inmovilizadas presentan generalmente ventajas esenciales, como una mayor estabilidad a condiciones extremas (temperatura y pH), o mayor estabilidad mecánica.

Con el fin de comprobar la estabilidad mecánica de las CLEAs, se comparó la actividad de la enzima soluble tras 1 hora de vortex o sólo 30 s de FastPrep frente a la recuperada para las CLEAs. Las actividades enzimáticas de la forma soluble, disminuyeron un 90% y un 70%, respectivamente. La enzima nativa y soluble al no haberse precipitado con sales ni entrecruzado con glutaraldehído sufre una fuerte desnaturalización debido a las fuerzas de agitación. Sin embargo, las CLEAs, estructuras más rígidas están protegidas contra fuerzas mecánicas, una característica indispensable para la manipulación de enzimas industriales.

También se observó que estas CLEAs se conservaban mucho mejor a 4 °C y a temperatura ambiente, en comparación con la forma soluble. De hecho, tras 3 meses a 4 °C y temperatura ambiente, la actividad de BpAXE nativa disminuyó un 80% y totalmente, respectivamente. Sin embargo, las CLEAs sólo perdieron el 20% de actividad tras 3 meses a 4 °C, y el 45% a temperatura ambiente. Estos datos apoyan de nuevo la ganancia de estabilidad que presentan las CLEAs frente a la enzima sin inmovilizar.

A continuación, se realizó un estudio de la estabilidad frente a elevadas temperaturas (55, 60 y 65 °C), tanto para las CLEAs como para la forma nativa

(Figura 5.4). Tras sólo 5 minutos a 55 °C, BpAXE soluble se inactivó totalmente, y a temperaturas mayores bastó con 2 minutos. *Bacillus pumilus* es una especie mesófila que crece óptimamente a 30 °C, por lo que era de esperar que temperaturas tan altas desnaturalizaran la enzima. De nuevo, las CLEAs presentaron cambios de termoestabilidad, tras 5 min a 55 °C estas aún mantenían el 80% de la actividad inicial. Lo cual supone un aumento de la vida media en alrededor 5 veces con respecto a la forma nativa (desde 3 min a más de 15 min). Este efecto también pudo observarse a 60 °C, dónde tras 2 min las CLEAs aun conservaban el 60% de la actividad e incluso el 30-20% tras 8 min. Así pues, las CLEAs presentan un favorable cambio en la termoestabilidad.

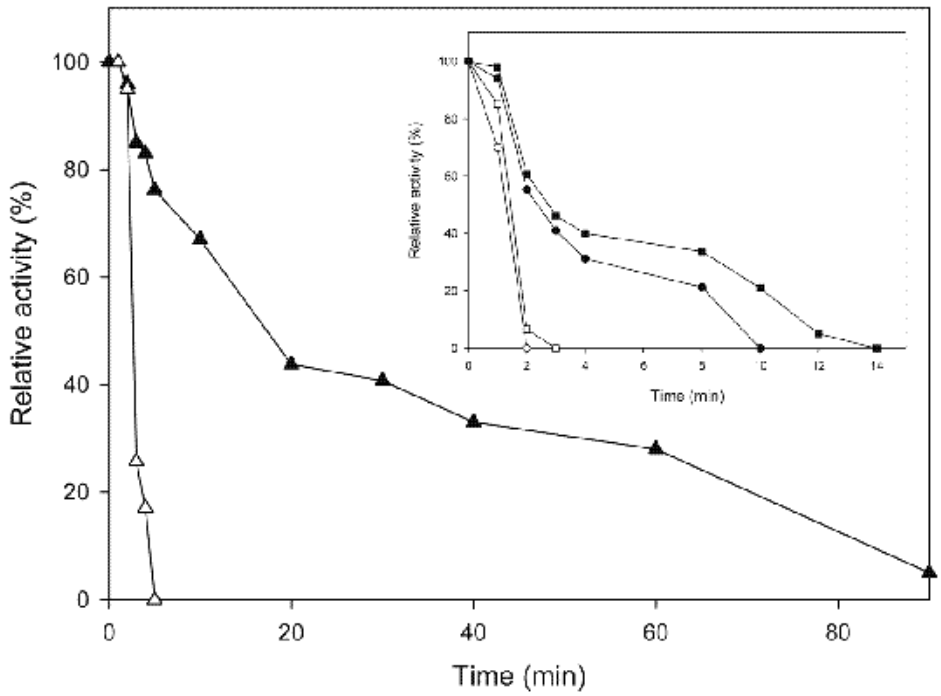


Figura 5.4: Estabilidad de CLEAs y enzima soluble frente a diferentes temperaturas. Las CLEAs se representan en símbolos negros: 55 °C (▲), 60 °C (■) and 65 °C (●), la forma libre se representa con los correspondientes símbolos en blanco. La figura interior representa la estabilidad a 60 y 65 °C. Los valores de actividad se tomaron con la medida estándar para *p*-NPA a 25 °C tras la incubación.

De igual modo, las CLEAs presentaron una mayor estabilidad frente al pH, de nuevo, en comparación con la forma libre. Se estudió la actividad residual de las CLEAs tras 24 h a pHs 3-11 (Figura 5.5). La rígida estructura de las CLEAs tolera pHs más extremos y desnaturalizantes que la BpAXE soluble. La tolerancia a pH extremos ha sido descrita también para otras CLEAs, como una tirosinasa (Aytar y Bakir, 2008) y una subtilisina (Sangeetha y Abraham, 2008). Estos estudios confirman que el glutaraldehído estabiliza la proteína frente a condiciones de estrés como fuerzas mecánicas, pH extremos y elevadas temperaturas, gracias a estos enlaces inter e intramoleculares.

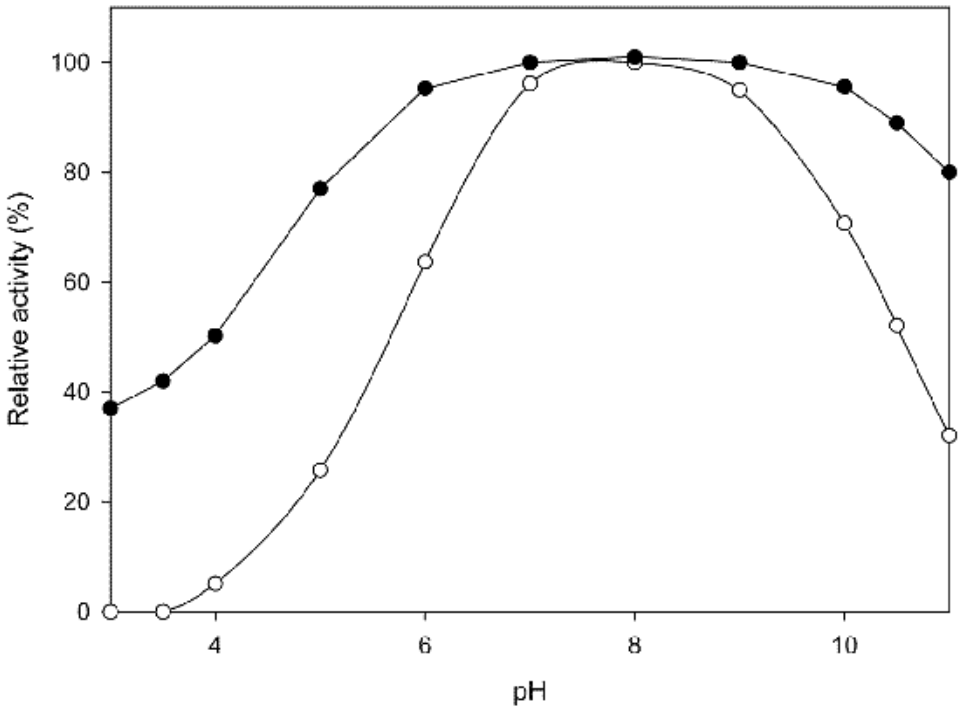


Figura 5.5: Estabilidad de CLEAs y forma libre frente a pHs. Las enzimas se incubaron durante 24h a 25 °C y se determinó su actividad mediante el método de medida estándar con *p*-NPA a pH 8.0. Enzima soluble (○), CLEAs (●). Los tampones utilizados fueron 50 mM de acetato sódico (pH 3.0-5.0), fosfato potásico (pH 6.0-7.0), Tris-HCl (pH 8.0-9.0) y ácido bórico (pH 10-11).

2.4. CLEAs en la síntesis de intermedios β-lactámicos

Las AXEs pertenecen a las familias 1 a 7 y 12 de las carbohidrato esterasas, según la base de datos CAZy. Estas catalizan la hidrólisis de compuestos con ácidos grasos de cadena corta, como el *p*-NPA (C3). No se ha descrito en la bibliografía ninguna AXE activa frente a ésteres de antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs), como el ketoprofeno metil ester (Figura 1.17). Esto se debe a que estas enzimas tienen una cavidad menos profunda que otras (capítulo IV), y que no puede alojar en su interior, el grupo ácido del éster, el ketoprofeno.

Sin embargo, el uso de AXEs en la síntesis de intermedios avanzados de β-lactámicos, es bien conocida (Degrassi y col., 2000; Martínez-Martínez y col., 2007). Para comprobar la aplicación industrial real de las CLEAs de BpAXE, se estudió la desacetilación enzimática de la cefalosporina C (CPC) y el ácido-7-aminocefalosporánico (7-ACA) en presencia de estas CLEAs optimizadas. Tras 200 min a 20 °C, 500 µg de CLEAs fueron capaces de desacetilar completamente 200 mM de 7-ACA (Figura 5.6).

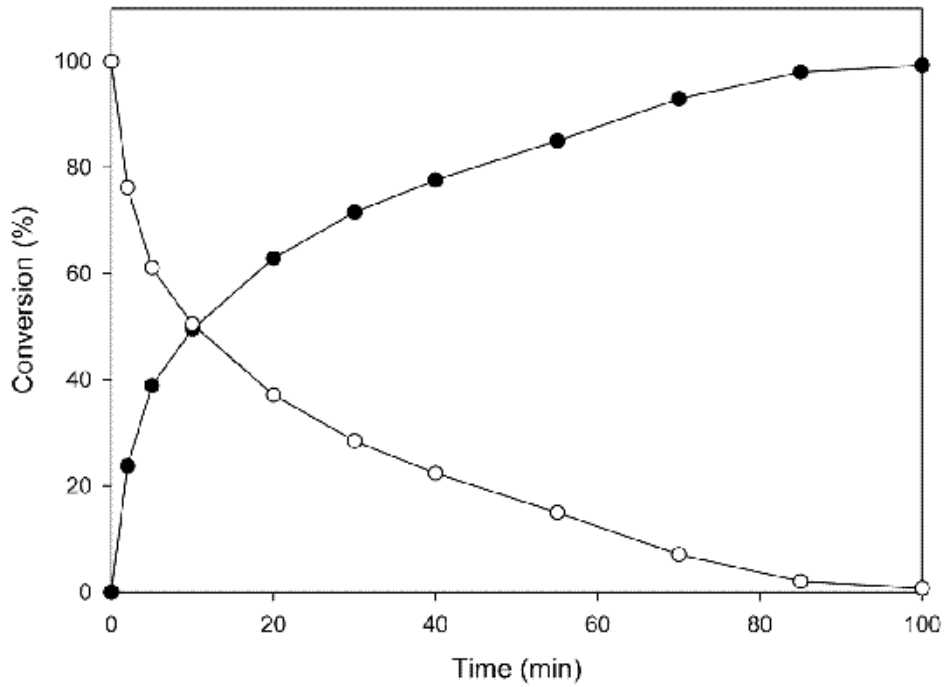


Figura 5.6: Seguimiento de la conversión de 200 mM 7-ACA con 500 µg de CLEAs a 20 °C. Sustrato (7-ACA) (○), desacetil-7-ACA (●).

A continuación se calcularon los valores de K_M y *Vmax* para las CLEAs para CPC y 7-ACA, los valores para la enzima soluble fueron calculados previamente por nuestro grupo (Martínez-Martínez y col., 2007) (Tabla 5.3).

Tabla 5.3: Parámetros cinéticos de la enzima soluble y CLEAs[¶].

	K_M (mM)		*Vmax* (µmol/min/mg)		k_{cat}/K_M ($mM^{-1}.min^{-1}$)	
	Enzima soluble*	CLEAs	Enzima soluble*	CLEAs	Enzima soluble*	CLEAs
7-ACA	20.6	70.8	23.3	14.0	266.7	46.6
CPC	215	144.5	81	59.3	88.6	96.5

[¶] Las reacciones se llevaron a cabo como se explica en Materiales y Métodos a 20 °C, con 40 µg/mL de CLEAs.

* Valores tomados de Martínez-Martínez y col., 2007.

La enzima contenida en las CLEAs presentaba, en comparación con la soluble, valores de *Vmax* menores para ambos sustratos. Por otra parte, los valores de K_M también variaron, siendo notablemente mayor (70.8 mM) y menor (144.4 mM) para el 7-ACA y CPC, respectivamente. El valor de k_{cat}/K_M reveló que el 7-ACA era 3 veces mejor sustrato que el CPC para la enzima soluble, aunque para las CLEAs, el CPC fue 2 veces mejor sustrato que el 7-ACA. La eficiencia para el CPC resultó ser similar para

ambas formas, contrariamente a lo observado para el 7-ACA, dónde la forma soluble fue alrededor de 5-6 veces mejor.

De este modo, la producción de CLEAs ha alterado sus características cinéticas con respecto a la enzima soluble, y estos cambios podrían tener positivas aplicaciones industriales. En el proceso de formación de intermedios directos a partir de CPC se suceden la desacetilación del C_3 y la eliminación del resto α-aminoadipilo de la posición 7 de la cadena lateral. Las CLEAs, al presentar mayor eficiencia por el CPC, podrían actuar al principio para dar desacetil-CPC, y este, tras la actuación de la D-amino oxidasa (D-AAO, EC 1.4.3.3) y la glutaril-7-ACA acilasa (GLA, EC 3.5.1.93) eliminar enzimáticamente el resto α-aminoadipilo, dando el desacetil-7ACA.

2.5. Reutilización de las CLEAs en reactor

Como se ha descrito anteriormente, una de las mayores ventajas que presentan las enzimas inmovilizadas (además de la estabilidad) es su reciclado, es decir la capacidad de recuperación de la enzima para ser utilizada en una nueva reacción enzimática. Así pues, estas CLEAs, nuevos biocatalizadores, pueden ser separados del medio mediante filtración o centrifugación (Cao y col., 2003). Se llevaron a cabo reacciones en reactores de 1.5 mL, perdiéndose sólo alrededor de 1.8% de actividad/ciclo realizado. Esta pérdida fue aún menor si se aumentaba el volumen del reactor a 6 mL, donde se perdió menos del 1% de actividad/ciclo en los 12 primeros ciclos (Figura 5.7 interior). Con este último reactor de 6 mL se realizaron hasta 50 ciclos de recuperación (Figura 5.7), mostrando finalmente una vida media de recuperación de 45 ciclos. Se han descrito en la bibliografía, numerosos casos de enzimas inmovilizadas con valores similares de recuperación, pero siempre en soportes físicos como el Eupergit C (Katchalski-Katzir y Kraemer, 2000). Sin embargo mediante el uso de CLEAs, no se ha llegado nunca a una recuperación tan elevada, el mejor dato publicado es de 68% de recuperación tras 11 ciclos (Sangeetha y Abraham, 2008), siendo la vida media de estos agregados, 17 ciclos. Estos resultados apoyan firmemente la ventaja de producir CLEAs de BpAXE con elevada resistencia mecánica que permitan muchos ciclos de uso industrial.

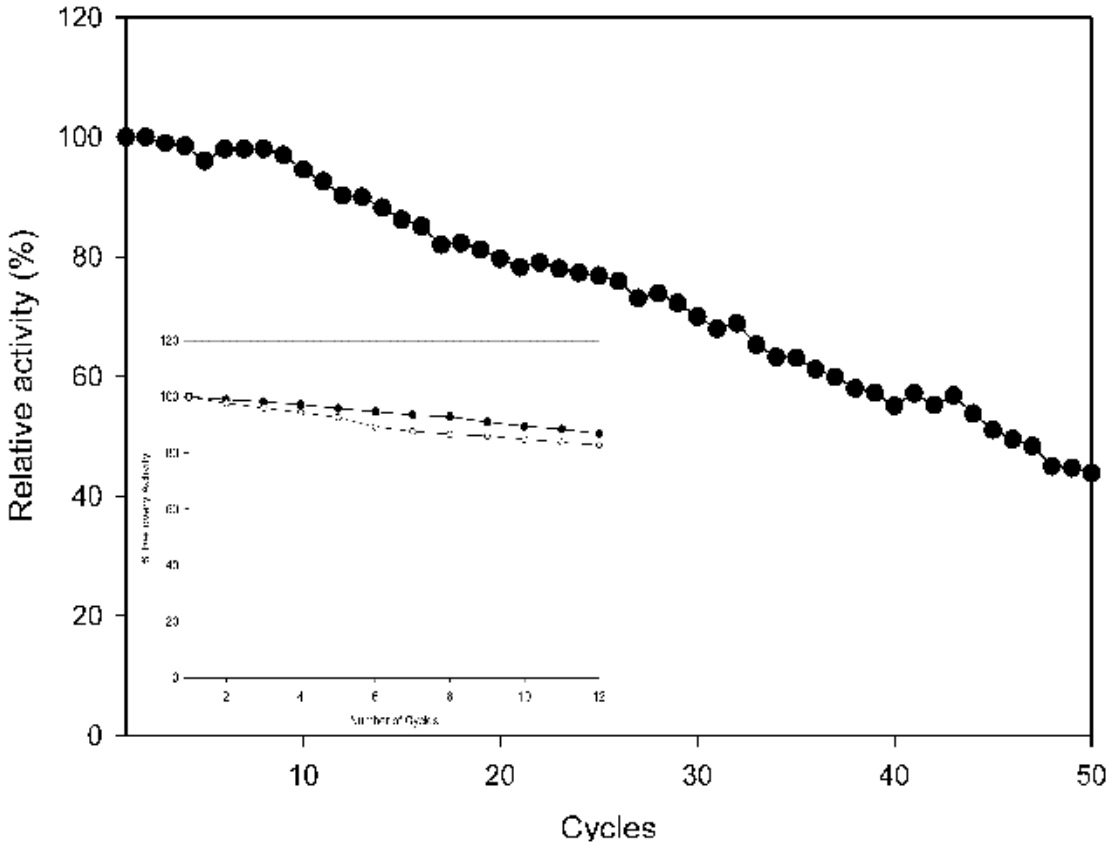


Figura 5.7: Estabilidad operacional de FastPrep CLEAs en reactor para la biotransformación de 7-ACA. Reacciones de 20 min a 20 °C con 20 µg/mL fueron centrifugadas, el pellet se resuspendió en un nuevo medio de reacción con 150 mM 7-ACA en 150 mM tampón fosfato pH 7.5. Volumen del reactor: 1.5 mL (○) y 6 mL (●).

3. Conclusiones

Los resultados presentados en el presente capítulo son muy alentadores, detallan el proceso de obtención de CLEAs con aplicación en la síntesis de intermedios β-lactámicos como el desacetil-ácido-7-aminocefalosporánico y la desacetil-cefalosporina C. De este modo, por primera vez en la bibliografía se ha utilizado un sistema de dispersión que consigue recuperar el 100% de actividad en tan sólo 30 s y que produce CLEAs de gran calidad. Esta nueva y original tecnología puede ser escalada ya que el FastPrep dispone de un adaptador para dos reactores de 50 mL (BigPrep), es decir dispersa hasta 100 mL de CLEAs en 30 s. De este modo, el estudio abre una nueva posibilidad en la preparación de catalizadores de bajo coste, incrementando además su estabilidad y eficiencia operacional.

Capítulo VI

Clonación y caracterización de una carboxilesterasa eucariótica de *Yarrowia lipolytica* CLIB122.

1. Introducción

Tras la clonación, cristalización e inmovilización de una acetil xilan esterasa de origen bacteriano (BpAXE), sería interesante la clonación de otras esterasas, siempre dentro de la superfamilia de α/β hidrolasas, con propiedades catalíticas distintas a las AXEs, e incluso de un organismo eucariótico. En el primer capítulo se comentó el interés de la industria farmacéutica por enzimas capaces de actuar sobre mezclas racémicas para resolver compuestos ópticamente puros (Margolin, 1993), como por ejemplo, el ketoprofeno metil ester. Este compuesto es un intermedio racémico en la síntesis del ácido del antiinflamatorio no esteroideo (NSAID). El enantiómero S- es hasta 100 veces más potente que el R-, sin embargo, este último por separado tiene también aplicaciones industriales (Ong y col., 2005). Es por ello que se ha tratado de resolver quiralmente estos ésteres mediante el uso de enzimas.

La levadura *Yarrowia lipolytica*, conocida previamente como *Candida endomycopsis* o *Saccharomyces lipolytica*, es una de las levaduras más ampliamente estudiadas (Aloulou y col., 2007a, 2007b). Esta levadura es la única del género *Yarrowia*, y presenta numerosas diferencias con las especies más frecuentemente estudiadas: *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*, en términos de evolución filogenética, fisiología o biología molecular. *Yarrowia lipolytica* es un organismo no patógeno para el hombre, recientemente aprobado como GRAS (*Generally Recognized As Safe*), por lo que sus aplicaciones industriales son aún mayores (Bankar y col., 2009). Se trata de un ascomicete dimórfico aerobio que secreta numerosos metabolitos al medio (como ácidos orgánicos y proteínas extracelulares). Se ha identificado esta levadura en varios alimentos ricos en grasas como el queso o el aceite de oliva (Yamagami y col, 2001; Fickers y col., 2005), este organismo asimila sustratos hidrofóbicos como nutriente, ya que secreta varias lipasas al medio (Barth y Gaillardin, 1997). Debido a estas propiedades, y siguiendo con la línea de investigación de la presente Tesis, en este capítulo se realizó la clonación y expresión de una nueva carboxilesterasa de *Y. lipolytica* CLIB122 en diferentes sistemas de expresión, así como se determinó la actividad específica de las enzimas recombinantes resultantes, y su potencial en la resolución del ketoprofeno metil ester racémico.

2. Resultados

2.1. Elección del gen de *Yarrowia lipolytica* CLIB122

Una vez seleccionado el género y especie de la levadura de interés, *Yarrowia lipolytica* CLIB122, se seleccionó un gen que codificaba para una hipotética esterasa. En la página del NCBI, aparecen 48 genes de esta cepa potenciales para esterasas, aunque sólo cuatro de ellos codifican para carboxilesterasas (dos en el cromosoma D, uno en el C y otro en el E). Se realizó entonces, una extensa búsqueda con el fin de identificar genes de otras levaduras (clonados o no), y que tuvieran relativa homología con el gen de *Y. lipolytica* CLIB122. Esto se realiza con el fin de asegurar que la proteína expresada posea realmente propiedades hidrolíticas, y no sea una proteína inactiva.

La proteína codificada por el gen XM503610 del cromosoma E de *Yarrowia lipolytica* CLIB122 presentó elevada homología con otras esterasas, sobre todo con con una carboxilesterasa de *Y. lipolytica* CLIB180 (97% identidad), y que ha sido recientemente clonada (Kim y col., 2007). Las otras esterasas con homología no habían sido clonadas, y su identidad con respecto a YICE era relativamente baja, 22% con carboxilesterasas putativas de *Aspergillus clavatus* y *Penicillium marneffei*, y 21% con otra de *Neosartorya fischeri* (Figura 6.1).

Además, esta hipotética esterasa presentaba baja homología (18%) con la *p*-nitrobenzilesterasa de *B. subtilis*, recientemente cristalizada (código PDB: 3C7J), y gracias a esta se pudo, también por homología determinar la serina e histina del centro activo, Ser189 e His387. Posteriormente, en el modelado se buscó un residuo ácido cercano a estos dos aminoácidos previamente descritos, siendo el tercer residuo el Glu302, conservado en las otras esterasas putativas alineadas (Figura 6.1).

La cepa *Y. lipolytica* CLIB122 se adquirió a través del CIRM (*Centre International de Ressources Biologiques Microbiennes*, Grignon, Francia). Se trata de un centro que agrupa y conserva todo tipo de cepas bacterianas (patógenas o no), organismos filamentosos y levaduras. La cepa fue cultivada en medio rico para levaduras YPD (ver Materiales y Métodos, apartado 1), para finalmente realizar el aislamiento de genómico mediante el kit comercial de Quiagen modificado para la ruptura de la pared celular de eucariotas.

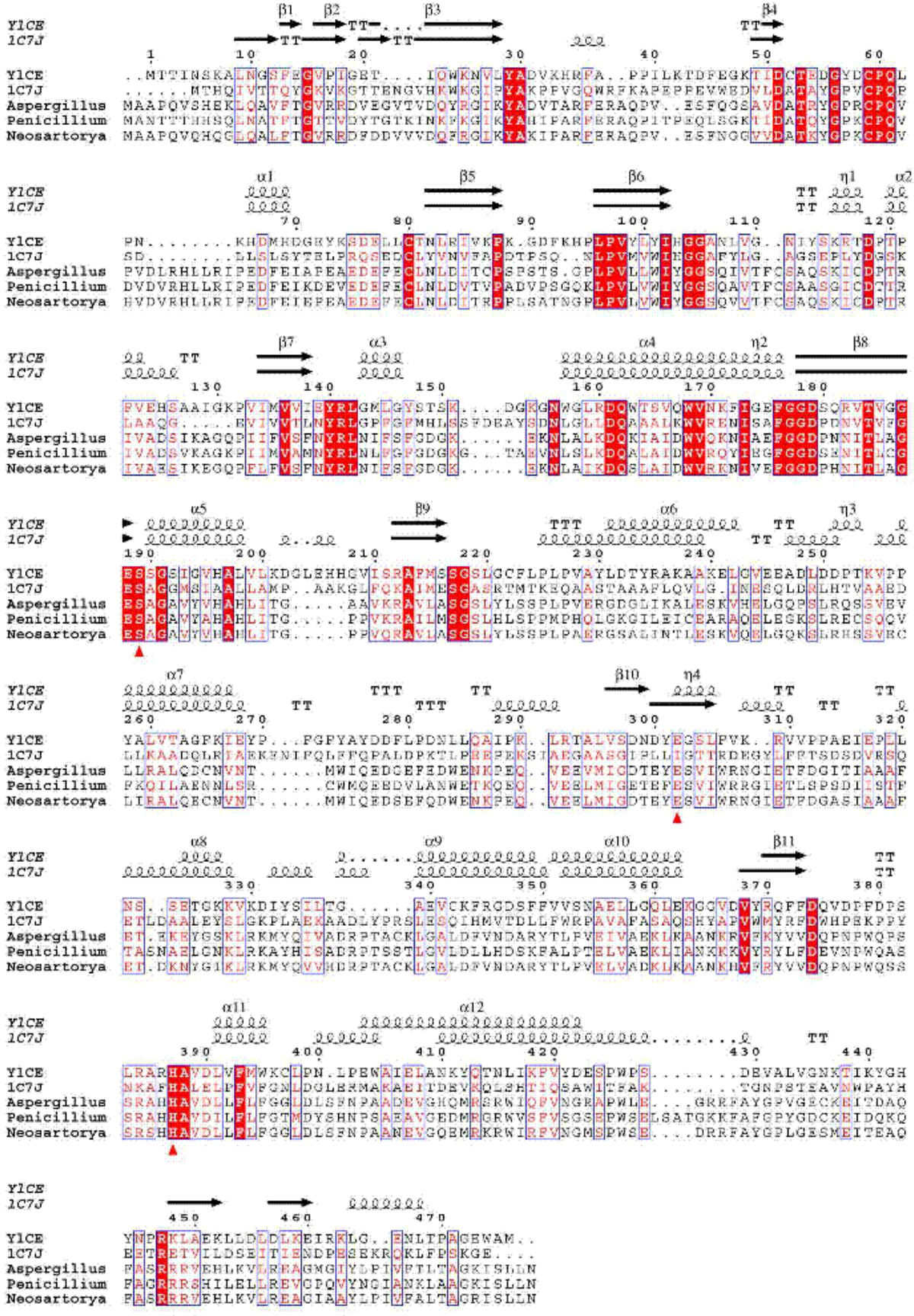

Y1CE
1C7J
Aspergillus
Penicillium
Neosartorya

Figura 6.1: Alineamiento de múltiples secuencias de proteínas con YICE de *Y. lipolytica* CLIB122. Las secuencias se alinearon mediante el programa CLUSTAL-W (Thompson y col., 1994) y se obtuvo esta figura con el programa ESPript (Gouet y col., 1999). CE de *Y. lipolytica CLIB122* (YICE), mostró un 18% identidad con una *p*-nitrobenzilesterasa de *Bacillus subtilis* (código PDB: 1C7J), 22% con carboxilesterasas hipotéticas de *Aspergillus clavatus* y *Penicillium marneffei*, y 21% con otra de *Neosartorya fischeri*. Los residuos más conservados se sobreiluminan en rojo. Los triángulos representan los aminoácidos del centro activo.

2.2. Clonación del gen XM503610 en diferentes vectores

El gen seleccionado, de 1431 pb, codificaba para una proteína de 476 aminoácidos, y con una teórica masa molecular de 53 kDa. Se clonó el gen tanto en un vector de expresión eucariota (pPIC9K), como en dos vectores de expresión procariotas (pET28a y pET24b).

Los oligos diseñados para pPIC9K y pET28a fueron exactamente iguales, ya que no se producía desfase de la lectura del gen en ninguno de los vectores. Se amplificó el gen con los siguientes oligos, mediante PCR (ver Materiales y Métodos, apartado 5.2):

YICE-up: 5´ GGAATTCATGACTACAATTAACTCGAAAGCACTC 3´.
YICE-down: 5´ CGCGGCCGCCTACATAGCCCACTCTCCA 3´.

Los oligos 5´ y 3´ presentaban la secuencia de corte para las enzimas de restricción *EcoR*I y *Not*I, respectivamente. Se clonó el gen en ambos vectores, y se transformó en *E. coli* DH5α. Tras identificar los clones con el gen y verificar por secuenciación la ausencia de mutaciones, se transformó en *Pichia pastoris* GS115 para pPIC9K-YICE, *y en E. coli* Rosetta (DE3)pLys para pET28a-YICE.

También se realizó la clonación en otro vector procariótico, pET24b. Para esta nueva clonación se diseñaron nuevos oligos 5´ y 3´ también con los puntos de corte para *EcoR*I y *Not*I, respectivamente, pero con una base más en 5´ para no causar desfase en la lectura del vector pET24b-YICE, y sustituyendo el codón TAG (Stop) por TTG (Leu), para permitir la proteína fusión con colas de histidinas en el C-terminal:

YICE-up en pET24b: 5´ GGAATTCCATGACTACAATTAACTCGAAAGCACTC 3´.
YICE-down en pET24b: 5´ CGCGGCCGCCAACATAGCCCACTCTCCA 3´.

2.3. Expresión de YICE recombinante en diferentes sistemas de expresión

2.3.1. Expresión en *Pichia pastoris* GS115

Las proteínas eucarióticas, al provenir de organismos más evolucionados, necesitan una serie de modificaciones postraduccionales que ocurren en la célula eucariótica. Estas modificaciones son necesarias para la correcta conformación de las estructuras secundaria y terciaria de proteínas eucarióticas, afectando a la estructura, solubilidad, estabilidad, vida media, resistencia a proteasas, compartimentalización, y finalmente, a su actividad biológica. Entre ellas destacan:

- Retención de la metionina aminoterminal en las proteínas recombinantes, que no está presente en las formas nativas. Afecta a su estabilidad y produce inmunogenicidad (Chaudhuri y col., 1999; Takano y col., 1999; Daly y Hearn, 2005).
- Necesidad de chaperonas apropiadas para el correcto plegamiento de las proteínas. Para esto se han desarrollado nuevos sistemas de expresión, que sobreexpresan diferentes chaperonas, junto con la proteína de interés (Cole, 1996).
- Problemas de preferencia de codones (o *codón bias*). El código genético es degenerado, varios tripletes pueden dar lugar a un mismo aminoácido. Cada especie tiene su propia proporción de tripletes, siendo unos más frecuentes que otros (Grosjean y Fiers, 1982). Cuando la desviación de codones del gen que se quiere expresar es diferente al del organismo de expresión, la eficiencia de traducción y, por tanto, el rendimiento en la expresión disminuye considerablemente.
- Glicosilaciones: forma N- y O- oligosacáridos que afectan a la estructura final de la proteína eucariótica.

Actualmente, *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) junto con *Saccharomyces cerevisiae*, son los sistemas microbianos más habituales de expresión de proteínas heterólogas en eucariotas (Cregg y col., 2000; Zhou y col., 2005), ya que incorporan toda la maquinaria necesaria para el correcto procesamiento de estas proteínas. Así pues, parece evidente que *E. coli* podría verse limitado como sistema de expresión, ya que, al tratarse de un organismo procariótico, no posee toda esa maquinaria necesaria para procesar correctamente la carboxilesterasa eucariótica seleccionada.

Por lo anteriormente mencionado, el gen seleccionado se clonó, inicialmente, en *Pichia pastoris* GS115, como sistema de expresión eucariótico clásico. Esta cepa puede dar lugar a dos tipos de fenotipos $His^{+}Mut^{S}$ e $His^{+}Mut^{+}$, dependiendo de dónde se produce la recombinación, es decir, dependiendo de las enzimas utilizadas para linealizar el vector con el gen.

Análogamente, tras amplificar suficiente vector en *E. coli* (DH5α), se digirió con *Bgl*II para linealizarlo y transformar *P. pastoris* GS115, mediante electroporación. Los clones se cultivaron durante 2 días a 30 °C en medio MM y MD (ver Materiales y Métodos, apartado 4.3), para seleccionar los clones $His^{+}Mut^{S}$. Los clones Mut^{S} no pueden metabolizar bien el metanol como fuente de carbono, por lo que crecerán poco o nada en medio mínimo (MM), pero sí en medio con dextrosa (MD).

Tras amplificar suficiente vector en *E. coli* (DH5α), se digirió con *Pme*I para linealizarlo y transformar *P. pastoris* GS115, mediante electroporación. Los clones se cultivaron durante 2 días a 30 °C en medio MM y MD (Materiales y Métodos, apartado 4.3), para seleccionar los clones $His^{+}Mut^{+}$. Los clones Mut^{+} sí pueden metabolizar el metanol como fuente de carbono, por lo que crecerán igual en medio mínimo (MM) o en medio con dextrosa (MD).

En este punto, se obtuvieron varios clones $His^{+}Mut^{S}$ e $His^{+}Mut^{+}$, a continuación, se extrajo genómico de varios clones, para comprobar que, efectivamente, habían integrado el gen en su genoma. Con ese genómico se realizó una PCR de colonias, utilizando como cebadores los oligos α-factor en 5´ y AOX1 en 3´.

α-Factor: 5´ TACTATTGCCAGCATTGCTGC 3´
AOX1: 5´ GGCAAATGGCATTCTGACATCCT 3´

Finalmente, se seleccionaron 5 clones positivos Mut^{S}, y otros 5 Mut^{+}. Estos clones se cultivaron en el medio complejo BMMY para su expresión (ver Materiales y Métodos, apartado 4.3), durante 96 horas a 30 °C, con el fin de determinar el mejor clon (Mut^{+} o Mut^{S}) y tiempo de expresión.

Durante cuatro días, cada 12 horas se fueron tomando alícuotas de pellet y sobrenadante, y se cargaban en geles SDS-PAGE, para comprobar la presencia de una proteína de 53 kDa (sin la señal extracelular o α-factor) en el medio extracelular, o bien de 63 kDa en el pellet celular (con los 10 kDa del α-factor).

En todos los clones seleccionados (Mut^{S} y Mut^{+}), se observó una gran expresión intracelular. La única diferencia fue el tiempo, apareció una banda de 63 kDa a partir de las 36 horas para Mut^{S} (Figura 6.2), y tras 24 horas de crecimiento para Mut^{+}. La expresión de los clones Mut^{S} se prolongó varios días, pero en los clones Mut^{+} no se mantuvo durante mucho tiempo, tan sólo 24 horas más.

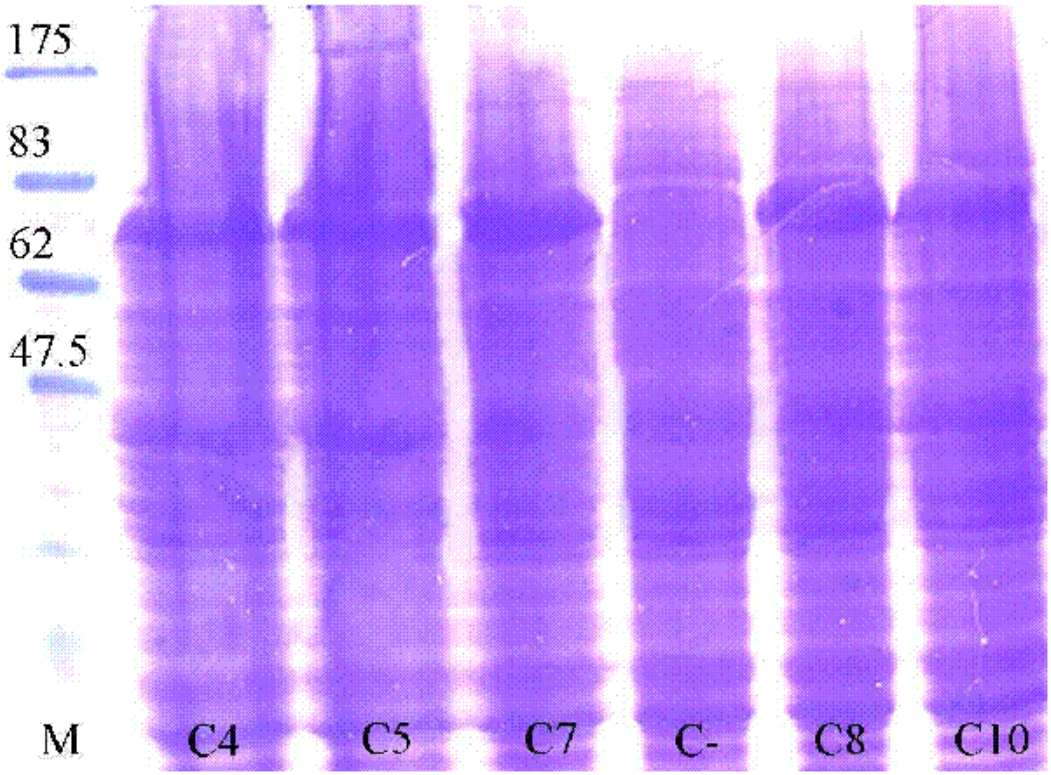


Figura 6.2: SDS-PAGE del producto de expresión del gen XM503610 en *Pichia pastoris* tras 36 h de inducción a 30 °C. M, marcadores de masa molecular comerciales (P7708S; New England Biolabs). C4, 5, 7, 8 y 10 corresponden con diferentes clones Mut^S seleccionados por la presencia del gen insertado en el genoma. C- corresponde con un control negativo de *Pichia sp.* sin el gen, cultivado de la misma manera. En los clones positivos se aprecia la presencia de una banda de alrededor 63 kDa (YICE con el α-factor).

En los medios extracelulares de estos clones (Mut^+ y Mut^S), se observó una banda de alrededor 63 kDa (Figura 6.3). El hecho de que la proteína presente en el sobrenadante aún conserve el α-factor es algo poco probable, puesto que esta cola se elimina al exportarse la proteína al medio. Es más, se observa el mismo patrón de bandas en el control negativo. Es por ello, que ninguna de estas proteínas extracelulares, incluidas las de menor tamaño (47-60 kDa), corresponden con la carboxilesterasa de *Y. lipolytica*, YICE, sino que son simples proteínas extracelulares de *P. pastoris* GS115. Ni tras más tiempo de cultivo se observó la banda deseada en el medio extracelular. Es difícil explicar porqué la proteína intracelular no es transportada al medio extracelular, aunque lo más lógico sería que al añadir una cola N-terminal de 10 kDa (α-factor), se produzca un plegamiento erróneo de la proteína, y este no sea reconocido por la maquinaria de transporte.

Otra posible hipótesis sería que YICE se procesara correctamente pero fuera degradada conforme fuera exportada al medio extracelular. BMGY y BMMY, a pesar de ser medios tamponados (por lo que no se producirían cambios de pH que afecten a las proteínas extracelulares), pueden contener enzimas proteolíticas producidas por la propia *Pichia sp.*, estas proteasas podrían haber degradado YICE

conforme era transportada al espacio extracelular sin ser entonces, detectables en gel SDS-PAGE.

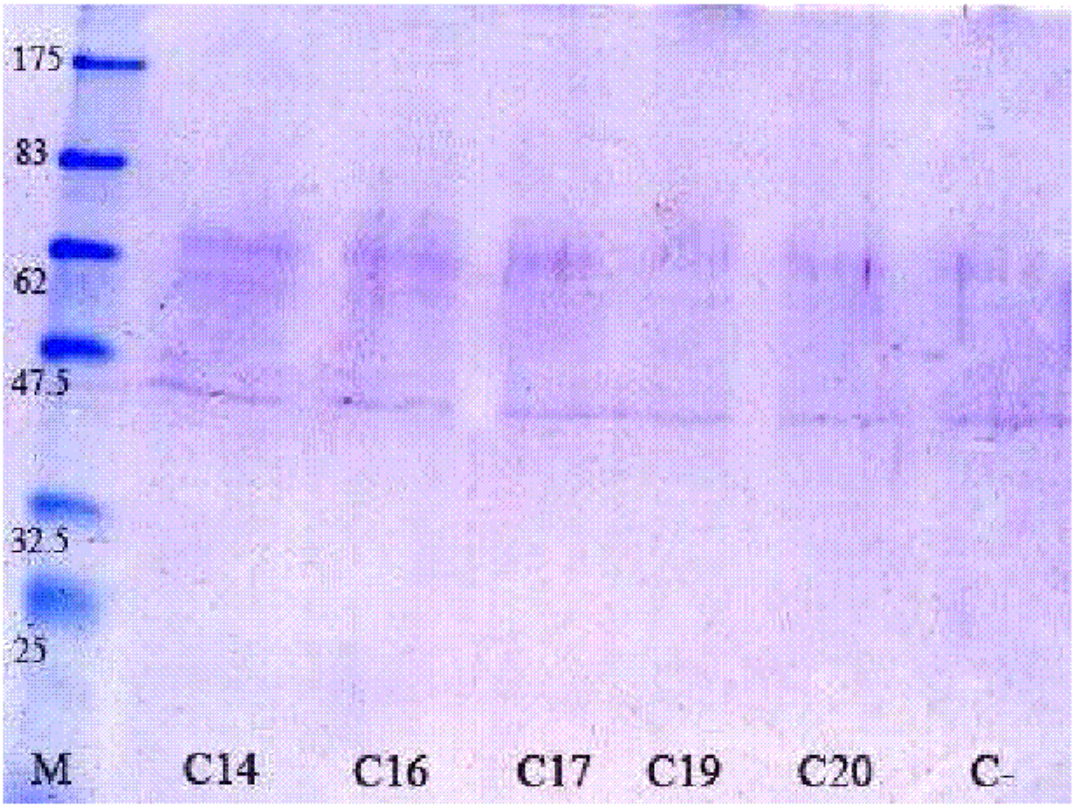


Figura 6.3: SDS-PAGE del producto de expresión del gen XM503610 en *Pichia pastoris* tras 24 h de inducción a 30 °C. M, marcadores de masa molecular comerciales (P7708S; New England Biolabs). C14, 16, 17, 19 y 20 corresponden con diferentes clones Mut^+ seleccionados por la presencia del gen insertado en el genoma. C- corresponde con un control negativo de *Pichia sp.* sin el gen pero cultivado de la misma manera. En los clones se aprecia la presencia de diferentes proteínas entre 63 kDa y 46 KDa.

No se detectó actividad en los medios extracelulares de los cultivos de los 10 clones inducidos, ni siquiera concentrando el medio de todo un litro de cultivo a su menor volumen. Estos resultados apoyan que YICE no era excretada al medio, o bien, que fue atacada por proteasas extracelulares.

Es evidente que los niveles de expresión extracelular obtenidos no eran suficientes para una extensa caracterización enzimática, por lo que se prosiguió con la expresión de la proteína eucariótica en un sistema de expresión procariótico, *E. coli*.

2.3.2. Expresión y purificación de YICE recombinante en *E. coli* Rosetta (DE3)pLys

Se realizó entonces la transformación con pET28b-YICE en *E. coli* Rosetta (DE3)pLys, en busca de una proteína soluble y activa. Sin embargo, sólo se obtuvieron cuerpos de inclusión, insolubles incluso al bajar la temperatura de inducción, disminuir la concentración de IPTG, o incluso al cambiar la cepa de expresión por Rosetta (DE3), BL21 (DE3), o BL21 (DE3)pLys.

Por ello, se realizó una nueva clonación, pero esta vez en pET24b. Este vector permite expresar la cola de histidinas en el extremo C-terminal, de modo que desaparece del extremo N-terminal, por si estuviera causando problemas en el plegamiento de la proteína al ser expresada en pET28a (como podría estar ocurriendo con el α-factor N-terminal de *P. pastoris*).

De nuevo, los primeros intentos de inducción con pET24b-YICE produjeron insolubles cuerpos de inclusión. Esto no es extraño si tenemos en cuenta que se trata de una proteína eucariótica expresada en un procariota, y que debe presentar plegamientos y glicosilaciones proteicas propias de organismos más evolucionados. Finalmente, las condiciones de expresión se consiguieron optimizar para solubilizar parte de la proteína expresada en *E. coli* Rosetta (DE3)pLys, para ello se disminuyó la temperatura de inducción hasta 20 °C. Se observó una banda de proteína en gel SDS-PAGE de 56 kDa, lo cual correspondería con YICE más la cola de histidinas que añade pET24b, y consiguiendo así una buena cantidad de proteína en la fracción soluble (Figura 6.4), al igual que ocurría con una quitina deacetilasa de *S. cerevisiae* expresada en *E. coli* (Martinou y col., 2003).

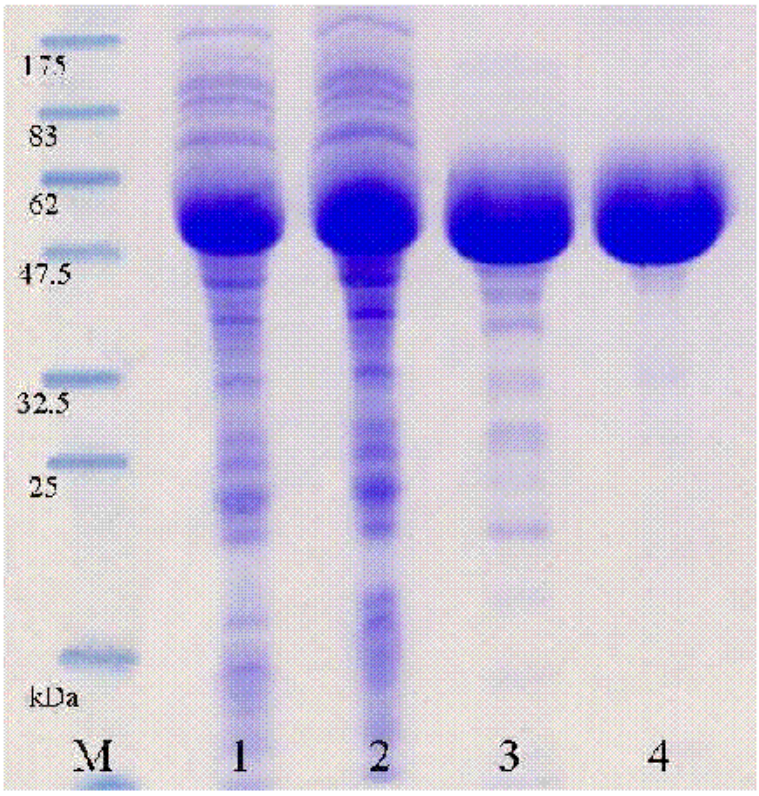


Figura 6.4: SDS-PAGE del producto de expresión del gen XM503610 en *E. coli* Rosetta (DE3)pLys tras 18 h de inducción a 20 °C. Cada calle contiene 20 µg de proteína. M, marcadores de masa molecular comerciales (P7708S; New England Biolabs). Calle 1, extracto crudo de Rosetta con pET24b-YICE inducido. Calle 2, extracto crudo tras ultrafiltración tangencial. Calle 3, fracción recolectada tras cromatografía de intercambio aniónico (CaptoQ). Calle 4, fracción recolectada tras la purificación tras cromatografía de afinidad (HisTrap FF).

2.4. Caracterización enzimática de la enzima recombinante

2.4.1. Actividades en los sistemas de expresión

A continuación, se intentó comparar la actividad de YICE producida en *Pichia sp.* con *E. coli* Rosetta (DE3)pLys, como sistemas de expresión.

Al no tener proteína soluble de *Pichia sp.* en el medio extracelular, se midió actividad en los pellets tras romper las células de levaduras con perlas de vidrio de 0.5 mm. Tras esta ruptura, sí se observó actividad con *p*-NPButirato para ese extracto crudo. Con el clon 7 de Mut^S, se obtuvo una actividad máxima a las 72 horas de inducción, similar a la actividad mostrada en el pellet del clon 14 de Mut^+ tras 48 horas de inducción. El clon Mut^+ al usar el metanol como fuente de carbono crece más rápidamente, por lo que es normal que la expresión de proteínas sea más temprana. Sin poder purificar esta proteína unida al α-factor, comparamos la actividad específica de este extracto de levadura con la actividad específica de YICE expresada en *E. coli*. La actividad específica mostrada por el extracto crudo

eucariótico fue de 1.17 UE/mg, menor incluso que la producida en *E. coli* sin purificar (2.1 UE/mg) (Tabla 6.1),

Por motivos de expresión, purificación y tiempo, se expresó YlCE de *Y. lipolytica* CLIB122 mediante pET24b en el sistema de expresión *E. coli*, al igual que otras proteínas (Miller y col., 2005). Tras las etapas de purificación de YlCE expresada con pET24b en *E. coli* Rosetta (DE3)pLys, se obtuvo un rendimiento del 84.2%, y un grado de purificación igual a 4.0 (Tabla 6.1). Esto indica que la proteína expresada supone alrededor del 25% del total de las proteínas de *E. coli*. En la fracción recuperada tras la HisTrap se obtuvo una actividad específica de 7.0 UE/mg para la hidrólisis del *p*-NPButirato en el medio de reacción estándar.

Tabla 6.1: Purificación de YlCE[§] recombinante expresada en *E. coli* Rosetta (DE3)pLys con el vector pET24b-YlCE.

Paso de purificación	Volumen (mL)	Actividad total (UE)	Actividad específica (UE/mg)[¶]	Factor de purificación	Rendimiento (%)
Extracto crudo	53	3558.3	2.1	1.0	100
Ultrafiltración tangencial (30 kDa)	28	3491.0	2.1	1.2	98.1
Intercambio aniónico (CaptoQ)	14	3244.3	5.7	3.2	91.2
Cromatografía de afinidad (HisTrap)	44	2996.1	7.0	4.0	84.2

[§] Purificación de un litro de cultivo bacteriano (15 g peso húmedo).

[¶] Actividad específica determinada en el medio de reacción estándar con *p*-NPButirato a 25 °C y pH 7.5.

La enzima así purificada resultó ser un monómero de 56 kDa, cuando se analizó mediante exclusión molecular.

2.4.2. Parámetros cinéticos sobre esteres de *p*-nitrofenilo

Para el estudio detallado de la especificidad enzimática, se utilizó entonces YlCE producida en el sistema de expresión pET24b en *E. coli*. Se estudió la especificidad de la enzima para los sustratos más comunes de las carboxilesterasas, los ésteres de *p*-nitrofenilo (acetato, butirato, caprilato, laurato, miristato y palmitato). No se observó actividad sobre el *p*-NPPalmitato (C_{16}) y apenas sobre el *p*-NPMiristato (C_{14}), en las condiciones estándar de medida. La actividad disminuyó conforme aumentó la longitud de la cadena del ácido graso (Tabla 6.2), lo cual confirma la naturaleza de la enzima: se trata de una esterasa y no de una lipasa. El mejor sustrato para YlCE fue el *p*-NPButirato, con una k_{cat}/K_M de 46.3 $mM^{-1}.s^{-1}$.

Tabla 6.2: Parámetros cinéticos de YICE recombinante[§].

	K_M (mM)	V_{max} (μM/s)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($mM^{-1}.s^{-1}$)
p-NPAcetato (C_2)	0.7	2.8	7.9	11.5
p-NPButirato (C_4)	0.5	8.4	23.6	46.3
p-NPCaprilato (C_8)	1.8	5.7	15.9	8.9
p-NPLaurato (C_{12})	2.2	2.2	6.2	2.8
p-NPMiristato (C_{14})	2.8	0.5	1.4	0.5
p-NPPalmitato (C_{16})	N.D	N.D	N.D	N.D.
α-Naftil acetato	0.6	3.0	8.5	14.3

[§]La actividad se determinó en el medio de reacción estándar con *p*-NPButirato a 25 °C, pH 7.5, y con 20 μg de proteína purificada.

A continuación, comparamos estos parámetros con los de la esterasa descrita en la bibliografía, con 97% de homología con YICE (Kim y col., 2007). Se denomina rYli180, y también fue expresada con una cola C-terminal en *E. coli* BL21(DE3), por lo que el plegamiento de ambas proteínas debe de ser similar. De entre todos los ésteres de *p*-nitrofenilo comerciales, el mejor sustrato de esta enzima es el *p*-NPButirato, al igual que YICE. Sin embargo, rYli180 no presento actividad para sustratos de más de 12 carbonos. Realmente la diferencia es pequeña, ya que la actividad que muestra YICE para el *p*-NPMiristato (C_{14}) es prácticamente nula (0.5 $mM^{-1}.s^{-1}$). Por otro lado, la K_M para el *p*-NPButirato, 0.15 mM, fue algo menor que 0.5 mM, calculada para YICE. Los valores de k*cat* y k*cat*/K_M fueron 4.0 $mM^{-1}.s^{-1}$ y 26.7 $mM^{-1}.s^{-1}$, respectivamente. Por lo que YICE, con una eficiencia catalítica de 46.3 $mM^{-1}.s^{-1}$, resultó ser dos veces más activa que rYli180, frente a estos sustratos.

2.4.3. Parámetros cinéticos sobre sustratos con aplicación industrial

Con el fin de comprobar si esta enzima tenía aplicaciones industriales como biocatalizador, se estudió la actividad de YICE sobre el éster racémico del antiinflamatorio no esteroideo (NSAID) (R, S)-ketoprofeno metil ester, y sobre intermediarios en la síntesis de antibióticos β-lactámicos: 7-ACA y CPC.

Apenas se observó producto en las reacciones de YICE en presencia de 7-ACA y CPC, en las condiciones de reacción estándar (Figura 6.5) (ver Materiales y Métodos, apartado 10.1). Por lo que esta enzima no parece ser muy eficaz para la síntesis de estos compuestos desacetilados, sobre todo en comparación con la BpAXE, anteriormente inmovilizada. Los intermedios de la síntesis de cefalosporinas utilizados son compuestos muy grandes, formados prácticamente por un grupo alcohol unido a un pequeño acetato (Figura 1.15). Es por ello que, probablemente, YICE no posea una cavidad lo suficientemente abierta para permitir el acceso de toda la molécula, y que así, el acetato penetre en el centro activo.

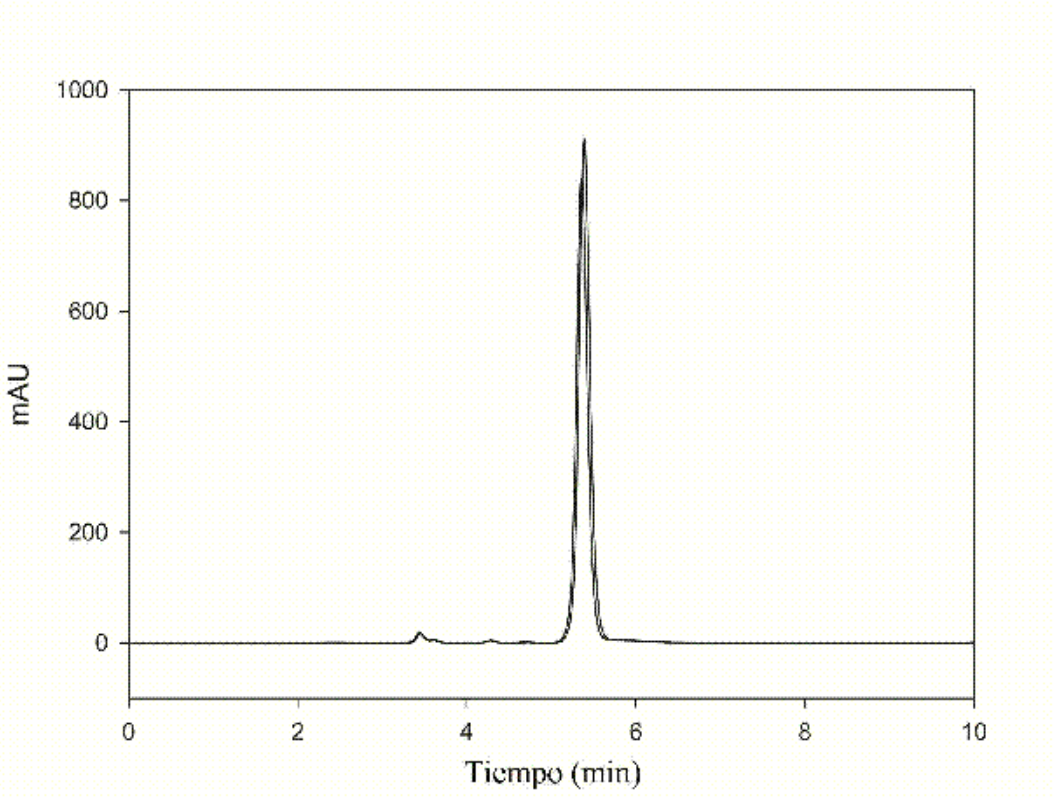


Figura 6.5: Cromatogramas superpuestos de autohidrólisis de 7-ACA en el medio de reacción tras 4 horas a 20 °C, y reacción YICE con 7-ACA en las mismas condiciones.

Sin embargo, tras 22 horas a 30 °C en agitación, se observó una notable actividad enantioespecífica sobre el R-ester del ketoprofeno metil ester (Figura 6.6), dando como resultado el R-ketoprofeno bastante puro. Para el 22% de conversión, el exceso enantiomérico fue igual a 91%, y el ratio enantiomérico (E) 29. YICE es por lo tanto muy enantioespecífica para el (R)-éster, y su ratio es superior a 10, por lo que podría tener aplicación industrial.

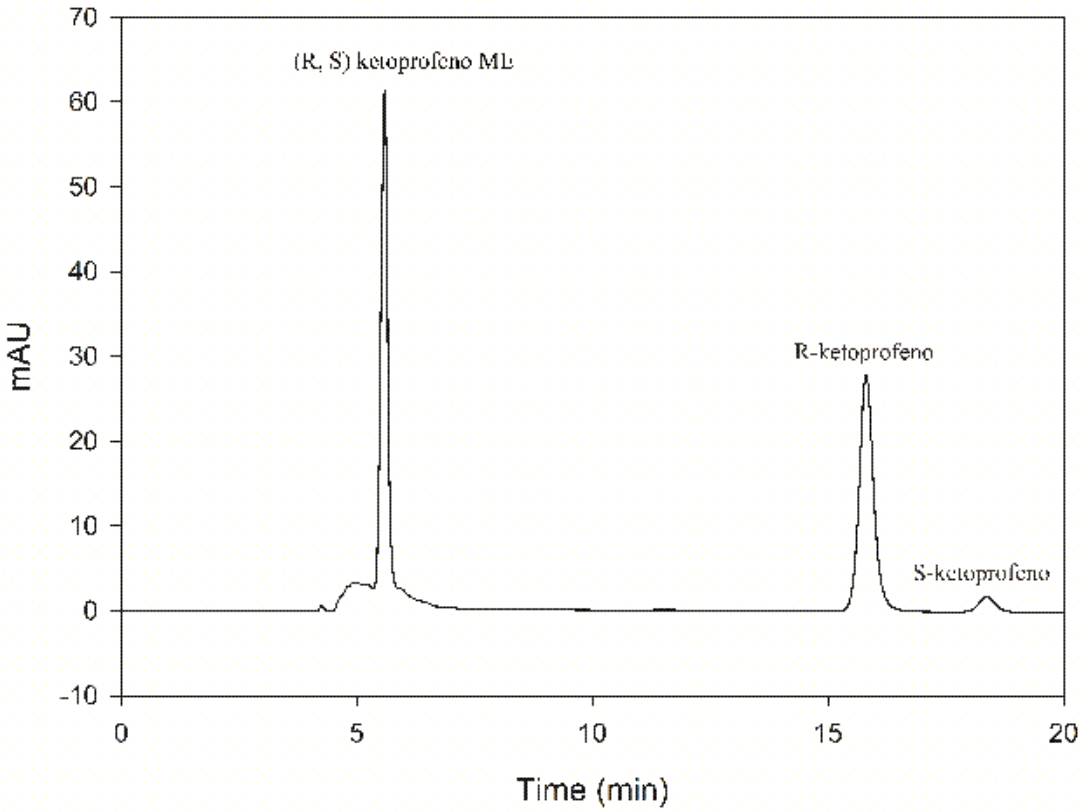


Figura 6.6: Cromatograma tras la incubación de YICE con 1.5 mM de (R, S)-ketoprofeno ME a 30 °C durante 22 horas en tampón fosfato 50 mM pH 7.5 y 0.5% Triton X-100 (p/v).

A continuación, se calculó la K_M para este sustrato en presencia de 0.5% Triton X-100, para permitir la formación de micelas de sustrato, ya que este es insoluble a la concentración de la reacción. Se calculó la K_M para el (R)-metil ester (Figura 6.7), enantiómero con mayor afinidad.

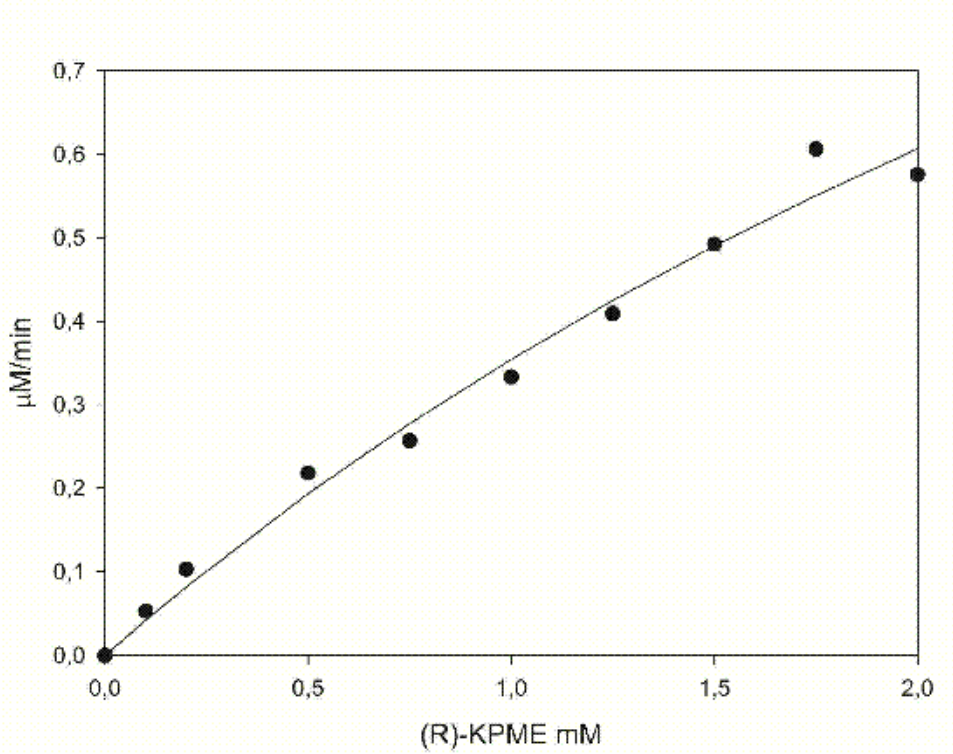


Figura 6.7: K_M de YICE para (R)-ketoprofeno metil ester. Se calcularon las velocidades tras 90 min de incubación a 30 °C en presencia de 0.5% Triton X-100 (p/v).

Como resultado, se obtuvo una K_M de 2.1 mM y una V_{max} de 4.9 µM/min/mg proteína. El valor de K_M de esta enzima fue del mismo orden que los de otras carboxilesterasas descritas en la bibliografía, y calculadas en presencia de Triton X-100. Así, la CE de *Pseudomonas fluore*scens (Choi y col., 2003) mostró una K_M de 3.3 mM, mientras que en una carboxilesterasa de una librería metagenómica fue igual a 16.4 mM (Kim y col., 2006). Sin embargo, estas esterasas eran activas sobre el S-ester con mayor afinidad que sobre el R-, a diferencia de YICE. El ácido S- es 100 veces más activo que el R-, y por lo tanto más comercial, sin embargo, también se han encontrado aplicaciones al R-ketoprofeno.

Heefner y col. (1994) demostraron que este enantiómero, menos eficaz que el (S)-, poseía características antipiréticas y analgésicas. De hecho, el (R)-ketoprofeno ha sido usado en numerosos estudios clínicos, entre ellos estudios en pacientes con dolor dental postoperatorio, presentando una buena actividad analgésica y antiinflamatoria (Urquhart, 1994; Cooper, 1998). Tanto es así, que el enantiómero (R)-, libre de la forma (S)-, se añade comúnmente a pastas dentífricas para aliviar el dolor dental (Hutt y Catwell, 1984). Por lo que, lejos de tratarse de una enzima ineficaz desde el punto de vista industrial, puede ser aplicada a la resolución enzimática del ácido (R)-ketoprofeno, interesante como ya hemos comentado para la industria de pastas dentales. Cuando se resuelve enzimáticamente el (S)-ketoprofeno, el (R)-ester sobrante debe volver a racemizarse mediante procesos

químicos para de nuevo repetir el proceso de hidrólisis estereoespecífica por el S-ester, para así aprovechar todo el sustrato posible. Sin embargo, en este caso, la hidrólisis del isómero (R)-ester por separado, puede ser aún más rentable que la suma de los dos costosos procesos anteriores, ya que ambos ácidos tendrían utilidad por separado.

2.4.4. Estabilidad enzimática

Se estudió la estabilidad de YICE tras incubar la enzima a 30-35 °C, y a temperaturas mayores. La enzima resultó ser muy estable a temperaturas mesófilas, temperaturas fisiológicas de la levadura. De hecho, fue estable durante 16 horas a 35 °C. Sin embargo, al aumentar la temperatura de incubación se inactivó rápidamente, perdiéndose prácticamente toda la actividad tras 10 min a 55 °C o tras 2 min a 60 °C (Figura 6.8).

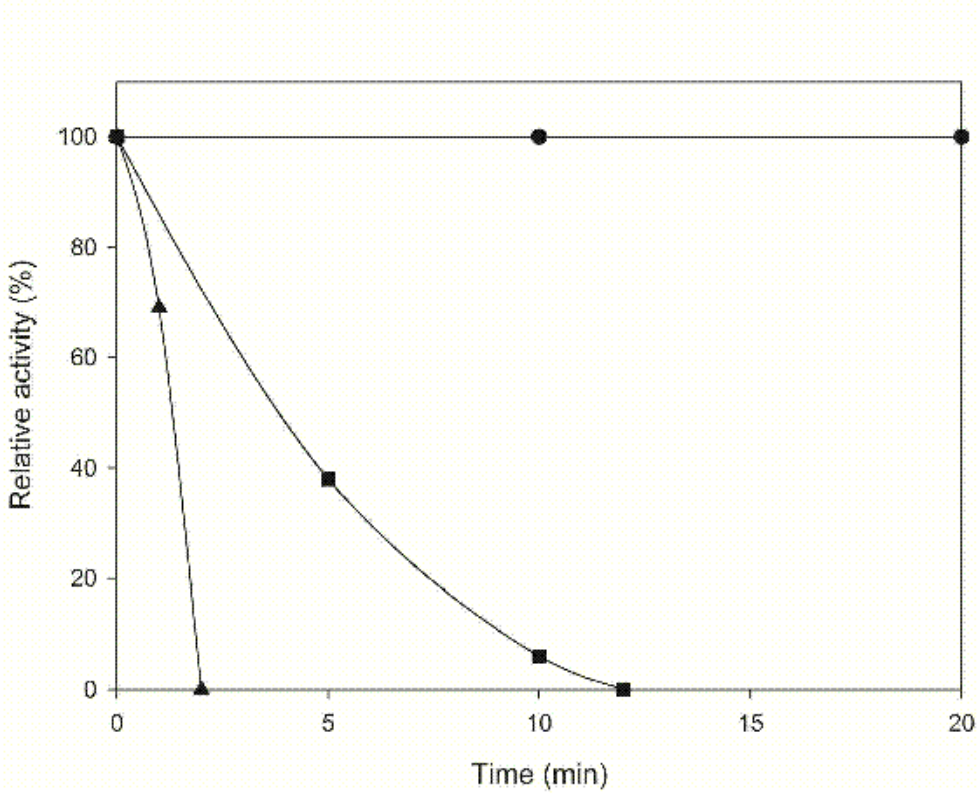


Figura 6.8: Estabilidad de YICE a pH 7.5. Se incubó la enzima durante diferentes periodos de tiempo a 30 °C (●), 55 °C (■), 60 °C (▲). Tras esto, se midió la actividad residual en el medio de reacción estándar a pH 7.5, 25 °C y con *p*-NPButirato.

El pH óptimo de YICE está entre pH 7.5 y pH 8.0 (Figura 6.9), observándose un acusado descenso de la actividad relativa a pHs ácidos y alcalinos. Por otra parte, la enzima no presentó buenas propiedades de estabilidad, tras 24 h de incubación a diferentes pHs a 30 °C, sólo se observó el 67% de actividad a pH 7.5, por lo que ni

siquiera pHs neutros son capaces de mantener la estructura tridimensional de la proteína.

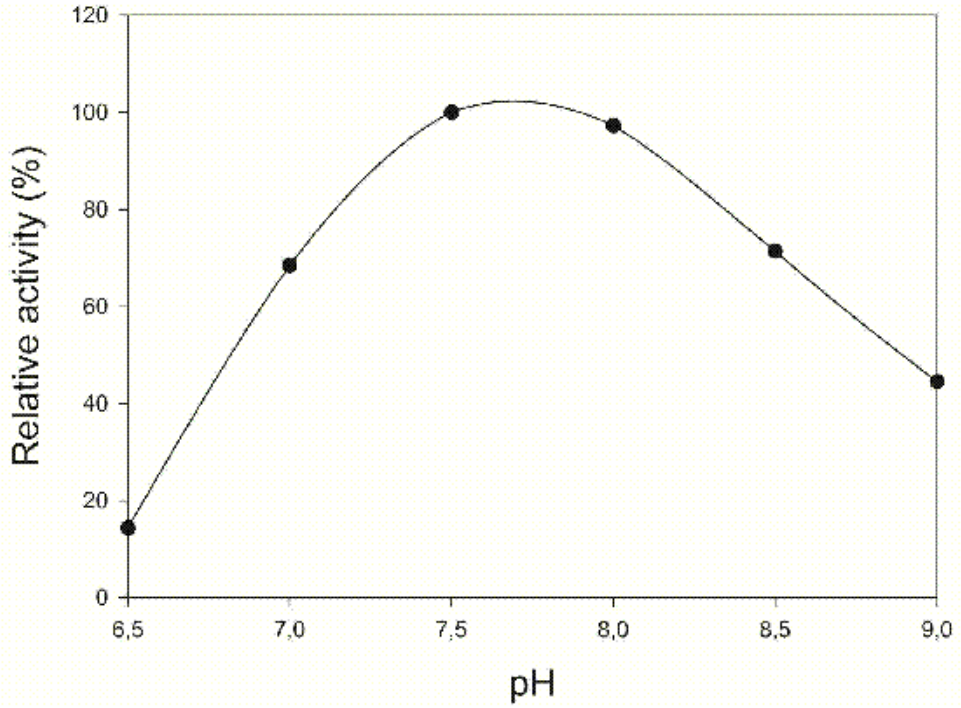


Figura 6.9: pH óptimo de YICE. Se midió actividad residual en los siguientes tampones (50 mM): fosfato potásico (pH 6.5-7.5), Tris-HCl (pH 8.0-9.0) en el medio de reacción estándar con *p*-NPButirato, a 25 °C.

2.5. Análisis *in sillico* de YICE

El modelado de YICE se realizó mediante el programa Swissmodel (http://swissmodel.expasy.org/), usando la *p*-nitrobenzilesterasa cristalizada de *B. subtilis* (código PDB: 1C7J) (Spiller y col., 1999), a pesar de su baja homología con YICE (18%). Ambas enzimas han demostrado ser monoméricas, 1C7J tiene una masa molecular de 54 kDa, y elimina eficazmente el grupo alcohol *p*-nitrobenzilo (*p*NB-OH) de antibióticos β-lactámicos esterificados como la cefalexina-*p*NB (cefalosporina de primera generación) o el loracarbef-*p*NB (cefalosporina de cuarta generación) (Chen y col., 1995; Moore y Arnold, 1996).

El modelado tridimensional de YICE presenta la típica arquitectura de las α/β hidrolasas, el sándwich α/β/α (Figura 6.10). Este se compone de 9 hebras-β, con la segunda antiparalela, y rodeadas a ambos lados por 6+6 hélices α. La Figura 6.1 simula la estructura secundaria de la secuencia de aminoácidos, y divide la primera hebra β del modelado en 3 hebras β más pequeñas, por eso suma 11 hebras β totales. La lámina β central se curva desde el principio al final, formando un semi-

círculo (Figura 6.10 A). En este modelado, se pudo observar la triada del centro catalítico compuesta por los aminoácidos Ser189-His387-Glu302 (Figura 6.1). Estos tres residuos limitan una cavidad en la estructura (Figura 6.10 B), donde se introducirían los diferentes sustratos. La Ser189 e His387 de la cavidad, están a tan sólo 3.5 Å de distancia el uno del otro, la Ser se separa hasta 7.4 Å del Glu302, que a su vez se distancia de 3.9 Å de la histidina (Figura 6.11 A). La cavidad se compone de cadenas alifáticas de aminoácidos hidrofóbicos como Ala388, Leu391, Gly104, Gly105, Val109, Gly110, e Iso112, que sirven para estabilizar el ácido en su interior y aportar estabilidad durante la hidrólisis (Figura 6.11 B). También se observan residuos apolares sin esa cadena alifática, como la Met394. Algunos aminoácidos hidrofóbicos de YICE, como Leu391 y Ala388 se conservan en todas las carboxilesterasas del alineamiento (Figura 6.1), otros sin embargo, han sido reemplazados en YICE (Met394, Val109, o Gly110), y sustituidos siempre por otros residuos hidrofóbicos de características similares (Leu, Leu y Thr, respectivamente). Se observa también, una treonina (Thr117) al final de la cavidad, otro aminoácido hidrofóbico, pero no conservado en el resto de enzimas. Este residuo también posee un hidroxilo terminal, por lo que quizá podría estar relacionado con la estabilidad del sustrato en el interior de la garganta. En resumen, en todos los casos se conserva una sucesión común, rica en aminoácidos apolares de cadenas alifáticas (en los bordes de la garganta) y aromáticas (al final de la garganta), que deben formar una cavidad hidrofóbica (Figura 6.11).

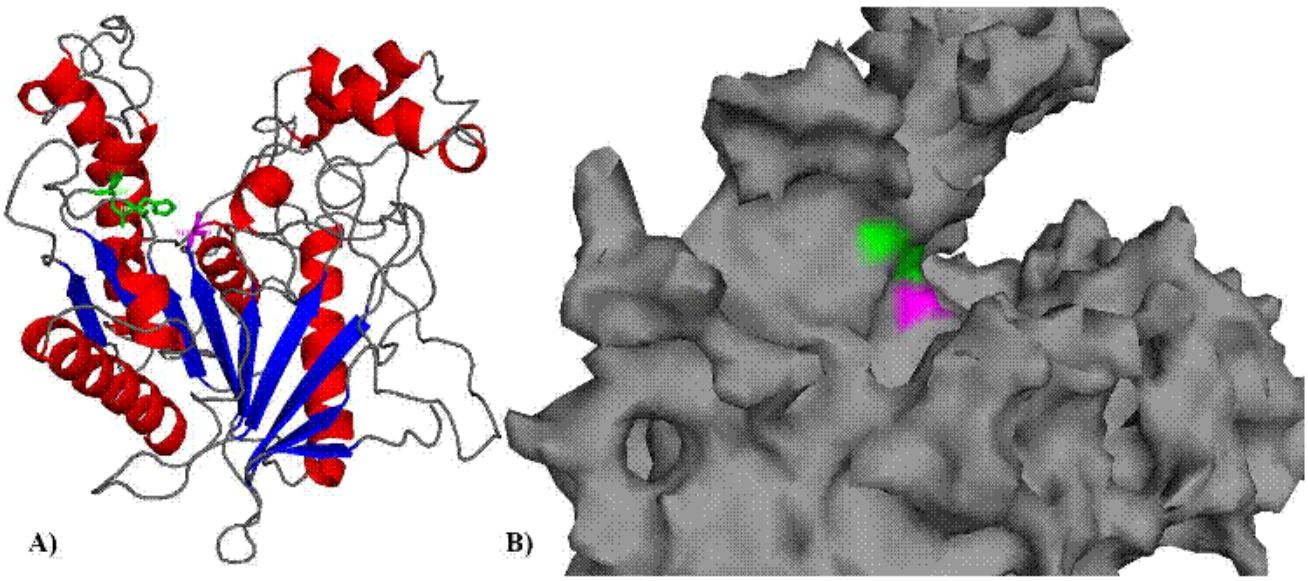


Figura 6.10: A) Modelado de la estructura tridimensional de YICE, se observa el sándwich α/β/α. B) Ampliación del centro activo de la proteína en la superficie de la estructura, con los aminoácidos limitando una cavidad hidrofóbica. Ser189 en violeta, His387 y Glu302 en verde. Figuras realizadas con el programa PyMol (http://pymol.sourceforge.net/) (DeLano, 2002).

A su vez, el Trp395 de YICE es reemplazado en el resto de esterasas por otro residuo con cadena aromática pero más corta, la Phe. Ello, quizá produzca diferencias en la especificidad de sustrato de las enzimas, en esta enzima el grupo indol del Trp395 se encuentra en la zona final de la cavidad, limitando su profundidad a 13.6 Å, frente a los 20 Å de la cavidad de *p*-nitrobenzyl esterasa de *B. subtilis* (1C7J) (Spiller y col., 1999).

El aminoácido aromático Trp395 deja una distancia suficiente para la entrada de sustratos de tamaño medio, como el ketoprofeno de 9 Å, sin llegar a ser tan larga como para albergar ácidos de cadena larga como el palmitato (C_{16} y de 16 Å de longitud).

A continuación, se realizó un *docking* con la página http://www.dockingserver.com/web/docking/ (Bikadi y Hazai, 2009), entre el modelado de YICE y el KPME racémico, para comprobar estructuralmente esa estereospecificidad, y si la cavidad hidrofóbica de la proteína era lo suficientemente grande como alojar los ácidos en su interior (Figura 6.11). Para ello se diseñaron por separado ambos enantiómeros y se fueron trasladando y rotando por todo el centro activo, generando "poses". Cada una de estas poses se evalúa la energía de unión del complejo proteína-ligando que se forma. Cuanto menor es esta energía, tanto mejor es la interacción, y por tanto más estable será el complejo formado (Kitchen y col., 2004).

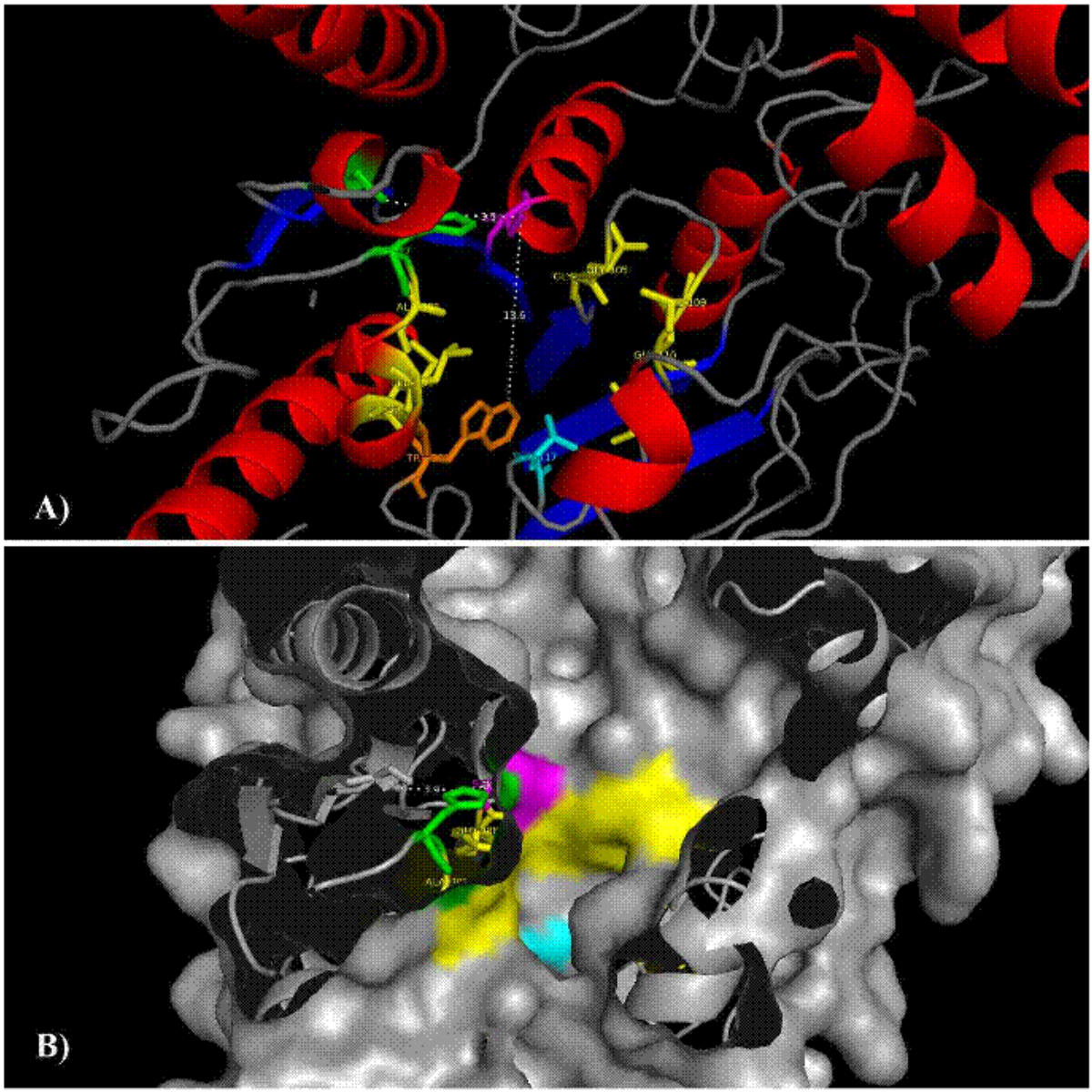


Figura 6.11: A) Ampliación del centro activo de YICE, distancias y composición de la cavidad hidrofóbica. B) Ampliación de la superficie de la cavidad hidrofóbica Los residuos amarillos y naranjas representan aminoácidos alifáticos y aromáticos, respectivamente. La Ser de la triada se representa en violeta, junto con el Glu e His en verde. Por último, la Thr se representa en azul claro. Figura realizada con el programa PyMol (http://pymol.sourceforge.net/) (DeLano, 2002).

La Ser189 (serina activa) se encontraba definida por el codo nucleofílico (GESSG), en un extremo de la cavidad hidrofóbica. Para que se realice la hidrólisis, el ácido del compuesto se introduce en el interior de la cavidad ya comentada, sin embargo las posibles poses para el S-éster dejaban el carbonilo del sustrato muy alejado de la serina activa (Figura 6.11 A), y la energía de unión obtenida fue de -5.10 kcal/mol. Mientras que cuando se superponía el R-éster, se conseguía introducir correctamente el ácido en la cavidad, aproximando notablemente el carbonilo del sustrato al hidroxilo de la serina activa (Figura 6.11 B). Además la

energía de unión de esta interacción fue aún menor que la anterior, -6.10 kcal/mol, lo cual permitiría la especificidad de esta enzima con la disposición de los isómeros en el centro activo.

De manera similar se realizó un *docking* entre el 7ACA y el modelado de YICE. Así, se comprobó que para que el acetato estuviera cercano a la serina activa, el 7-dACA debía situarse en una posición más externa y por lo tanto menos estable, ya que no se producían interacciones con cadenas laterales de residuos, como ocurría en el caso del (R, S) ketoprofeno metil ester. Esto explica la baja energía del complejo obtenido, tan sólo -3.02 kcal/mol. Así pues, el sustrato no puede estabilizarse en la cavidad para ser accesible al centro activo, por lo que el 7ACA no parecería un buen sustrato desde el punto de vista estructural.

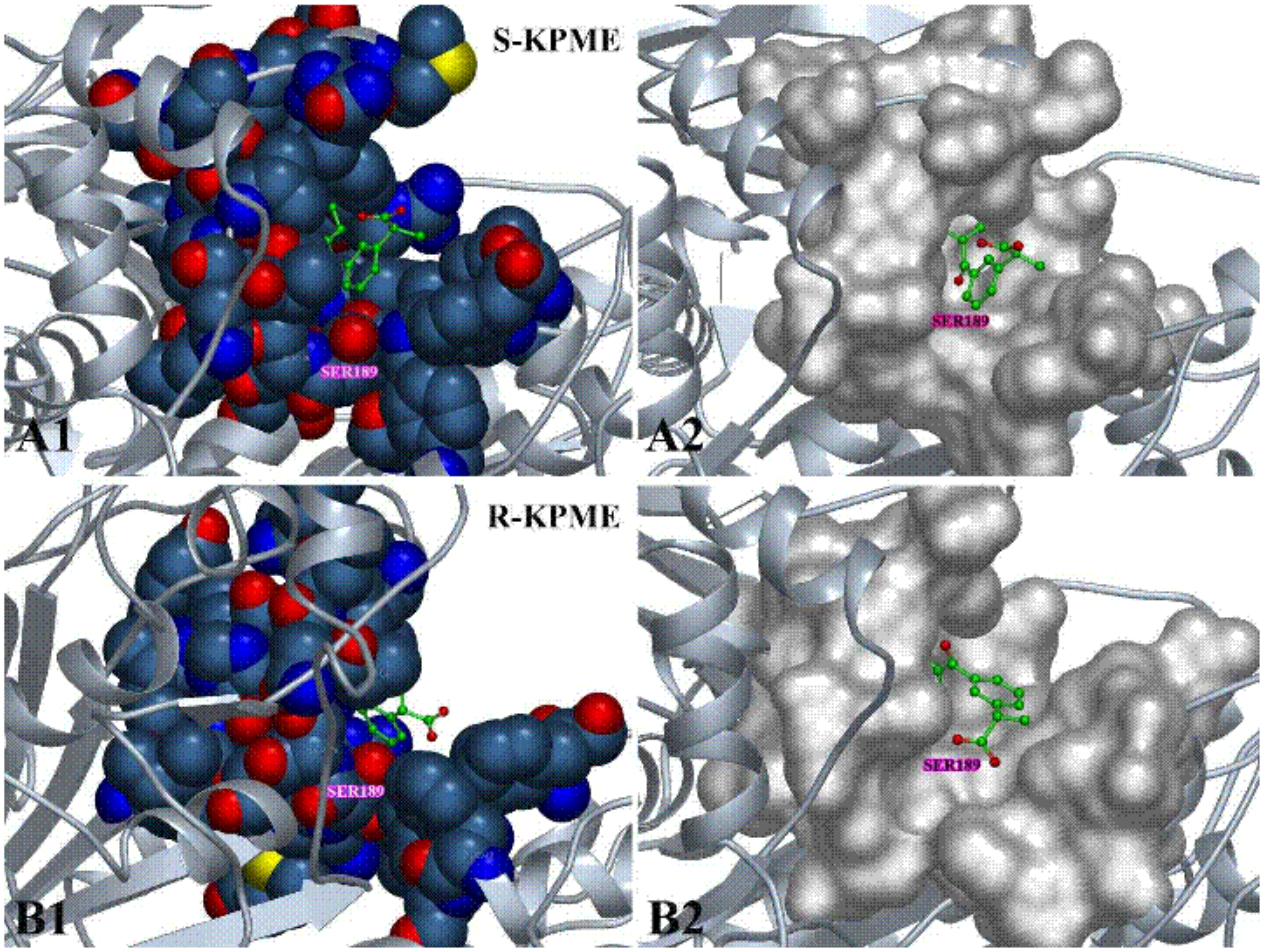


Figura 6.12: *Docking* de los dos enantiómeros del ketoprofeno metil ester en el modelado de YICE. A) Con S-Ketoprofen metil ester. A1, estructura de la proteína en forma de esferas. A2, superficie de YICE. B) Con R-Ketoprofen metil ester. B1, estructura de la proteína en forma de esferas. B2, superficie de YICE. Se muestra la localización de la Ser189. Figura realizada con la página Dockingserver http://www.dockingserver.com/web/docking/ (Bikadi y Hazai, 2009).

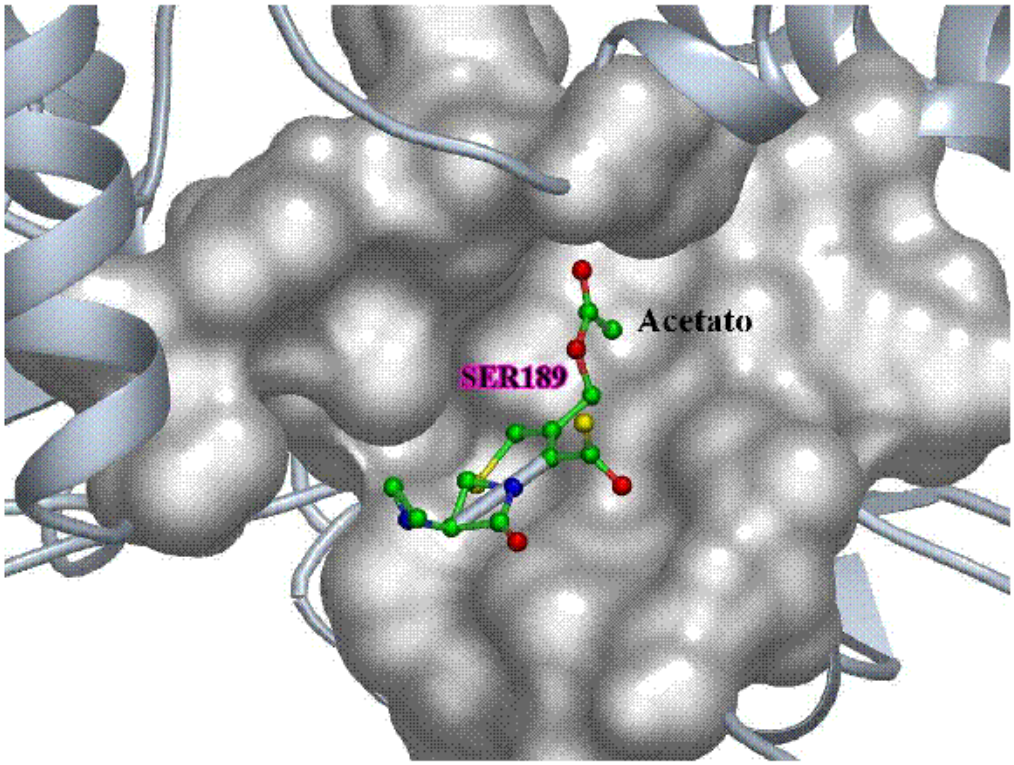


Figura 6.13: Docking de una molécula de 7ACA sobre el modelado de YICE. Se muestra la localización de la Ser189. Figura realizada con la página Dockingserver http://www.dockingserver.com/web/docking/ (Bikadi y Hazai, 2009).

3. Conclusiones

Este estudio supone la caracterización de una nueva carboxilesterasa (CE) de un organismo eucariota con actividad frente a un éster racémico del ketoprofeno. El gen que codifica para una hipotética CE se expresó en diferentes sistemas de expresión, con el fin de obtener el máximo rendimiento de actividad posible. Contrariamente a lo esperado, el sistema de expresión eucariótico, *Pichia pastoris*, no fue el más adecuado, al no observarse proteína expresada en el medio extracelular, tan sólo se obtuvo proteína intracelular con baja actividad específica, debido probablemente a la larga cola N-terminal del α-factor, que interfería en el correcto plegamiento de la proteína y/o en su solubilidad. Se expresó entonces, el gen en *E. coli*, para ello se utilizaron dos vectores de expresión diferentes hasta conseguir solubilizar parte de la proteína, expresada inicialmente como cuerpos de inclusión.

Se caracterizó la enzima purificada con esteres de *p*-nitrofenilo, obteniéndose valores de eficiencia catalítica (K_{cat}/K_M) elevados para su mejor sustrato, el *p*-NPButirato, a pesar de haber expresado la enzima en un organismo procariótico, y sin las ya comentadas modificaciones postraduccionales propias de organismos eucarióticos.

Finalmente, esta enzima presentó una elevada actividad sobre el (R)-ester del ketoprofeno metil ester (ee_p=91%). Inicialmente, el hecho de que ataque al (R)-ester en vez de la (S)-ester puede parecer poco interesante ya que el (S)-ketoprofeno es hasta 100 veces más activo que el (R)- (Cabre y col., 1998). Sin embargo, existen otras aplicaciones para este enantiómero ópticamente puro. Hasta hoy, sólo se han encontrado dos sistemas enzimáticos de producción del enantiómero (R)-ácido, uno corresponde a una esterasa de levadura, *Citeromyces matriensis* CGMCC 0573 no secuenciada (Gong y col., 2002), y el otro a una esterasa de *B. stearothermophilus* JY144 (Kim y col., 2002), con sólo 13% de homología con YICE.

Por otra parte, el modelado de YICE permite observar de nuevo la estructura típica de las α/β hidrolasas, que se organiza formando una cavidad rodeada de aminoácidos hidrofóbicos ricos en cadenas alifáticas y aromáticas (Figura 6.11) dónde se localizará el ácido a escindir del alcohol (en el caso del ketoprofeno metil ester). Se comprobó mediante *docking*, que efectivamente este isómero (R)- tiene una energía de unión menor que el (S)-, explicando así los resultados experimentales obtenidos en la hidrólisis del éster racémico.

Capítulo VII

La caracterización de una carboxilesterasa termoestable de *Geobacillus kaustophilus* HTA426, indica la existencia de una nueva familia de carboxilesterasas.

1. Introducción

Las esterasas, como su nombre indica, catalizan la hidrólisis de enlaces éster. La mayoría de las carboxilesterasas (CEs, EC 3.1.1.1) se caracterizan por su alta estereoespecificidad, no necesitan cofactores, y son muy activas en presencia de disolventes orgánicos. Además, la disposición de su centro activo les permite atacar una amplia variedad de compuestos con diferentes afinidades (Bencharit y col., 2006). Por ello, el uso de estas enzimas es una opción muy interesante en aplicaciones industriales, resolución de fármacos esteroespecíficos o de agentes antimicrobianos como intermediarios β-lactámicos (Moher y col., 1989; Borneman y col., 1992; Margolin y col, 1993).

Debido al creciente interés que han provocado, se han identificado carboxilesterasas en una amplia variedad de microorganismos, y muchas de ellas ya han sido clonadas como la CE de *Bacillus stearothermophilus* (Kim y col., 2002) o la CE de *Pseudomonas sp.* S34 (Kim y col., 2003). En los últimos años, muchos microorganismos termófilos han sido aislados y sus genomas secuenciados, estos han demostrado ser una fuente inagotable de nuevas enzimas, incluyendo hipotéticas lipasas y esterasas (Atomi, 2005; Egorova y Antranikian, 2005; Unsworth y col., 2007). La clonación de varios de estos genes y su caracterización, junto con la resolución de algunas estructuras tridimensionales, ha permitido la clasificación de estas enzimas en diferentes familias, todas dentro de la superfamilia de las α/β hidrolasas (Cycler y col., 1994; Arpigny y Jaeger, 1999).

Por otro lado, esterasas de organismos termófilos como *Geobacillus kaustophilus* HTA426 podrían ser aún más útiles desde el punto de vista biotecnológico, debido a su alta termoestabilidad (Gomes y Steiner, 2004). Las aplicaciones tecnológicas de CEs y lipasas han sido recientemente revisadas por Jaeger y col. (1994; 1998; 1999), Bornscheuer (2002a) y Jaeger y Eggert (2002).

En la búsqueda de nuevas CEs, se seleccionó el gen GK3045 de *Geobacillus kaustophilus* HTA426 que codificaba para una hipotética CE. Este microorganismo es especialmente interesante ya que crece a temperaturas de hasta 74 °C (óptimamente a 60 °C), por lo que sus enzimas deberían presentar características termoestables frente a otras mesófilas (Atomi y Imanaka, 2004). Este microorganismo fue aislado a partir de sedimentos de la Fosa de las Marianas en el océano Pacífico (a una profundidad de 10897 m) (Takami y col., 1997). El genoma de este bacilo termófilo fue secuenciado por el grupo del Prof. Takami (Japón), se compone de un cromosoma de 3.54 Mb y un plásmido de 47.9 kb (Takami y col., 2004a; 2004b).

En el presente capítulo se describe la caracterización de esta enzima termoestable con el fin de determinar su especificidad frente intermedios avanzados (sintones) de cefalosporinas semisintéticas y ésteres de

antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs). También se realizó un modelado estructural en base a una proteína homóloga cristalizada, y se comparó con otras carboxilesterasas de estructura conocida.

2. Resultados

2.1. Secuencia de aminoácidos

El genoma secuenciado de *Geobacillus kaustophilus* HTA426 presentaba un ORF de elevada homología con CEs, así se seleccionó el gen GK3045, de 741 pb, que codificaba para una hipotética proteína de 246 aminoácidos.

La secuencia de nucleótidos del gen GK3045 (GenID 3185723) permitió deducir la secuencia de aminoácidos de la proteína. Esta secuencia presentaba elevada homología con CEs de otras especies de *Geobacillus* y *Bacillus*, entre ellas un 99% de similitud con la EstA de *Geobacillus thermoleovorans* YN (DQ 288886; GI 82791235, GtEstA) (Figura 7.1). Esta misma enzima mostró a su vez elevada identidad con la Est30 de *G. stearothermophilus* (código PDB: 1TQH; GsEst30, ATCC12980) y con la Est30 del termófilo *G. thermodenitrificans* (YP_001127089, GtEst30), con 97 y 96%, respectivamente. Todos estos microorganismos son extremófilos, ya que el género *Geobacillus* crece a elevadas temperaturas.

Mediante el programa CLUSTAL-W se alinearon estas cuatro secuencias proteicas de elevada similitud con el fin de conocer la estructura secundaria de GkCE y, por homología determinar los aminoácidos del centro activo mediante el uso del programa ESPript (Gouet y col., 1999). Así pues, se dedujo que GkCE posee la típica triada catalítica de esterasas y lipasas: Ser-Asp-His. La Ser catalítica (Ser93) se encuentra inmersa en la secuencia consenso Gly-X-Ser-X-Gly formando el codo nucleofílico o "*nucleophilic elbow*" (Figura 7.1), y cerca de los otros dos aminoácidos de la triada catalítica Asp192 e His222.

A continuación, los aminoácidos que parecían pertenecer a este centro activo se mutaron de forma dirigida por otros aminoácidos que no produjeran cambios bruscos en la estructura de la proteína. Los mutantes Ser93Gly, Asp192Val y His222Leu se expresaron conforme a lo explicado en Materiales y Métodos (apartado 5.3.2), para verificar la importancia catalítica de esos aminoácidos. No se observó actividad en ninguno de los tres mutantes Ser93Gly, Asp192Val e His222Leu con ésteres de *p*-NP (*p*-NPA, *p*-NPButirato y *p*-NPCaprilato). Debido a estos ensayos y, de nuevo, por homología con 1TQH (Liu y col., 2004), estos residuos debían ser, efectivamente, esenciales en la catálisis.

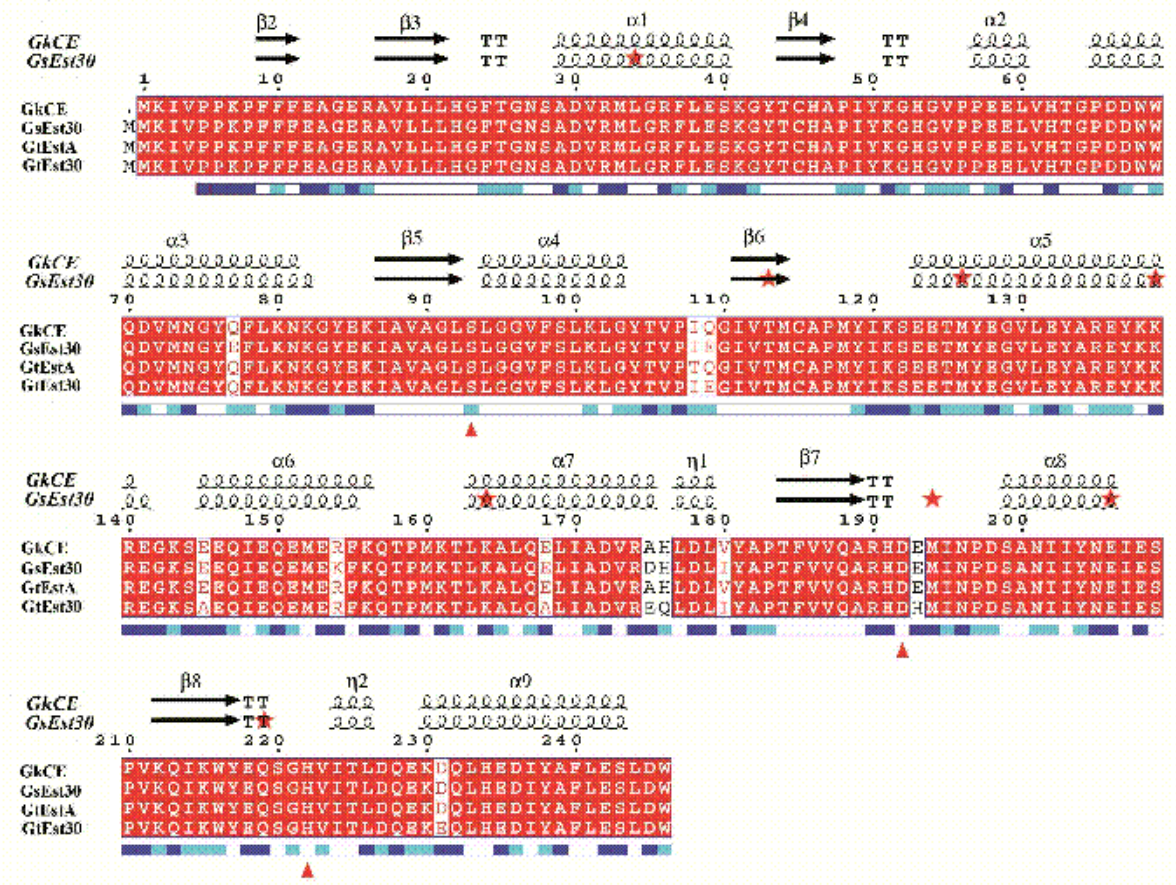


Figura 7.1: Alineamiento de múltiples secuencias de CE homólogas. Las secuencias se alinearon mediante el programa CLUSTAL-W (Thompson y col., 1994). La estructura secundaria de GkCE se obtuvo a partir de la página SWISSPROT databank. Esta figura se realizó con el programa ESPript (Gouet y col., 1999). CE de *G. kaustophilus* HTA426 (GkCE), mostró un 97% identidad con GsEst30 de *G. stearothermophilus*, 99% con EstA de *G. thermoleovorans* YN (GtEstA) y 96% con GtEst30 de *G. thermodenitrificans*. Los residuos más conservados se sobreiluminan en rojo. Los símbolos sobre estos bloques muestran la estructura secundaria, dónde los muelles representan las hélices α y las flechas, las hebras β. Los triángulos representan los aminoácidos del centro activo, K212 es la lisina dónde se produce el corte proteolítico. Los residuos que forman la bolsa hidrofóbica de la proteína se marcan con estrellas rojas. El gradiente mostrado debajo de esos bloques de aminoácidos indica la accesibilidad relativa de los residuos, siendo el azul oscuro el más exterior.

2.2. Clonación del gen, expresión y purificación enzimática

A partir de genómico del microorganismo *Geobacillus kaustophilus* HTA426, cedido por el Prof. Takami (Japón), se clonó el gen GK3045 por primera vez en el sistema de expresión pET28a conforme a lo descrito en Materiales y Métodos (apartado 5.3.1.). Este vector se introdujo mediante electroporación en *Escherichia coli* Rosetta (DE3) para la sobreexpresión de una proteína fusión, este vector añade

una cola de 36 aminoácidos en el extremo N-terminal de la proteína expresada, entre los que se encuentra una cola de 6 histidinas.

Seguidamente, se seleccionó un clon con el vector pET28a-GkCE, para verificar la presencia de la secuencia génica original (sin mutaciones) mediante secuenciación. Este clon se cultivó en 1 L de TB suplementado con kanamicina-cloranfenicol hasta DO_{600}= 5 a 37 °C, en este punto se añadió 0.5 mM de IPTG para su inducción a 30 °C durante 6 horas. Se obtuvo un alto nivel de expresión de proteína en forma totalmente soluble (Figura 7.2, calle 2), que según el análisis bioinformático de Image Quant TL (Amershan Biosciences) representaba el 28% del total de las proteínas de *E. coli*, tal y como se confirmó posteriormente en la tabla de purificación.

El extracto enzimático fue purificado mediante un proceso de dos etapas, ultrafiltración tangencial en una columna de 100 kDa seguida de cromatografía de afinidad. Las histidinas de la cola N-terminal se unen al Ni^{2+} de la columna HisTrap (Crowe y col., 1994), mediante un gradiente de imidazol se rompe esa unión, eluyendo entonces la proteína más pura. Tras estas etapas, se consiguió purificar la proteína con un rendimiento del 65% (Tabla 7.1). El factor de purificación fue igual a 3.4, lo cual confirmó que la proteína expresaba representaba alrededor del 30% de las proteínas totales de *E. coli*. En la fracción recuperada tras la HisTrap, se obtuvo una actividad específica de 19.1 UE/mg para la hidrólisis del *p*-NPCaprilato mediante el método de medida estándar.

Tabla 7.1: Purificación de GkCE[§] recombinante expresada en *E. coli* Rosetta (DE3) con el vector pET28a6His-GkCE.

Paso de purificación	Volumen (mL)	Concentración de proteína (mg)	Actividad total (UE)	Actividad específica (UE/mg)[¶]	Factor de purificación	Rendimiento (%)
Extracto crudo	505	328	1892	5.8	1.00	100
Ultrafiltración tangencial	94	108	1510	13.9	2.5	79.8
Cromatografía de afinidad (HisTrap)	437	64	1220	19.1	3.4	65.5

[§] Purificación de un litro de cultivo bacteriano (19 g peso húmedo).

[¶] Actividad específica determinada mediante el método de medida estándar con 0.8 mM *p*-NPCaprilato a 25 °C y pH 8.0.

En el gel SDS-PAGE (Figura 7.2) se observaron dos bandas sobreexpresadas (30 kDa y 27 kDa) tanto en el extracto crudo (Figura 7.2, calle 2), como en las fracciones recolectadas tras la HisTrap (calle 5). Ambas bandas aparecían también en el gel de expresión de la proteína homóloga GtEstA de *G. themoleovorans* YN (Soliman y col., 2007), pero sin aportar explicación alguna.

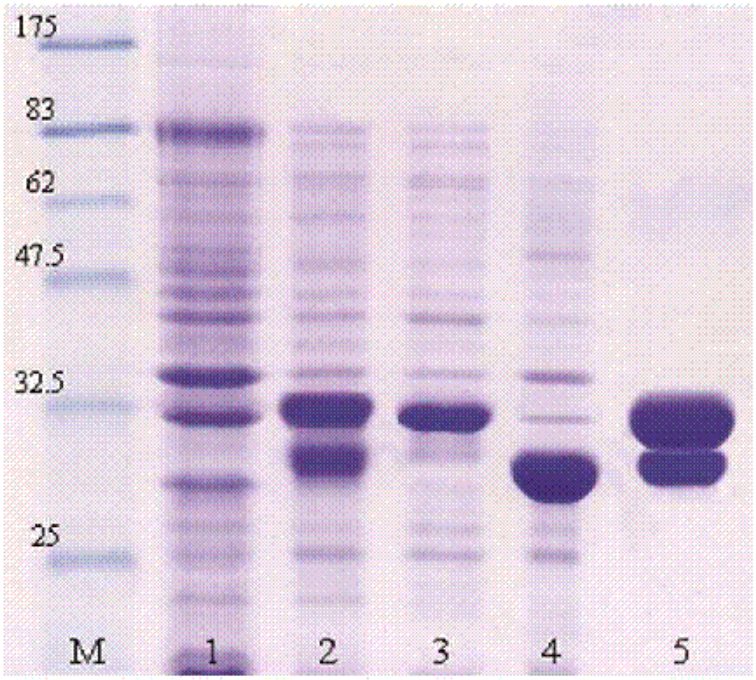


Figura 7.2: SDS-PAGE del producto de expresión del gen GK3045 en *E. coli* Rosetta (DE3) tras 6 h de inducción a 30 °C. Cada calle contiene 20 µg de proteína. M, marcadores de masa molecular comerciales (P7708S; New England Biolabs). Calle 1, control de inducción con Rosetta (DE3) transformada con pET28a pero sin el gen. Calle 2, extracto crudo de Rosetta con pET28a-GkCE inducido 6 h tras ultrafiltración tangencial. Calle 3, expresión de la proteína mutada con mutagénesis dirigida (K212R), sin corte proteolítico. Calle 4, expresión de la proteína mutada con mutagéneis dirigida (K212Stop), que rinde una proteína más corta pero inactiva. Calle 5, fracción recolectada tras la purificación del extracto crudo con HisTrap FF. En esta última calle se observa una proteína de alrededor 30 kDa y otra de unos 27 kDa, esta última sería el resultado de la anterior tras un corte proteolítico.

Se confirmaron las masas moleculares de ambas bandas mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas (descrito en Materiales y Métodos, apartado 7.2), 32,045 Da y 27,754 Da, respectivamente (Figura 7.3). Esta técnica permite determinar las masas moleculares de las proteínas hasta con 1 Da de precisión (Pearcy y col., 2001; Williams y col., 2001). Además, mediante filtración en gel (exclusión molecular), se determinó la naturaleza monómerica de ambas proteínas.

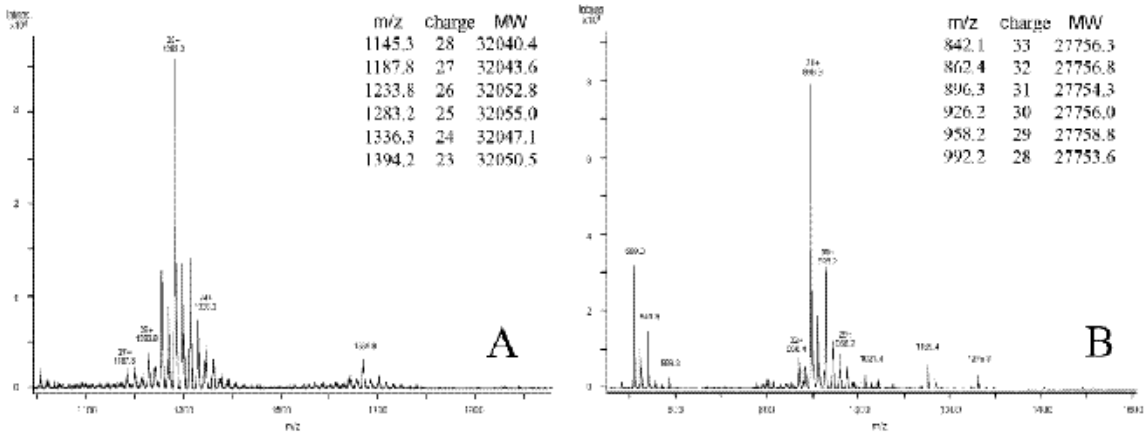


Figura 7.3: Espectrometría de masas de cada una de las proteínas por separado (dos bandas). A) Cromatograma de la banda de mayor tamaño (32 kDa). B) Cromatograma de la banda de menor tamaño (27 kDa). A cada muestra ionizada se le asigna una masa molecular en función de la carga/masa (m/z) con un software de deconvolución (*Data analysis* LC/MSD *Ion Trap*, versión 3.2).

Estas bandas no se pudieron separar mediante cromatografía de afinidad (Histrap) (Figura 7.4) por lo que se dedujo que ambas proteínas poseían la cola de histidinas en el N-terminal, pudiendo ser la segunda, y más pequeña el resultado de un corte proteolítico en el extremo C-terminal.

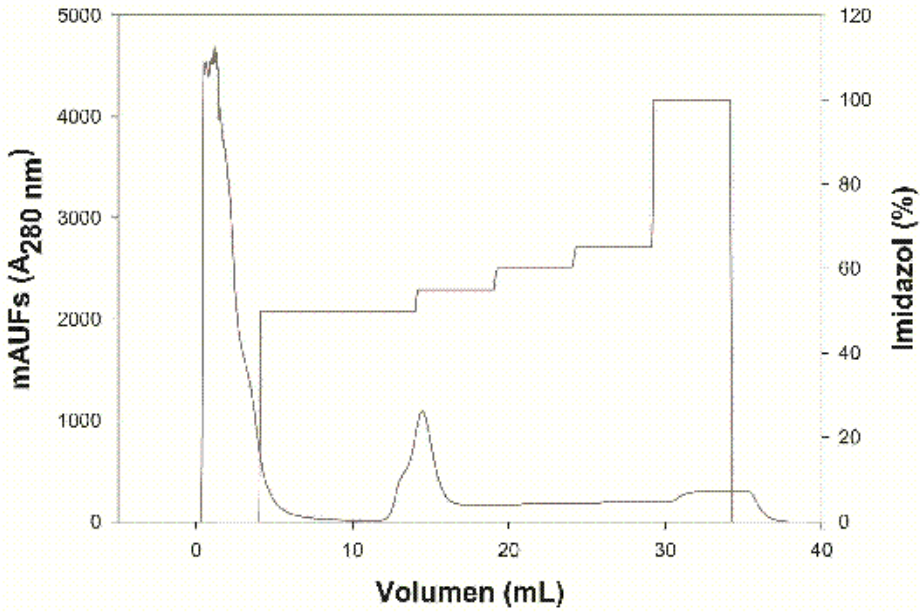


Figura 7.4: Cromatograma de la purificación de GkCE recombinante tras pasar por una columna de HisTrap FF. Sólo una pequeña proporción de la proteína pinchada se pega a la columna, entre la proteína eluída (volumen de elución: 15 mL), se observan dos picos prácticamente juntos e inseparables mediante esta técnica. Se trata de las proteínas de 32 kDa y 27 kDa, ambas poseen las colas de histidinas (ver Materiales y Métodos, apartado 6.3).

Al restar la masa molecular de la proteína de menor masa (27,754 Da) a la de mayor (32,045 Da), se obtuvo la masa molecular del extremo C-terminal eliminado del resto de la proteína durante el supuesto corte proteolítico (4,291 Da). La técnica utilizada para la determinación de las masas moleculares tiene un 1 Da de error, por lo que se dedujo que el corte endopeptídico se producía exactamente entre los aminoácidos K212-Q213, al comienzo de la hebra β8, eliminando así la secuencia QIKWYEQSGHVITLDQEKDQLHEDIYAFLESLDW de 4,294 Da del extremo C-terminal de la proteína. Este supuesto punto de corte (K212-Q213), se observó también en la secuencia de la proteína GtEstA de *G. thermoleovorans* YN (Figura 7.1).

Se realizó entonces un análisis proteolítico con el programa informático, CLC Protein Workbench versión 3.0.2 (www.clcbio.com), en busca de proteasas de *E. coli* capaces de cortar en ese punto. Sin embargo, aún no se ha descrito la enzima propia de *E. coli* capaz de realizar este corte endopeptídico. A continuación, se construyeron los mutantes K212R y K212Stop, dónde la lisina se cambió por un aminoácido similar, arginina (para no producir cambios bruscos en la proteína) y por un codón Stop, respectivamente. El clon K212Stop produjo una proteína de 27 kDa sin actividad esterasa: "enzima muerta" (Figura 7.2, calle 3). La falta de actividad puede deberse a que el aminoácido His222 del centro activo ha sido eliminado de la secuencia proteica. El clon K212R produjo una única banda sobreexpresada de alrededor 30 kDa (Figura 7.2, línea 4), es decir, se consiguió eliminar el punto de corte para la proteasa de *E. coli*. Además, esta última proteína presentó una actividad específica similar a la parental (5.76 U/mg frente a 5.84 U/mg del parental). Esto confirma el origen de estas dos bandas, la ruptura se debía a un ataque proteolítico, y probablemente, también explicaría la presencia de estas bandas en la EstA de *G. thermoleovorans* NY. A partir de aquí, se utilizó el clon mutado sin corte proteolítico para el resto del trabajo.

2.3. Caracterización enzimática de la enzima recombinante

2.3.1. Parámetros cinéticos

2.3.1.1. Ésteres de *p*-nitrofenilo

La especificidad de la enzima para los sustratos más comunes de las esterasas, los ésteres de *p*-nitrofenilo (*p*-NP) (acetato, butirato, caprilato, laurato, miristato y palmitato) fue estudiada. No se observó actividad con *p*-NPMiristato (C_{14}), ni *p*-NPPalmitato (C_{16}) en las condiciones estándar de medida. Además, la actividad disminuyó conforme aumentaba la longitud de la cadena del ácido graso (Figura 7.5), lo cual confirma que esta enzima es una esterasa y no una lipasa.

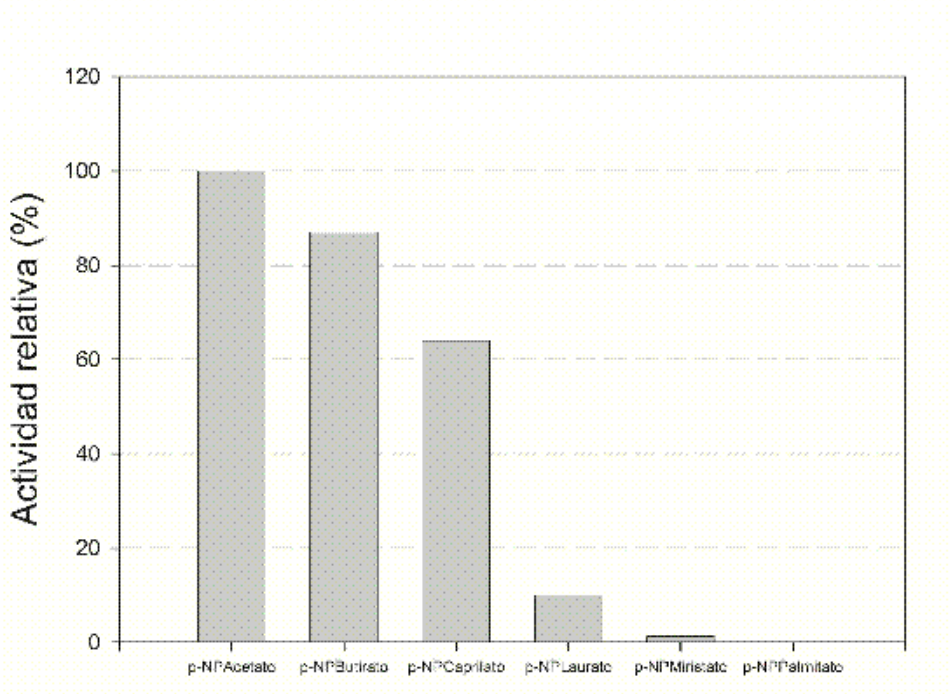


Figura 7.5: Actividad relativa de GkCE frente a diferentes ésteres de *p*-NP, de longitud de la cadena de ácidos grasos creciente. *p*-NPAcetato (C_2), *p*-NPButirato (C_4), *p*-NPCaprilato (C_8), *p*-NPLaurato (C_{12}), *p*-NPMiristato (C_{14}) y *p*-NPPalmitato (C_{16}). Cada medida se realizó en las condiciones estándar a 25 °C, pH 8.0 con la misma cantidad de enzima y de sustrato.

El mejor sustrato para GkCE resultó ser el *p*-NPA (C_2), con una k_{cat} de 280.4 s^{-1} (Tabla 7.2). Se observaron también inhibiciones a alta concentración de sustrato para el *p*-NPCaprilato (Figura 7.6) y el *p*-NPLaurato, que fueron ajustados a la siguiente ecuación:

$$V = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]\left(\frac{[S]}{K_{SI}}\right)}$$

Dónde, K_M es la constante de Michaelis-Menten, [S] es la concentración de sustrato, *Vmax* es la velocidad máxima de la reacción, y K_{SI} es la constante de inhibición. Los valores obtenidos para K_{SI} fueron 2.02 mM para el *p*-NPCaprilato y 0.02 mM para el *p*-NPLaurato. Por otro lado, se midió actividad con ésteres de naftil acetato, presentando una mayor k_{cat}/K_M para el β-naftil acetato, 36.8 $mM^{-1}.s^{-1}$. Estos valores de K_M tienen el mismo orden de magnitud que los de otras esterasas, YesT de *Bacillus subtilis* presenta una K_M de 2.8 mM y 1 mM para el *p*-NPA y ésteres de naftil acetato, respectivamente (Martínez-Martínez y col., 2008b). La rhamnogalacturonan acetil esterasa (RGAE) de *B. halodurans* C125 presentó una K_M más elevada, 14.1 mM para el *p*-NPA (Navarro-Fernández y col., 2008).

Los valores de K_M y k_{cat} de las CE homólogas no han sido publicados por lo que no se pudieron comparar. Los valores de k_{cat} son parecidos a los de otras CEs de la bibliografía, Rv3487c de *Mycobacterium tuberculosis* (Zhang y col., 2005), presentó casi el doble de k_{cat} para el *p*-NPA, 501.8 s^{-1}.

Tabla 7.2: Parámetros cinéticos de GkCE recombinante[§].

	K_M (mM)	K_{SI} (mM)[¶]	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($mM^{-1}.s^{-1}$)
p-NPAcetato (C_2)	2.8		280.4	101.2
p-NPButirato (C_4)	1.4		9.1	6.7
p-NPCaprilato (C_8)	0.40	2.02	4.8	11.9
p-NPLaurato (C_{12})	14.6	0.02	70.5	4.8
p-NPMiristato (C_{14})	1.0		0.08	0.1
p-NPPalmitato (C_{16})	1.8		0.03	0.01
α-Naftil acetato	0.6		12.3	19.2
β-Naftil acetato	1.2		44.9	36.8

[§]La actividad se determinó mediante el medio de reacción estándar a 25 °C, pH 8.0 y con 12.5 µg de enzima purificada.

[¶] K_{SI} es la constante de inhibición.

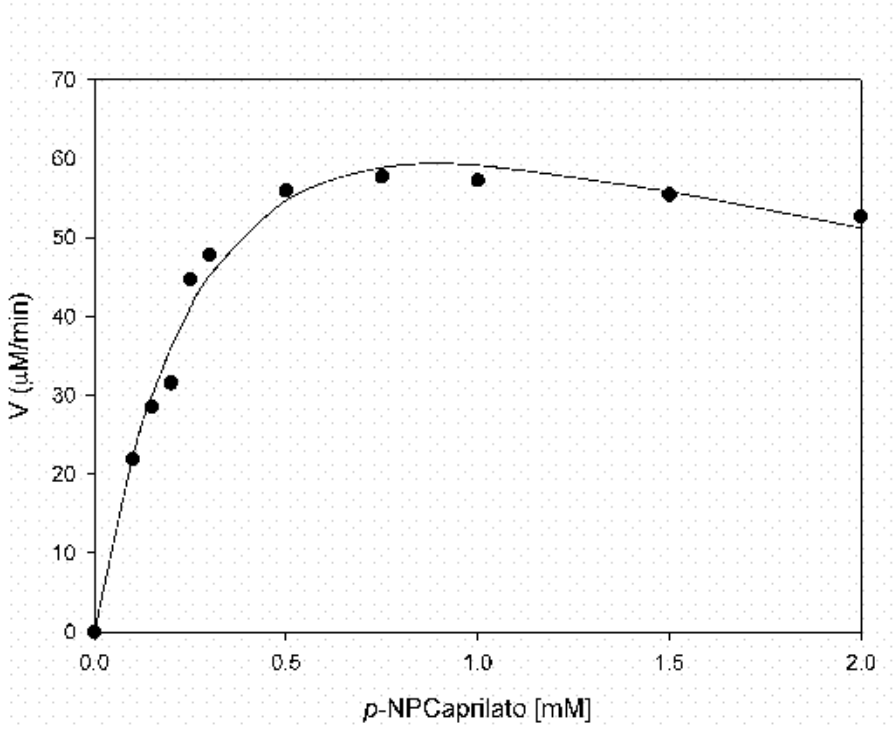


Figura 7.6: Inhibición a alta concentración de sustrato mostrada por GkCE sobre *p*-NPCaprilato (C_8) en las condiciones estándar de medida.

2.3.1.2. Sustratos con aplicación industrial

Se midió actividad con GkCE purificada frente a intermedios de antibióticos β-lactámicos semisintéticos, mediante el método de medida estándar (ver Materiales y Métodos, apartado 10.1). Al igual que ocurría con la carboxilesterasa anterior, YICE, tras 4 horas en presencia de 7-ACA, no se observó 7-dACA en el cromatograma, tan sólo sustrato.

A continuación, se midió actividad en presencia de (R, S)-ketoprofeno metil ester mediante el método de medida estándar (ver Materiales y Métodos, apartado 10.2), en presencia de 0.5% Triton X-100 y se calculó la K_M para la mezcla racémica. GkCE resultó ser activa sobre el ketoprofeno, pero desafortunadamente no de forma enantioespecifica; la K_M obtenida fue 0.96 mM y una V*max* de 59.1 μM/min/mg de proteína, valores similares a los de otras carboxilesterasas de la bibliografía (Choi y col., 2003; Kim y col., 2006). Sin embargo, el ee_p fue excesivamente bajo, 16.7% para el 20% de conversión. La presencia de disolventes orgánicos o detergentes (Kim y col., 2003; Kim y col., 2006) puede modificar la enantioespecificidad de las CEs, sin embargo, bajo las mismas condiciones no se modificó la esteroespecificidad de GkCE.

2.3.2. Estabilidad enzimática

El efecto del pH en la actividad enzimática y en la estabilidad se estudió con *p*-NPCaprilato como sustrato, ya que su autohidrólisis es menor que la del *p*-NPA o *p*-NPButirato (Kakugawa y col., 2007). El pH óptimo de la enzima fue 8.0 (Figura 7.7). A pesar de su elevada homología, las otras CEs emparentadas presentaron diferencias en este parámetro, GsEst30 prefiere pHs más altos, en concreto su pH óptimo fue 9.5 (Ewis y col., 2004), por el contrario, EstA de *G. thermoleovorans* YN presentó un pH óptimo de 7.5 (Soliman y col., 2007).

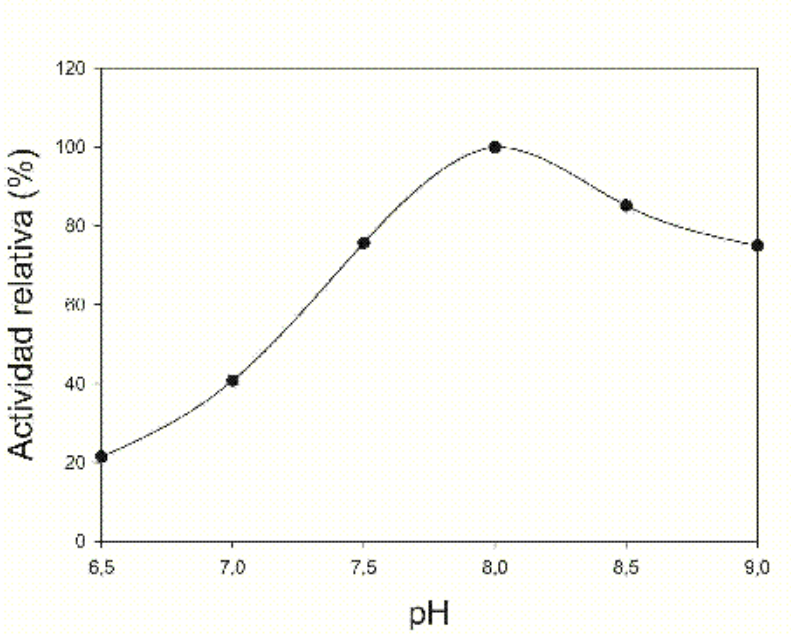


Figura 7.7: pH óptimo de GkCE. Se determinó la actividad residual mediante el método de medida estándar en los siguientes tampones (50 mM): fosfato potásico (pH 6.5-8.0) y bicarbonato sódico (pH 8.0-9.0), a 25 °C y con 0.8 mM de *p*-NPCaprilato.

Tras 24 h a diferentes pHs, GkCE resultó ser estable entre pH 6.0 y 9.0 (Figura 7.8), manteniendo un 62% de actividad a pH 6.0. La enzima no fue estable, sin embargo, tras una hora a pH 11.0 o durante más de 2 horas a pH 4.0.

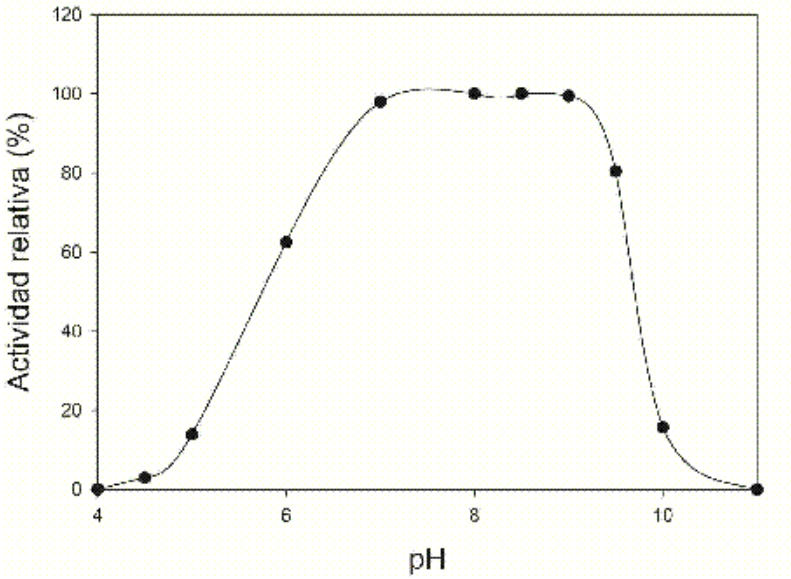


Figura 7.8: Estabilidad de GkCE a diferentes pHs. La enzima se incubó durante 24 h en los siguientes tampones (50 mM): acetato sódico (pH 4.0-5.5), fosfato potásico (pH 6.0-8.0), bicarbonato sódico (pH 8.0-9.0) y ácido bórico (pH 9.5-11). Se determinó la actividad residual mediante el método de medida estándar a 25 °C, pH 8.0 y con 0.8 mM de *p*-NPCaprilato.

A continuación, se determinó la estabilidad de la proteína entre 60 y 80 °C. Como se muestra en la Figura 7.9, GkCE fue estable a temperaturas de 60-65 °C, sin embargo, su actividad disminuía rápidamente por encima de 65 °C. A la temperatura fisiológica del microorganismo, 60 °C, GkCE retuvo el 100% de actividad durante las 5 primeras horas de incubación, y aún mantenía el 60% de su actividad tras 12 h (Figura 7.9 interior). Se observó un pequeño incremento inicial de la actividad (alrededor de un 10%) a 60 °C, debido probablemente a cambios estructurales por el efecto de la temperatura, algo común en enzimas termoestables (Constantino y col., 1990; Martínez-Martínez y col., 2008). No se pudo llevar a cabo el estudio de la temperatura óptima de la enzima debido a la inestabilidad de estos sustratos a altas temperaturas.

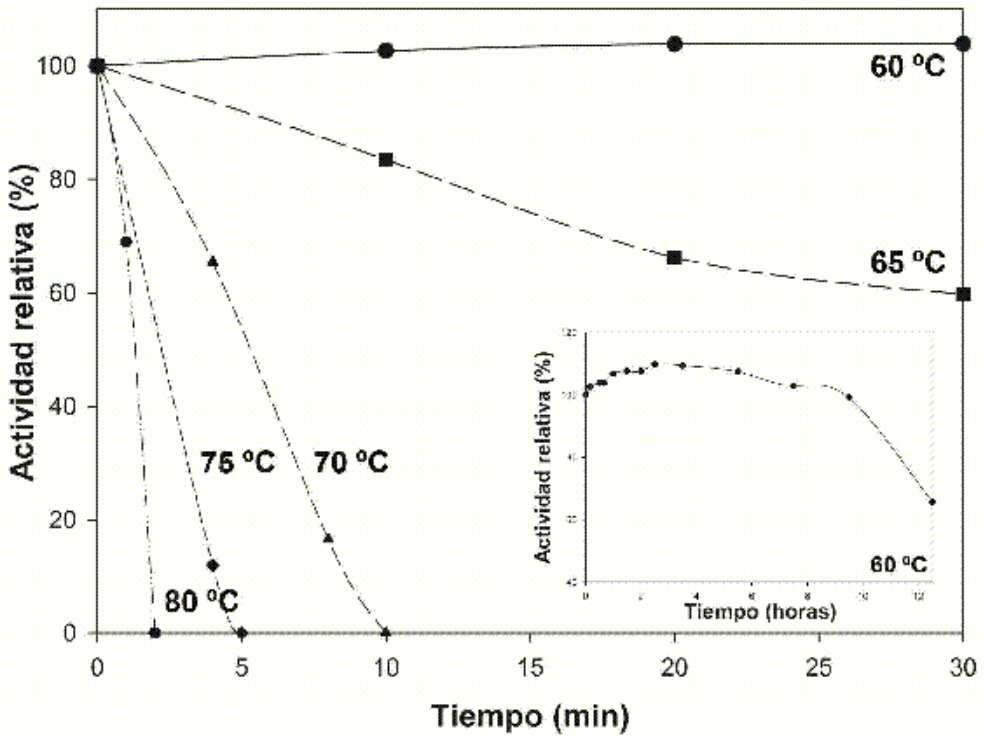


Figura 7.9: Estabilidad de GkCE frente a diferentes temperaturas. Se incubó la enzima durante diferentes periodos de tiempo y temperatura. La figura interior muestra la estabilidad a 60 °C durante tiempos más largos (horas). Tras esto, se midió la actividad residual mediante el método de medida estándar a pH 8.0, 25 °C y con *p*-NPCaprilato.

El efecto de disolventes orgánicos, detergentes y urea en la estabilidad de GkCE fue también estudiado. Tras 60 min de incubación a 60 °C con 5% de detergentes no iónicos (p/v) (Tergitol y Triton X-100), la actividad de GkCE se vio levemente alterada (Tabla 7.3). La enzima aún poseía el 23% de actividad residual tras 60 min a 30 °C en presencia de 2% SDS. Aunque sí se inhibió totalmente a 60 °C en presencia de este detergente desnaturalizante. Además, la enzima soportó bien concentraciones de 40% (v/v) a 30 °C de disolventes orgánicos, pero no lo hizo a concentraciones de 90% (v/v) o temperaturas mayores (60 °C). GkCE se activó hasta el 150% en presencia de 1 M de urea, y fue estable tras 1h a una concentración de 8 M de urea a 30 °C.

De este modo, GkCE presentó además de la esperada termoestabilidad, elevada actividad en presencia de agentes desnaturalizantes. GkCE fue más estable frente a disolventes orgánicos que EstBB1 de *B. subtilis* (cepa RRL-BB1), dónde se producía una clara inactivación en presencia de 60% (v/v) etanol e isopropanol (Maqbool y col., 2006). La CE EstA1 de *Bacillus sp.* (cepa BP-7) se inhibió con SDS y urea al 0.3% (p/v) (Prim y col., 2001), concentraciones que no alteraron la actividad de GkCE, ya que incluso retuvo el 91% de actividad a 8 M de urea.

Para determinar si GkCE necesitaba cationes divalentes como cofactores, se incubó durante 30 min a 30 °C en presencia de 5 mM Mg^{2+}, Cu^{2+}, Co^{2+}, Fe^{2+}, Ca^{2+}, Zn^{2+}, Mn^{2+}. La actividad enzimática no se vio alterada con la incubación. Tras esto, se añadió 10 mM EDTA como quelante de iones, lo cual tampoco afectó la actividad. De esto se dedujo que GkCE, al igual que la mayoría de esterasas y todas las carboxilesterasas, no es una metaloproteína.

Tabla 7.3: Efecto de agentes desnaturalizantes sobre GkCE recombinante a temperaturas de 30 °C y 60 °C.

	Actividad relativa (%) (tras mezclar)		**Actividad relativa (%) tras incubar 60 min a 30°C (60°C)**	
Detergente	***1%***	***5%***	***1%***	***5%***
Tween 20	99 ± 1	75 ± 3	100 ± 3 (64 ± 3)	64 ± 4 (59 ± 5)
Triton X-100	100 ± 3	85 ± 5	105 ± 6 (95 ± 1)	94 ± 4 (88 ± 2)
Tergitol	100 ± 5	103 ± 2	104 ± 4 (98 ± 6)	103 ± 2 (99 ± 3)
	0.1%	***2%***	***0.1%***	***2%***
SDS	111 ± 7	23 ± 2	111± 3 (0)	23 ± 4 (0)
	0.1%	***0.3%***	***0.1%***	***0.3%***
CTAB	96 ± 3	98 ± 4	96 ± 3 (3 ± 1)	99 ± 4 (2 ± 1)
Disolvente orgánico	***40%***	***90%***	***40%***	***90%***
Metanol	103 ± 3	73 ± 4	101 ± 3 (3 ± 1)	8 ± 4 (0)
Etanol	86 ± 6	94 ± 4	56 ± 8 (8 ± 2)	54 ± 5 (0)
Acetona	74 ± 2	50 ± 4	64 ± 5 (2 ± 1)	49 ± 5 (2 ± 1)
2-propanol	88 ± 3	87 ± 5	35 ± 6 (16 ± 3)	25 ± 8 (0)
DMSO	97 ± 8	62 ± 4	95 ± 7 (0)	0 (0)
TBME	44 ± 7	33 ± 6	40 ± 4 (41 ± 5)	33 ± 4 (3 ± 1)
Urea	***1M***	***8M***	***1M***	***8M***
	152 ± 5	112 ± 3	94 ± 3 (93 ± 5)	91 ± 2 (4± 1)

2.3.3. Estudios de inhibición

Para investigar los aminoácidos implicados en la catálisis, se incubó la enzima en presencia de compuestos a dos concentraciones (0.5 mM y 5 mM) que se unen a determinados aminoácidos (Tabla 7.4). El PMSF (Fenilmetilsulfonil fluoride) se

une a la serina, PGO (Fenilglioxal fosfato) se une a la arginina, PLP (Piridoxal-5´-fosfato) se une a la lisina, y el DPC (Dietilpirocarbonato) se une a la histidina.

Tabla 7.4: Efecto de diferentes inhibidores en la actividad enzimática de GkCE recombinante[5].

Inhibidor	Actividad relativa (%) de GkCE Concentración		
	0,5 mM	5 mM	Aminoácido inhibido
PMSF	0	0	Serina
PGO	100 ± 2	94 ± 2	Arginina
PLP	99 ± 2	95 ± 2	Lisina
DPC	45 ± 5	36 ± 3	Histidina
Eserina	105 ± 2	98 ± 3	
Paraoxon	0	0	

[5]La actividad residual se midió mediante el método de medida estándar con 0.8 mM *p*-NPCaprilato, 25 °C y pH 8.0, tras 30 min de incubación a 30 °C.

La Tabla 7.4 muestra que la Eserina, el PGO y el PLP no afectaron la actividad de GkCE, ni siquiera a 5 mM. Contrariamente, la actividad sí se inhibió con tan sólo 0.5 mM de PMSF o DPC. Estos resultados sugieren que tanto serina como histidina estarían implicadas en la reacción catalítica.

Por otro lado, esta Tabla 7.4. permite clasificar a GkCE como una carboxilesterasa, según su patrón de inhibición (Main, 1960; Park y col., 2006), ya que es inhibida fuertemente por el paraoxon (dietil-*p*-nitrofenil fosfato) pero no por la Eserina (también llamada fisostigmina), y no como una aril esterasa (no se ven afectadas por el paraoxon) o como una acetil esterasa (se inhiben también por la Eserina) (Park y col., 2006).

2.4. Determinación de la estructura molecular

La enzima GsEst30 cristalizada de *G. stearothermophilus* presenta un 97% de homología con GkCE (código PDB: 1TQH) (Liu y col., 2004), se utilizó esta estructura como molde para construir un modelo tridimensional fiable de GkCE (Figura 7.10 A), mediante el programa SWISSMODEL (Guex y col., 1997; Schwede y col., 2003; Arnold y col., 2006). Tal y cómo se observa en el modelado, la estructura de GkCE se divide en dos dominios compuestos por el centro catalítico rodeado a su vez de la zona de unión a sustrato y el resto formando el clásico sándwich α/β/α (Figura 7.10 A). El dominio más pequeño (o caperuza) consiste en tres hélices-α que protegen el centro catalítico: α2 (Pro57-Leu60), α5 (Glu123-Arg140) y α6 (Glu145-Lys156) (Figura 7.1). El dominio de mayor tamaño es la clásica lámina β central de

las α/β hidrolasas, rodeada de seis hélices α: α1 (Ala29-Ser40), α3 (Pro65-Asn81), α4 (Leu94-Gly103), α7 (Leu163-Leu179), α8 (Ser199-Glu206) y α9 (Lys230-Ser243). Se observó también en este modelo que el aminoácido K212 dónde teóricamente se producía el corte proteolítico, se encontraba efectivamente en el exterior de la proteína, siendo por lo tanto, accesible al ataque de proteasas de *E. coli* (Figura 4.10 A, K212 en verde).

Por homología con 1TQH, el centro catalítico consiste en la triada Ser93-His222-Asp192. La Ser93 se encuentra entre la hebra β5 y la hélice α4 (Figura 7.1). Mediante mutagénesis dirigida, se ha visto que estos aminoácidos son esenciales en la actividad, además de conservarse en estas enzimas emparentadas: GtEst30, GsEst30 y GtEstA (Figura 7.1).

El mecanismo de actuación de las esterasas ha sido ampliamente estudiado, la serina catalítica forma interacciones débiles con la cadena carbonada lateral del aspártico. Esta serina se estabiliza mediante unión por puente de hidrógeno de su grupo hidroxilo a la cadena lateral de la histidina. En el modelado de GkCE, el conjunto de estos tres aminoácidos se encuentran localizados en una pequeña cavidad formada por el extremo C-terminal de la lámina β central y cubierta por 3 α-hélices: α2-α5 y α6.

Por otro lado, GkCE se diferencia de sus homólogas debido a la ausencia de la metionina inicial (Met1). GkCE, al igual que otras CEs no emparentadas (CE de *B. anthracis*, *B. halodurans* o *Oceanbacillus iheyensis*) sólo presenta una metionina, y no dos seguidas. De hecho se ha visto que a veces la metionina inicial de la proteína puede ser eliminada de la secuencia tras la traducción, este pequeño cambio parece afectar a la estabilidad de la enzima (Takano y col., 1999).

Si estudiamos la topología de GkCE y sus homólogas, estas sólo se diferencian en la caperuza (Figura 7.11 C-F, marco). La caperuza de GsEst30 es menor, probablemente debido al cambio de la R154 por una lisina, que disminuye la longitud de la hélice α6 (Figura 7.1). Desafortunadamente, no se ha podido correlacionar la longitud de esta caperuza con los parámetros cinéticos (K_M y *Vmax*), ya que sólo se puede comparar la actividad relativa de GsEst30 para los diferentes ésteres de *p*-NP (Ewis y col., 2004), sin encontrarse diferencias destacables.

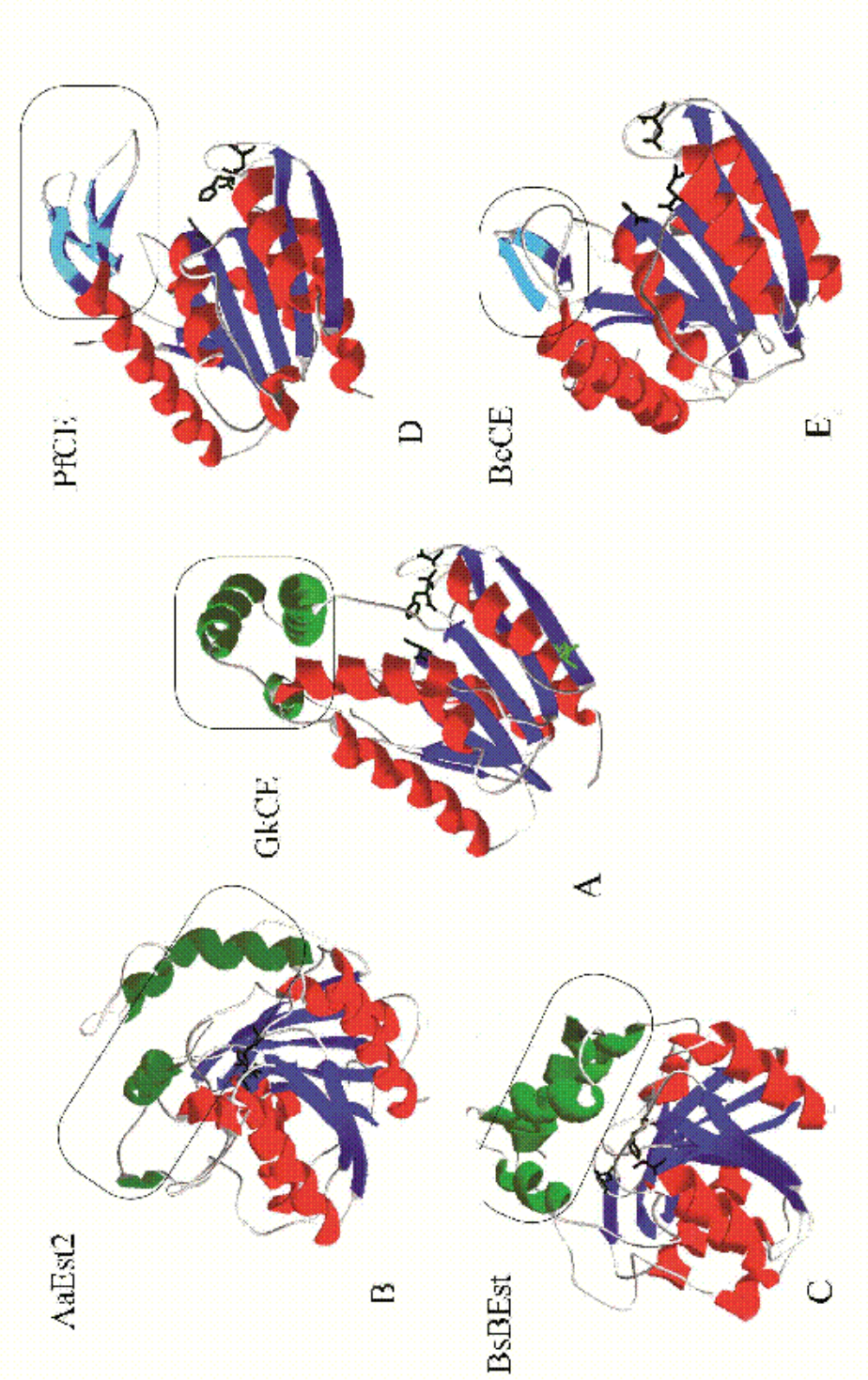


Figura 7.10: Representación esquemática de la estructura terciaria de varias CEs. (A) Estructura de la monomérica GkCE, el punto de corte proteolítico (K212) se representa en verde. (B) CE *de A. acidocaldarius* ([AaEst2] código PDB: 1EVQ). (C) CE *B. subtilis* ([BsBEst] código PDB: 2R11). (D) CE *de P. fluorescens* ([PfCE] código PDB: 1AUO). (E) CE de *B. cereus* ([BcCE] código PDB: 2H1I). Los aminoácidos del centro catalítico se representan en negro (Ser-His-Asp). Hebras β y hélices α pertenecientes al plegamiento α/β típico se representan en azul y rojo, respectivamente. Las caperuzas de cada proteína se muestran en verde o azul claro dependiendo de si se componen

hélices α o hebras β, respectivamente. Estas figuras han sido obtenidas con los programas SWISSMODEL y Swiss-PDBViewer.

3. Discusión

En este capítulo se ha descrito la clonación de una CE termoestable, GkCE presentó una gran estabilidad y mantenimiento de su actividad, incluso en condiciones de elevada temperatura, pHs extremos o presencia de compuestos desnaturalizantes. Esta enzima no era activa sobre intermedios de antibióticos β-lactámicos semisintéticos, pero sí catalizaba la hidrólisis de ésteres de un antiinflamatorio no esteroideo (NSAID), como el ketoprofeno metil ester. A pesar de presentar una alta afinidad por el ketoprofeno metil ester, el ee_p (o pureza enantiómerica) fue más bajo de lo esperado, 16%, por lo que las reacciones catalizadas por esta enzima perderían interés industrial (Margolin y col., 1993; Kim y col., 2003).

Por otro lado, el trabajo muestra que GkCE y sus homólogas son diferentes en propiedades y secuencia de aminoácidos con respecto de otras CEs descritas en la bibliografía. Se intentó clasificar GkCE y sus homólogas en la actual clasificación de enzimas lipolíticas de Arpigny y Jaeger (1999), teniendo en cuenta la estructura molecular, topología y especificidad de sustrato. Esta clasificación data de 1999, incluye 8 familias de lipasas y esterasas bacterianas. GkCE mostró una pequeña homología con dos de esas 8 familias: la familia similar a la lipasa sensible a hormonas (*HSL-family*, o familia IV) y la familia VI.

Los diagramas topológicos de las CEs emparentadas (Figura 7.11 C-F) muestran que la primera hebra de la lámina β central ha desaparecido. Así pues, la hoja β central de estas 4 enzimas se compone sólo de 7 hebras β (β2-β8), con la primera β2 (en el N-terminal) antiparalela a las demás. Se compararon entonces estas topologías con las de otras CEs de familias descritas, CE de *Alicyclobacillus acidocaldarius* (AaEst2, código PDB: 1EVQ) y Brefeldin A esterasa de *Bacillus subtilis* (BsBEst, código PDB: 2R11) han sido clasificadas como miembros de la familia IV (familia HSL) del grupo de enzimas lipolíticas (Wei y col., 1999; De Simone y col., 2000). Ambas enzimas presentan el clásico plegamiento α/β hidrolasa, compuesto por 8 hebras β, con la segunda (y no la primera) antiparalela a las demás (Figura 7.11 A-B) (Ollis y col., 1992). Además, las caperuzas de GkCE y sus homólogos están bastante cercanas al extremo N-terminal de esta hoja β central, sin llegar a bloquear el centro catalítico (Figura 7.10 A). Sin embargo, las caperuzas de AaEst2 y BsBEst rodean la zona de unión a sustrato (Figura 7.10 B y C). De vuelta a la topología, es evidente constatar la diferente composición de ambas caperuzas, mientras que en GkCE y sus emparentadas se componen de 2 hélices α y una hélice 3_{10} (Figura 7.11 C-F), en AaEst2 se compone de 3 hélices α y tres hélices 3_{10} (Figura

7.11 A). BsBEst también tiene una caperuza diferente a la de GkCE, con 4 hélices α (Figura 7.11 B) (Wei y col., 1999). AaEst2 y BsBEst poseen sólo 16 y 6% de homología, respectivamente con GkCE. Por lo anteriormente descrito, parecería claro que GkCE y sus homólogas no pueden pertenecer a la familia IV de enzimas lipolíticas.

A continuación, comparamos GkCE y sus proteínas emparentadas con los miembros de la familia VI. PfCE de *Pseudomonas fluorescens* (código PDB: 1AUO) y BcCE de *Bacillus cereus* (código PDB: 2H1I) pertenecen a esta familia (Kim y col., 1997). Ambas presentan una lámina β central similar a la de GkCE, con sólo 7 hebras β (β2-β8) y la primera antiparalela a las demás (β2) (Figura 7.11 G-H). Además, las enzimas de la familia VI tienen una masa molecular entre 23-30 kDa (Arpigny y Jaeger, 1999), parecido al de GkCE. Sin embargo, la forma activa de estas CEs suele ser un dímero, mientras que GkCE es un monómero. PfCE y BcCE tampoco presentan la típica caperuza compuesta por hélices α sino por pequeñas hebras β. El centro catalítico se protege o recubre por 4 hebras β en el caso de BcCE y 4 hebras β más una hélice 3_{10} en PfCE (Figura 7.11 D-E). En este último caso, la caperuza es muy grande y podría incluso bloquear la unión de sustratos con una cadena de ácidos grasos larga. Aunque la especificidad de BcCE no se ha descrito, sí se sabe que PfCE es activa sobre sustratos entre C_2-C_{10} (Hong y col., 1991), mientras que GkCE ataca incluso sustratos de C_{14}, por lo que esta caperuza podría estar directamente implicada en la especificidad de sustrato de las CEs. Por último, PfCE y BcCE muestran baja similitud con GkCE (15 y 12%, respectivamente), y por consiguiente, con sus homólogas (GsEst30, GtEstA y GtEst30). De nuevo, no se pudo clasificar a este grupo de CEs dentro de la familia VI. Así pues, las CEs de *Geobacillus sp.* no encajan en base a la topología, a la caperuza o a la especificidad de sustrato en ninguna de las dos familias propuestas.

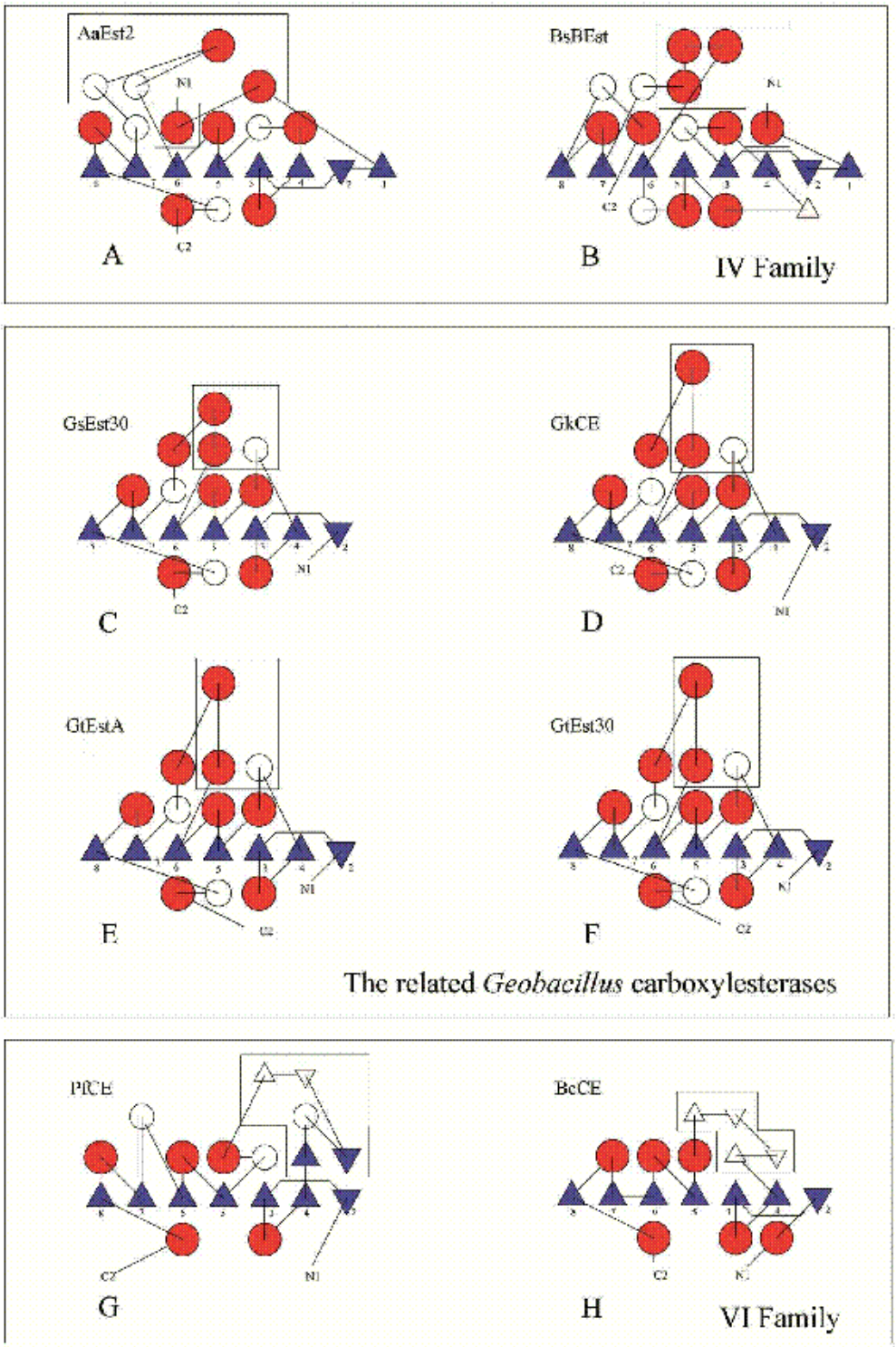


Figura 7.11: Diagramas topológicos de los miembros de la nueva familia de CE de *Geobacillus sp.* y otros miembros de la superfamilia de α/β hidrolasas. (A) Diagrama de CE de *A. acidocaldorius* (AaEst2, 1EVQ). (B) Diagrama de CE de *B. subtilis* (BsBEst, 2R11). (C) Diagrama de GsEst30 de *G. stearothermophilus* (1TQH). (D) Diagrama de GkCE. (E) Diagrama de GtEstA de *G. thermoleovorans* YN. (F) Diagrama de GtEst30 de *G. thermodenitrificans*. (G) Diagrama de PfCE de *P. fluorescens* (1AUO). (H) Diagrama de BcCE de *B. cereus* (2H1I). Las hélices α y hebras β se representan con círculos y triángulos, respectivamente. Los círculos y triángulos blancos representan hélices 3_{10} o

(hélices α más pequeñas) y hebras β más pequeñas presentes en las estructuras, respectivamente. Las figuras encuadradas representan hebras β y hélices α que no se encuentran en el plegamiento clásico α/β, y que forman las caperuzas. Los diagramas se obtuvieron mediante el programa TOPS (Michalopoulus y col., 2004).

De lo anterior, se puede deducir que las CEs de *Geobacillus sp.* derivan de un ancestro común, pero lejano de las familias IV y VI. Se realizó entonces un árbol filogenético para entender mejor esta relación (Figura 7.12). En este filograma se observa que GkCE y sus homólogas están muy cercanas en la evolución y forman el ancestro común de las familias IV y VI, separadas por una larga distancia evolutiva.

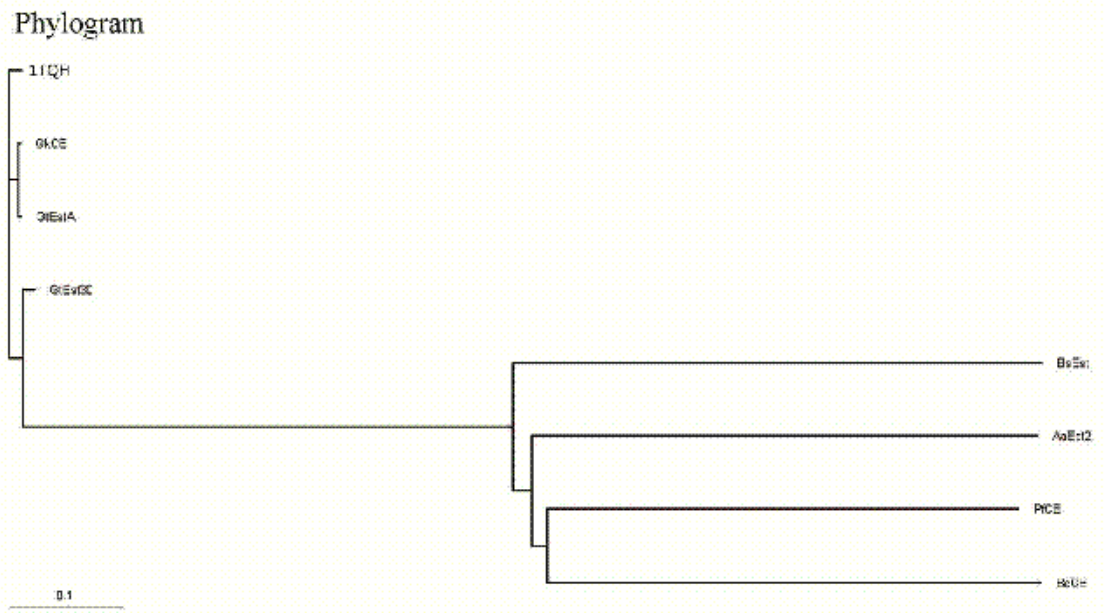


Figura 7.12: Análisis filogenético de las CEs estudiadas. Familia IV, *A. acidocaldarius* (AaEst2) y CE de *B. subtilis* (BsBEst); familia VI, CE de *P. fluorescens* (PfCE) y CE de *B.cereus* (BcCE); y la nueva familia de CEs de *Geobacillus sp.* GkCE, 1TQH, GtEst30 y GtEstA. El filograma se construyó con el programa TreeView mediante el *neighbor-joining method* (Saitou y Nei, 1987).

4. Conclusiones

En este capítulo se ha clonado, sobreexpresado y mutado una CE de *G. kaustophilus* HTA426 en *E. coli*, para obtener GkCE, de 30 kDa, estable tras eliminarse el punto de corte para una endopeptidasa, aumentando así la proporción de enzima activa. GkCE fue activa frente a ésteres de *p*-NP de cadena corta (C_2-C_{14}), y presentó elevada estabilidad en condiciones alcalinas y temperaturas de hasta 60 °C, en presencia de detergentes no iónicos, de disolventes orgánicos y de urea. A pesar de estas propiedades, GkCE resultó ser poco estereoespecífica sobre el (R, S) ketoprofeno metil ester, lo cual limita en

cierto modo sus aplicaciones en biotransformaciones. GkCE y sus homólogas pertenecen a una nueva familia de CEs, de caperuza atípica, y aún sin estudiar completamente. Esta familia ha sido descrita por primera vez por nuestro grupo, basándonos en la topología, la estructura molecular y propiedades biológicas. Así pues, GkCE y sus homólogas fueron clasificadas en una nueva familia, diferente de las familias IV y VI de las enzimas lipolíticas ya conocidas.

Capítulo VIII

Propiedades estereospecíficas de una carboxilesterasa de *Bacillus halodurans* C125. Profundización en las características moleculares de la nueva familia de carboxilesterasas de la familia *Bacillaceae*.

1. Introducción

De forma general, sólo uno de los dos enantiómeros (R- o S-) de un fármaco racémico presenta un nivel de acción terapéutica o biológica adecuado, mientras que el otro enantiómero suele ser inactivo, o incluso puede presentar efectos indeseados (Turner, 2004). Es por esto, que la industria farmacéutica ha aumentado la oferta de compuestos ópticamente puros. Se calcula que el 80% de los nuevos fármacos que estén en el mercado en 2010 serán compuestos quirales puros (Steenkamp y Brady, 2008). El problema es que la separación de muestras racémicas no siempre es fácil, suele ser bastante tediosa, además de necesitar un costoso equipamiento (Ong y col., 2005). Es por esto que, resultaría muy útil el uso de enzimas esteroespecificas para resolver mezclas racémicas.

En los últimos años ha crecido el interés por las esterasas, ya que son capaces de catalizar gran variedad de reacciones con aplicación industrial. Estas enzimas son consideradas hoy en día, como potentes biocatalizadores en detergentes y alimentación, pero sobre todo en la industria farmacéutica (Bornscheuer, 1999). En particular, las carboxilesterasas son conocidas por su capacidad de resolver los racematos del compuesto antiinflamatorio ketoprofeno (Capítulo I, Figura 1.17) (Ghezzi y col., 1998; Ossipov y col., 2000). Se trata de un fármaco con actividad analgésica y antipirética, que se usa comúnmente en enfermedades inflamatorias crónicas (Avouac y Teule, 1988). El enantiómero S- es 100 veces más activo que el R- sobre la ciclooxigenasa (Suesa y col., 2004), de ahí el interés de encontrar una enzima que actue sobre el S-ketoprofeno ester, y que rinda el S-ketoprofeno (ácido libre) sin afectar al R-ester. El problema es que los ésteres de ketoprofeno (etil ester, metil ester,...) son poco solubles en soluciones acuosas, lo que dificulta la reacción enzimática. Se ha conseguido introducir el ácido de este antiinflamatorio no esteroideo (NSAID) en ciclodextrinas (Tayade y Vavia, 2006), en busca de una mayor biodisponibilidad del ácido. Este dato, abre la posibilidad de complejar el éster racémico tanto en micelas como en ciclodextrinas.

Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos hidrosolubles con una cavidad de tamaño variable dependiendo del número de glucosas que la componen, dando lugar a las α, β y γ- ciclodextrinas (Figura 8.1). Estas glucosas se unen por enlaces α-(1→4), y permiten complejar en su cavidad compuestos hidrofóbicos, formando así complejos de inclusión. Las ciclodextrinas, sobre todo las modificadas, se usan en aplicaciones farmacéuticas para solubilizar, estabilizar, aumentar la biodisponibilidad o controlar la liberación de determinados compuestos (Hirayama y Uekama, 1987).

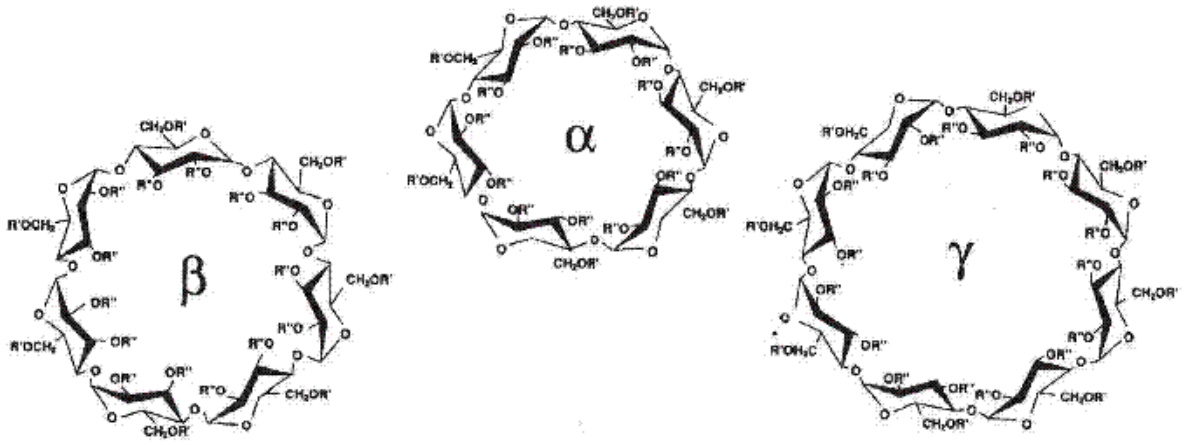


Figura 8.1: Estructura de las α-, β- y γ-CDs.

Bacillus halodurans C125 crece bien desde pH 7.0 hasta pH 10.5 (Takami y col., 1999a, 1999b, 2000a), a temperaturas relativamente altas (hasta 55 °C) y en presencia de 12% de NaCl (Takami y col., 2000b), por lo que fue seleccionado.

El gen BH3554 de 747 pb, parecía un buen candidato en la búsqueda de nuevas esterasas, ya que codificaba para una hipotética carboxilesterasa.

El presente capítulo describe la clonación y caracterización de una nueva enzima con afinidad por el (R, S)-ketoprofeno metil ester. Para su estudio cinético, el sustrato se complejó en ciclodextinas modificadas (2-hidroxipropil-β-ciclodextinas), se calcularon las constantes de formación y se midió actividad en presencia de estos complejos. Finalmente, se construyó un modelo de la estructura tridimensional y esquema topológico de la proteína, estableciendo una relación entre las secuencias primaria y terciaria de las proteínas de esta familia que explicaría las diferentes afinidades de sustrato dentro de esta familia.

2. Resultados

2.1. Secuencia de aminoácidos

B. halodurans C125 presenta un ORF de 747 pb (BH3554) que codifica para una hipotética carboxilesterasa, y que presenta un 70% de similitud para GkCE de *G. kaustophilus* HTA426, previamente caracterizada en el capítulo VII. En el capítulo anterior se describió que GkCE pertenece a una nueva familia de carboxilesterasas dentro de la clasificación de enzimas lipolíticas (Arpigny y Jaeger, 2002), al igual que otras carboxilesterasas del género *Geobacillus*.

Además, y evidentemente, este ORF presentaba también elevada homología con las carboxilesterasas de la anterior familia, 70% con *G. stearothermophilus* (código PDB: 1TQH, ATCC12980), *G. thermoleovorans* YN (GtEstA, GI 82791235), y *G. thermodenitrificans* (GtEst30, YP_001127089). El alineamiento mediante el programa CLUSTAL-W entre los miembros de esta nueva familia y la secuencia de aminoácidos de esta hipotética carboxilesterasa de *B. halodurans* C125 (BhCE) se muestra en la Figura 8.2. Por otra parte, y para ampliar el número de enzimas hipotéticas con elevada homología, se añadieron a este alineamiento, las carboxilesterasas de *Bacillus stearothermophilus* (código PDB: 1R1D, GI 46015395), *B. cereus* (BcCE, ZP_04200076, enzima diferente a 2H1I del capítulo anterior), *B. pumilus* (BpCE, YP_001488246), *B. anthracis* (BaCE, YP_031197), *B. thurigiensis* (BtCE, YP_039118) y *B. licheniformis* (BlCE, YP_080734), todas ellas con un 69% de homología con BhCE. La Figura 8.2 reveló pues la presencia de los tres mismos aminoácidos en el centro catalítico: Ser93, Asp192 e His222, al igual que secuencias muy conservadas, como por ejemplo el codo nucleofílico alrededor de la serina activa (G-X-S-X-G) (Figura 8.2, marco azul).

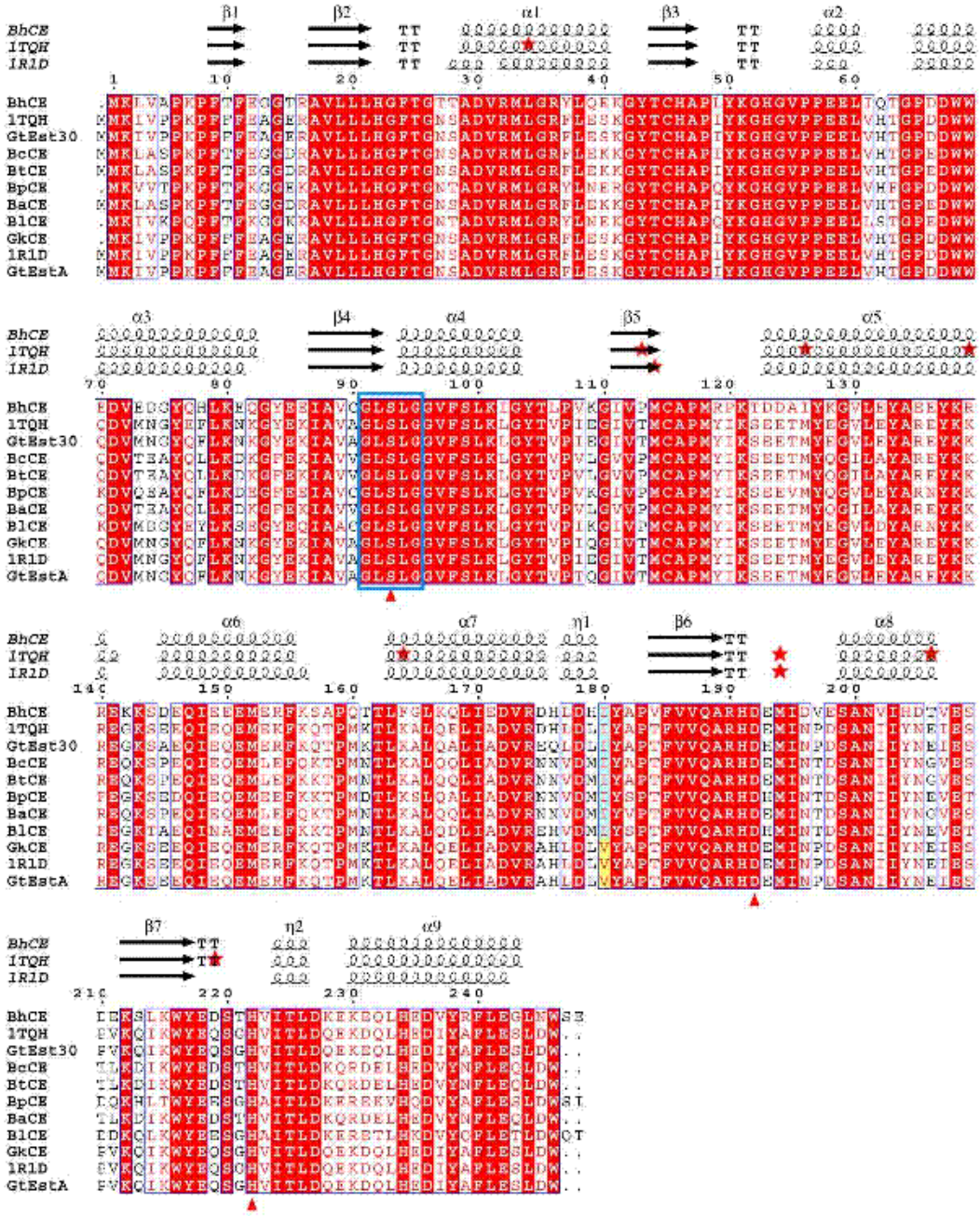


Figura 8.2: Alineamiento de múltiples secuencias de CE homólogas. Las secuencias se alinearon mediante el programa CLUSTAL-W (Thompson y col., 1994). La estructura secundaria de BhCE se obtuvo a partir de la página SWISSPROT databank, para dar esta figura con el programa ESPript (Gouet y col., 1999). CE de *B. halodurans* C125 (BhCE), mostró un 70% identidad con GkCE, 1TQH de *G. stearothermophilus*, GtEst30 de *G. thermodenitrificans*, GtEstA de *G. thermoleovorans*, 69% con BcCE de *B. cereus*, BtCE de *B. thurigiensis*, BpCE de *B. pumilus*, BaCE de *B. anthracis*, BlCE de *B. licheniformis* y 1R1D de *B. stearothermophilus*. Los residuos más conservados se sobreluminan en rojo. En la posición 180, Ile y Val se señalan en azul y amarillo, respectivamente. Los símbolos sobre estos bloques muestran la estructura secundaria, dónde los muelles representan las hélices α y las flechas, las hebras β. Los triángulos representan los aminoácidos del centro activo. El marco azul entre los aminoácidos 91-95 representa la secuencia conservada GXSXG. Los residuos que forman la cavidad hidrofóbica de la proteína se marcan con estrellas rojas.

2.2. Expresión y purificación de BhCE recombinante

El gen BH3554 codificaba para una secuencia de 249 aminoácidos, fue clonado y expresado en *E. coli*, tal y como se ha descrito en Materiales y Métodos (apartado 5.4). El fragmento de 747 pb fue amplificado mediante PCR, digerido secuencialmente con *EcoR*I y *Not*I, ligado en pET28a digerido de la misma manera y por último transformado en *E. coli* Rosetta (DE3)pLys. La proteína de fusión así generada presentó 30 aminoácidos adicionales en el extremo N-terminal (MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGSEF) propios del vector pET28a y con una masa molecular teórica de 32 kDa.

La proteína resultante, BhCE, se expresó en la fracción soluble de *E. coli* Rosetta (DE3)pLys tras la inducción con 0.5 mM IPTG durante 14 horas a 30 °C . Tras esto, se concentró el extracto enzimático desde 3.08 a 5.09 UE/mg, mediante ultrafiltración tangencial en una membrana de 30 kDa (Tabla 8.1). El extracto enzimático concentrado se sometió a intercambio aniónico (CaptoQ, GE Healthcare), y se eluyó en un gradiente 40-60% de NaCl, para finalmente pasar por una columna de afinidad (HisTrap FF, GE Healthcare), eliminando así otras proteínas contaminantes. Tras este último paso, se dializó la enzima purificada en Tris-HCl 50 mM, pH 8.0 y se conservó a -80 °C con 5% glicerol. Los resultados obtenidos de este proceso de purificación se muestran en la Tabla 8.1. Con este protocolo, se consiguió purificar la proteína con un rendimiento del 71.4% y un grado de purificación de 3.8. Este dato concuerda con el resultado obtenido mediante SDS-PAGE, donde la proteína expresada suponía alrededor del 25% del total de las proteínas de *E. coli* (Figura 8.3, calle 1). En la fracción recuperada tras la HisTrap se observó la ausencia de otras bandas de proteína contaminante (Figura 8.3, calle 3), y se obtuvo una actividad específica de 11.8 UE/mg para la hidrólisis del *p*-NPCaprilato.

Tabla 8.1: Purificación de BhCE recombinante expresada en *E. coli* Rosetta (DE3)pLys con el vector pET28a6His-BhCE[§].

Paso de purificación	Volumen (mL)	Actividad total (UE)	Actividad específica (UE/mg)[¶]	Factor de purificación	Rendimiento (%)
Extracto crudo	50	15775	3.1	1.0	100
Ultrafiltración tangencial (30 kDa)	11	10461	5.1	1.9	81.6
Intercambio aniónico (CaptoQ)	44	11493	9.7	3.2	72.8
Cromatografía de afinidad (HisTrap)	154	11258	11.8	3.8	71.4

[§] Purificación de un litro de cultivo bacteriano (18 g peso húmedo).

[¶] Actividad específica determinada en el medio de reacción estándar con 0.8 mM *p*-NPCaprilato a 25 °C, y pH 8.0.

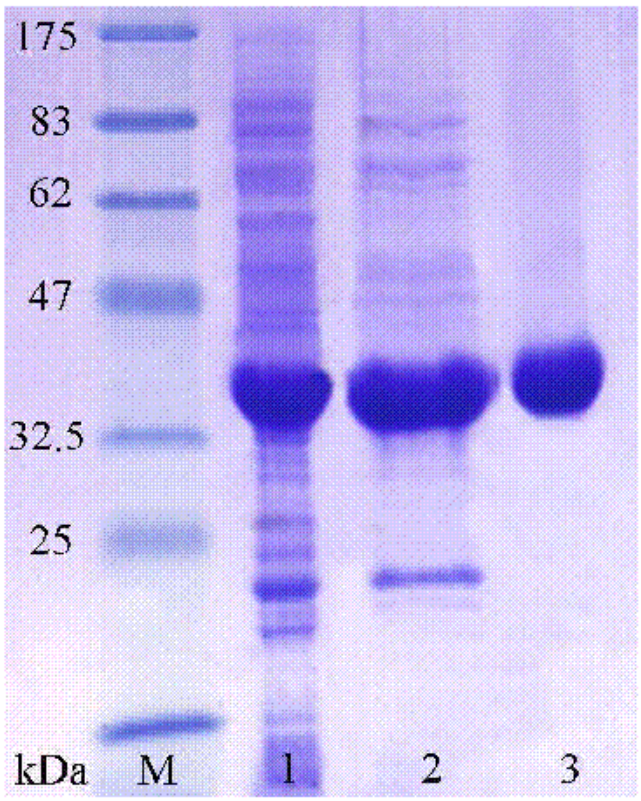


Figura 8.3: SDS-PAGE del producto de expresión del gen BH3554 en *E. coli* Rosetta (DE3)pLys tras 14 h de inducción a 30 °C. Cada calle contiene 20 µg de proteína. M, marcadores de masa molecular comerciales (P7708S; New England Biolabs). Calle 1, extracto crudo de Rosetta (DE3)pLys con pET28a-BhCE inducido tras ultrafiltración tangencial. Calle 2, fracción recolectada tras cromatografía de intercambio aniónico (CaptoQ). Calle 3, fracción recolectada tras cromatografía de afinidad, HisTrap FF. En esta última calle se observa una proteína de alrededor 32 kDa.

La masa molecular de BhCE recombinante se analizó mediante espectrometría de masas, estimándose en 32157.9 Da. Dicho valor coincidía con la estimación obtenida mediante programas informáticos (32 kDa), a partir de la secuencia primaria más los aminoácidos adicionales introducidos por pET28a. Por otro lado, se confirmó la naturaleza monomérica de la carboxilesterasa mediante filtración en gel (Superdex 200 10/300GL, Amersham).

2.3. Caracterización enzimática de la enzima recombinante

2.3.1. Parámetros cinéticos

La actividad enzimática de BhCE fue estudiada con los distintos ésteres de *p*-nitrofenilo (Tabla 8.2). El mejor sustrato fue el *p*-NPAcetato (C_2), según la eficiencia catalítica ($kcat/K_M$) obtenida, 329.2 $mM^{-1}.s^{-1}$. La eficiencia catalítica ($kcat/K_M$) descendió a medida que crecía la longitud de la cadena de ácidos grasos. Esto corrobora que BhCE es una carboxilesterasa, y no una lipasa. En todos los casos, las K_M para BhCE fueron menores que para GkCE (Capítulo VII), por lo que esta enzima debe presentar pequeños cambios estructurales, que la hacen más activa frente a estos sustratos.

La K_M para el *p*-NPButirato fue 0.74 mM, parámetro más bajo que los descritos en la bibliografía para otras esterasas con el mismo sustrato, como por ejemplo EstE5 de una librería metagenómica que mostró una K_M de 1.06 mM para *p*-NPC_4 (Nam y col., 2009).

Tabla 8.2: Parámetros cinéticos de BhCE recombinante[5].

	K_M (mM)	Vmax (µM/s)	$k_{cat}(s^{-1})$	k_{cat}/K_M ($mM^{-1}.s^{-1}$)
p-NPAcetato (C_2)	0.26	25.7	85.6	329.2
p-NPButirato (C_4)	0.74	28.3	94.2	127.3
p-NPCaprilato (C_8)	0.18	7.1	15.9	99.4
p-NPLaurato (C_{12})	1.39	0.8	2.8	2
p-NPMiristato (C_{14})	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
p-NPPalmitato (C_{16})	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

[5]La actividad se determinó mediante el método de medida estándar con diferentes concentraciones de sustratos, a 25 °C y con 3 µg de enzima purificada.

Al igual que ocurría con GkCE, no se observó desacetilación de intermedios avanzados en la síntesis de antibióticos β-lactámicos (7-ACA y CPC), tras 4 h de incubación en presencia de BhCE, en el medio de reacción estándar.

La capacidad de BhCE para hidrolizar de forma estereoespecífica el ketoprofeno metil ester ((±)-2-(3-benzoilfenil) propionato metilester) fue estudiada en presencia

de Triton X-100 0.8% (p/v). Tras 70 h a 30 °C en presencia de 200 µg de BhCE purificada y 0.5 mM de S-ketoprofeno metil ester, se transformó el 78% en el respectivo ácido, por lo que la enzima era activa sobre este éster. En presencia de 0.5 mM de la mezcla racémica, inicialmente se hidrolizaba el S-ester, pero al disminuir la proporción de este enantiómero, disminuía la velocidad, parándose la reacción alrededor del 60% de conversión de (R, S)-ketoprofeno metil ester (Figura 8.4). El exceso enantiomérico (ee_p) al 15% de conversión fue de 77.6%. La K_M para el (S)-ketoprofeno metil ester, en presencia de 0.8% Triton X-100 para solubilizar el KPME, fue de 4.48 mM (Figura 8.5). Este valor es similar a los de otras carboxilesterasas actuando sobre este sustrato en presencia de Triton X-100. Así, la carboxilesterasa de *Pseudomonas fluore*scens (Choi y col., 2003) mostró una K_M de 3.3 mM, mientras que otra carboxilesterasa de una librería metagenómica fue mayor (16.4 mM) (Kim y col., 2006).

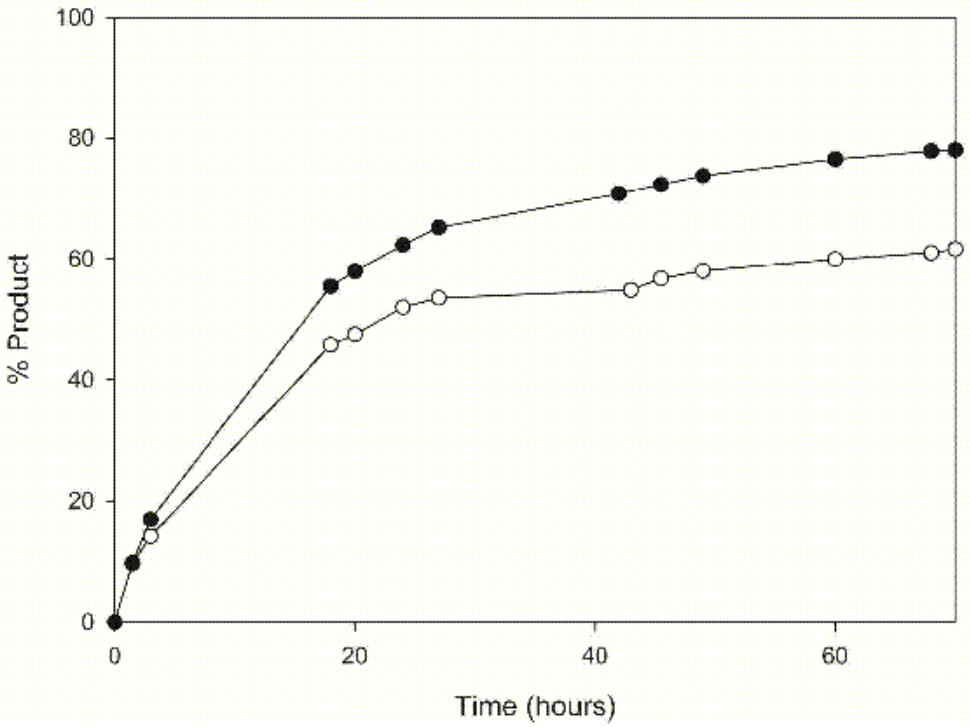


Figura 8.4: Conversión de 0.5 mM de (R, S)-ketoprofeno metil ester (○) y 0.5 mM (S)-ketoprofeno metil ester (●) en ketoprofeno (ácido). Las dos reacciones se realizaron en paralelo y ambas con 200 µg de BhCE purificada. La reacción se llevo a cabo en Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, 0.8% Triton X-100, a 30 °C.

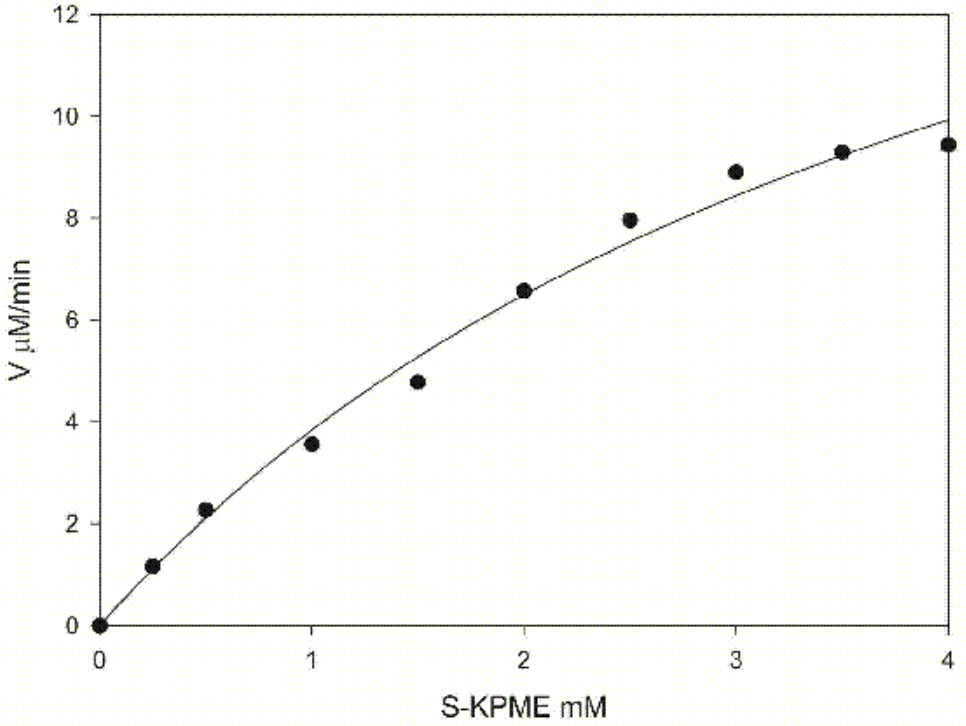


Figura 8.5: K_M de BhCE para (S)-ketoprofeno metil ester. Las velocidades fueron calculadas tras 18 horas de incubación a 30 °C, y en presencia de 0.8% Triton X-100 (p/v).

A continuación, se estudió la estabilidad de la enzima tras incubarla a temperaturas entre 35-60 °C (Figura 8.6), y midiendo la actividad residual con el método de medida estándar usando *p*-NPCaprilato como sustrato. A 35 °C, la enzima conservó el 90% de su actividad tras 48 h, pero descendió bruscamente por encima de 55 °C (Figura 8.6, inserto). Tales resultados están de acuerdo con la temperatura fisiológica del microorganismo.

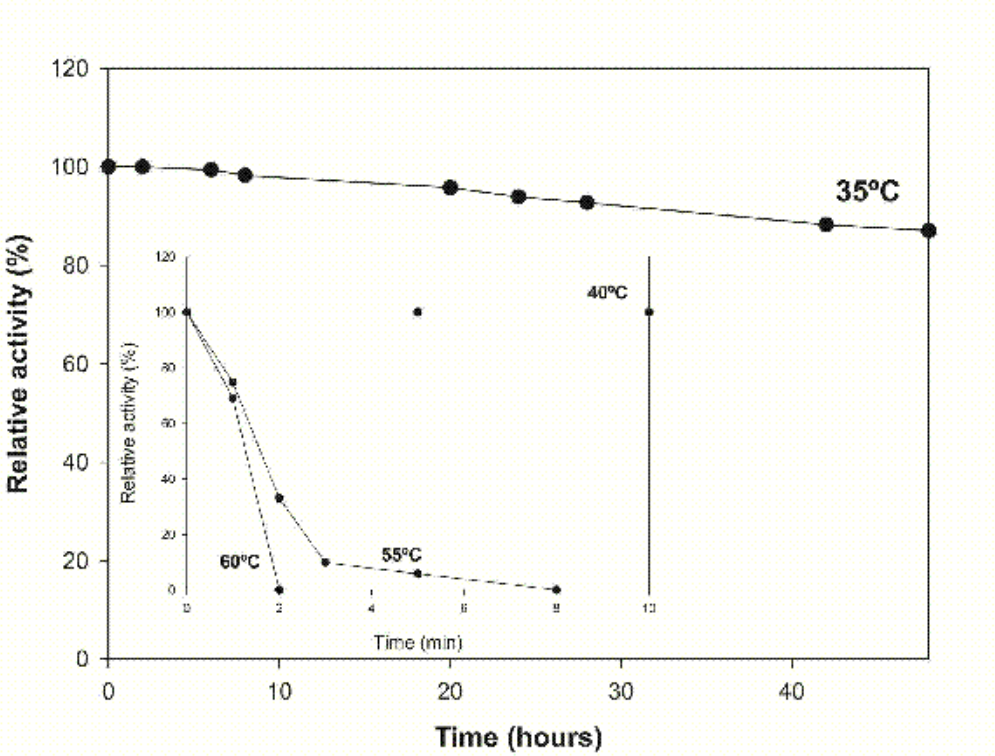


Figura 8.6: Estabilidad de BhCE frente a diferentes temperaturas. Se incubó la enzima durante diferentes periodos de tiempo y temperatura. La figura interior muestra la estabilidad a 40, 55 y 60 °C durante tiempos más cortos (min). Tras la incubación, se midió la actividad residual mediante el método de medida estándar con 0.8 mM *p*-NPCaprilato, 25 °C y pH 8.0.

Respecto al efecto del pH en la actividad enzimática, el pH óptimo de la enzima fue de 8.0, con *p*-NPCaprilato como sustrato (Figura 8.7). También se estudió la estabilidad de la enzima frente a diferentes pHs tras 24 y 48 horas de incubación a 30 °C (Figura 8.8), observándose que BhCE es bastante estable en rangos de pH 7.5-9.5 tras 24 horas (Figura 8.8, círculos llenos). Tras 48 horas, su estabilidad descendió a pHs superiores a 8.0, pero aún retuvo el 21% de su actividad a pH 10.5 (Figura 8.8, círculos vacíos). En los diferentes ensayos enzimáticos, se tuvo en cuenta tanto la autohidrólisis del sustrato como la variación del coeficiente de extinción molar del producto (*p*-nitrofenol) con el pH (ver Materiales y Métodos, apartados 9.2).

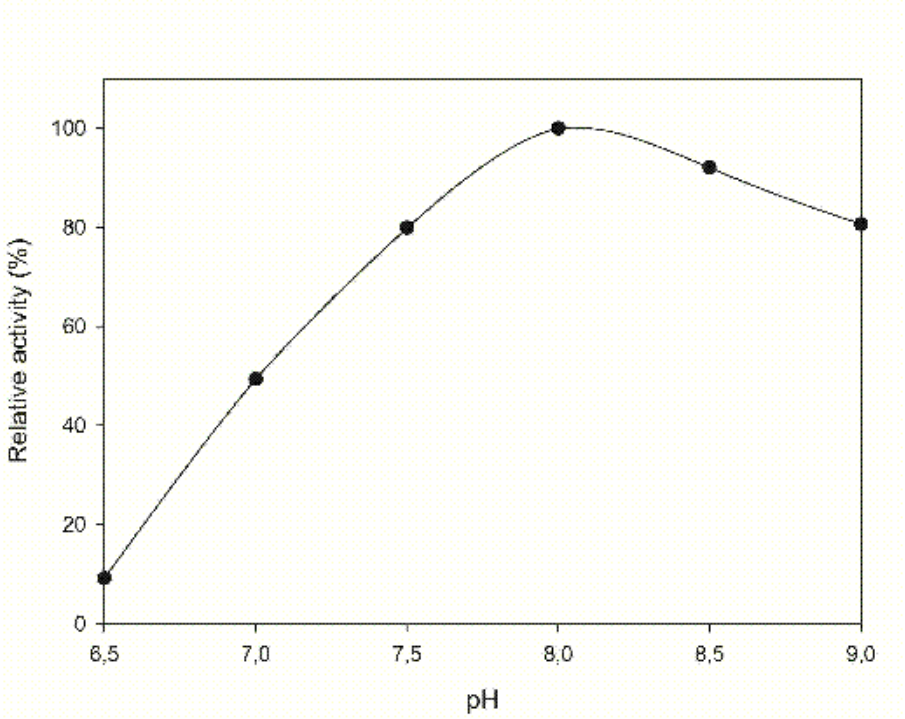


Figura 8.7: pH óptimo de BhCE. Se midió la actividad con 0.8 mM *p*-NPCaprilato, 25 °C y a diferentes pHs en los siguientes tampones (50 mM): fosfato potásico (pH 6.5-7.5), Tris-HCl (pH 8.0-9.0).

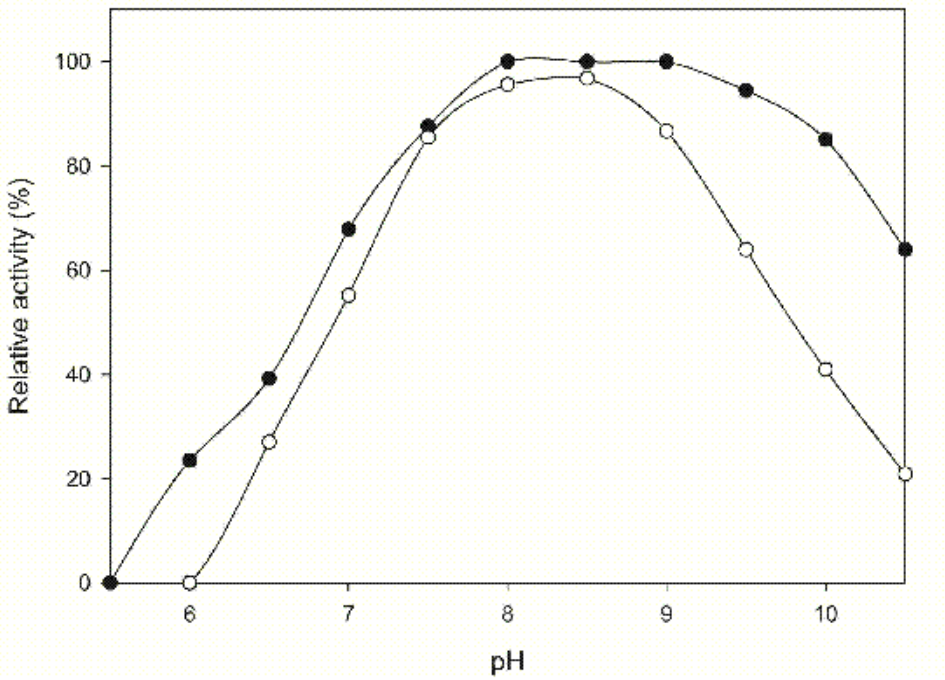


Figura 8.8: Estabilidad de BhCE a diferentes pHs. La enzima se incubó durante 24 (•) y 48 h (o) en los siguientes tampones (50 mM): acetato sódico (pH 5.5), fosfato potásico (pH 6.0-7.5), Tris-HCl (pH 8.0-9.5) y ácido bórico (pH 10-10.5). Se midió la actividad residual mediante el método de reacción estándar con 0.8 mM *p*-NPCaprilato, 25 °C y pH 8.0.

2.3.2. Efecto de los iones

Los posibles efectos de cationes divalentes sobre la actividad enzimática de BhCE purificada fueron analizados (Tabla 8.3). En su presencia, apenas se observaron cambios en la actividad de BhCE. El agente quelante EDTA tampoco afectó la actividad, por lo que se concluyó que BhCE no es una metaloproteína, al igual que la mayoría de carboxilesterasas.

Tabla 8.3: Efecto de cationes divalentes en la actividad de BhCE, antes y después de añadir EDTA. Se incubó BhCE purificada durante 30 min a 30 °C en 50 mM Tris-HCl pH 8.0 en presencia de 5 mM de diferentes cationes, y posteriormente se incubaron con 10 mM de EDTA. Se midió la actividad residual mediante el método de medida estándar con 0.8 mM *p*-NPCaprilato, 25 °C y pH 8.0.

	Actividad relativa (justo al añadir iones)	Actividad relativa (tras 30 min de incubación)	Actividad relativa (tras 60 min de incubación con EDTA)
$NiSO_4$	108 ± 4	93 ± 1	92 ± 3
$MgCl_2$	104 ± 2	94 ± 5	94 ± 6
$FeSO_4$	104 ± 2	94 ± 1	95 ± 2
$CoCl_2$	115 ± 3	101 ± 2	92 ± 3
$CaCl_2$	112 ± 2	100 ± 5	91 ± 6
$ZnSO_4$	110 ± 5	90 ± 4	101 ± 6
$MnCl_2$	105 ± 2	93 ± 3	95 ± 3

2.3.3. Efecto de inhibidores

BhCE se inhibió fuertemente en presencia de dietilpirocarbonato (DPC) y fenilmetilsulfonil fluoride (PMSF), tanto a 0.5 como a 5 mM (Tabla 8.4), indicando respectivamente, la importancia de histidina y serina en su catálisis. Los efectos tras la incubación con fenilglioxal-fosfato, PGO (que se une a la arginina) o piridoxal-5´-fosfato, PLP (que se une a Lys) fueron menores, mostrando una menor implicación de estos aminoácidos. El paraoxon, un organofosfato (insecticida), inhibió drásticamente la enzima, mientras que la Eserina no lo hizo. Este patrón de inhibición permite clasificar a BhCE dentro del grupo de las Serin-esterasas (B-esterasas o carboxilesterasas EC 3.1.1.1), (Cohen y col., 1956; Park y col., 2006), al igual que su aparente homóloga, GkCE, descrita en el capítulo VII.

Tabla 8.4: Efecto de diferentes compuestos inhibidores[5].

	Concentración		
	0.5 mM	***5 mM***	***Aminoácido inhibido***
PMSF	0	0	Ser
PGO	79 ± 6	74 ± 3	Arg
PLP	99 ± 1	100 ± 1	Lys
DPC	0	0	His
Eserina	85 ± 2	108 ± 5	
Paraoxon	0	0	

[5]La actividad residual se midió mediante el método de medida estándar con 0.8 mM *p*-NPCaprilato, 25 °C y pH 8.0, tras 30 min de incubación a 30 °C.

2.3.4. Efecto de diferentes compuestos desnaturalizantes

La estabilidad de BhCE fue estudiada tras incubar la enzima purificada en presencia de diferentes agentes desnaturalizantes (Tabla 4.5). Así, un pequeño incremento en la actividad fue observado con Triton X-100 o Tergitol, llegando incluso al 135% de actividad, tras incubar con 5% de Tergitol (p/v). Sin embargo, el Tween 20 inhibió fuertemente la enzima al 5% (p/v), mostrando sólo el 65% de actividad residual.

La actividad enzimática también se vio alterada tras la incubación de la enzima purificada en diferentes disolventes orgánicos (Tabla 4.5). Únicamente se observó activación tras la incubación en presencia de 40% DMSO, aunque mayores concentraciones inactivaron también la enzima. El DMSO se usa comúnmente para diluir proteínas, y puede producir desnaturalización de proteínas (Bhattacharjya y Balaram, 1997) o estabilizarlas (Rajendran y col., 1995), también se han descrito casos de inhibición (Kleifeld y col., 2000) y activación enzimática. Simon y col. (1998) observaron un comportamiento de activación parecido al de BhCE en otra hidrolasa diferente, frente a la misma concentración de este disolvente orgánico pero sin aportar explicación alguna. Por último, la urea inactivó a BhCE, a 1 M tras una hora en un 40%. Este último resultado, junto con los descritos anteriormente para los disolventes orgánicos, indican que BhCE tiene alta estabilidad en condiciones extremas.

Tabla 4.5: Efecto de diferentes compuestos desnaturalizantes en BhCE. Se incubó la enzima durante una hora a 30 °C en presencia de dos concentraciones de estos compuestos. La actividad residual se midió mediante el método de medida estándar con 0.8 mM *p*-NPCaprilato, 25 °C y pH 8.0.

	Actividad relativa (%)		**Actividad relativa (%) tras incubar 60 min at 30 °C**	
Detergente	*1%*	*5%*	*1%*	*5%*
Tween 20	96 ± 4	84 ± 3	77 ± 4	65 ± 3
Triton X-100	95 ± 4	103 ± 8	103 ± 2	117 ± 6
Tergitol	95 ± 4	90 ± 1	139 ± 8	135 ± 6
	0.5%	*2%*	*0.5%*	*2%*
SDS	90 ± 4	9 ± 2	22 ± 2	6 ± 1
	0.1%	*5%*	*0.1%*	*5%*
CTPB	90 ± 5	53 ± 6	80 ± 8	62 ± 7
Disolvente orgánico	*40%*	*90%*	*40%*	*90%*
Metanol	82 ± 2	28 ± 1	0	0
Etanol	80 ± 3	71 ± 4	0	0
Acetona	74 ± 4	74 ± 2	3 ± 2	5 ± 2
2-propanol	76 ± 2	70 ± 4	0	0
DMSO	143 ± 6	40 ± 5	125 ± 4	0
Urea	*1M*	*4M*	*1M*	*4M*
	102 ± 5	85 ± 4	60 ± 4	4 ± 2

2.4. Complejos Ketoprofeno metil ester-Ciclodextrinas

El diagrama de fases que refleja la solubilidad del (R, S)-ketoprofeno metil ester (KPME) en presencia de HP-β-ciclodextrinas (CD) se realizó siguiendo el método de Higuchi y Connors (1965). La Figura 8.9 muestra una relación no lineal entre la concentración de CDs y la cantidad de KPME solubilizado. Szetjtli (1982) describió los distintos tipos de diagramas de fases posibles entre una molécula huésped y ciclodextrinas. El diagrama obtenido para los complejos [KPME-HP-β-CD] correspondería según su descripción, con el tipo A_P, que indica una estoiquiometría superior a 1:1. Por similitud con otros diagramas encontrados en la bibliografía (López-Nicolás y col., 1995; Lucas-Abellán, 2008), asumimos que por cada molécula de KPME se unen dos moléculas de CD, relación 1:2. De este modo, se pueden calcular las constantes de equilibrio entre el KPME unido a CDs y el libre, suponiendo que las moléculas de CDs se unen secuencialmente a una de KPME (López-Nicolás y col., 1995).

Asumiendo esto, el equilibrio entre KPME y HP-β-CDs se expresa tal que así:

$$[\mathrm{KPME}]_l + [\mathrm{CD}]_l \overset{K_1}{\Leftrightarrow} [\mathrm{KPME-CD}] \quad (1)$$

$$[\mathrm{KPME-CD}] + [\mathrm{CD}]_l \overset{K_2}{\Leftrightarrow} [\mathrm{KPME-CD_2}] \quad (2)$$

Donde "*l*" hace referencia a la concentración del compuesto *libre*. Las constantes de complejación K_1 y K_2 se definen como:

$$K_1 = \frac{[\mathrm{KPME-CD}]}{[\mathrm{KPME}]_l\,[\mathrm{CD}]_l} \quad (3)$$

$$K_2 = \frac{[\mathrm{KPME-CD_2}]}{[\mathrm{KPME-CD}][\mathrm{CD}]_l} \quad (4)$$

El balance de materia para el KPME y CDs en solución acuosa se puede describir mediante la siguiente ecuación:

$$[\mathrm{KPME}]_t = [\mathrm{KPME}]_l + K_1\,[\mathrm{KPME}]_l[\mathrm{CD}]_l + K_1K_2\,[\mathrm{KPME}]_l[\mathrm{CD}]_l^2 \quad (5)$$

El $[\mathrm{KPME}]_l$ es la solubilidad del compuesto en agua en ausencia de CDs, es decir la cantidad mínima medible sin CDs. Así, $[\mathrm{KPME}]_t$ es la concentración *total* detectable, es decir la suma de la soluble y de la encapsulada en CDs en forma de complejos 1:1 y 1:2.

Se puede entonces deducir la concentración de ciclodextrinas libres (ecuación (6)) a partir de la ecuación (3) y (4):

$$[\mathrm{CD}]_l = -(1 + K_1[\mathrm{KPME}]_l) + \frac{\sqrt{((1+K_1\,[\mathrm{KPME}]_l)^2+(4K_1K_2[\mathrm{KPME}]_l[\mathrm{CD}]_t))}}{2K_1\,K_2[\mathrm{KPME}]_l} \quad (6)$$

Si ajustamos mediante regresión no lineal los datos del diagrama de fases representado en la Figura 8.9 a la ecuación (5), pero dónde las [CDs] libres son expresadas en función de las ciclodextrinas totales según la ecuación (6), y la $[\mathrm{KPME}]_l$ es igual a la solubilidad de KPME sin ciclodextrinas (100 µM), los valores de complejación para los complejos 1:1 (K_1) y 1:2 (K_2) obtenidos fueron 483 M^{-1} y 476 M^{-1}, respectivamente.

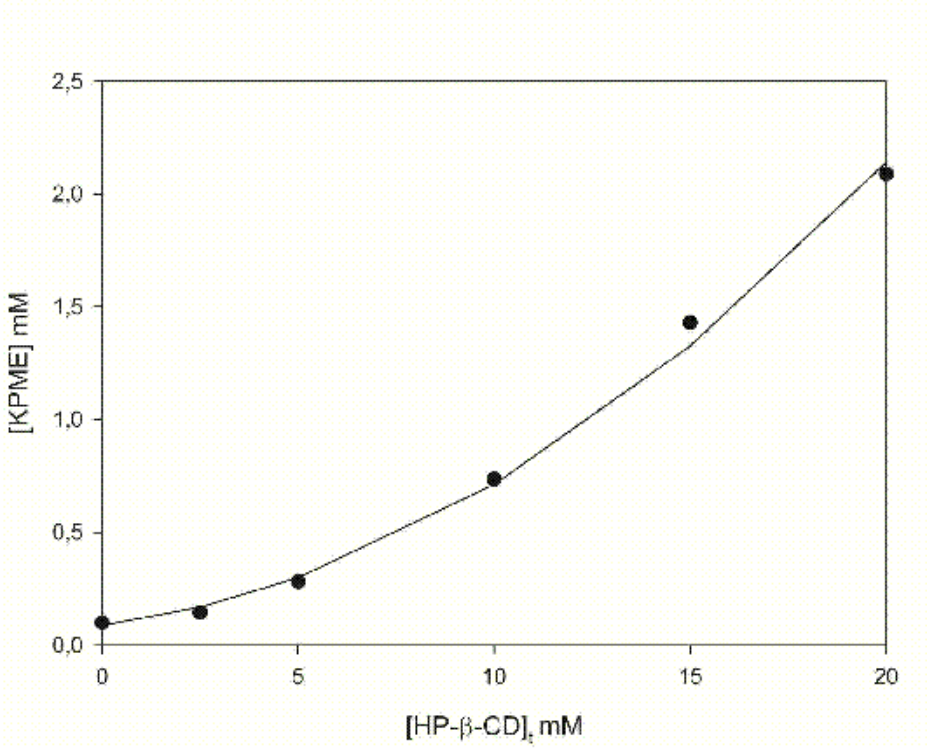


Figura 8.9: Diagrama de solubilidad para el (R, S)-ketoprofeno ME en presencia de las HP-β-ciclodextrinas tras 5 días de agitación a 25 °C en 100 mM tampón pirofosfato potásico, pH 8.0.

Una propiedad interesante de los complejos [KPME-CD] es que suponen un "almacen" de KPME para la enzima. Conforme el KPME va siendo hidrolizado por la enzima, los complejos liberan gradualmente KPME al medio para que se cumplan los equilibrios, de forma que siempre exista la misma concentración de KPME libre y soluble. De tal manera que en presencia de CDs, la velocidad de la reacción fue constante, no sufre la deceleración típica al disminuir el sustrato presente y soluble en la solución (Figura 8.10), lo cual permitió evidentemente un porcentaje de conversión mayor para el mismo tiempo de reacción. Además, como las CDs no son simétricas, complejan los compuestos de una mezcla racémica de forma selectiva (Mine y col., 2003; Bicchi y col., 2010), ello permite alterar la proporción de isómero frente a otro disponible para la enzima. En este caso, para una misma conversión (18%), el ee_p de la reacción disminuyó de 63 a 57 con CDs, lo cual significa que complejan con mayor afinidad el (S)-éster, no estando disponible así para la enzima. Estas pequeñas diferencias pueden, sin embargo, ser útiles en la transformación estereoespecífica de KPME con una enzima más activa sobre el R-ester que sobre el S-ester, como podría ser YICE, ya que favorecería ligeramente la transformación del (R)-KPME.

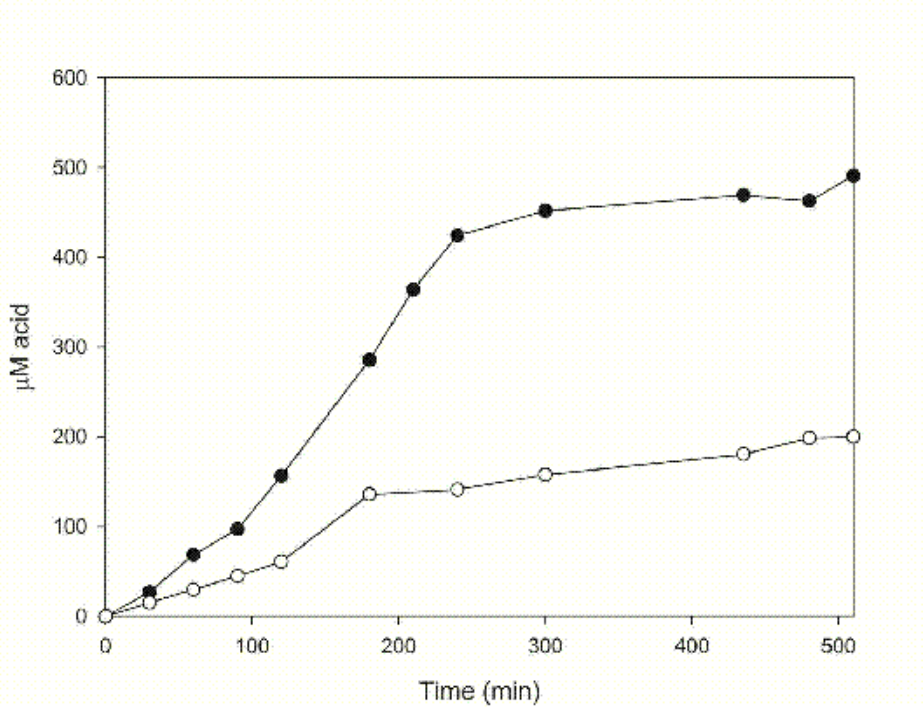


Figura 8.10: Hidrólisis en el tiempo de KPME por BhCE en ausencia de CDs (--) y en presencia de KPME complejado en HP-β-CD (línea continua). El medio de reacción a 30 °C contenía 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 200 µg de BhCE purificada, 600 µM KPME libre (o) o 600 µM KPME total pero complejado con HP-β-CDs (•).

2.5. Determinación de la estructura molecular

En la Figura 8.2, se muestra el alineamiento de las cuatro enzimas emparentadas pertenecientes a la nueva familia descrita en el capítulo VII, y BhCE de *B. halodurans* C125 con 70% de homología con ellas. Además, se alinean otras carboxilesterasas del género *Bacillus*, con 69% de homología para BhCE. Gracias a esta Figura se dedujeron los aminoácidos implicados en la catálisis (representados con triángulos). La Ser93, se encuentra en una secuencia consenso GLSLG, localizada topológicamente al final de la hebra β4, formando el clásico codo nucleofílico. Los otros dos aminoácidos del centro activo, Asp192 e His222, están alejados de esta serina activa en la secuencia primaria, pero próximos en la secuencia terciaria de la proteína.

La estructura tridimensional de BhCE no ha sido aún descrita, por lo se realizó el modelado estructural de esta proteína monomérica tomando como molde la Est30 de *G. stearothermophilus* (código PDB: 1TQH) con un 70% de homología, la estructura obtenida presentó un valor de *E-value* (*Expectation value*) de 4.38519e ^{101}, cuanto más bajo es este dato, más fiable es el modelado. La Figura 8.11 muestra el modelo obtenido, con los aminoácidos del centro catalítico embebidos en el interior de una cavidad formada por el extremo C-terminal de

hebras β. El Asp192 y la His222 se localizan al final de de las hebras β6 y β7, respectivamente. La estructura se compone de 6 hebras β paralelas y una antiparalela, alternadas con hélices α, a modo de sándwich α/β/α (Figura 8.11 A-B), de nuevo, estructura típica de las α/β hidrolasas (Cycler y col., 1993).

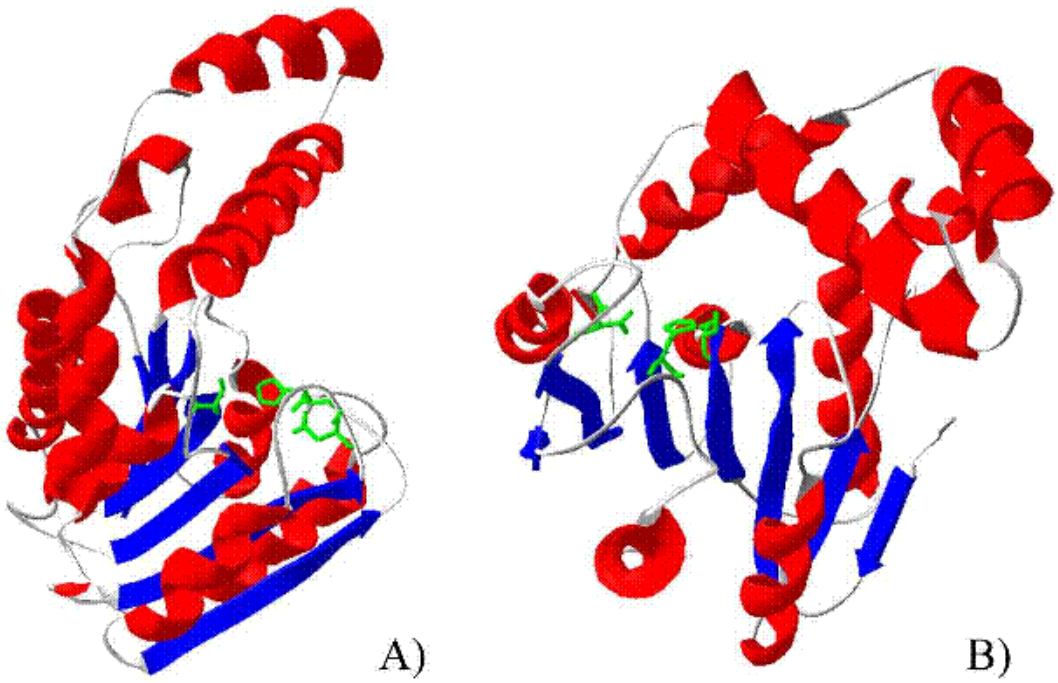


Figura 8.11: Modelo de la estructura tridimensional de BhCE, tomando como molde Est30 de *G. stearothermophilus* (código PDB: 1TQH). A y B representan dos posiciones del mismo modelo. Los aminoácidos del centro activo se señalan en verde. Las figuras se realizaron con el programa SWISSMODEL.

En la Figura 8.11 se pueden observar dos subdominios de BhCE. El mayor dominio se compone del clásico sándwich α/β/α con 6 hebras β paralelas y una antiparalela a las demás (la primera) rodeado de hélices α. En el extremo C-terminal de esa lámina β-central, y sobre las hélices α que forman parte del primer dominio, se disponen otras 3 hélices α, ya en las zonas más externas de la proteína (Figura 8.11). Este último dominio más pequeño se denomina, como en el capítulo anterior, caperuza de la carboxilesterasa, y se conserva también en las cuatro enzimas del género *Geobacillus*.

La familia 102623 de la superfamilia α/β hidrolasas, de acuerdo con la base de datos SCOP, se compone, hasta la fecha, de exclusivamente dos carboxilesterasas, la Est30 *de G. stearothermophilus* (código PDB: 1TQH) y la carboxilesterasa de *B. stearothermophilus* (código PDB: 1R1D). Se representaron a continuación, los diagramas topológicos de ambas proteínas (Figuras 8.12 B-C), junto con los de

otras enzimas alineadas en la Figura 8.2. En todos los casos se observó un orden similar en la lámina β central (Figura 8.12). Anteriormente, 1TQH y GkCE se clasificaron en la misma familia por sus similitudes estructurales (capítulo VII), 1R1D presenta un 99% y 97% de homología con 1TQH y GkCE, respectivamente, por lo que también pertenecería a esta familia de carboxilesterasas. Además, al igual que en estas otras tres esterasas anteriores, la lámina β central de BhCE sigue el mismo orden (7-6-5-4-2-3-1) (Figura 8.12 A), y presenta dos dominios bien definidos (Figura 8.11). Las caperuzas de 1TQH, 1R1D y GkCE están formadas por las hélices α 2, 5 y 6 (Figura 8.12 B-D), y se distribuyen en el extremo C-terminal de la lámina β central. Las proteínas BhCE y BcCE, carboxilesterasa de *B. cereus* (proteína no cristalizada, diferente a 2H1I del capítulo VII) están, por lo tanto, estructuralmente emparentadas con las enzimas anteriores (Figura 8.12 A y E, respectivamente).

Topológicamente, existen pequeñas diferencias entre ambas enzimas y GkCE. BhCE presenta la hélice α6 de la caperuza desplazada bruscamente hacia la derecha, mientras que, en BcCE se desplaza hacia el lado izquierdo. Este hecho podría ser el responsable de unas mayores eficiencias catalíticas (k_{cat}/K_M) de BhCE sobre ésteres de *p*-NP, con respecto a GkCE, ya que al abrirse la caperuza, el sustrato se liberaría y se introduciría en el interior de la cavidad más rápidamente en BhCE. Se representaron, a continuación, los centros activos cubiertos de la caperuza para ambas proteínas, con el fin de corroborar la relación entre el movimiento de la hélice α6 y la afinidad de sustrato de estas enzimas (Figura 8.13 A-B). Mientras que el hidroxilo de la Ser93 de GkCE estaba a 17 Å del extremo C-terminal de la hélice α6 de la caperuza, el de BhCE estaba a 20.8 Å, la hélice α6 se había desplazado, por lo tanto, 3.8 Å hacia arriba. De ahí que los diagramas topológicos presentaran pequeñas diferencias en la orientación de la hélice α6 y que, los sustratos se sitúen con mayor facilidad en esta última cavidad.

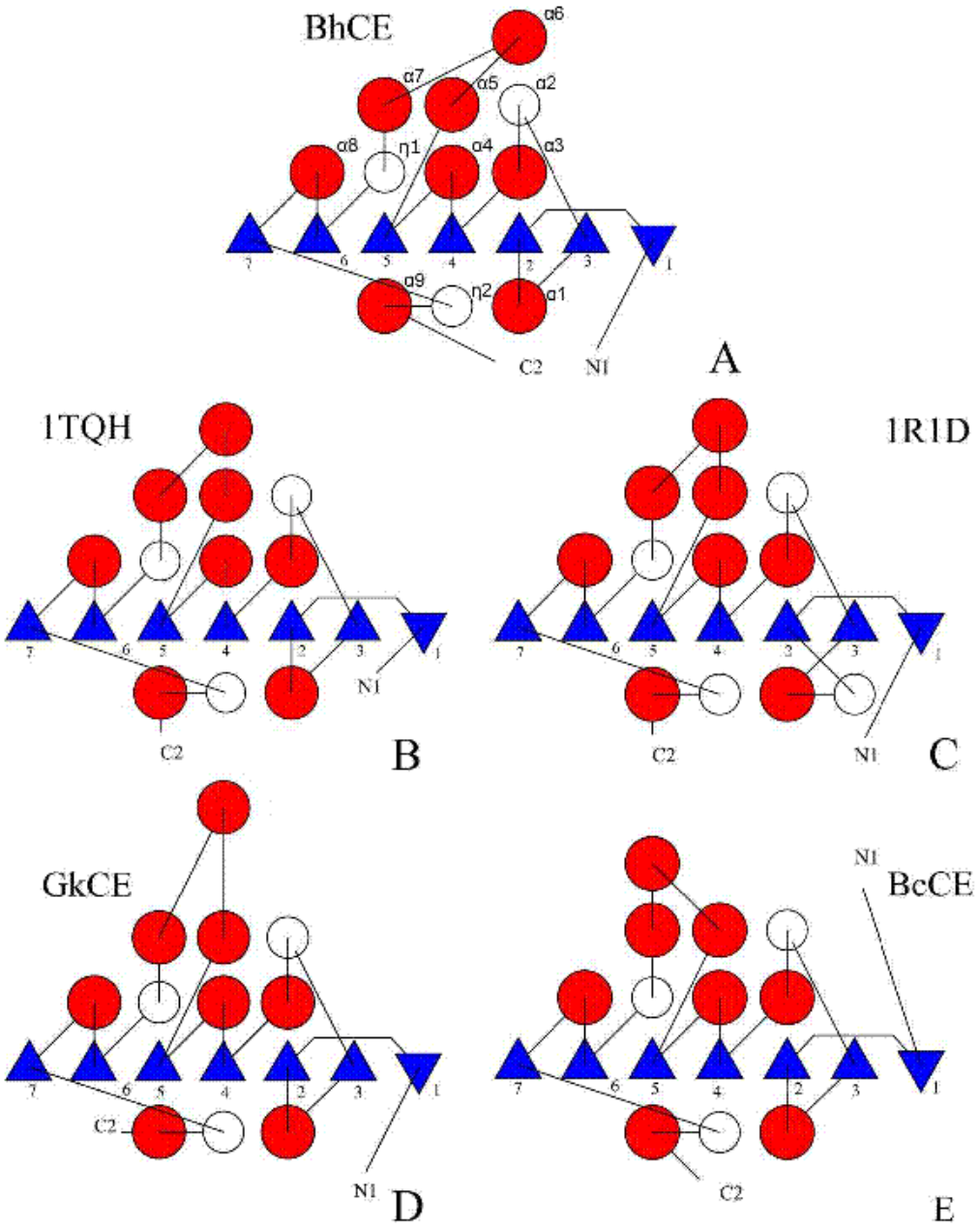


Figura 8.12: Diagramas topológicos de BhCE de *B. halodurans* C125 y otros miembros de la familia descrita en el capítulo VII. (A) Diagrama de la carboxilesterasa BhCE de *B. halodurans* C125. (B) Diagrama de Est30 de *G. stearothermophilus* (código PDB: 1TQH). (C) Diagrama de la carboxilesterasa de *B. stearothermophilus* (código PDB: 1R1D). (D) Diagrama de la carboxilesterasa de *G. kaustophilus* HTA426 (GkCE). (E) Diagrama de la carboxilesterasa de *B. cereus* (BcCE). Las hélices α y hebras β se representan con círculos y triángulos, respectivamente. Los círculos blancos representan hélices 3_{10}. Los diagramas se obtuvieron mediante el programa TOPS (Michalopoulus y col., 2004).

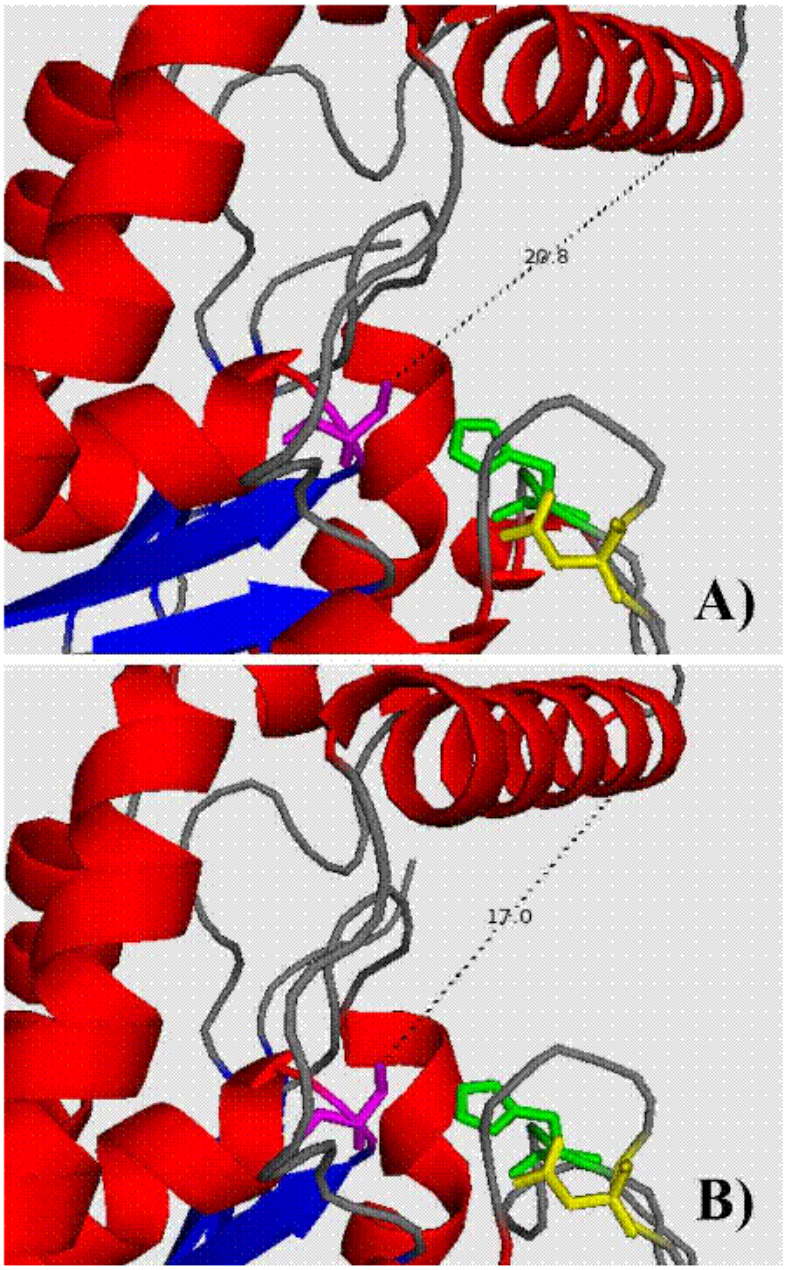


Figura 8.13: Centro activo de A) BhCE y B) GkCE, con los aminoácidos del centro activo en color, Ser (violeta), Asp (amarillo) e His (verde). Se calcula la distancia en Å desde el hidroxilo de la Ser al extremo C-terminal de la hélice α-6. Las figuras se realizaron con el programa PyMOL (DeLano, 2002).

3. Discusión

Pequeños cambios en la secuencia primaria de las proteínas son responsables de las visibles diferencias estructurales de las proteínas. A continuación, mediante el AutoDock 4.0 (Morris y col., 1998) se determinó el volumen de las cavidades de las dos enzimas cristalizadas de esta familia 1TQH y 1R1D (Figura 8.14). A pesar de que ambas proteínas presentaban un 99% de homología y prácticamente ninguna diferencia en la estructura primaria y secundaria, el volumen calculado para los

PDBs descargados directamente de la página del *Protein Data Bank* (no se trata, por lo tanto, de modelados), fue de 264,7 $Å^3$ para 1TQH y tan sólo 152 $Å^3$ para 1R1D, es decir la primera cavidad era casi dos veces mayor que la segunda. Los datos volumétricos de las cavidades son similares a los del compartimento, dónde se encuentran los aminoácidos del centro activo, de una quimotripsina, 260-340 $Å^3$ (Kostetsky, 2007).

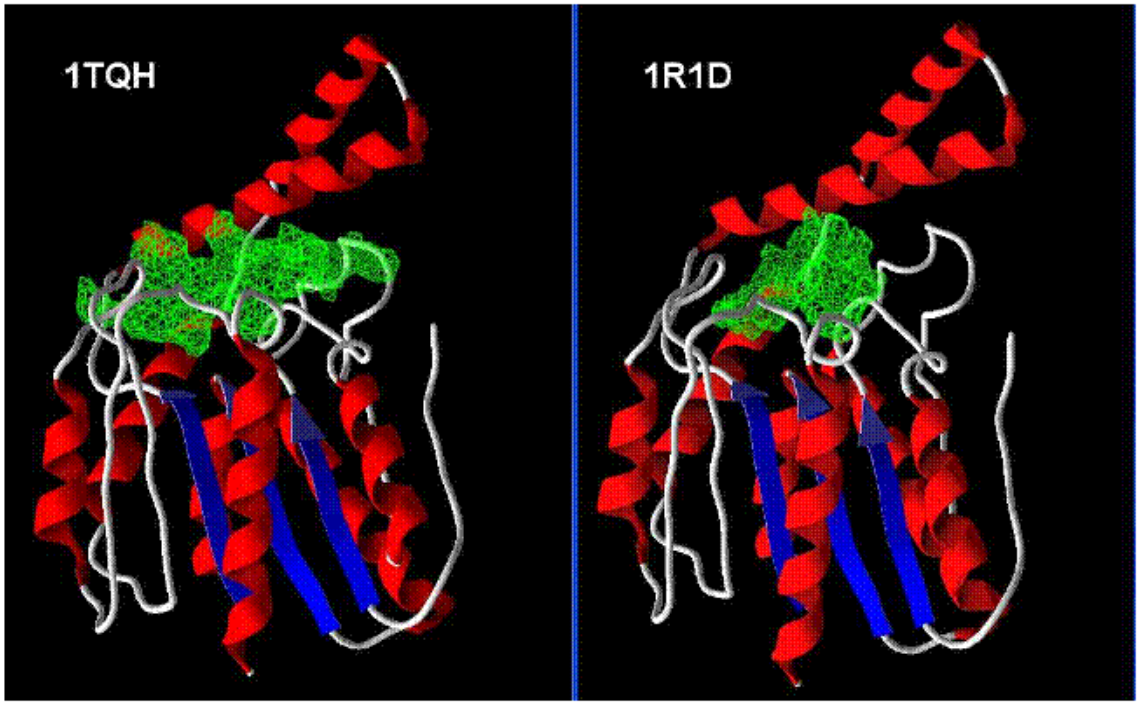


Figura 8.14: Cálculo del volumen de la cavidad interna de las carboxilesterasas de *G. stearothermophilus* (código PDB: 1TQH) y de *B. stearothermophilus* (código PDB: 1R1D). Ambas proteínas poseen un 99% de homología, pero notables diferencias en el volumen de su cavidad (señalada en verde). El cálculo se realizó mediante el programa informático AutoDock 4.0.

En la búsqueda de una posible explicación a este notable cambio estructural, se superpusieron las estructuras moleculares de 1TQH y 1R1D, observándose que la cadena lateral de la Lys122 de 1R1D, se encontraba bruscamente girada de 6.4 Å hacia el interior de la cavidad (Figura 8.15, flecha roja), mientras la misma cadena lateral de 1TQH está a aproximadamente 60 ° de la anterior, dejando una cavidad mayor. En la secuencia de aminoácidos de ambas proteínas, se produjo una única mutación anterior a esa K122, el Glu78 de la hélice α3 de 1TQH se cambiaba por una Gln en 1R1D, y sus cadenas laterales se encontraban a apenas 1.8 Å (Figura 8.15 B). Lo importante es que, este cambio producía un efecto aditivo en la estructura terciaria de ambas proteínas, ya que mientras la cadena lateral de la Lys80 de ambas proteínas se encuentra a tan sólo 3.7 Å, en la Lys122, el giro es ya de 6.4 Å, introduciéndose en el interior de la cavidad de 1R1D pero 60° más hacia el exterior en 1TQH (Figura 8.15 B), limitando así la cavidad de 1R1D. Los residuos

78 y 122 de 1TQH y 1R1D corresponderían con los residuos 77 y 121 de BhCE, ya que esta última proteína presenta una sola metionina aminoterminal, y no dos como 1TQH o 1R1D (Figura 8.2).

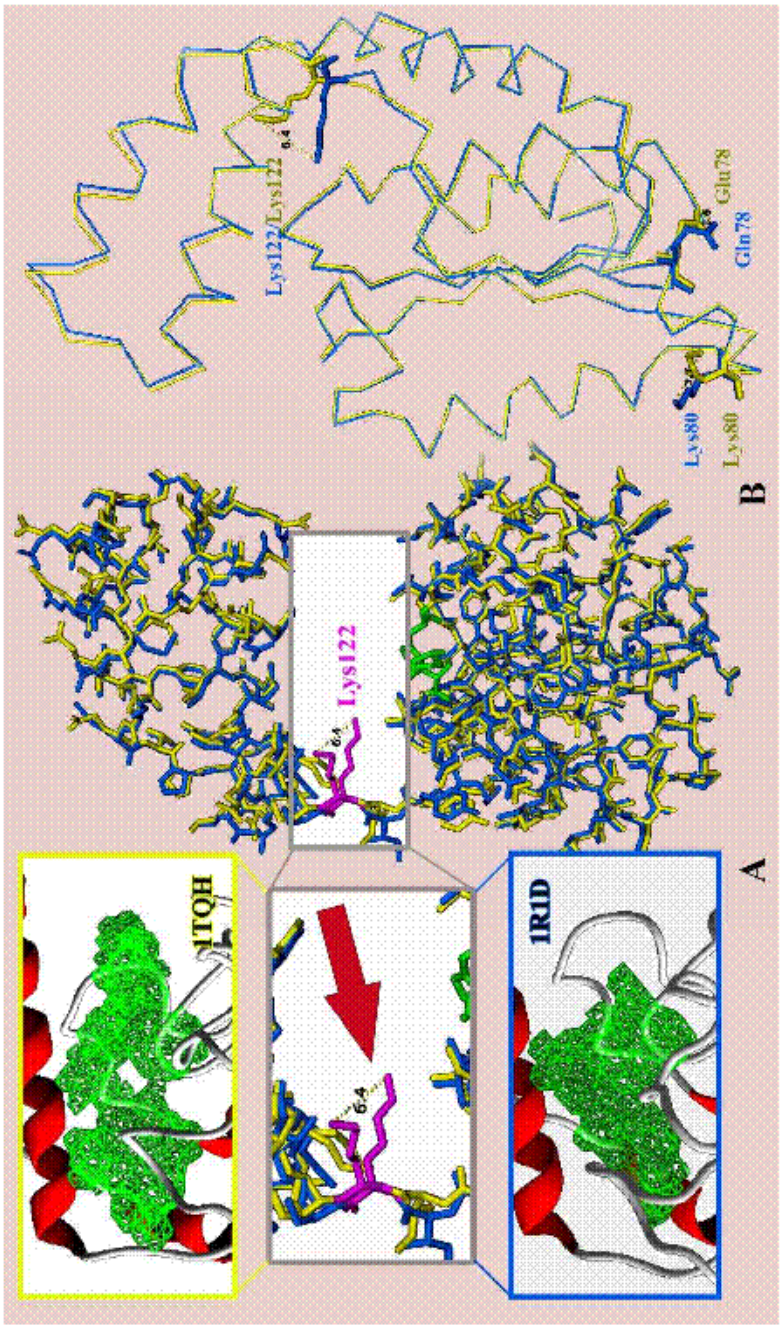


Figura 8.15: Superposición de las carboxilesterasas de *G. stearothermophilus* (código PDB: 1TQH, en amarillo) y de *B. stearothermophilus* (código PDB: 1R1D, en azul). A) Se representan los residuos de las estructuras, y las ampliaciones de ambas cavidades con las Lys122 separadas por 6.4 Å en violeta. B) Otro corte diferente de las estructuras, se representa el esqueleto de la proteína (C_α) con los residuos Glu78, Lys80 y Lys122 de 1TQH en amarillo y los residuos Gln78, Lys80 y Lys122 de 1R1D en azul. Las figuras se realizaron con el programa PyMOL (DeLano, 2002).

Para comprobar si este efecto se daba en otros miembros de la familia mostrada en la figura 8.2, se modelaron el resto de proteínas, usando la página Geno3D. El volumen de la cavidad de BhCE fue de 255 $Å^3$, de 224 $Å^3$ para GtEst30, de 252 $Å^3$ para BcCE, de 272 $Å^3$ para BpCE, de 192 $Å^3$ para BaCE, de 243 $Å^3$ para BlCE y de 207 $Å^3$ para BtCE. Los valores anteriores fueron muy diferentes a los de las cavidades de 1R1D, GkCE, y GtEstA, con 152, 136 y 139 $Å^3$, respectivamente. Sin embargo, sólo dos de estas enzimas poseían un Glu en la posición 78 y que permitía el giro de la cadena lateral de la Lys122, por lo que además de este residuo, debían existir otras variaciones en la secuencia primaria que permitieran extender la cavidad.

Comprobando la secuencia primaria y el volumen de estas cavidades, se dedujo que la posición 180 de la secuencia primaria de estas proteínas podría estar, a la vez que la Lys122, implicada en las variaciones de volumen. El aminoácido de esta posición presentaba una distribución similar al de las cavidades. Las enzimas con cavidad grande presentaron todas una isoleucina en la posición 180 (Figura 8.2, marcado en amarillo), al final de la hélice η1 y justo antes de la hebra β6. Mientras que las enzimas con una cavidad más pequeña presentan una valina en esa misma posición (Figura 8.2, marcado en azul). Esta posición separa el extremo C-terminal de la caperuza (hélice α7 y η1 de la Figura 8.2) de la hebra β6 de lámina β central, formando una bisagra entre ambas regiones (Figura 8.16). La presencia de uno u otro aminoácido en esta posición fuerza un pequeño desplazamiento de la hélice α8 pero apenas se producen cambios en la lámina β central. La Figura 8.16 representa la superposición de la estructura terciaria de cinco proteínas estudiadas (BhCE, 1TQH, BcCE, GkCE y 1R1D) de la zona alterada por este cambio en la posición 180. Como se aprecia en la Figura 8.16 A, la presencia de las isoleucinas de BhCE, 1TQH y BcCE al final de la hélice η1 (en amarillo) no se superpone con la valina de GkCE y 1R1D (en azul). Parecería que la valina orienta la hélice α8 hacia el interior de la estructura (Figura 8.16 B), mientras que las isoleucinas orientan la hélice α8 hacia el exterior, a alrededor 0.5 Å de la hélice α8 de las proteínas con una valina en la posición 180. El extremo N-terminal de la hélice α8 se sitúa al final de la cavidad interna donde se aloja el sustrato, delimitando por lo tanto su profundidad, por lo que efectivamente la existencia de una bisagra (posición 180) que orienta la hélice α8 estaría afectando al volumen de la cavidad, e indirectamente a la eficiencia catalítica. La presencia de estos residuos en la posición 180 supone la única diferencia conservada y repetida en ambos grupos BhCE/1TQH/GtEst30/BcCE/BtCE/BpCE/BaCE/BlCE frente a GkCE/1R1D/GtEstA, no obstante, no se descarta la existencia de otras características que contribuyan a la ordenación de la cavidad, aunque no tan evidentes como el giro en la Lys122 o el cambio Ile180/Val180.

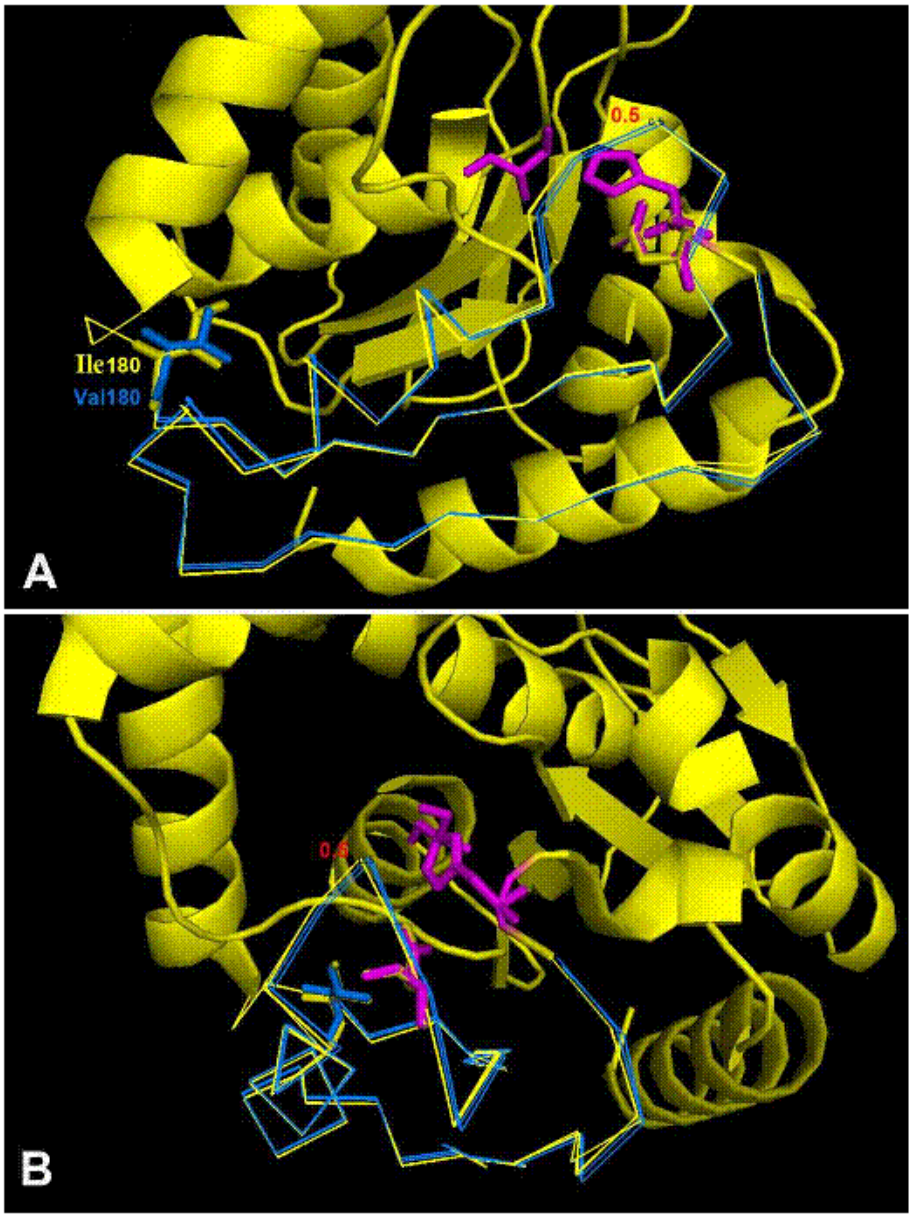


Figura 8.16: Superposición del esqueleto (C_α) desde el residuo 180 al 221 de cinco carboxilesterasas de la misma familia BhCE, 1TQH, BcCE, GkCE y 1R1D. El resto de la estructura amarilla corresponde a 1TQH. En amarillo se representa la estructura de 1TQH, BhCE y BcCE, en azul la de 1R1D y GkCE. La Ile180 se señala en amarillo mientras que la Val180 en azul. A) y B) representan dos vistas diferentes de estas estructuras, dónde se aprecia la aproximación de 0.5 Å de la hélice α8 al centro activo (en violeta). Las figuras se realizaron con el programa PyMOL (DeLano, 2002).

A continuación, se realizó un estudio filogenético con el método *neighbor-joining* (Saitou y Nei, 1987), para verificar las relaciones de proximidad evolutiva entre las proteínas con estructuras similares, conociendo tan sólo su secuencia primaria (Figura 8.17). El análisis filogenético de las diferentes carboxilesterasas de los géneros *Bacillus* y *Geobacillus* estudiadas, demostró que, aunque todas estas enzimas se encuentran muy emparentadas, las enzimas con la Val180 se agrupan

en una subclase claramente separada de las enzimas con la cavidad más grande, es decir, con una Ile180.

Los resultados del presente capítulo muestran que pequeños cambios en la secuencia de aminoácidos de una proteína, incluso en un único residuo específicamente situado, pueden producir notables cambios en la estructura final, e indirectamente alterar la eficiencia catalítica. La enzima 1R1D de *B. stearothermophilus* presentó valores de K_M 10 veces más elevados para ésteres de *p*-nitrofenilo que BhCE, aunque no se han publicado los datos de eficiencia catalítica (Matsunaga y col., 1974). La carboxilesterasa 1R1D, junto con GkCE y BhCE, son las únicas enzimas caracterizadas de las aquí estudiadas. De lo poco publicado se puede deducir que BhCE presenta mayores eficiencias catalíticas para los ésteres de *p*-nitrofenilo, en comparación con GkCE, tal y como se postuló en el apartado de caracterización cinético, estas diferencias podrían deberse a los cambios estructurales aquí descritos. Así pues, este trabajo cuantifica el volumen de la cavidad catalítica de enzimas claramente emparentadas y pertenecientes a la familia descrita en el capítulo anterior, deduciendo la existencia de una subclase con cavidades catalíticas más estrechas. Según nuestro conocimiento, nunca antes se había establecido tal relación entre secuencias primaria, terciaria de una proteína y su eficiencia catalítica, para finalmente, verificar estos datos mediante un análisis filogenético.

Figura 8.17: Análisis filogenético de las CEs estudiadas. Carboxilesterasa de *G. kaustophilus* HTA426 (GkCE); EstA de *G. thermoleovorans* (GtEstA); carboxilesterasa de B. *stearothermophilus* (1R1D); Est30 de *G. stearothermophilus* (1TQH), Est30 de *G. thermodenitrificans* (GtEst30); carboxilesterasa de *B. halodurans* C125 (BhCE); carboxilesterasa de *B. pumilus* (BpCE);

carboxilesterasa de *B. licheniformis* (BlCE); carboxilesterasa de *B. thurigiensis* (BtCE); carboxilesterasa de *B. cereus* (BcCE) y carboxilesterasa de *B. anthracis* (BaCE). Junto al nombre de cada enzima, se añade el valor del volumen de su cavidad (en $Å^3$). El filograma se construyó con el programa Mega 4 mediante el *neighbor-joining method* (Saitou and Nei, 1987).

4. Conclusiones

El gen BH3554 de *B. halodurans* C125 fue clonado, expresado y purificado en *E. coli*. El patrón de especificidad de sustrato y de inhibición sugiere que esta enzima es una carboxilesterasa (EC 3.1.1.1). Además, la enzima mostró actividad sobre el (R, S)-ketoprofeno metil ester siendo 70 veces más estereospecifica para el enantiómero (S). Los complejos [HP-β-CD-KPME] formados suponen un reservorio de sustrato muy útil en aplicaciones industriales ya que liberan gradualmente el compuesto, de acuerdo con las constantes calculadas. Otra consecuencia de este estudio ha sido la identificación de nuevos miembros de la familia descrita en el capítulo anterior, de nuevo, debido a su elevada homología, estructura terciaria y topología. De este modo, BhCE pertenece a la familia de GkCE, recientemente definida, pero presenta propiedades catalíticas diferentes, como por ejemplo, su estereospecificidad por el (S)-ketoprofeno ME y mayor eficacia catalítica frente a otros sustratos. Estas diferencias catalíticas se deben probablemente a pequeñas modificaciones en la secuencia primaria que producen grandes cambios conformacionales al abrir la cavidad de la proteína, aumentando pues su volumen. Finalmente, en base a homología, topología y volumen de cavidad se incorporaron las carboxilesterasas del género *Bacillus sp.* a esta familia; que parecía estar limitada únicamente al género *Geobacillus sp.*, como se postuló en el capítulo anterior. Ambos géneros pertenecen a la familia *Bacillaceae*, por lo que se entendería que aparecieran nuevos representantes de esta familia de carboxilesterasas en otros géneros de la familia *Bacillaceae*.

Capítulo IX

Discusión General

Las α/β hidrolasas constituyen uno de los grupos enzimáticos más amplios y extendidos de la naturaleza. Como se ha comentado anteriormente, presentan gran variedad de especificidades, e incluyen enzimas como lipasas, dienelactona hidrolasas, serin-carboxipeptidasas, acetilcolinesterasas, otras esterasas y muchas más enzimas. En los últimos años, se han publicado numerosas revisiones que intentan explicar cómo, para un mismo núcleo estructural, existe tal diversidad catalítica (Heikimheimo y col., 1999, Nardini y Dijkstra, 1999, Holmquist, 2000; Qian y col., 2007). Incluso se ha creado la valiosa base de datos ESTHER, que aporta continua información sobre secuencias, estructuras tridimensionales y propiedades catalíticas de esta superfamilia (Renault y col., 2005).

La presente Tesis Doctoral estudia dos grupos concretos de α/β hidrolasas, las acetil xilan esterasas (AXEs) y las carboxilesterasas (CEs). Los genes clonados y proteínas expresadas en este trabajo presentan un plegamiento α/β similar en su estructura terciaria, sin embargo, sus centros catalíticos (triada y cavidad) se organizan de forma diferente, lo cual explicaría que AXEs y CEs no catalicen los mismos sustratos. Efectivamente, una de las principales diferencias entre estos dos grupos de enzimas es esa especificidad de sustrato, mientras las AXEs han demostrado ser activas frente a intermedios avanzados de antibióticos β-lactámicos semisintéticos, las CEs son capaces de hidrolizar una mezcla racémica del (R, S) ketoprofeno metil ester, para dar el ketoprofeno, un antiinflamatorio no esteroideo (NSAID). Así pues, los cinco capítulos descritos en esta memoria indagan en las aplicaciones industriales de estas enzimas, a la vez que aportan información estructural que permite aumentar el conocimiento de la relación estructura-función de la superfamilia de α/β hidrolasas en general.

1. Acetil xilan esteresas: estructura e inhibición

La base de datos CAZy (http://www.cazy.org/) describe familias que degradan, modifican o crean uniones glicosídicas. La superfamilia de Carbohidrato Esterasas (CE-) se compone actualmente 16 subfamilias, las AXEs y cefalosporin deacetilasas (CAH) pertenecen a 8 de ellas (CE-1 a 7 y CE-12). Dentro de estas enzimas se encuentra la AXE de *Bacillus pumilus* CECT5072, BpAXE, que pertenece a la familia CE-7, y podría tener importantes aplicaciones en la producción de desacetil-cefalosporinas (Martínez-Martínez y col., 2007).

La estructura de BpAXE, se resolvió mediante difracción de rayos X, al igual que el complejo BpAXE unido covalentemente a un inhibidor suicida, el paraoxon, con 1.9 Å y 2.7 Å de resolución, respectivamente. Para ello se obtuvieron numerosos cristales de buena calidad con la enzima purificada (Figura 4.7). De forma general, se observó la organización básica del plegamiento α/β, típica de las α/β hidrolasas. Al comparar la disposición de las hebras β y hélices α, BpAXE poseía hélices α

insertadas en zonas también clásicas de diversificación de la estructura básica (α/β *fold*). La lámina β central se compone de 9 hebras β, con la segunda antiparalela al resto, la adición de más hebras β en esa hoja parece ser un fenómeno limitado a lipasas (Schrag y col., 1991; Sussman y col., 1991).

Al igual que otros miembros de la superfamilia de α/β hidrolasas, BpAXE presenta una triada catalítica compuesta por una serina nucleofílica (Ser181), una histidina básica (His288) y un residuo ácido (Asp269), muy lejanos en la estructura primaria, pero finalmente, cercanos tras el plegamiento de la proteína. La estructura cuaternaria de BpAXE consiste en un trímero de dímeros, formando así un hexámero de 210 kDa. Esta compleja asociación de monómeros es común en las AXEs (Degrassi y col., 2000; Vincent y col., 2003), aunque la causa no está del todo clara. El hexámero presenta una cavidad central con los centros catalíticos de cada monómero expuestos unos frente a otros (Figura 4.8 A), lo que aparentemente tendría una implicación catalítica.

La triada se encuentra bloqueando la entrada a una cavidad de profundidad limitada por la presencia de la Tyr206. Mediante *docking* de una molécula de palmitato sobre el centro activo de esta enzima, se dedujo que, efectivamente, la Tyr206 suponía un impedimento estérico para la entrada completa de este sustrato y su unión a la serina activa (Figura 4.9). La cadena lateral de este residuo reducía la profundidad de la cavidad hidrofóbica en 4 Å, con respecto a una CE como AeCX1 de *Actinidia erianthia* (Iperuma y col., 2008). Según nuestro conocimiento, nunca antes se había descrito un impedimento estérico que explicara la especificidad de las AXEs para ésteres con ácidos de cadena corta.

A su vez, BpAXE y otras AXEs presentan una gran apertura al exterior y que facilita el acceso hasta el centro activo de sustratos grandes como el 7-ACA o el CPC. Sin embargo, es bien sabido que únicamente el grupo ácido del compuesto penetra en el interior de la bolsa hidrofóbica, en este caso de tamaño limitado. Por lo cual, aunque la proteína se abra al exterior, sólo se hidrolizarán sustratos con ácidos grasos de cadena corta, preferentemente de 3 o 4 carbonos, ya que sustratos más grandes chocarían con la Tyr206 o Pro221, impidiendo la catálisis al no haber contacto entre el grupo hidroxilo de la Ser181 y el grupo éster del sustrato. La apertura del monómero BpAXE y la cavidad central del hexámero, facilitarían de igual forma la rápida liberación de producto, y la entrada de una nueva molécula de sustrato al centro activo. De este modo, la velocidad de catálisis de BpAXE es rápida frente a estos compuestos, cómo se estudió en el capítulo V, la eficiencia catalítica (k_{cat}/K_M) fue de 88.6 $mM^{-1}.min^{-1}$ y 266 $mM^{-1}.min^{-1}$, para el CPC y 7-ACA, respectivamente.

Compuestos inhibidores similares a un determinado sustrato, pero capaces de formar complejos irreversibles con la enzima, son siempre útiles para definir cómo una enzima uniría ese sustrato. Estos complejos cristalizados son ideales en

estudios estructurales, ya que el inhibidor permite determinar los grupos necesarios para el correcto reconocimiento y unión del sustrato por la enzima.

Las α/β hidrolasas presentan un mecanismo de acción muy similar, realizan un ataque nucleofílico del grupo carbonilo del sustrato, se produce entonces un intermediario tetrahédrico covalentemente unido al nucleófilo, y que necesitará de una molécula de agua para ser escindido de la enzima. Si este carbonilo reactivo es reemplazado por un grupo fosfato (por ejemplo, dietil-fosfato), dando un compuesto organofosforado, se fosforila ese nucleófilo, y la hidrólisis rara vez se lleva a cabo. En el caso del paraoxon (dietil-*p*-nitrofenilfosfato), ese grupo fosfato está unido a un grupo *p*-nitrofenilo que se libera durante la formación del intermediario irreversible. Este compuesto ha sido utilizado como inhibidor estructural de numerosas acetilcolinesterasas (Kousba y col., 2004), carboxilesterasas (Febbraio y col., 2008; Levisson y col., 2009) o fosfolipasas (Samanta y col., 2009), incluso se ha descrito una γ-quimitripsina (serin-proteasa, pero no es una α/β hidrolasa) unida a este compuesto (Harel y col., 1991). Determinados autores utilizan este compuesto para la clasificación de esterasas, dividiéndolas así en cuatro grandes grupos (Park y col., 2006; Iperuma y col., 2007). Sin embargo, aunque todas comparten el mecanismo de acción, nunca antes se había inhibido una acetil xilan esterasa en presencia de un organofosfato.

Tras comprobar esta eficiente inhibición (Figura 4.3), se calcularon las constantes cinéticas de la inhibición reversible (K_i) e irreversible (k_i), al fosforilar covalentemente la serina activa (Figura 4.4). Para ello se utilizó el método clásico para inhibiciones irreversibles (Main, 1969; Leytus y col., 1984; Liu y Tsou, 1986), pero modificado en nuestro Departamento (Tudela y col., 1986). En los procedimientos anteriores, se aumentaba la concentración del inhibidor, $[I]_o$, frente a una concentración fija de enzima, $[E]_o$, mientras que Tudela y col. (1986) mantuvieron la relación $[E]_o/[I]_o$ fija en todas las medidas. Esta modificación permite disminuir el error que supone la aparición de concentraciones variables de producto en cada reacción. El valor de la constante de inactivación k_i obtenido mediante esta aproximación, 0.012 s^{-1}, fue hasta 30 veces menor que en otras carboxilesterasas estudiadas (Febbraio y col., 2008; Forsberg y Puu, 1984). Un posterior análisis estructural aportó información sobre ese dato, en comparación con estas carboxilesterasas ya estudiadas.

Así, se cristalizó el complejo BpAXE-paraoxon, la estructura tridimensional resuelta a 2.7 Å, no presentó grandes cambios conformacionales con respecto a la forma nativa, de hecho el *rmsd* fue muy bajo. En la estructura se observó el dietil-fosfato (DEP) unido covalentemente al Oγ de la Ser181. Aunque a nivel general no se produjeron modificaciones estructurales, en el centro catalítico sí aparecieron pequeñas diferencias. La cadena lateral de la Ser181 se desplazó para contactar con el inhibidor, siempre dentro de su restricción de desplazamiento, al

encontrarse en una zona desfavorable del diagrama de Ramachandran. A su vez, los residuos Tyr91, Gly182, Tyr206, Pro221 y Val271 se aproximaron a menos de 4 Å, para estabilizar esa unión (Figura 4.8 B).

Este modo de unión es prácticamente igual que en el resto de las α/β hidrolasas cristalizadas en presencia del inhibidor, aunque con notables diferencias en las distancias entre residuos y DEP. Así, la unión en BpAXE resultó ser más fuerte y tensa que en otras estructuras comparadas, explicando entonces, el bajo valor de k_i obtenido, ya que se necesita de más energía, para acercar los residuos implicados en la unión del DEP. Estas fuertes conexiones pueden deberse también a que el DEP se sitúa levemente girado (60 °) con respecto a otras CEs inhibidas, debido a la presencia de la Tyr206, residuo ausente en otras CEs. En BpAXE, mientras un etilo se adentra en la cavidad hidrofóbica, el otro se sitúa en el exterior (Figura 4.8 B), algo que no ocurre en las CEs cristalizadas y estudiadas. Además, ese residuo limitante podría estar implicado en la especificidad de esta enzima por sustratos con ácidos grasos de cadena corta (Figura 4.9).

Aunque el mecanismo de unión de las enzimas es el mismo, es evidente que la disposición del inhibidor y, por lo tanto, de los sustratos en la cavidad de BpAXE será diferente al de las CEs estudiadas. De este modo, a pesar de ser todas esterasas de la superfamilia α/β hidrolasas, no todas presentan la misma disposición del sustrato en su cavidad, ya que esto depende de los residuos hidrofóbicos que la componen, que lo orientan, y que determinan, por lo tanto, la especificidad de sustrato.

Por homología en la estructura y en el mecanismo de acción, las α/β hidrolasas parecen ser objetivos ideales de los organofosfatos, ya que contactan con su residuo nucleofílico (Ser o Cys) y bloquean la hidrólisis posterior. A su vez, y a pesar de no haberse descrito nunca, BpAXE también se inhibió en presencia de paraoxon. Sin embargo, existen otras α/β hidrolasas que lejos de ser inhibidas por el DEP, consiguen escindirlo de su centro activo, liberando una nueva enzima libre y activa, este tipo de enzimas se denominan paraoxonasas (A-esterasas). También existen esterasas resistentes al ataque de este sustrato (D-esterasas). ¿Cuál es la diferencia estructural entre estas enzimas y las AXEs o CEs?

Una S-formilglutatión hidrolasa (SFGH, D-esterasa), inicialmente resistente a paraoxon, fue cristalizada (Legler y col., 2008). Esta enzima poseía un residuo localizado específicamente, el Trp207, que impedía la unión estable entre el compuesto y la serina activa (Figura 4.11 A). Al mutar ese residuo, el DEP podía introducirse en la cavidad, por lo que sí se producía inhibición enzimática (Figura 4.11 B), lo cual ocurre naturalmente en BpAXE.

Existe otro caso de mutagénesis dirigida que produce actividad paraoxonasa inédita (Newcomb y col., 1997), la Gly137 es reemplazada por un Asp en una acetilcolinesterasa, favoreciendo la entrada de una molécula de agua necesaria en

la hidrólisis del DEP. En el caso contrario, el agua no podría entrar en la cavidad hidrofóbica, y el inhibidor seguiría unido a la serina. Por lo que para que se produzca inhibición no debe haber impedimentos estéricos, y el agua debe ser accesible al nucleófilo.

De este análisis, se han podido determinar los requisitos estructurales de las α/β hidrolasas para ser susceptibles o resistentes al ataque de compuestos organofosforados como el paraoxon, destacando la complejidad estructural y su importancia en la inhibición. Estos requisitos se cumplían en otras enzimas de la familia carbohidrato esterasas 12 (Figura 4.12), como la RGAE de *B. subtilis* o de *B. halodurans* C125, la cual se inhibió también en presencia de paraoxon, demostrando así la validez de esta teoría.

2. Inmovilización enzimática de BpAXE

Es siempre difícil obtener enzima estable y activa sobre sustratos deseados a escala industrial. Muchas de ellas se han inmovilizado en soportes sólidos con el fin de estabilizarlas y facilitar su uso en procesos industriales (Hartmeier, 1988). Sin embargo, el proceso de inmovilización suele producir una disminución del rendimiento espacio/tiempo, debido a la dilución de actividad con la adición de estos soportes. Ello, junto con el coste añadido de estos procesos, hace plantearse la necesidad de establecer una nueva metodología para inmovilizar enzimas sin que se reduzca tan bruscamente el rendimiento.

Recientemente, se han descrito en la bibliografía, unas partículas insolubles compuestas por agregados de enzima entrecruzados, denominados CLEAs (*Cross-linked Enzyme Aggregates*). Estas partículas se componen de moléculas enzimáticas inmovilizadas sobre sí mismas, son biocatalizadores generalmente estables en condiciones extremas y, evidentemente, no necesitan de caros soportes que diluyan la actividad. Al igual que la cristalización de proteínas, las CLEAs requieren de gran cantidad de enzima purificada, por lo que tras haber optimizado las condiciones de expresión, purificación para su cristalización y comprobar su eficacia en la desacetilación de intermedios semisintéticos de cefalosporinas, BpAXE pareció ser idónea para este proceso.

En los últimos años se han publicado numerosos artículos de CLEAs y CLECs (*Cross-linked Enzyme Crystals*) de diferente composición enzimática (Cao y col., 2001; Ayala y col., 2002; Vafiadia y col., 2008), y siempre han mostrado un aumento en su estabilidad, frente a la enzima soluble. Puesto que BpAXE no es estable en presencia de disolventes inorgánicos como el acetonitrilo o el *tert*-butanol al 90%, la precipitación se realizó en presencia de sulfato amónico al 90% de saturación, recuperando el 72% de la actividad introducida, tras el entrecruzamiento con 1% de glutaraldehído.

Con el fin de observar diferencias en las estructuras de las CLEAs resultantes, se realizó un estudio al MEB, se observaron diferencias en la porosidad y permeabilidad de las CLEAs producidas con 40 y 80% de saturación de sulfato amónico (Figura 5.1 B), al igual que los agregados obtenidos con sulfato amónico (Figura 5.2 A) frente a disolventes orgánicos (Figura 5.2 B-C). Los valores de actividad retenida descritos en la bibliografía para otras enzimas no suelen ser superiores al 80% con este precipitante, las CLEAs de una penicilin G-acilasa precipitada con sulfato amónico sólo retuvieron el 41% de la actividad inicial introducida (Cao y col., 2001), frente al 73% de una subtilisina (Sangeetha y col., 2008)

Esta permeabilidad, junto con los datos de actividad retenida, sugirieron la implicación de la dispersión de las partículas insolubles en el medio de reacción, y que impediría, evidentemente, el acceso del sustrato a los centros activos, disminuyendo entonces la actividad.

Así, utilizando las condiciones básicas de dispersión descritas por Aytar y Bakir (2008), se determinó la actividad retenida con 30 s y 1 h de vortex, 35 y 72% de actividad, respectivamente. De ahí surgió la posibilidad de utilizar un nuevo sistema más agresivo para la dispersión de estos agregados, un disruptor celular. El FastPrep es un homogeneizador comercial capaz de realizar movimientos rápidos en las tres direcciones a la vez. En el presente estudio, tras sólo 30 s de agitación con este disruptor, se recuperó el total de la actividad introducida antes de la precipitación, obteniendo así un ahorro de tiempo y un mayor efecto protector de las partículas (Tabla 5.1).

La diferencia de tamaño de las partículas producidas frente a las tres condiciones de agitación ya mencionadas, se analizó mediante MO. Los resultados mostraron cómo, tras pocos segundos de agitación, las CLEAs agitadas con FastPrep presentaban una menor área media, el 80% de las partículas tenían menos de 150 μm^2 frente al 27% de las obtenidas tras 30 s de vortex (Figura 5.3). Ello confirmaba la hipótesis de partida, la disminución de la actividad está directamente relacionada con el tamaño de las partículas, y se puede recuperar con el uso de un buen mecanismo de agitación, el FastPrep.

La dispersión de una mayor cantidad de partículas mediante FastPrep sigue siendo posible, ya que existen en el mercado adaptadores de hasta 100 mL de muestra, por lo que la cantidad de enzima dispersada obtenida en 30 s sería industrialmente aplicable.

Además estas CLEAs fueron más estables que la proteína soluble frente al aumento de temperatura (Figura 5.4) o al pH (Figura 5.5). Una posible explicación es que el glutaraldehído estabiliza la proteína frente a condiciones de estrés como fuerzas mecánicas, pHs extremos y temperaturas, gracias a estos enlaces inter- e intramoleculares. Las principales ventajas de la técnica para obtener CLEAs con el

100% de actividad retenida son la rapidez, la sencillez y la única necesidad del homogeneizador. Así mismo, las CLEAs presentan como ventaja esencial que no requieren de soportes, ya que ellas mismas lo son, por lo que no se reduce la relación actividad/espacio.

Se analizaron entonces los parámetros cinéticos de estas CLEAs con posible aplicación industrial. Las CLEAs podrían utilizarse al principio de la síntesis de intermedios de antibióticos β-lactámicos, desacetilando el CPC, ya que la inmovilización ha disminuido la K_M para este compuesto.

Otro criterio a tener en cuenta para la aplicación industrial de una enzima inmovilizada es su vida media. Estas CLEAs presentaron una vida media de 45 ciclos, similar a la calculada en enzimas inmovilizadas sobre soportes físicos como el Eupergit (Katchalski-Katzir y Kraemer, 2000). En este sentido, las CLEAs descritas en el capítulo V son perfectamente escalables y aplicables a la producción industrial de antibióticos β-lactámicos.

3. Compuestos ópticamente puros y carboxilesterasas

No sólo las AXEs o cefalosporin deacetilasas son α/β hidrolasas interesantes desde el punto de vista industrial. En el capítulo IV, se resolvió la estructura molecular de BpAXE, una enzima con importante actividad sobre intermedios avanzados de antibióticos β-lactámicos, pero que no es capaz de hidrolizar el compuesto (R, S) ketoprofeno metil ester. Por ello, se procedió, a continuación, a la clonación de nuevas esterasas con posible actividad sobre ese sustrato, las carboxilesterasas (EC 3.1.1.1). Por la disposición de su centro activo, se trata de enzimas generalmente enantioespecíficas, es decir, capaces de seleccionar un enantiómero concreto en una mezcla racémica. Dentro de la gran cantidad de fármacos estereospecíficos, antihipertensivos como el enalapril o captopril, antibióticos como la cefalexina o la levofloxacina, destacan los antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs). La eficacia antiinflamatoria de estos compuestos, derivados del ácido 2-arilpropiónico, reside esencialmente en el isómero S-, que es hasta 100 veces más activo que el R-. En la presente Tesis, se seleccionaron enzimas con actividad sobre el (R, S) ketoprofeno metil ester (KPME), intermediario en la síntesis del S-ketoprofeno, comúnmente conocido como Fastum®, y utilizado en el tratamiento de la artritis reumatoide.

El capítulo VI describe la clonación y caracterización de una esterasa eucariótica. Se seleccionó un gen que codificaba para una hipotética carboxilesterasa, YICE, de *Yarrowia lipolytica* CLIB122, este gen presentaba baja homología con genes no expresados de otros géneros de levadura. A continuación, se clonó el gen en tres vectores diferentes, pPIC9K, pET28a y pET24b, para ser

expresado en organismos eucarióticos como *Pichia pastoris* GS115 y en procariotas como *E. coli* Rosetta (DE3)pLys.

Dada la amplia variedad de modificaciones postraduccionales que sufren las proteínas de origen eucariótico, con el fin de expresar y plegar correctamente la proteína, el primer sistema de expresión utilizado fue *Pichia sp.*. Gracias al α-factor N-terminal de 10 kDa expresado en pPIC9K, la proteína sería expulsada al espacio extracelular. No obstante, el empleo de este sistema de expresión, no produjo los resultados esperados, el α-factor no se procesó correctamente, y se produjo una proteína intracelular activa pero difícil de purificar.

Estudios anteriores han permitido la expresión de proteínas eucarióticas en un organismo procariótico (Shi y col., 2004; Larsen y col., 2008; Akinterinwa y Cirino, 2009), por lo que se expresó YICE en *E. coli* con el clásico vector pET28a, este vector también añade una cola de histidinas en el extremo N-terminal de la proteína. Desafortunadamente, se obtuvieron cuerpos de inclusión que no pudieron solubilizarse. Partiendo de la posibilidad de que cualquier cola en el extremo N-terminal de YICE estuviera afectando al correcto plegamiento de la proteína, se expresó entonces en pET24b, vector que expresa una cola de histidinas en el C-terminal de la proteína. Tras la optimización, se obtuvo al fin, una buena cantidad de enzima soluble. Esta enzima presentó mejores actividades específicas en comparación con la enzima expresada en *Pichia pastoris* y sin purificar. Por lo que se dedujo que realmente, las colas N-terminales afectaban a la solubilidad de la enzima. El mejor sustrato para YICE fue el *p*-NPButirato, con una k_{cat}/K_M de 46.3 $mM^{-1}.s^{-1}$.

Tras una completa caracterización, YICE presentó una esterospecificidad por el enantiómero R- de la mezcla racémica (R, S) ketoprofeno metil ester, con un exceso enantiómerico (ee_p) igual a 91% para el 22% de conversión, y un ratio enantiomérico (E) igual a 29. En este sentido, y teniendo en cuenta que este ácido ópticamente puro se utiliza comúnmente en la producción de dentífricos para pacientes con dolor dental, la enzima podría tener utilidad en esta industria.

No obstante, sus propiedades enzimáticas y estabilidad no fueron buenas, en comparación con otras enzimas ya clonadas, y la actividad del enantiómero S- es 100 veces mayor, por lo que fue conveniente expresar nuevas carboxilesterasas con mayor ee_p para este sustrato. Debido a la dificultad de expresar proteínas eucarióticas en *Pichia sp.*, y dada la actual repercusión industrial de los organismos extremófilos, se seleccionaron nuevos genes que codifican para hipotéticas carboxilesterasas, pero de organismos extremófilos procarióticos: el termófilo *Geobacillus kaustophilus* HTA426 y el alcalófilo *Bacillus halodurans* C-125.

El capítulo VII describe, por un lado, la clonación y caracterización de una carboxilesterasa de *Geobacillus kaustophilus* activa sobre el (R, S) ketoprofeno metil ester, y por otro la clasificación de esta enzima y sus homólogas dentro de

una nueva familia en el sistema de organización de enzimas lipolíticas, lipasas y esterasas principalmente, descrito por Arpigny y Jaeger (1999).

Durante la expresión en *E. coli*, esta carboxilesterasa, GkCE, sufría un corte proteolítico que disminuía seriamente el rendimiento de la producción. Mediante espectrometría de masas, se determinaron las masas moleculares de las proteínas por separado, tras lo cual se dedujo el punto del extremo C-terminal en el que estaría produciéndose el corte (K212-Q213), y que posteriormente, fue objeto de una mutagénesis dirigida. Así, la proteína mutada en el residuo Lys212 por una arginina apenas sufrió cambios en la actividad, pero eliminaba el punto de corte para una proteasa propia de *E. coli*. Como buena carboxilesterasa, su actividad específica disminuía conforme aumentaba la cadena de ácidos grasos. Además, su especificidad e inhibición por paraoxon, pero no por Eserina, permitió clasificar esta enzima dentro de las B-esterasas o carboxilesterasas verdaderas (EC 3.1.1.1) (Park y col., 2006).

Esta enzima recombinante presentó una buena estabilidad frente a temperaturas relativamente elevadas, 60-65 °C. *Geobacillus kaustophilus* HTA es una bacteria termófila aislada de sedimentos oceánicos de la Fosa de las Marianas, a una profundidad de 10897 m (Takami y col., 1997). La profundidad de la fosa es extremadamente fría, pero posee ventilaciones hidrotermales gracias a la difusión de las placas tectónicas, el organismo se aisló en estas determinadas zonas, por lo que vive óptimamente a temperaturas elevadas, y sus enzimas le permiten operar a temperaturas extremas. A su vez, la enzima fue estable durante 24 h a pH 7.0-9.0, y en presencia de disolventes orgánicos o detergentes no iónicos, propiedades que la hacen muy interesante en la industria. Se midió actividad en presencia del (R, S) ketoprofeno metil ester en busca de una buena estereoespecificidad para el (S)-, al contrario que la YICE anterior. Sin embargo, el exceso enantiomérico (ee_p) de GkCE para esta mezcla racémica fue de tan sólo 16.7% para el 20% de conversión, por lo que la posible aplicación industrial de esta enzima se redujo.

A continuación, se realizó un extenso análisis de la secuencia secundaria y terciaria de esta proteína y otras carboxilesterasas homólogas del mismo género, GkCE mostró un 97% identidad con GsEst30 de *G. stearothermophilus*, 99% con EstA de *G. thermoleovorans* YN (GtEstA) y 96% con GtEst30 de *G. thermodenitrificans*. La enzima GsEst30 ha sido cristalizada recientemente (código PDB: 1TQH) (Liu y col., 2004), se utilizó esta estructura como molde para construir un modelo tridimensional fiable de GkCE (Figura 7.10 A). De nuevo, GkCE presentaba la estructura clásica de las α/β hidrolasas, aunque con notables diferencias con otras carboxilesterasas previamente cristalizadas. Se representaron los diagramas topológicos de estas cuatro enzimas emparentadas (Figura 7.12 C-F), la lámina β central había perdido la primera de las 8 hebras β, con respecto a las carboxilesterasas estudiadas de la familia IV (Figura 7.12 A-B). CE de *Alicyclobacillus*

acidocaldarius (AaEst2, código PDB: 1EVQ) y Brefeldin A esterasa de *Bacillus subtilis* (BsBEst, código PDB: 2R11) han sido clasificadas como miembros de la familia IV (familia HSL) de la superfamilia α/β hidrolasas (Wei y col., 1999; De Simone y col., 2000). Así pues, la hebra β1 de la familia IV está ausente en las cuatro enzimas de *Geobacillus*, siendo entonces la primera hebra β, y no la segunda antiparalela al resto, lo cual supone una diferencia topológica importante.

Por otro lado, GkCE y sus homólogas presentaron una pequeña caperuza compuesta por tres hélices α, y que recubría ligeramente el centro catalítico. PfCE de *Pseudomonas fluorescens* (código PDB: 1AUO) y BcCE de *Bacillus cereus* (código PDB: 2H1I), son miembros de la familia VI (Kim y col., 1997), y sus caperuzas se componen de cuatro hebras β y no hélices α como GkCE. Las caperuzas de las enzimas de *Geobacillus* eran diferentes en estructura terciaria y disposición espacial a las caperuzas descritas para enzimas de las familias IV y VI de enzima lipolíticas (Figura 7.12 A-B, G-H).

Así pues, tras comparar topología y estructura tridimensional de estas enzimas con otras CEs presentes en la bibliografía, y clasificadas dentro de las dos únicas familias de enzimas lipolíticas bacterianas (Arpigny y Jaeger, 1999), con pequeña homología para GkCE, se propone la existencia de una nueva familia de carboxilesterasas limitada aparentemente, al género *Geobacillus sp.*. Sin embargo, sería interesante extender la búsqueda a proteínas de menor homología, con el fin de ampliar esta familia de enzimas.

Por otro lado, los resultados de exceso enantioméricos obtenidos en los dos capítulos anteriores eran claramente insuficientes para la síntesis comercial de (S)-ketoprofeno, por ello se buscó una nueva enzima capaz de catalizar preferentemente el (S)-ester del antiinflamatorio no esteroideo. Para ello se seleccionó la bacteria alcalófila secuenciada *Bacillus halodurans* C125, capaz de crecer a pHs de hasta 10, y se clonó el gen BH3554 que codificaba para una hipotética carboxilesterasa, BhCE, con un 70% de homología para GkCE. Se expresó y purificó la proteína con elevada estabilidad frente a pHs extremos y que obedecía, al igual que las dos anteriores enzimas, el patrón de especificidad e inhibición clásico de las carboxilesterasas (Park y col., 2006). Sin embargo, sus eficiencias catalíticas (k_{cat}/K_M) fueron mayores que las de YlCE y GkCE, con 329.2 $mM^{-1}.s^{-1}$ para *p*-NPA frente a 101.23 $mM^{-1}.s^{-1}$ para GkCE o 11.51 $mM^{-1}.s^{-1}$ para YlCE. Por lo tanto, esta enzima debe poseer cambios conformacionales que la hacen más activa frente ésteres de *p*-nitrofenilo como sustrato.

Tras comprobar su eficacia sobre el (R, S)-ketoprofeno metil ester, se calculó la K_M en presencia de Triton X-100, al igual que en los anteriores capítulos. Pese a presentar la mayor K_M, con 4.48 mM para el (S)-ketoprofeno metil ester, BhCE presentó un ee_p de 77% para el S-éster, al 15% de conversión, por lo que fue la única de las tres con aplicación directa en la industria de los NSAIDs (Figura 8.5).

Tayade y Vavia (2006) complejaron el ketoprofeno en HP-β-CD con éxito, lo que planteó la posibilidad de introducir la mezcla racémica esterificada para aumentar su biodisponibilidad, y superar así el problema de la baja solubilidad del sustrato en la correcta actividad enzimática. Tras calcular las constantes de complejación mediante un diagrama de fase (Figura 8.9) y regresión no lineal, se midió la actividad enzimática en un medio de reacción con KPME a concentraciones insolubles, y por lo tanto inaccesibles para la enzima, frente a la misma concentración de sustrato pero complejado con ciclodextrinas. Los resultados mostraron que las HP-β-CDs son capaces de liberar el sustrato soluble al medio mucho más rápidamente que tiene lugar la solubilización natural del compuesto, permitiendo así una velocidad de reacción constante, lo que conlleva a una mayor transformación de sustrato en el mismo tiempo.

En una segunda parte, se determinó la estructura molecular de BhCE tomando como molde la carboxilesterasa de *G. stearothermophilus* (código PDB: 1TQH), con un 70% de homología. Tras comparar el plegamiento típico de las α/β hidrolasas, se clasificó esta enzima como la primera proteína del género *Bacillus* perteneciente a la nueva familia descrita en el capítulo VII. De igual forma, otras enzimas con un 70% de homología con las esterasas del género *Geobacillus*, como BcCE de *B. cereus* o BtCE de *B. thurigiensis*, permitían ampliar esta familia.

La Figura 8.12 mostró pequeñas diferencias topológicas existentes entre BhCE y GkCE, la hélice α6 de la caperuza se encontraba girada hacia la derecha en el diagrama topológico (Figura 8.12 A). En los modelados estructurales de ambas proteínas, se confirmó que esta hélice α, que recubre el centro activo, se disponía de forma diferente, lo que abría más la cavidad de BhCE, con respecto a GkCE (Figura 8.13). Esto facilitaría así la entrada de sustrato/salida de producto, y podría explicar las mayores eficiencias catalíticas de BhCE para los ésteres de *p*-nitrofenilo estudiados.

En la búsqueda de los residuos implicados en estas modificaciones conformacionales, se estudiaron dos proteínas cristalizadas con un 99% de homología, pero con notables diferencias en sus estructuras, así, 1TQH presentó una cavidad casi dos veces mayor que la carboxilesterasa de *B. stearothermophilus* (código PDB: 1R1D). Debido a su elevada homología, los cambios estructurales estaban limitados a muy pocos residuos en la secuencia primaria. Se encontró que el residuo 78 era un Glu en 1TQH pero una Gln en 1R1D, ello producía un cambio de orientación de la cadena lateral de la Lys122 en ambas proteínas. En 1R1D, la cadena lateral de la Lys122 se introducía en el interior de la cavidad limitando su volumen a tan sólo 152 $Å^3$, frente a los 264 $Å^3$ de 1TQH, dónde la cadena lateral de su Lys122 giraba 60 ° y no penetraba en la cavidad.

Tras calcular el volumen del resto de enzimas, se definieron dos grandes grupos, proteínas de cavidad grande o pequeña. La única posición de la secuencia

primaria, que obedecía la misma distribución que los volúmenes, correspondería al residuo 180, las proteínas de pequeño volumen poseían una Val mientras que las de gran volumen presentaban una Ile. Este residuo se situaba al final de la hélice 3_{10} η1 (Figura 8.2), y se correlacionó con una posible bisagra entre las hélices α7 y α8, que delimitaría el final de la bolsa hidrofóbica de las enzimas (Figura 8.16). En este sentido, no se descarta la existencia de otras modificaciones que afecten al volumen de las cavidades, pero no tan evidentes o que sigan la misma distribución como los cambios puntuales aquí descritos, Lys122 y Ile/Val180. Incluso en el análisis filogenético (Figura 8.17), las proteínas de cavidad similar previamente definidas, se relacionaban evolutivamente entre ellas.

De esta forma, la familia descrita en el capítulo VII se ha ampliado al género *Bacillus*, ambos géneros pertenecen a la familia *Bacillaceae*, por lo que no se descarta que enzimas pertenecientes a otros géneros cercanos como *Oceanbacillus*, *Anoxybacillus*, *Lysinibacillus*, sean nuevos miembros de esta recientemente definida familia de carboxilesterasas.

Los trabajos realizados en la presente Tesis Doctoral, indagan fundamentalmente en la relación estructura/actividad de cuatro α/β hidrolasas, pero también aportan información hasta ahora desconocida, como sus aplicaciones industriales, las bases moleculares de la inhibición por paraoxon, la existencia de una nueva familia de carboxilesterasas en la clasificación de enzimas lipolíticas o incluso la implicación puntual de residuos en la estructura terciaria de las proteínas. Cuando Ollis y col. (1992) definieron por primera vez esta superfamilia de proteínas, no pudieron prever la gran variedad de enzimas que hoy son miembros, ni sus, a veces pequeñas, diferencias estructurales responsables de sus diferentes actividades catalíticas.

Capítulo X

Resumen en Inglés
English version

The following is a reduced English version, including "Introduction", "Materials and Methods", "Results and Discussion" and "Conclusions", for the European Doctor Degree.

1. Introduction

All the enzymes examined in this project are members of the α/β hydrolase family (Ollis *et al.*, 1992). This is a large group of enzymes with members in all domains of life, and with a diverse range of catalytic activities and specificities, including carboxylesterases, acetylcholinesterases, acetyl xylan esterases, serine carboxypeptidases, dienelactone hydrolases, haloalkane dehalogenases, lipases and other diverse esterases (Ollis *et al.*, 1992).

Several reviews covering the wide variety of catalytic activities and structural variations seen in the family have been published (Heikinheimo *et al.*, 1999; Nardini and Dijkstra, 1999; Holmquist, 2000), included in the ESTHER database, which contains sequence and kinetic information about the family members of the α/β hydrolase (Hotelier *et al.*, 2004).

Despite a wide diversity in primary sequence, members of the family have a very similar structural core, which contains a variety of insertions, usually related to the particular substrate specificities and/or catalytic activities of the enzyme (Heikinheimo *et al.*, 1999). Nevertheless, their surprising and intriguing structural similarity, combined with the preservation of the arrangement of the catalytic residues, suggested that they had possibly evolved from a common ancestor (Ollis *et al.*, 1992), or that they might be an example of a convergent fold (Holmquist, 2000). Since then, about 221 structures belonging to this family have been solved (Heikinheimo *et al.*, 1999), demonstrating the immense plasticity of the fold.

1.1. α/β hydrolases

1.1.1. α/β overall fold

The "canonical" α/β hydrolase fold (Figure 1.1) has been described as consisting of a central eight-stranded parallel β sheet, with strand β2 antiparallel, surrounded on both sides by α helices (Nardini and Dijkstra, 1999). The topology of the central β sheet is 87653421, and the N-terminal and C-terminal β strands can cross each other at an angle of approximately 90°, Figure 1.2 B shows a prototype enzyme.

The discovery that cutinases have only five strands in its β sheet and four α helices, has set the minimal fold size (Heikinheimo *et al.*, 1999). Examples of enzymes with a maximum size in their fold structure include acetylcholinesterases

and some fungal lipases, which contain up to 12 strands in the central twisted sheet (Schrag *et al.*, 1991; Sussman *et al.*, 1991).

The α/β hydrolase fold is able to provide a stable scaffold for the active sites of a wide variety of enzymes. The catalytic residues always constitute a highly conserved triad: a nucleophile (serine, cysteine or aspartic acid) positioned after strand β5, an acidic residue (aspartic or glutamic), almost always positioned after strand β7 and an absolutely conserved basic residue, histidine, located after the last β strand (Figure 1.1 and 1.3). Although well separated in the primary sequence, the residues come into close proximity when the protein folds (Figure 1.2)

The nucleophile is always located in a very sharp turn, called the *'nucleophile elbow'*, where it can be easily approached by the substrate; it is identified by the consensus sequence Gly-X-Nucleophile-X-Gly. The sharp turn is possible only because of the two glycine residues in the motif. This geometry contributes to the formation of the oxyanion-binding site, which is needed to stabilize the negatively charged transition state that occurs during hydrolysis (Holmquist, 2000).

1.1.2. Catalytic properties

The α/β hydrolase fold enzymes constitute a typical example of evolutionary differentiation within a common fold. In order to accommodate different substrates, loops were inserted in the centre of the molecule, usually at the C-terminal ends of strands β3, β4, β6, β7 or β8 (before or after helix αF). Changes in the sequences of these loops can thus accommodate the differences in activities and substrates specificities seen in different family members, while leaving the basic structure of the protein unaffected (Nardini and Dijkstra, 1999).

These insertions shape the substrate-binding site of the α/β hydrolase domain, near where the catalytic machinery is situated. They may be as short as only a few residues or they may be large enough to form a complete domain that either seals off the catalytic cavity, except for a narrow tunnel, or acts as a movable lid that allows the substrate to enter the active site and the product to leave it (Qian *et al.*, 2007). Most lipases have their active site covert by a secondary structure element, a lid, which must change conformation to allow substrates to access the active site (Figure 1.2 A) (Barbe *et al.*, 2009). Some carboxylesterases also display a smaller lid, but it has no implication on interfacial activation but on the substrate specificity (Figure 1.3) (Kim *et al.*, 1997). The absence of a lid is also a feature of acetyl xylan esterases and cutinases (Ghosh *et al.*, 1999).

The resulting enzymes range from 25-65 kDa in molecular mass, they operate on substrates with completely different chemical or physicochemical properties and they act in diverse biological contexts. Thioesterases are involved in a multitude of biochemical processes, including bioluminescence and metabolism. Serine carboxypeptidases recognize the negatively charged carboxylate terminus of

their peptide substrates. Haloalkane dehalogenase is a detoxifying enzyme that converts halogenated aliphatics to the corresponding alcohols, while haloperoxidase catalyzes the halogenation of organic compounds. Hydroxynitrile lyase cleaves carbon-carbon bonds in cyanohydrins with concomitant hydrogen cyanide formation as a defence mechanism in plants. Dienelactone hydrolase uses substrate-assisted catalysis to degrade aromatic compounds. Lipases act at the water/lipid interface of their neutral water-insoluble ester substrates.

1.2. Classification of α/β hydrolases

The members of the α/β hydrolase superfamily diverged from a common ancestor into a number of hydrolytic enzymes with a wide range of substrate specificities, together with other proteins with no recognized catalytic activity. The ESTHER database (http://bioweb.ensam.inra.fr/esther) gathers and annotates all the published information related to gene and protein sequences of this superfamily, as well as biochemical, pharmacological and structural data, and connects them so as to provide the bases for studying structure-function relationships within the family (Hotelier *et al.*, 2004; Renault *et al.*, 2005). The ESTHER database is the most complete tool that holds all α/β hydrolase fold proteins together, although other databases also contribute valuable information:

- CAZy (*Carbohydrate Active Enzymes*): is a knowledge-based resource specialized in the enzymes that build and breakdown complex carbohydrates and glycoconjugates like acetyl xylan esterases (AXEs) or Rhamnogalacturonan esterases (RGAEs) (http://www.cazy.org/) (Cantarel *et al.*, 2009).
- SCOP (*Structural Classification of Proteins):* (http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/) is a database of protein structures that provides a comprehensive ordering according to their evolutionary and structural relationships. It includes the α/β hydrolase superfamily (Andreeva *et al.*, 2004).
- CATH: *Class (C), Architecture (A), Topology (T) and Homologous superfamily (H)* is a hierarchical domain classification of protein structures, (http://www.cathdb.info/) (Cuff *et al.*, 2008).
- LED (*Lipase Engineering Database*): integrates information on sequence, structure, and function of lipases, esterases, and related proteins. It is a useful tool in identifying functionally relevant residues other than the active site residues, and for designing mutants of desired substrate specificity (http://www.led.uni-stuttgart.de/) (Fisher and Pleis, 2003).
- MELDB (*Microbial Esterase and Lipase Database*): (http://www.gem.re.kr/meldb/inter.html) (Kang *et al.*, 2006).

There are 91 subfamilies (51 in which at least one protein structure is known), classified into 4 subclasses according to homology, conserved specific motifs (subclasses C, L, H and X) (Table 1.1). To date, at least 227 different proteins have been crystallized and have been shown to belong to the superfamily (Figure 1.5). The conserved α/β hydrolase fold is coloured in red and the annexes domains in black.

Inhibitors are substrate analogues that have been used to characterize enzymes in biochemical and structural studies. Esterases inhibitors often have a phosphonate atom instead of a carbon in the reaction centre; this phosphonate is able to form a stable tetrahedral intermediate, which resembles the tetrahedral oxyanion transition state of catalysis. Organophosphourous compounds such as paraoxon (Figure 1.8) are currently used to classified different esterases in order to test their sensibility for it and substrate specificity (Park *et al.*, 2006).

1.3. Industrial production of α/β hydrolases

According to the α/β hydrolase members, only lipases and proteases have been produced for the industry, and esterases too, but at smaller scale.

1.3.1. Lipases and proteases

Lipases constitute the most important group of biocatalysts for biotechnological applications because they are available in large quantities. A "true" lipase (EC 3.1.1.3) catalyses the hydrolysis and synthesis of long-chain acylglycerols, with trioleoylglycerol being the standard substrate. They usually display exquisite regioselectivity and stereoselectivity and do not usually require cofactors, nor do they catalyse side reactions. These properties make lipases the first commercial α/β hydrolases and today they constitute the most widely used group of biocatalysts in organic chemistry (Jaeger *et al.*, 1999; Jaeger and Eggert, 2002) (Table 1.3).

Industry also commercializes proteases, which account for 40% of the market enzymes (Gupta *et al.*, 2002). Subtilisin is the most important biocatalyst (Glowacka *et al.*, 2005; Aráujo *et al.*, 2009), and is sold by Novozymes and Genencor (Chan *et al.*, 2005; Drenth *et al.*, 2005) (Table 1.4).

1.3.2. Esterases

Esterases (EC 3.1.1.x) and lipases (EC 3.1.1.3) are two major classes of α/β fold hydrolases which are widely distributed in nature. Their physiological functions are involved in carbon source utilization, pathogenicity, and detoxification (Potter and Wadkins, 2006; Satoh and Hosokama, 2006). While similar in molecular structure and catalytic mechanism, esterases can be distinguished from lipases by their

preference for short chain acyl derivatives and the lack of requirement of interfacial activation.

Esterases represent a diverse group of α/β hydrolases catalyzing the cleavage and formation of ester bonds. They exhibit high stereospecificity, require no cofactor in the reaction, and are stable and even active in organic solvents, all of which makes them attractive biocatalysts in the applications of synthesis and food processing (Bornscheuer and Kazlauskas, 1999; Bornscheuer, 2002b).

The classification of esterases is complicated and confusing. Aldrige and Rimon arranged esterases into three groups based on substrate specificity: A-, B-, and C-esterases (Aldridge, 1953). Type A-esterases (paraoxonases) hydrolyze organophosphates such as paraoxon (Figure 1.8). In contrast, type B-esterases (carboxylesterases) are inhibited by organophosphates. Type C-esterases (acetylesterases) are also inhibited by organophosphates and by Eserine (Park *et al.*, 2006). Finally, the later defined D-esterase group is not inhibited by paraoxon but susceptible to Hg^{2+} (Main, 1960). In 1999, Arpigny and Jaeger compared 53 sequences of bacterial lipases and esterases in order to establish a new classification based on structural and sequence identity.

The mechanism of esterases is similar to that displayed by lipases and serine proteases (like chymotrypsin) (Figure 1.9). Initially, the nucleophilic serine oxygen activated by the histidine residue, which in turn is stabilized by the aspartic/glutamate residue, attacks the carbonyl carbon of the substrate, leading to the formation of an acyl-enzyme intermediate. In the next step, water activated in the same manner as Ser by His and Asp/Glu (general base catalysis) in the previous step, attacks the carbonyl atom of the substrate again. Cleavage of the ester bond generates the final product (acid, alcohol, etc.) and regenerates the enzyme (Silverman, 2000; Bornscheuer, 2002).

1.4. Acetyl xylan esterases

Semi-synthetic cephalosporins are one of the most widely used antibiotics. Many esterases are active on cephalosporin C (CPC) or 7-amino cephalosporanic acid (7-ACA), among them; some acetyl xylan esterases (AXEs) show high specific activity on these substrates (Degrassi *et al.*, 2000; Vincent *et al.*, 2003), and most belong to the carbohydrate esterase families 1 to 7 and 12 (CAZy database).

In addition, AXE hydrolyses the ester linkages of the acetyl groups of acetylated xylan (Figure 1.13). Hence, these enzymes have great potential application for the chemoenzymatic deacetylation of cephalosporins for antibiotic synthesis. The reaction that is carried out by AXE is based on the removal of an acetyl group of the 3-position from cephalosporins (Figure 1.15), which are a highly valuable starting material for producing semi-synthetic β-lactam antibiotics.

1.5. Carboxylesterases

Carboxylesterases are remarkable catalysts, showing extremely wide and overlapping substrate specificities (Margolin, 1993; Quax and Broekhuizen, 1994; Bornscheuer and Kazlauskas, 1999). The large and flexible binding pocket facilitates the formation of multiple binding interactions (predominantly hydrophobic, van der Waals, and hydrogen bonding) and provides mostly hydrophobic residues accounts for the ability of these enzymes to recognize such an immense array of compounds (Bencharit *et al.*, 2003).

Although a considerable number of microbial carboxylesterases that have been overexpressed in suitable hosts are known, only a few have been used for the synthesis of optically pure compounds (Steenkamp and Brady, 2008), being the production of nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) (Figure 1.17) the main biotechnological application of these enzymes. Carboxylesterases are used for the chiral separation of racemic mixtures of 2-arylpropionic methyl esters like (R, S) ketoprofen methyl ester, and convert to (S)-ketoprofen (acid), which is 100 times more active than the (R)-isomer. Ketoprofen is a NSAID that exhibits a pharmaceutical activity which reduces inflammation and relieves pain, mainly though its (S)-enantiomer. In many cases it is very difficult to find a commercial enzyme with both satisfactory enantioselectivity and activity for the kinetic resolution of some unnatural substrates, such as ketoprofen.

2. Objectives

Taking into account the data presented in the Introduction section, it was in great interest to search for α/β hydrolases as new biocatalysts which allow us to improve the production of semi-synthetic cephalosporins and to obtain optically pure ketoprofen isomers. Among the diversity of α/β hydrolases, the present project will be focussed on acetyl xylan esterases and esterospecific carboxylesterases.

3. Materials and Methods

3.1. Biochemicals

Restriction enzymes were obtained from New England BioLabs (Beverly, MA). T_4 DNA ligase was from Roche Diagnostics. Pfu Turbo® DNA polymerase and its 10X reaction buffer were from Stratagene (La Jolla, CA). Taq DNA polymerase and its 10X reaction buffer were from Promega. DNeasy system for genomic DNA isolation, QIAprep spin plasmid miniprep kit and QIAquick PCR purification kit were from QIAgen (USA). Substrates, antibiotics, IPTG, BSA, were from Sigma (Madrid, Spain). Ketoprofen (free acid) was purchased from Sigma and esterified in our laboratory according to the method described by Kim and Lee (2004). Buffers, glutaraldehyde 25% solution and ammonium sulphate were from Fluka (Buchs, Suiza). Broths were obtained from Pronadisa (Condalab, Madrid, Spain). Ultrafiltration and microfiltration membranes, HisTrap chelating, PD10, Phenyl Sepharose and Superdex 200 prepacked columns were from GE Healthcare (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia). 7-aminocephalosporanic acid, cephalosporin C and their desacetyl-substrates were obtained from Bioferma S.A. (Murcia, Spain). All other chemicals were of reagent grade and obtained from commercial sources.

3.2. Microorganisms

E. coli Rosetta (DE3) and (DE3)pLys cells, pET28a and pET24b plasmid were from Novagen (USA). *Pichia pastoris* GS115 and pPIC9K vector were purchased from Invitrogen (Frederick, EEUU). Non commercial strains used in his work were:

- *Bacillus pumilus* CECT5072 was obtained from the *Colección Española de Cultivos Tipo* (Valencia, Spain). It was used to produce an acetyl xylan esterase (AXE) in *E. coli*.
- *Yarrowia lipolytica* CLIB122 was purchased from CIRM (*Centre International de Ressources Microbiennes*, Grignon, France), growth in YPD and processed in order to obtained genomic DNA. The locus tag XM503610 was amplified by PCR in order to produce YICE, a carboxylesterase from *Y. lipolytica* CLIB122 in *Pichia pastoris* and *E. coli*.
- *Geobacillus kaustophilus* HTA426 genomic was obtained from the Agency for Marine-Earth Science and Technology (JAMSTEC) (Japan). The locus tag GK3045 was amplified by PCR in order to produce GkCE, a carboxylesterase from *G. kaustophilus* HTA426 in *E. coli*.
- *Bacillus halodurans* C125 genomic was obtained from the Agency for Marine-Earth Science and Technology (JAMSTEC) (Japan). The locus tag

BH3554 was amplified by PCR in order to produce BhCE, a carboxylesterase from *B. halodurans* C125 in *E. coli*.

3.3. Protein expression *in E. coli*

Recombinant Rosetta (DE3) and (DE3)pLys cells were grown at 37 °C in a TB medium containing kanamycin 50 μg·mL^{1} and chloramphenicol 34 μg·mL^{1} and induced at selected OD_{600} values by adding IPTG at different concentrations to determine the optimum amount of inductor. After induction, the cells were grown at 30 °C (or 20 °C for YICE) and collected at intervals (from 6 h for GkCE to 18 h to YICE) by centrifugation. A 100 mL LB culture was used to inoculate 1 L of TB medium- kanamycin-choramphenicol, which was grown in a 2.5 L flask.

3.4. Protein expression in *P. pastoris*

Linear DNA (pPIC9K-YICE) was used to generate stable transformants of *Pichia pastoris* GS115 by electroporation, via homologous recombination between the transforming DNA regions of homology within the genome (Scorer *et al.*, 1994). pPIC9K includes an α-factor that allows secretion of the recombinant protein. After 4 days of the transformation, His^+ transformants were detected in the Minimal Dextrose (MD) plates. Transformation of GS115 with *Bgl*II-linearized pPIC9K constructs favours recombination at the AOX1 locus. Displacement of the alcohol oxidase (AOX1) structural gene occurs at a frequency of 5-35% of the His^+ transformants, rendering His^+Mut^S phenotype. Transformation of GS115 with *Pme*I-linearized constructs favours recombination at the HIS4 locus. Most of the transformants should be His^+Mut^+. Patching or replica-plating on MD versus Minimal Methanol (MM) plates can readily distinguish Mut^+ and Mut^S transformants. Transformants were confirmed by PCR to contain the insert (YICE gene).

BMGY and BMMY (buffered complex glycerol or methanol medium) were the buffered media, usually used for the expression of secreted proteins. BMMY was used for induction of YICE at 30 °C.

3.5. Protein preparation for purification

Crude extracts were lysed with a mill homogenizator (Minizeta IIE, Neztsch, Germany) from a cell suspension of the suitable buffer (Tris-HCl 50 mM pH 8.0 for BpAXE, GkCE and BhCE, and or potassium phosphate buffer 50 mM pH 7.5 for YICE). The insoluble fraction of the lysate was removed by centrifugation at 6000*g* for 15 min at 4 °C. The supernatant was cleaned of nucleic acids with 3 U/mL DNase I (Sigma) for 30 min at room temperature, followed by centrifugation at 6000*g* for 15 min at 4 °C. The extract was concentrated by ultrafiltration with a 30

kDa or 100 kDa cut-off membrane on a QuixStand system (GE Healthcare) and frozen at -80 °C with 5% glycerol for weeks.

3.6. Enzyme assays

Esterase activity was determined spectrophotometrically by hydrolysis of different esters of *p*-NP. The standard reaction medium (1 ml) contained Tris-HCl 50 mM pH 8.0 (potassium phosphate 50 mM, pH 7.5 for YICE), substrate at the appropriate concentration (2 mM *p*-NPAcetate for BpAXE, 2 mM *p*-NPButyrate for YICE and 0.8 mM *p*-NPCaprylate for GkCE and BhCE in cuvette), and 50 µl of the purified enzymes. Hydrolysis was measured at 405 nm with a ε=16,980 $M^{-1}\cdot cm^{-1}$ (pH 8.0) and ε=9964 $M^{-1}\cdot cm^{-1}$ (pH 7.5), using a Shimadzu UV-2401PC spectrophotometer at 25 °C. One unit of activity was defined as the amount of enzyme releasing 1 µmol of *p*-NP per min under assay conditions. Different *p*-NP esters such as *p*-NP acetate (C_2), *p*-NP butyrate (C_4), *p*-NP caprylate (C_8), *p*-NP laurate (C_{10}), and *p*-NP Myristate (C_{14}) were used to determine the substrate specificity.

3.7. Enzyme stability

The pH stability of the purified enzymes was studied in the pH range of 4.0 to 10. The following buffers (50 mM) were used: sodium acetate (pH 4.0 to 5.5), potassium phosphate (pH 6.0 to 8.0), Tris-HCl (pH 8.0 to 9.0), and boric acid (pH 9.5 to 11.0). In the pH stability study, the residual enzyme activities were measured after a 24 h (48 h for BhCE) incubation at 30°C with the standard reaction medium, at pH 8.0 (pH 7.5 for YICE) with *p*-NPCaprylate (for GkCE and BhCE), *p*-NPButyrate (for YICE) and *p*-NPAcetate (for BpAXE). The optimum pH toward the activity of the esterase was also determined with the same buffers, but between pH 6.0 to 9.0 because of the substrate autohydrolysis. The variation of the product ε with the pH was considered (Table 3.3).

The thermostability of the enzyme was examined using the standard assay after incubation of the enzyme at different temperatures for different periods of time. The stability of the enzyme against denaturing agents (detergents, organic solvents, and urea) was also studied using a standard assay with *p*-NP caprylate (GkCE and BhCE). Each measurement was carried out with two different concentrations of the compounds: 0.1% to 5% (w/v) concentrations of detergents, 40% to 90% (v/v) concentrations of organic solvents, and 1 M to 8 M urea.

The inhibitory effect of the chemical modifiers, which are specific to particular amino acids, such as pyridoxal 5´-phosphate (PLP) to Lys, phenylglyoxal phosphate (PGO) to Arg, phenylmethylsulfonyl (PMSF) to Ser, and diethylpirocarbonate (DPC) to His, was examined. Enzyme activity was measured using a standard assay with *p*-

NP caprylate. Two different concentrations (0.5 mM and 5 mM) of each inhibitor were added to the enzyme, the mixture was incubated for 30 min at 30°C, and the reaction was then started with the addition of substrate. Paraoxon and Eserine, which contribute in the classification of esterases, were also studied under the same conditions as described above.

A 5 mM concentration of divalent cations ($CaCl_2$, $CuSO_4$, $FeSO_4$, $MnCl_2$, $MgCl_2$, and $ZnSO_4$) was separately added to the enzyme and incubated for 30 min at 30 °C to investigate the effect on the enzyme activity. In order to clarify whether the divalent cations are required for the reaction, 10 mM EDTA was added to the enzyme and incubated for 60 min at 60 °C. The residual activities were measured using the standard assay after incubation.

3.8. HPLC analysis

3.8.1. Activity towards β-lactam intermediates

For assay of the 7-ACA and CPC desacetylating activities, the purified enzymes were incubated at 20 °C with these compounds in potassium phosphate 150 mM pH 7.5. The reaction was stopped by the addition of mobile phase and by centrifuging out the protein (16000*g*, 2 min). Samples from the supernatant were subjected to reversed-phase HPLC using a Kromasil C_8 column and a mobile phase consisting of 30% methanol containing tetrabutylammonium hydrogen sulphate 15 mM and potassium phosphate buffer 10 mM pH 6.5, monitoring the optical absorption in the effluent at 254 nm (Martínez-Martínez *et al.*, 2007). Under these chromatographic conditions and at a flow rate of 1 mL/min, the desacetylated products appear as well resolved peaks from the corresponding substrates ($Rt_{7\ ACA}$ = 5.4 min, $Rt_{desacetyl\ 7\ ACA}$ =3.5 min, Rt_{CPC} =4.5 min, $Rt_{desacetyl\ CPC}$ =2.6 min). The amount of product was estimated by peak integration, using the desacetylated substrates as standards.

3.8.2. Activity towards (R, S) ketoprofen methyl ester

The quiral compound, methyl (±)-2-(3-benzoylphenyl)-propionate (ketoprofen methyl ester) was synthesized chemically by esterification with a routinely acidic catalyst (Kim and Lee, 2004). 1 mL reaction containing Tris-HCl 50 mM pH 8.0, 0.5% Triton X-100, (R, S) ketoprofen methyl ester ((R, S) ketoprofen ME) at different concentrations and 200 µg purified enzyme were incubated for 90 min at 30 °C to determine kinetic parameters of the enzyme. The reaction was stopped by dilution into mobile phase (dilution 1/10). One unit of esterase activity was defined as the amount of enzyme producing 1 mol of (R, S) ketoprofen free acid from the corresponding methyl ester per minute, under the specified conditions. The

concentrations of (R, S) ketoprofen ME, (R)- and (S)-ketoprofen were determined using a HPLC Agilent 1100 Serie (Santa Clara, EEUU). The column and mobile phase used were Chirex Phase 3005 (Phenomenex) and ammonium acetate 30 mM in methanol with 0.2% acetic acid, respectively. Under these chromatographic conditions and at a flow rate of 0.8 mL/min, and with the monitored eluent at 256 nm, the acid products appear as well resolved peaks from the corresponding substrates ($Rt_{(R, S)\ ketoprofen\ ME}$= 5.51 min, $Rt_{R\ ketoprofen}$= 16 min, $Rt_{S\ ketoprofen}$= 18.4 min). The amount of product was estimated by peak integration, using the free acids as standards.

3.9. Protein analysis

Protein concentration was determined by the Bradford method and using bovine serum albumin as standard (Bradford, 1976). Protein eluting from the columns during purification was monitored as at 280 nm.

The molecular mass of the recombinant protein was determined by gel filtration onto a Superdex 200 column (GE Healthcare), which had been previously calibrated using standard proteins of known molecular weight. The molecular mass of the denaturized protein was also determined by SDS polyacrylamide gel electrophoresis (Laemmli, 1970), using 12% acrylamide resolving gel. Samples were heated at 100 °C for 4 min in 2% SDS, 5% 2-mercaptoethanol and run in comparison with molecular weight standards.

The accurate molecular mass of GkCE and BhCE were also determined by liquid chromatography/MSD spectrophotometry (LC/MS) with electrospray ionization, using HP/1100 LC/MSD (Agilent Technologies, USA) (Pearcy *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 2001). The software for determining the molecular weights of the purified proteins in a spectrum was the Data Analysis for LC/MSD Trap v3.2.

3.10. Sequence analysis and structure homologies

Protein similarity searchers and alignment were performed using the data from CLUSTAL-W (Thompson *et al.*, 1994). Model building was developed by using SWISS-MODEL (Guex y col., 1997; Schwede y col., 2003; Arnold y col., 2006) and Geno3D sites (Geourjon y col., 2001; Combet y col., 2002). The Swiss-PdbViewer (Guex and Peitsch, 1997; Schwede *et al.*, 2003; Arnold *et al.*, 2006) and PyMOL (DeLano, 2002) programs were used to visualize the structures. ESPript output (Gouet *et al.*, 1999) was used to render the analysis of multiple sequence alignments. Topology diagrams were prepared with TOPS (Michalopoulos *et al.*, 2004). Phylograms were built using TreeView and Mega4 software with the neighbour-joining method (Saitou and Nei, 1987).

3.11. BpAXE crystallization

Initial crystallization of *B. pumilus* AXE (BpAXE) was tested by hanging drop vapour diffusion method mixing 0.4 μl of reservoir fluid and 0.4 μl of 8 mg/mL BpAXE in 50 mM Tris-HCl pH 8.0, alone or supplemented with 0.5 mM diethyl-*p*-nitrophenyl phosphate (Paraoxon). SeMet substituted protein was used in the crystallization trials with the inhibitor. The best crystals, reaching about 0.3 mm (prismatic crystals) or 0.2 mm (cubic crystals) in their largest dimension, were produced in about 1-2 weeks at 21 °C (Figure 4.7). In the absence of inhibitor, crystals were obtained with 0.2 M $MgCl_2$, 0.1 M Na Hepes pH 7.5 and 30 % PEG 400; and in the presence of inhibitor, with 0.2 M NH_4 acetate, 0.1 M Bis-Tris pH 5.5 and 45% 2-methyl-2,4-pentanediol (MPD).

Both reservoir buffers were crioprotectant in themselves, so crystals were harvested directly from the drop. Data were collected at 100 K (Oxford cryosystem) at beamlines ID23-1 (apo-AXE) and BM16 (paraoxon complex) of the ESRF synchrotron (Grenoble) using an ADSC Quantum 315r CCD detector (apo-AXE) and an ADSC Quantum 210r CCD detector (paraoxon complex).

3.12. CLEAs production

Pilot tests of aggregation with ammonium sulphate were carried out by adding the required volume of saturated ammonium sulphate solution, to 1 mL of a 1 mg/mL solution of the purified enzyme BpAXE in 50 mM Tris-HCl pH 8.0 to bring the mixture to the desired degree of saturation with the salt. Pilot tests of aggregation with acetonitrile or with *tert*-butanol (final concentrations up to 90% v/v) were carried out in the same way except for the addition of the cold solvent instead of the salt solution. After 1 h the appropriate amount of a freshly prepared 25% (v/v) aqueous solution of glutaraldehyde was stirred into the suspensions to attain the desired concentration, 1%. The pilot assays yielded optimally active CLEAs when using ammonium sulphate at 80% saturation, and a 3 h cross-linking period with 1% glutaraldehyde. To scale-up CLEAs production, these conditions were used with an initial enzyme solution containing 5.3 mg/mL purified BpAXE. At the end of the cross-linking period the entire suspension was centrifuged (20 min, 6000*g*), washing the precipitated CLEAs three times by repeated cycles of suspension in potassium phosphate 150 mM pH 7.5 and centrifugation. The final preparation of the CLEAs, stored at 4 °C, was stable for several weeks.

CLEAs were observed at optical microscopy at an enlargement of 40X with an electron Jeol T6.100 (Japan) scanning electron microscope (SEM) operated at 15 kV.

For CLEAs dispersion, a novel approach was used in which the CLEAs were subjected to reciprocating mixing using a FastPrep-24 sample preparation system

(M.P. Biomedicals, CA, USA) at a setting of 6.0 m/s. Vortex at medium speed was also used as the widely used method for dispersing CLEAs.

3.13. Inclusion complexes of (R, S) ketoprofen methyl ester with HP-β-cyclodextrins

Phase diagram was carried out according to Higuchi and Connors (1965) as follows: excess amounts of ketoprofen-ME were added to aqueous solutions containing increasing concentrations of hydroxypropyl-β-cyclodextrins (HP-β-CD) in sodium pyrophosphate buffer 100 mM pH 8.0 and shaken at 25 °C for 5 days to reach equilibrium. The aqueous solutions were filtered through a 0.2 µm membrane filter and diluted in 80% ethanol-water. The ketoprofen-ME was spectrophotometrically determined (ε_{256}= 17300 $M^{-1}\cdot cm^{-1}$) and the filtrate absorbance was measured at 256 nm.

4. Results and Discussion

4.1. Molecular basis for the structural and kinetic interaction of acetyl xylan esterases by paraoxon

4.1.1. Protein production, purification and crystallization

BpAXE amino acid sequence was 89% identical to the AXE from *B. pumilus* PS213, 76% identical to the cephalosporin C deacetylase of *B. subtilis* (PDB entry: 1ODS), and less than 41% to the other identified AXEs from *Thermoanaerobacterium sp.* and *Thermotoga maritima* (PDB entry: 1VLQ), all of which belong to the carbohydrate family CE-7 (http://www.cazy.org/fam/CE7.html) (Figure 4.1).

The BpAXE gene was cloned, expressed as soluble enzyme in *E. coli* Rosetta (DE3)pLys in the presence of seleniomethionine and purified up to 99% purity (Figure 4.2).

4.1.2. Paraoxon inhibition of BpAXE

Organophosphorus compounds such as paraoxon are known inhibitors of carboxylesterases (Park *et al.*, 2006; Iperuma *et al.*, 2007), but they have not been tested as inhibitors of acetyl xylan esterases, even though both share the typical α/β fold. When paraoxon was mixed with BpAXE in the standard reaction medium, a high activity inhibition was observed (Figure 4.3), the product accumulation curve approached an asymptote, which is typical of complexing type irreversible inhibitors (Tian and Tsou, 1982). These inhibitors combine with the enzyme (Figure

4.4) to form a reversible complex (defined by K_I) prior to the irreversible inhibition step that phosphorylates the active site (defined by k_i).

The kinetic parameters of this irreversible inhibition were calculated by a different method from others that only increase inhibitor concentration $[I]_o$ in the reaction (Main, 1969; Leytus *et al.*, 1984; Liu and Tsou, 1986), instead of change also enzyme concentration $[E]_o$ but maintaining the ratio $[E]_o/[I]_o$ as a constant (Tudela *et al.*, 1986) (Figure 4.5). The old methods produce a different product concentration $[P_\infty]$ for each $[I]_o$ used, introducing steady-state changes of up to 30% (Tian and Tsou, 1982), which affects the estimated values of k_i and K_I (equations 1), 2) and 3)).

The values of K_I (5.6 mM) and k_i (0.012 s^{-1}) were obtained by non-linear regression of the apparent inactivation constant (λ) vs $[I]_o$, as shown in Figure 4.6. The k_i value was 30 fold lower than in carboxylesterase EST2 from the thermophilic eubacterium *Alicyclobacillus acidocaldarius* (Febbraio *et al.*, 2008) and acetylcholinesterase from electric eel (Forsberg and Puu, 1984).

4.1.3. Crystallization and overall structure

BpAXE was crystallized (Figure 4.7) in the presence and absence of paraoxon, and diffracted to 1.9 and 2.7 Å resolution, respectively. The diffraction and refinement of both structures were obtained by Prof. Dr. Vicente Rubio from the Instituto de Biomedicina y Enfermedades Raras (Valencia, Spain).

The enzyme exhibits a doughnut-like hexameric structure formed by a trimer of dimers (Figure 4.8 A). Each 320-residue subunit presents the canonical α/β hydrolase fold, nucleated by a 9-stranded twisted β-sheet flanked by α-helices. There is an insertion of a three helix bundle between α6 and β8. The active centre contains the classical catalytic triad composed of Ser-181, Asp-269 and His-298 with the six active centres of the hexamer pointing towards the central pore.

The native and the paraoxon-bound BpAXE structures superimpose closely with an rmsd of 0.20 Å. Only slight side chains movements around the tetragonal intermediate are observed to allocate it, which in any case exceed 0.8 Å. Therefore, the binding of paraoxon does not induce any conformational movement in the enzyme structure, as was reported previously for other α/β hydrolases (Iperuma *et al.*, 2008).

4.1.4. Binding of paraoxon in BpAXE

Electron density maps for the paraoxon containing crystals displayed clear density for a covalently bound diethyl phosphate moiety (Figure 4.8 A). The density also revealed that the *p*-nitrophenyl group of paraoxon had been cleaved off

during crystal soaking. The phosphate group of paraoxon is clearly defined by tetrahedral density and is covalently bound to Ser-181 Oγ, with the O3 atom of paraoxon placed appropriately in the oxyanion hole.

In all the subunits a hydrogen bond is observed, between O3 atom and the amide N atom of Tyr-91 (~2.20 Å) at the end of β4, while in subunits A and C, it also interacts with the amide N atom of Gln-182 (2.86 Å). This fact reveals two slightly different modes of paraoxon binding depending on whether the O3 atom binds stronger to the amide N atom of Tyr-91 or Gln-182. Moreover, His-298 interacts with the lateral chain O atom of Ser-181 but only in subunits B, C and F. Of the two ethyl arms of the bound paraoxon molecule, one extends toward the surface of the protein while the second points towards the inner side of the catalytic gorge, pointing to residue Tyr-206 (Figure 4.8 A). The two ethyl substituents are stabilized by packing against the side chains of Tyr-91, Tyr-206, Pro-221, and Val-271, and these interactions may explain the higher affinity of paraoxon.

On comparing the structure to other enzymes of the α/β hydrolase family (carboxylesterase, brain or plasma platelet activating factor, esterase or even cutinase) with a paraoxon bound (PDB entries: 2O7V 3DT6, 3D5E, 3DOI, 2CUT, respectively), they all share the same mode of paraoxon binding, although with small differences that will be discussed below.

4.1.5. Tyr-206 seems important in explaining the use of small substrates in the BpAXE

The presence of Tyr-206 in the BpAXE probably helps to explain the specificity for smaller substrates shown by the AXEs with respect to carboxylesterases. Compared with the carboxylesterase AeCXE1, the presence of Tyr-206 reduces the depth of the catalytic site by approximately 4 Å. Therefore, the distance from the catalytic serine to the bottom of the gorge is reduced from the 10 Å found in AeCX1 enzyme (Iperuma *et al.*, 2008) to 6 Å in the BpAXE, drastically limiting the size of substrate that can be allocated in it. Superposition of palmitate in BpAXE structure shows that 1) the palmitate carboxylate group is located in the same position of the Tyr-206 side chain, 2) residue Pro-221, located in the base of helix α6, crashes with the C4 atom of the palmitate acyl chain and 3) the site where the palmitate acyl chain is located in the BpAXE has polar and charged, instead of hydrophobic, residues (Figure 4.9). Therefore, the use of long substrates in the BpAXE seems very difficult.

4.1.6. Discussion

Although the literature abounds with studies relating organophosphates and α/β hydrolases, no information about the action of the organophosphates in the

acetyl xylan esterases has been reported. Many serine hydrolases such as acetylcholinesterases, phospholipases or even γ-chymotrypsin have been inhibited by organophosphorus compounds (OPs). Comparison of the refined structures of wild type and paraoxon complexes shows virtually no conformational changes in the protein backbone overall or in the active site, with rmsd from 0.16 Å for γ-chymotrypsin (Harel *et al.*, 1991) up to 0.4 Å for EstA from *Thermotoga maritima* carboxylesterase (PDB code: 3DOI, Levisson *et al.*, 2009).

The X-ray structures of serine hydrolases inhibited by paraoxon show acyl pocket residues establishing H-bonds with the DEP group of paraoxon at distances closer than 4 Å. The amide nitrogen of the hydrophobic residues Phe-274 and Leu-153 make H-bonds with the phosphoryl oxygen O3 of the DEP moiety in the human plasma platelet-activating factor acetyl hydrolase at distances of 2.65 and 2.9 Å, respectively (PDB code: 3D5E; Uttamkumar and Bahnson, 2008). This interaction changes slightly in the AeCXE1 carboxylesterase from *Actinidia erianthia* (PDB code: 2O7V), since the O3 atom interacts with the amide N of two Gly residues since the β4-α3 connection is larger (Iperuma *et al.*, 2008). However, in the case of BpAXE, the distance of 2.20 Å between the O3 atom and the Tyr-91 amidic N shows a forced disposition of the paraoxon comparing the distances of 2.94 Å and 2.75 Å with Gly-92 and Gly-93, respectively, in the AeCXE1 structure, or the 2.73 Å with the Ala-198 in the EstA structure (PDB code: 3DOI, Levisson *et al.*, 2009), thus revealing a more relaxed binding. This forced disposition could explain the low k_i value obtained above, compared to other carboxylesterases (Forsberg and Puu, 1984; Febbraio *et al.*, 2008).

Since these small conformational changes of the protein do not explain the basis of the inhibition, a molecular reason for this phenomenon was hint at the resistance of S-Formylglutathione hydrolase (SFGHs, D-esterase) towards OPs. Superposition of the native SFGH from *Saccharomyces cerevisiae* (PDB code: 1PV1) and inhibited BpAXE demonstrated the absence of steric exclusion of DEP on the AXE deep active site, since no indol (from the Trp197) appears to block this gorge (Legler *et al.*, 2008) (Figure 4.10). This enzyme was mutated by W197I, enlarging the acyl pocket and increasing the rate of paraoxon inhibition in three orders of magnitude (Legler *et al.*, 2008), which suggests a putative role of Trp-197 in the SFGH esterases resistance to OPs (Figure 4.11). On the other hand, AchE from *Lucidia cuprina* was mutated in another acyl pocket residue Gly137Asp, rendering a novel OP hydrolase activity (Newcomb *et al.*, 1997). Modelling of G137D enzyme suggests the residue may act as a base that orientates a water molecule in the appropriate position for hydrolysis of the phosphorylated enzyme intermediate.

Based on the above structural requirements for paraoxon inhibition, another family of carbohydrate esterases (CE-12) might display this inhibition. RGAE from *B. halodurans* (CE-12) was inhibited to 40% activity in the presence with 5 mM

paraoxon, the RGAE from *B. subtilis* (PDB code: 2O14), to 45% identity shows no molecular exclusion in it structure towards DEP (Figure 4.12).

In conclusion, this chapter shows for the first time that carbohydrate esterases are sensitive to paraoxon inhibition, including BpAXE (CE-7) and BhRGAE (CE-12). The combined kinetic and structural results on BpAXE indicate that the binding of paraoxon to the active site is exquisitely sensitive to the gorge topography and the acyl pocket, with both being less efficient kinetically than in carboxylesterases and acetylcholinesterases. These results open up new studies of organophosphorus compound inhibition in other carbohydrate esterases, from a structural and kinetic point of view.

4.2. Cross-linked enzyme aggregates for the production of desacetyl β-lactam antibiotics intermediates

4.2.1. Optimization CLEAs production

The BpAXE enzyme, was overexpressed as a soluble protein in *E. coli* Rosetta (DE3)pLys cells, but without seleniomethionine, and purified. As a pre-screening, three different precipitants were tested, one at 90% saturation (ammonium sulphate) and the other two at 90% v/v (acetonitrile and *tert*-butanol) for one hour. When the solution became turbid, it was cross-linked with 1% glutaraldehyde until no activity was detected in the supernatant (3 hours). CLEAs prepared in such a way, were then washed, obtaining 72% recovery of the free enzyme activity with ammonium sulphate (AS-CLEAs), whereas the addition of acetonitrile or *tert*-butanol decreases the enzyme activity to only 3% and 15% recovery, respectively. The recovery activity of CLEAs particles varied from 11% at 20% AS-saturation to 72% at 80% AS-saturation (Figure 5.1 A). Thus, the later concentration of the precipitant was chosen for further assays. In addition, from the results at different concentrations of glutaraldehyde, 1% (v/v) of this dialdehyde yielded optimal results for preventing resolubilization of the aggregate upon dilution.

The structure of AS-CLEAs showed enzyme molecules packed together, forming a uniform mesh of cavities (Figure 5.2 A). In the case of acetonitrile or *tert*-butanol, the surfaces displayed fewer holes and a reduced contact area with substrate (Figure 5.2 B-C).

4.2.2. Effect of particle size

CLEAs represent a solid pellet where protein molecules are highly connected by inter- and intramolecular glutaraldehyde cross-links. In order to decrease the size of these particles and increase the substrate diffusion, several mechanical stirring methods were tested. CLEAs were vortexed for 30 seconds or for one hour as classic dispersion method. In addition, and for the first time, they were introduced

in a cell disruptor with precession movement (FastPrep). Different activities were found as a result of this mixing period and the apparatus used (Table 5.1). Relative activity after one hour of vortex was double that after 30 s. Longer agitation times did not increase this maximum relative activity (72% recovery). Surprisingly, after 30 s of FastPrep, the recovered CLEAs activity was 109% of the original (Table 5.1), which differed from the more 29% recovered when free enzymes were subjected to the same treatment. These results proved that CLEAs conferred good stability towards mechanical friction, compared to soluble enzyme form.

This mechanical mixing reduced the particle size of the clusters (Figure 5.3 A) in such a way that the majority of the aggregates distribution were in the range of 0-149 μm^2 when 3600 s of vortex and 30 s of FastPrep, corresponding to maximal recovery of the activity. However, the smaller time of vortex (30 s) only gave rise to a homogeneous distribution in particle size between 0-4999 μm^2, and 10% of big aggregates (>5000 μm^2) with clear mass transfer limitations (Figure 5.3 B).

4.2.3. Characterization of CLEAs

CLEAs prepared from BpAXE showed improved stability to temperature compared to soluble enzyme (Figure 5.4, filled triangles). Also, CLEAs presented higher stability over the pH-range studied (Figure 5.5, filled circles) and especially at pH 4.0 where around 50% of activity was recovered. In the absence of precipitant and glutaraldehyde, the native free enzymatic activity decreased rapidly at pH lower than pH 6.0 (Figure 5.5, open circles), and was almost completely inactivated at pH 4.0. Similar results were obtained at basic pHs (pHs >9.0).

CLEAs activity after 3 months at 4 °C represents 77.0% of the initial activity, whereas at room temperature it decreases to 55.3%. Both data are quite different from the soluble form of the enzyme, where only 21.2% of activity was recovered after 3 months at 4 °C, and only 9.8% at room temperature.

4.2.4. Potential for desacetylation of advanced intermediates of β-lactam antibiotics

In order to investigate the potential of acetyl xylan esterase CLEAs in the production of β-lactam antibiotics in aqueous media, the deacetylation of 7-amino cephalosporanic acid (7-ACA) and cephalosporin C (CPC) by ammonium sulphate CLEAs was studied (Figure 8.7). After 100 minutes at 20 °C, 500 µg of CLEAs were capable of converting 200 mM of 7-ACA into its corresponding desacetyl-substrate.

Reusability is one of the principal interests of biocatalysts. CLEAs can be reused either by filtration or centrifugation (Cao *et al.*, 2003). Figure 5.7, inset (open circles) shows that only 1.8% per cycle was lost in the case of 1.5 mL reaction,

whereas this percentage was only 1% per cycle in a 6 mL reactor (Figure 5.7, solid circles). This higher recovery of activity per cycle gives rise to an estimated half life of 45 cycles. This recovery and half life are in the range of usual values when an optimized immobilized enzyme is used in an industrial process, using a known solid support like Eupergit. This indicates that CLEAs produced by mechanical stirring in a FastPrep system are quite stable to mechanical stress and the enzymatic activity is recovered after several cycles, which are critical parameters for an industrial use of a catalyst.

4.3. Cloning and characterization of a carboxylesterase from *Yarrowia lipolytica*

After cloning and characterized an acetyl xylan esterase from prokaryotic origin, a novel esterase from eukaryotic origin was cloned, in order to explore a different enzyme with α/β hydrolases fold. In this chapter, we present the cloning, overexpression in two microbial expression systems, and biochemical characterization of a carboxylesterase from the yeast *Yarrowia lipolytica* CLIB122 (YICE). In addition, the enantioselective resolution of racemic (R, S) ketoprofen methyl ester was examined using the recombinant enzyme.

4.3.1. YICE cloning and purification

Y. lipolytica CLIB122 genome is recently sequenced with 48 putatives genes that codified for esterases. The gene XM503610 displays homologies with other cloned or putatives esterases (Figure 6.1), 97% to an esterase from *Y. lipolytica* CLIB180 (Kim *et al.*, 2007), 22% to CE from *Aspergillus clava*tus or *Penicillium marneffei*, or 21% with CE from *Neosartorya fischeri*.

Cloning of the gene was attempted by PCR in pPIC9K, pET28a and pET24b with the primers described in Material and Methods (section 5.2). Low protein expression and low activity were observed following expression in a eukaryotic system such as *Pichia pastoris* GS115, with both phenotypes, Mut^S and Mut^+, where, inexplicably, the enzyme was not exported to the extracellular space and conserved the N-terminal α-factor signal peptide directing the recombinant proteins to the media.

In the expression system *E. coli* with pET28a-YICE, recombinant protein was observed in sonicates, although little or no enzymatic activity was detected after different optimization, because of inclusion bodies. These expression problems might be due to the N-terminal α-factor that produces internal problems for the correct protein fold. For this reason, the pET24b vector was used since it adds a Histag in the C-terminal end of the protein. After an optimization with this system, inclusion bodies were eliminated with 0.5 mM IPTG for 18 h at 20 °C. This

improvement in expression was similar to other reported cases (Martinou *et al.*, 2003). Thus, this pET24b was found to be the most efficacious of the three used in this study.

This purified enzyme shows a specific activity of 7.02 U/mg with *p*-NPButyrate. This level of expression was not only sufficient for kinetic and biochemical studies, but also for producing large amounts of esterase for biotechnological applications (Miller *et al.*, 2005).

4.3.2. Biochemical characterization of the recombinant YICE

The purified YICE was tested toward *p*-nitrophenyl esters from C_2 to C_{14} at pH 7.5, 25 °C (Table 6.1). YICE showed higher activity for *p*-NPButyrate, and this substrate was used for the rest of the characterization. The catalytic efficiency for *p*-NPButyrate was 46.27 $mM.s^{-1}$, with this k_{cat}/K_M being higher than for other related esterases, like for a *Y. lipolytica* CLIB180 carboxylesterase (26.7 $mM.s^{-1}$) (Kim *et al.*, 2007).

To test whether YICE has a potential use in industrial applications as a biocatalyst, the enantioselective resolution of (R, S) ketoprofen methyl ester with this enzyme was studied. After 22 h, the enantiomeric excess at 22% conversion of the product was 91%. The K_M was 2.1 mM under 0.5% Triton X-100 micelated substrate, which is the same order of magnitude as other enantiospecific carboxylesterases from the bibliography calculated in similar conditions, 3.3 mM for a CE from *Pseudomonas fluorescens* (Choi *et al.*, 2003) and 16.4 mM for a CE form a metagenomic library (Kim *et al.*, 2006).

Unfortunately, *Y. lipolytica* CLIB122 carboxylesterase does not exhibit thermostability, since this yeast is a mesophilic organism, although it remains stable at pH 7.0-8.0.

4.3.3. YICE modelling

The molecular model of the monomeric YICE was obtained using the crystal structure of *p*-nitrobenzyl esterase from *B. subtilis* as template (PDB code: 1C7J) with only 18% homology (Figure 6.10). YICE has a typical α/β hydrolase fold (Ollis *et al.*, 1992), consisting of a nine-stranded β sheet, surrounded by 6+6 α-helices. Like other α/β hydrolases structures covered in this project, it contains insertions additional to the prototype fold. The binding pocket cavity is formed by the side chains of hydrophobic residues such as Ala388, Leu391, Gly104, Gly105, Val109, Gly110 and Iso112 (Figure 6.11).

4.4. Characterization of a new *Geobacillus kaustophilus* HTA426 carboxylesterase

4.4.1. GkCE cloning and purification

Sequence analysis of the *Geobacillus kaustophilus* HTA426 genome revealed one major open reading frame of 741 bp, which encodes a hypothetical polypeptide of 246 residues. The deduced amino acid sequence of the gene showed significant identity with sequences of other *Geobacillus* and *Bacillus* species in the database. The putative carboxylesterase from *G. kaustophilus*, GkCE, is most closely related to EstA of *Geobacillus thermoleovorans* YN, GtEstA (DQ 288886; GI 82791235) with a sequence identity of 99% (Figure 7.1). The enzyme also showed high homology to Est30 from *Geobacillus stearothermophilus*, GsEst30 (PDB code 1TQH; ATCC 12980 and ATCC 7954) and to the thermostable Est30 of *Geobacillus thermodenitrificans*, GtEst30 (YP_001127089), with sequence identities of 97 and 96%, respectively.

The selected gene was cloned as described in Materials and Methods (Section 5.3.1.) and was expressed in *E. coli* Rosetta (DE3), in TB medium supplemented with kanamycin-chloramphenicol and induced with 0.5 mM IPTG for 6 h. The soluble GkCE was purified by a two-step procedure consisting of a 100-kDa ultrafiltration step and Ni^{2+} chelating affinity chromatography into a HisTrap FF column. The SDS-PAGE gel of purified enzyme showed the expected band of 30 kDa (Figure 7.2, lane 2) and an additional one at 27 kDa. The two bands that appeared in the gel (30 kDa and 27 kDa) were also described by Soliman *et al.* (2007) in the closely related esterase, EstA of *G. thermoleovorans* NY, but with no explanation.

The molecular masses of these two bands were confirmed by liquid chromatography-mass spectrometry as 32,045 kDa and 27,754 kDa, respectively (Figure 7.3). These two bands could not be separated by a Ni^{2+} affinity chromatography (Figure 7.4). Bioinformatics approaches were used to identify potential peptidase cleavage sites, so a proteolytic analysis of the C-terminus was carried out by using the program CLC Protein Workbench (version 3.0.2). This showed a possible endopeptidase cut in K212-Q213 at the beginning of the β8-strand (Figure 7.1).

Thus, two mutants were constructed, one introducing a stop codon (K212Stop) and the other introducing a similar amino acid (Arg) (K212R). The first clone resulted in an expected 27 kDa dead enzyme (Figure 7.2, lane 4) since the catalytic histidine (His222) was removed. On the other hand, the second mutation resulted in an active enzyme with only one band of 30 kDa (Figure 7.2, lane 3) with a similar specific activity (5.76 U/mg versus 5.84 U/mg in the wild type). The latter mutant was used for the rest of this work and clearly confirmed the proteolytic attack as

the origin of these two bands in the GkCE, and probably explains the results obtained in EstA of *G. thermoleovorans* NY (Soliman *et al.*, 2007).

4.4.2. Biochemical characterization of the recombinant GkCE

Maximum activity was observed when *p*-NP acetate (C2) was used as a substrate (Figure 7.5). A decrease in activity was detected as the length of the side chain increased, which is similar behaviour to that described for other esterases. GkCE was not active towards β-lactams intermediaries like CPC or 7-ACA. GkCE was also tested towards (R, S) ketoprofen methyl ester, and although it showed good activity towards this substrate, ee_p was only 16.4% which could not be altered by the presence of detergents or organic solvents.

GkCE was most active at pH 8.0 and remarkably stable in a pH range of 6.0 to 9.0 (Figure 7.8), retaining 62% of activity at pH 6.0. The esterase was most stable at temperatures between 60 and 65 °C but strongly decreased at temperatures above 70°C (Figure 7.9). On the other hand, the purified GkCE showed high stability against various compounds that affect protein folding like organic solvents, detergents or urea even at 60 °C (Table 7.3).

The GkCE was completely inhibited by PMSF and paraoxon at 0.5 mM. However, Eserine, PGO and PLP, had no effect on the activity, even at 5 mM (Table 7.4). The fact that the esterase was inhibited by organophosphates such as paraoxon and by serine inhibitors such as PMSF demonstrated that the enzyme is a serine esterase (B-esterase) (Park *et al.*, 2006).

4.4.3. Determination of GkCE molecular structure

By sequence identity with the crystallized protein Est30Gs (PDB code 1TQH), the catalytic triad of GkCE was located at Ser93, His222 and Asp192 (Figure 7.1) (Figure 7.10 A). In this model, K212 was in the periphery and thus it was accessible to the attack of proteases. The GkCE folds into two domains, with the catalytic triad and substrate-binding site located at the interface between the domains (Figure 7.10 A). The smaller domain of GkCE consists of three α-helices that form a cap over the active site. This cap lies mainly near the N-terminal end of the central sheet. The larger domain resembles the classical α/β hydrolase fold. It contains a central seven-stranded sheet, β2 to β8, and a classical α/β hydrolase fold surrounded by six α-helices.

4.4.4. Determination of a new carboxylesterase family

The molecular structure, topology, and substrate specificities of GkCE and its related proteins were compared in order to assign it to a family according to the lipolytic classification of Arpigny *et al.* (2002), which includes eight families of

bacterial lipases and esterases. GkCE shows only slight homology to two different families of esterases: the hormone-sensitive lipase (HSL) family (IV) and family VI.

For this purpose, topology diagrams of different enzymes from these families were constructed (Figure 7.11). Est2 from *Alicyclobacillus acidocaldarius,* AaEst2 (PDB code 1EVQ) and brefeldin A esterase from *B. subtilis,* BsBEst (PDB code 2R11) have been classified as IV members of the lipolytic enzymes (Wei *et al.*, 1999; De Simone *et al.*, 2000). Both enzymes display the typical α/β hydrolase fold with eight β-strands (Figure 7.11 A-B). In addition, the lids of GkCE and its relatives lie mainly near to the N-terminal ends of the central β sheets instead of surrounding the catalytic triad, as observed in AaEst2 or in BsBEst (Figure 7.11 B-C). AaEst2 and the BsBEst show only 16% and 6% sequence identity, respectively, to GkCE. Because of these differences, it seems logical that the family of related *Geobacillus* CEs cannot be classified in the family IV of lipolytic enzymes.

In contrast, *Pseudomonas fluorescens* CE, PfCE (PDB code 1AUO) and *Bacillus cereus* CE, BcCE (PDB code 2H1I), members of the family VI (Kim *et al.*, 1997), display the same central β-sheet with only seven strands like GkCE and its relatives (Figure 7.11 G-H) with the N-terminal β2-strand antiparallel to the others. All of them also share similar molecular masses (about 23 to 30 kDa). However, the active form in family VI is usually a dimer (Arpigny and Jaeger, 1999), in contrast to the results described in this study, where GkCE is monomeric. In this family VI, the catalytic cores are covered by four small β-strands that appear to block the binding of long chain acid esters by covering the C-terminal strands of the β-core (the active-site cleft) close to the catalytic triad (Figure 7.11 D-E). PfCE is active on acyl chains from C2 to C10, whereas the *Geobacillus* CEs are active on chain lengths from C2 to C12 (Hong *et al.*, 1991). The cap domain in GkCE is adjacent to the active site of the enzyme although its role is unclear; it might participate in the ability of the CEs to hydrolyze esters of longer chain fatty acids. In addition, PfCE and BcCE show low sequence identity with GkCE (15 and 12%, respectively) and, in consequence, with its related esterases (GsEst30, GtEstA and GtEst30). Thus, *Geobacillus sp*. CEs do not fit in terms of the topology of this family VI, its cap domain, or its substrate specificity.

It seems evident that GkCE and its relatives derived from a common ancestor, but are not closely related to families IV and VI of lipolytic enzymes (Figure 7.12). Therefore, these observations strongly suggest that aligned proteins constitute a novel *Geobacillus* carboxylesterase family and GkCE could be considered the first completely characterized member of this family.

4.5. New molecular insights in the carboxylesterase family obtained from the characterization of *Bacillus halodurans* C125 carboxylesterase.

4.5.1. Expression and functional analysis of the recombinant *B. halodurans* carboxylesterase

By searching in the *B. halodurans* C125 genome for an open reading frame (ORF) that encodes a hypothetical esterase with high homology with GkCE from *Geobacillus kaustophilus* HTA426, a fragment of 747 bp was identified as a putative esterase (BH3554), showing sequence homology of 70% with this protein. The gene was cloned by PCR amplification using the two oligonucleotides described in Material and Methods. The BhCE enzyme was overexpresed as a soluble protein in *E. coli* Rosetta (DE3)pLys under IPTG induction (0.5 mM) at 30 °C during 14 h (Figure 8.3). The overall yield of the recombinant enzyme in the purification procedure was 71.4% with a 3.8 purification fold (Table 8.1). The best substrate was *p*-NPAcetate (C2) according to the highest kcat/K_M. A decrease of activity was observed as the length of the fatty acid chain increased. These results indicated that BhCE preferentially hydrolyzes short-chain ester compounds. The catalytic efficiency for *p*-NP Acetate was 329.2 $mM^{-1}.s^{-1}$, higher than for the others esterases here reported, YlCE and GkCE, with values of 11.51 and 101.23 $mM^{-1}.s^{-1}$, respectively. Later, these results will be discussed.

A successful conversion of 0.5 mM (R, S)-ketoprofen ME was achieved. About 45% yields of the pure (S)-enantiomer in 70 hours with 200 µg purified enzyme (Figure 8.4) was obtained. The enantiomeric excess of 77.6% (ee_p) at 15% conversion rates suggested that the enzyme might be used as a novel biocatalyst for the synthesis of optically pure (S)-ketoprofen. The K_M for (S)-ketoprofen methyl ester was 4.48 mM (Figure 8.5).

Like other *Bacillus sp.* mesophilic enzymes, BhCE was not thermostable to high temperatures, even when it remained at 90% relative activity after 48 hours in the range of 35-40 °C. In terms of the pH effect, the BhCE showed a maximum stability at pH 8.0 (Figure 8.7). The stability tested at different pH levels showed that the purified enzyme was broadly stable within a pH range from 7.5-9.5, after 24 hours. The effect was drastic after 48 hours, but 21% activity was observed even at pH 10.5 (Figure 8.8).

The inhibition pattern of BhCE by the serine additive reagents, PMSF and paraoxon but not by Eserine (Table 8.4) indicated that the enzyme belongs to the carboxylesterase group or Serine-esterases (B-esterases, EC 3.1.1.1) (Cohen *et al.*, 1956; Park *et al.*, 2006).

4.5.2. Cyclodextrins solubility studies

The phase solubility diagram (Figure 8.9) obtained with HP-β-CD showed a nonlinear relationship between the amount of ketoprofen methyl esther (KPME) solubilised and the concentration of cyclodextrins in solution (A_P type diagram, Szejtli, 1982). The substrate exhibited higher overall solubility, as a result of complexation 1:2 with HP-β-CD.

Another interesting property of the [KPME-CD] complex is that it could be considered as a KPME reservoir that refills constantly KPME, since this drug disappears from the reaction medium. This effect can be observed in Figure 8.10 which shows how BhCE activity remains linear with the time depending on the KPME remaining in the reaction medium, whereas the initial rate depends only on the free KPME concentration.

4.5.3. Determination of BhCE structure

Given the absence of a 3D structure of BhCE, a 3D model was constructed, using Est30 from *G. stearothermophilus* (PDB code: 1TQH) as template. Figure 8.11 shows the general folding pattern of the BhCE model obtained. This domain revealed the presence of a central β-sheet consisting of 7 parallel strands, surrounded by α-helices in a α/β/α sandwich fold. The Asp and His residues are located at the C-terminal ends of strands 6 and 7, respectively. Thus, as shown in Figure 8.11, the catalytic site is located at the bottom of a gorge created by C-terminal β-strands.

The classification of vast amounts of emerging sequence and structural data into evolutionary families (SCOP or CATH databases), some light has arisen to understand the relationships between protein sequence and structure. On rendering the topology diagrams of the carboxylesterase family (102623) from the SCOP superfamily α/β hydrolase, *Geobacillus stearothermophilus* carboxylesterase (PDB code: 1TQH) and *Bacillus stearothermophilus* carboxylesterase (PDB code: 1R1D), these display a similar order of the central β-sheet (Figure 8.12 B-C). In chapter VII, 1TQH and GkCE were classified into the same family; 1R1D shows 97% homology with GkCE and also belongs to this new family, together with *Bacillus cereus* carboxylesterase (BcCE), different from 2H1I.

BhCE displays a similar organization surrounding the central β-sheet, but a cap with different orientation, Figure 8.12 shows helix α6 clearly moved to the right and to the left, in BhCE and BcCE, respectively. The clear movement of the cap (approximately 3 Å) in the BhCE structure might be responsible for the substrate specificities changes that this enzyme displays, compared to GkCE, as described above, since the large cap allows higher substrates or even facilitates the entrance and exit.

4.5.4. Discussion

Generally, the primary sequence of a protein dictates its fold and function, and accumulative changes in this sequence lead to the evolution of protein structures and functions. However, examples exist where very similar or even identical sequences fold into different structures.

In the search for specific amino-acid residues responsible for the enzymatic differences between these closely related enzymes, the volumetric cavity of both crystallized structures (1TQH and 1R1D), members of a same subfamily which differ by only a few amino-acid residues (99% homology), were calculated using AutoDock 4.0 program (http://autodock.scripps.edu/) (Morris y col., 1998) (Figure 8.14). The analysis showed that 1TQH cavity was up two times higher than 1R1D cavity, only because of a unique change in the primary structure. 1TQH presents a Glu78 instead of the Gln78 of 1R1D. This subtle change in sequence causes downstream the side chain of Lys122 to be oriented toward the 1R1D cavity, so limiting its accessible volume (Figure 8.15).

Therefore, it was very important to establish the basis for such structural divergence. In this way, volumes of all the related proteins aligned in Figure 8.2 were calculated, finding two major groups of enzymes, one with higher (>190 $Å^3$) and the other with smaller volumetric cavity (<160 $Å^3$). In the search for the residues implicated in the protein structure plasticity, the residue 180 was directly related with the volumetric cavity, since BhCE/1TQH/GtEst30/BcCE/BtCE/BpCE/BaCE/BlCE all display an Ile180 instead of a Val180, as in GkCE/1R1D/GtEstA. This unique conserved mutation led to big changes since it produced a 0.5 Å movement in the helix α8 (Figure 8.16), which limited the active site pocket. This specific amino acid might not be the only important change that affects the final cavity; but it was the only one conserved in both groups and with representative structural results.

A phylogenetic tree of all the related carboxylesterases illustrates the evolutionary relationships between these enzymes and how this change (Ile180Val) reduces the volumetric cavity (Figure 8.17).

5. Conclusions

5.1. Molecular bases for the structural and kinetic interaction of acetyl xylan esterases by paraoxon

The results presented in chapter IV show, for the first time that a large family of carbohydrate esterases, such as BpAXE (CE-7) and BhRGAE (CE-12) are sensitive to paraoxon inhibition. The combined kinetic and structural results of BpAXE indicate

that the binding of paraoxon to the active site is exquisitely sensitive to the gorge topography and the acyl pocket, with both being less efficient kinetically than in carboxylesterases and acetylcholinesterases. These results open up new studies of organophosphorus compounds inhibition in other carbohydrate esterases, from both a structural and kinetic point of view.

5.2. Cross-linked enzyme aggregates in the production of desacetyl β-lactam antibiotics derivatives, an optimized and efficient process

The results presented in chapter V indicate the possibility of using CLEAs to obtain β-lactams advanced intermediates (desacetyl-7-ACA and desacetyl-cephalosporanic acid), since the methodology developed reduces the time for producing CLEAs compared to the known technology (30 s vs 1 hour), with a high activity and operational stability, just by using a new mechanical stirring apparatus (FastPrep) to separate the aggregates produced after cross-linking. Thus, this study opens up a new era in CLEA technology, decreasing the costs of the biocatalyst, in terms of production and operational stability.

5.3. Cloning, expression in two different systems and characterization of a carboxylesterase from Yarrowia lipolytica

This study represents the characterization of a novel carboxylesterase from a eukaryotic source, *Yarrowia lipolytica* CLIB122 expressed without inclusion bodies in pET24b. The protein showed an enantioselectivity toward (R, S)-ketoprofen methyl ester, being clearly effective to produce R-ketoprofen with an enantiomeric excess of 91% for the toothpaste market.

5.4. Cloning, characterization of *Geobacillus kaustophilus* carboxylesterase and structural determination of a new esterase family

A hypothetical carboxylesterase from *Geobacillus kaustophilus* HTA426 has been overexpressed, purified and mutated in *E. coli*, to obtain a stable 30 kDa protein by removing the endopeptidase cut. This increase in expression by repairing the endopeptidase cut has not been previously described for these enzymes. The enzyme was active with high stability under alkaline pH, temperature (60 °C), non ionic detergents and organic solvents, which are important characteristics required for applications in detergents formulations and biotransformations. The three-dimensional structure was modelled by sequence alignment and compared with other carboxylesterases. GkCE and its relatives belong to a new bacterial carboxylesterase family, totally different to the other carboxylesterases families IV and VI based on their amino acid sequences, crystal structure and some kinetic characteristics properties.

5.5. Efficient enantioselective biocatalysis of (R, S)-ketoprofen ester in the presence of cyclodextrins

A carboxylesterase (EC 3.1.1.1) from *B. halodurans* C125 was overexpressed in *E. coli* and purified. The enzyme can catalyze the reaction of (R, S)-ketoprofen methyl ester with higher estereospecificity for (S)-ketoprofen methyl ester with an enantiomeric excess of 77%. This compound was complexed with hydroxypropyl-β-cyclodextrins, acting as a reservoir to produce a high level of conversion compared one obtained without cyclodextrins. The detailed study of volumetric cavity and sequence of *B. halodurans* carboxylesterase and relatives has permuted to subdivide the new family described in this project into two subclasses, one with cavities bigger than 190 $Å^3$ and the other with cavities smaller than 160 $Å^3$.

Bibliografía

Abrahan E.P., Newton G.G.F. The structure of cephalosporin C. (1923) *Biochem. J.* 79:377-393.

Akinterinwa O., Cirino P.C. Heterologous expression of d-xylulokinase from *Pichia stipitis* enables high levels of xylitol production by engineered *Escherichia coli growing on xylose*. (2009) *Metabolic Engineering* 11:48-55.

Aldridge W.N. Serum esterases. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination (1953) *Biochem. J.* 53:110–117.

Aloulou A., Puccinelli D., De Caro A., Leblond Y., Carrière F. A comparative study on two fungal lipases from *Thermomyces lanuginosus* and *Yarrowia lipolytica* shows the combined effects of detergents and pH on lipase adsorption and activity. (2007) *Biochim. Biophys. Acta* 1771:1446-1456.

Aloulou A., Rodriguez J.A., Fernandez S., Van Oosterhout D., Puccinelli D., Carrière F. Exploring the specific features of interfacial enzymology based on lipase studies. (2006) *Biochim. Biophys. Acta* 1761:995-1013.

Aloulou A., Rodriguez J.A., Puccinelli D., Mouz N., Leclaire J., Leblond Y., Carrière F. Purification and biochemical characterization of the LIP2 lipase from *Yarrowia lipolytica. (*2007) *Biochim. Biophys. Acta* 1771:228-237.

Altaner C., Saake B., Tenkanen M., Eyzaguirre J., Faulds C.B., Biely P., Viikari L., Siika-aho M., Puls J. Regioselective deacetylation of cellulose acetates by acetyl xylan esterases of different CE-families. (2003) *J. Biotechnol.* 105:95-104.

Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. Basic local alignment search tool. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410.

Anderson T.F. Techniques for the preservation of three-dimensional structure in preparing specimens for the electron microscope. (1951) *Trans. NY Acad. Sci.* 13:130-134.

Andreeva A., Howorth D., Brenner S.E., Hubbard T.J., Chothia C., Murzin A.G. SCOP database in 2004: refinements integrate structure and sequence family data. (2004) *Nucleic Acids Res.* 32:D226-229.

Araújo R., Silva C., Machado R., Casal M., Cunha A.M., Rodriguez-Cabello J.C., Cavaco-Paulo A. Proteolytic enzyme engineering: a tool for wool. (2009) *Biomacromolecules* 10:1655-1661.

Arnold B.H., Norman H. Hydrolysis of the acetoxymethyl group at the 3-position of the cephalosporin nucleus. (1969) US, 3:239-394.

Arnold K., Bordoli L., Kopp J., Schwede T. The SWISS-MODEL workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. (2006) *Bioinformatics* 22:195-201.

Arpigny J.L., Jaeger K.E. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. (1999) *Biochem. J.* 1:177-183.

Atomi H. Recent progress towards the application of hyperthermophiles and their enzymes. (2005) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 9:166-173.

Atomi H., Imanaka T. Thermostable carboxylesterases from hyperthermophiles. (2004) *Tetrahedron Asymmetry* 15:2729-2735.

Avouac B., Teule M. Ketoprofen: the European experience (1988) *J. Clin. Pharmacol.* 28:S2-S7

Ayala M., Horjales E., Pickard M.A., Vazquez-Duhalt R. Cross-linked crystals of chloroperoxidase. (2002) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 295:828-831.

Aytar B.S., Bakir U. Preparation of cross-linked tyrosinase aggregates. (2008) *Process Biochem.* 43:125-131.

Bakshy K., Gummadi S.N., Manoj N. Biochemical characterization of Alr1529, a novel SGNH hydrolase variant from *Anabaena sp.* PCC 7120. (2009) *Biochim. Biophys. Acta.* 1794:324-334.

Bankar A.V., Kumar A.R., Zinjarde S.S. Environmental and industrial applications of Yarrowia lipolytica. (2009) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84:847-865.

Barbe S., Lafaquière V., Guieysse D., Monsan P., Remaud-Siméon M., André I. Insights into lid movements of *Burkholderia cepacia* lipase inferred from molecular dynamics simulations. (2009) *Proteins* 77:509-523.

Barrett A.J., Rawlings N.D. 'Species' of peptidases. (2007) *Biol. Chem.* 388: 1151-1157.

Barth G., Gaillardin C. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. (1997) *FEMS Microbiol. Rev.* 19:219-237.

Bencharit S., Edwards C.C, Morton C.L., Howard-Williams E.L., Kuhn P., Potter P.M., Redinbo M.R. Multisite Promiscuity in the Processing of Endogenous Substrates by Human Carboxylesterase 1. (2006) *J. Mol. Biol.* 363:201-214.

Bencharit S., Morton C.L., Hyatt J.L., Kuhn P., Danks M.K., Potter P.M., Redinbo M.R. Crystal structure of human carboxylesterase 1 complexed with the Alzheimer's drug tacrine: From binding promiscuity to selective inhibition. (2003) *Chem. Biol.* 10:341-349.

Bhattacharjya S., Balaram P. Effects of organic solvents on protein structures: observation of a structured helical core in hen egg-white lysozyme in aqueous dimethylsulfoxide. (1997) *Proteins: Structure, Function and Genetic* 29:492-507.

Bicchi C., Cagliero C., Liberto E., Sgorbini B., Martina K., Cravotto G., Rubiolo P. New asymmetrical per-substituted cyclodextrins (2-O-methyl-3-O-ethyl- and 2-O-ethyl-3-O-methyl-6-O-t-butyldimethylsilyl-β-derivatives) as chiral selectors for enantioselective gas chromatography in the flavour and fragrance field. (2010) *Journal of Chromatography A* 1217:1106-1113.

Bikadi Z., Hazai E. Application of the PM6 semi-empirical method to modelling proteins enhances docking accuracy of AutoDock. (2009) *J. Cheminf.* 1:15.

Bornemann S., Cassells J.M., Dordick J.S., Hacking A.J. The use of enzymes to regioselectivity deacylete sucrose esters. (1992) *Biocatalysis* 7:1-12.

Bornscheuer U.T. Microbial carboxylesterases: classification, properties and application in biocatalysis. (2002) *FEMS Microbiol. Rev.* 26:73-81.

Bornscheuer U.T. Methods to increase enantioselectivity of lipases and esterases. (2002) *Curr. Opin. Biotechnol.* 13:543-547.

Bornscheuer U.T., Kazlauskas R.J. Hydrolases in organic synthesis: regio- and stereoselective biotransformations (1999) *Wiley-VCH, Weinheim*, 2nd edition.

Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. (1976) *Anal. Biochem.* 72:248-254.

Brady L., Brzozowski A.M., Derewenda Z.S., Dodson E., Dodson G., Tolley S., Turkenburg J.P., Christiansen L., Huge-Jensen B., Norskov L. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. (1990) *Nature* 343:767-770.

Brown D.L., Glatz C.E. Aggregate breakage in protein precipitation. (1986) *Chem. Eng. Sci.* 47:1831-1839.

Bugg T.D. Diverse catalytic activities in the alphabeta-hydrolase family of enzymes: activation of H_2O, HCN, H_2O_2, and O_2. (2004) *Bioorg. Chem.* 32:367-375.

Byun J.S., Rhee J.K., Kim D.U., Oh J.W., Cho H.S. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of EstE1, a new and thermostable esterase cloned from a metagenomic library. (2006) *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 62:145-147.

Cabre F., Fernandez M.F., Calvo L., Ferrer X., Garcia M.L., Mauleon D. Analgesic, antiinflammatory, and antipyretic effects of S(+)ketoprofen in vivo. (1998) *J. Clin. Pharmacol.* 38:3S-10S.

Cantarel B.L., Coutinho P.M., Rancurel C., Bernard T., Lombard V., Henrissat B. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. (2009) *Nucleic Acids Res.* 37:D233-238.

Cao L., van Langen L.M, Sheldon R.A. Immobilized enzymes: carrier-bound or carrier-free? (2003) *Curr. Opin. Biotechnol.* 14:387-394.

Cao L., van Langen L.M., van Rantwijk F., Sheldon R. A. Cross-linked aggregates of penicillin acylase: robust catalysts for the synthesis of β-lactam antibiotics. (2001) *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 11:665-670.

Chan A.W.J., Becker T., Neufeld R.J. Subtilisin absorptive encapsulation and granulation. (2005) *Process Biochemistry* 40:1903-1910.

Chaudhuri T.K., Horii K., Yoda T., Arai M., Nagata S., Terada T.P., Uchiyama H., Ikura T., Tsumoto K., Kataoka H., Matsushima M., Kuwajima K., Kumagai I. Effect of the extra n-terminal methionine residue on the stability and folding of recombinant alpha-lactalbumin expressed in *Escherichia coli*. (1999) *J. Mol. Biol.* 285:1179-1194.

Choi G.S., Kim J.Y., Kim J.H., Ryu Y.W., Kim G.J. Construction and characterization of a recombinant esterase with high activity and enantioselectivity to (S)-ketoprofen ethyl ester. (2003) *Protein Expr. Purif.* 29:85-93.

Chen Y., Usui S., Queener S.W., Yu C. Purification and properties of *p*-nitrobenzyl esterase from *Bacillus subtilis*. (1995) *J. Ind. Micro.* 15:10-18.

Clair N.L., Navia J. Cross-linked enzyme crystal as robust biocatalyst. (1992) *J. Am. Chem. Soc.* 114:7314-7316.

Cohen J.A., Janz H.S., Oosterbaan R.A. The chemical structure of the reactive group of esterases. (1956) *Biochim. Biophys. Acta.* 2:402-403.

Cole P.A. Chaperone-assisted protein expression. (1996) *Structure* 4:239-242.

Combet C., Jambon M., Deléage G., Geourjon C. Geno3D: Automatic comparative molecular modelling of protein. (2002) *Bioinformatics* 18:18213-18214.

Connors K.A. Binding constant-The measurement of molecular complex stability (1986) John Wiley&Sons, New York.

Constantino H.R., Brown S.H., Nelly R.M. Purification and characterization of a glucosidase from hyperthermophilic archaeobacterium, *Pyrococcus furiosus,* exhibing a temperature optimum of 105 to 115 °C. (1990) *J. Bacteriol.* 172:3654-3660.

Cooper S.A., Reynolds D.C., Reynolds B., Hersh E.V. Analgesic efficacy and safety of (R)- ketoprofen in postoperative dental pain (1998) *J. Clin. Pharmacol.* 38:11S-18S.

Correia M.A., Prates J.A., Brás J., Fontes C.M., Newman J.A., Lewis R.J., Gilbert H.J., Flint J.E. Crystal structure of a cellulosomal family 3 carbohydrate esterase from *Clostridium thermocellum* provides insights into the mechanism of substrate recognition. (2008) *J. Mol. Biol.* 379:64-72.

Coutinho P.M., Henrissat B. Carbohydrate-active enzymes: An integrated database approach. (1999) In: Gilbert, H.J., Davies, G., Henrissat B. and Svensson B. pp. 3-12, Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering, Royal Society of Chemistry, Cambridge.

Cregg J.M., Cereghino J.L., Shi J., Higgins D.R. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris.* (2000) *Mol. Biotechnol.* 16:23-52.

Crowe J., Dobeli H., Gentz R., Hochuli E., Stuber D., Henco K. 6xHis-Ni-NTA chromatography as a superior technique in recombinant protein expression/purification. (1994) *Methods Mol. Biol.* 31:371-387.

Cuff A.L., Sillitoe I., Lewis T., Redfern O.C., Garratt R., Thornton J., Orengo C.A. The CATH classification revisited--architectures reviewed and new ways to characterize structural divergence in superfamilies. (2008) *Nucleic Acids Res.* 37:D310-D314.

Cummins I., McAuley K., Fordham-Skelton A., Schwoerer R., Steel P.G., Davis B.G., Edwards R. Unique regulation of the active site of the serine esterase S-formylglutathione hydrolase. (2006) *J. Mol. Biol.* 359:422-432.

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

Daly R., Hearn M.T. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. (2005) *J. Mol. Recognit.* 18:119-138.

Dana R., Saghbini M., Lippman D., Cheung A. Isolating RNA using the FastPrep™ System. (1995) *J. NIH. Res.* 7, 61.

de Pascale D., Cusano A.M., Autore F., Parrilli E., di Prisco G, Marino G., Tutino M.L. The cold-active Lip1 lipase from the Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 is a member of a new bacterial lipolytic enzyme family. (2008) *Extremophiles* 12:311-323.

De Simone G., Galdiero S., Manco G., Lang D., Rossi M., Pedone C. A snapshot of a transition state analogue of a novel thermophilic esterase belonging to the subfamily of mammalian hormone-sensitive lipase. (2000) *J. Mol. Biol.* 303:761-771.

De Simone G., Menchise V., Alterio V., Mandrich L., Rossi M., Manco G., Pedone C. The crystal structure of an EST2 mutant unveils structural insights on the H group of the carboxylesterase/lipase family. (2004) *J. Mol. Biol.* 343:137-146.

Degrassi G., Kojic M., Ljubijankic G., Venturi V. The acetyl xylan esterase of *Bacillus pumilus* belongs to a family of esterases with broad substrate specificity. (2000) *Microbiology* 146:1585-1591.

Degrassi G., Okeke B.C., Bruschi C.V., Venturi V. Purification and characterization of an acetyl xylan esterase from *Bacillus pumilus.* (1998) *Appl. Environ. Microbiol.* 64:789-792.

DeLano W.L. The PyMOL Molecular Graphics System DeLano Scientific (2002) Palo Alto, CA, USA.

Dower W.J., Miller J.F., Ragsdale C.W. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. (1988) *Nucleic Acids Res.* 16:6127-6145.

Drenth J., Hol W.G.J., Jansonius J.N., Koekoek R. Subtilisin Novo: the three-dimensional structure and its comparison with subtilisin (2005) *Eur. J. Biochem.* 26:177-181.

Egorova K., Antranikian G. Industrial relevance of thermophilic Archaea. (2005) *Curr. Opin. Microbiol.* 8:649-655.

Elander R.P. Industrial production of β-lactam antibiotics. (2003) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61:385-392.

Samanta U., Kirby S.D., Srinivasan P., Cerasoli D.M., Bahnson B.J. Crystal structures of human group-VIIA phospholipase A2 inhibited by organophosphorus nerve agents exhibit non-aged complexes. (2009) *Biochem. Pharmacol.* 78:420-429.

Ericsson D.J., Kasrayan A., Johansson P., Bergfors T., Sandström A.G., Bäckvall J.E., Mowbray S.L. X-ray structure of *Candida antarctica* lipase A shows a novel lid structure and a likely mode of interfacial activation. (2008) J. Mol. Biol. 376:109-119.

Eto M. Organophosphorus Pesticides: Organic and Biological Chemistry. (1974) CRC Press, Cleveland OH 123-158.

Ewis H.E., Abdelal A.T., Lu C.D. Molecular cloning and characterization of two thermostable carboxyl esterases from *Geobacillus stearothermophilus*. (2004) *Gene* 31:187-195.

Febbraio F., D'Andrea S.E., Mandrich L., Merone L., Rossi M., Nucci R., Manco G. Irreversible inhibition of the thermophilic esterase EST2 from *Alicyclobacillus acidocaldarius*. (2008) *Extremophiles* 12:719-728.

Fernandes J.F.A., McAlpine M., Halling P.J. Operational stability of subtilisin CLECs in organic solvents in repeated batch and in continuous operation. (2005) *Biochem. Eng. J.* 24:11-15.

Fickers P., Benetti P.H., Wache Y., Marty A., Mauersberger S., Smit M.S., Nicaud J.M. Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. (2005) *FEMS Yeast Res.* 5:527-543.

Fischer M., Pleiss J. The Lipase Engineering Database: a navigation and analysis tool for protein families. (2003) *Nucleic Acids Res.* 31:319-321.

Forsberg A., Puu G. Kinetics for the inhibition of acetylcholinesterase from the electric eel by some organophosphates and carbamates. (1984) *Eur. J. Biochem.* 140:153-156.

Geourjon C., Combet C., Blanchet C., Deleage G. Identification of related proteins with weak sequence identity using secondary structure information. (2001) *Protein Sci.* 10:788-797.

Ghezzi P., Melillo G., Meazza C., Sacco S., Pellegrini L., Asti C., Porzio S., Marullo A., Sabbatini V., Caselli G., Bertini R. Differential contribution of R- and S- isomers in ketoprofen anti-inflammatory activity: role of cytokine modulation (1988) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 287:969-974.

Ghosh D., Erman M., Sawicki M., Lala P., Weeks D.R., Li N., Pangborn W., Thiel D.J., Jörnvall H., Gutierrez R., Eyzaguirre J. Determination of a protein structure by iodination: the structure of iodinated acetyl xylan esterase. (1999) *Acta Crystallogr. D* 55:779-784.

Głowacka A.E., Podstawka E., Szczęsna-Antczak M.H., Kalinowska H., Antczak T. Kinetic and molecular properties of *Bacillus subtilis* IBTC-3 subtilisin. (2005) *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochem. Mol. Biol.* 140:321-331.

Godfrey T., West S. Introduction to industrial enzymology. In: Godfrey T, West S, editors. Industrial enzymology. 2nd ed. London: Macmillan, 1996. p.1-8.

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

Gong P.F., Wu H.Y., Xu J.H, Shen D., Liu Y.Y. Biocatalytic preparation of enantiopure (R)-ketoprofen from its racemic ester by a new yeast isolate *Citeromyces matriensis* CGMCC 0573 (2002) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58:728-734.

Gordillo F., Caputo V., Peirano A., Chavez R., Van Beeumen J., Vandenberghe I., Claeyssens M., Bull P., Ravanal M.C., Eyzaguirre J. *Penicillium purpurogenum* produces a family 1 acetyl xylan esterase containing a carbohydrate-binding module: characterization of the protein and its gene. (2006) *Mycol. Res.* 110:1129-1139.

Gouet P., Courcelle E., Stuart D. I. Metoz F. ESPript: Multiple sequence alignment in PostScript. (1999) *Bioinformatics* 15:305-308.

Grosjean H., Fiers W. Preferential codon usage in prokaryotic genes: the optimal codon-anticodon interaction energy and the selective codon usage in efficiently expressed genes. (1982) *Gene* 18:199-209.

Guex N. and Peitsch M. C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling. (1997) *Electrophoresis* 18: 2714-2723.

Gupta P., Dutt K., Misra S., Raghuwanshi S., Saxena R.K. Characterization of cross-linked immobilized lipase from thermophilic mould *Thermomyces lanuginosa* using glutaraldehyde. (2009) *Bioresour. Technol.* 100:4074-4076.

Gupta R., Beg Q.K., Lorenz P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. (2002) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59:15-32.

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

Hakulinen N., Tenkanen M., Rouvinen J. Three-dimensional structure of the catalytic core of acetyl xylan esterase from *Trichoderma reesei*: insights into the deacetylation mechanism. (2000) *J. Struct. Biol.* 132:180-190.

Hara P., Hanefeld U., Kanerva L.T. Sol–gels and cross-linked aggregates of lipase PS from *Burkholderia cepacia* and their application in dry organic solvents. (2008) *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 50:80-86.

Harel M., Su C.T., Frolow F., Ashani Y., Silman I., Sussman J.L. Refined crystal structures of "aged" and "non-aged" organophosphoryl conjugates of gamma-chymotrypsin. (1991) *J. Mol. Biol.* 221:909-918.

Harris R.H., Vavra I. Ketoprofen: anti-inflammatory and anti-rheumatic drugs. (1985) *CRC Press, Boca Rotan* 2:151-69.

Hartmeier W. Immobilized Biocatalysts. (1988) Berlin: Spreinger-Verlag.

Heefner D.L., Zepp M. Enantioselective hydrolysis of ketoprofen esters by *Beauveria bassiana* and enzymes derived there from. (1994) *PCT Int. Appl.* WO 94 20635 A1.

Heikinheimo P., Goldman A., Jeffries C., Ollis D.L. Of barn owls and bankers: a lush variety of α/β hydrolases. (1999) *Structure* 7:R141-R146.

Hernández A.F., López O., Rodrigo L., Gil F., Pena G., Serrano J.L., Parrón T., Alvarez J.C., Lorente J.A., Pla A. Changes in erythrocyte enzymes in humans long-term exposed to pesticides: influence of several markers of individual susceptibility. (2005) *Toxicol. Lett.* 159:13-21.

Higuchi T., Connors K.A. Phase solubility techniques (1965) *Adv. Anal. Chem. Instr.* 210:56-63.

Hirayama F., Uekama K. Methods of investigating and preparing inclusion compounds. (1987) D. Duchêne, Editor, Cyclodextrins and their industrial uses. Editions de Santé, Paris 131-172.

Holmquist M. Alpha/Beta-hydrolase fold enzymes: structures, functions and mechanisms. (2000) *Curr. Protein Pept. Sci.* 1:209-235.

Hong K.H., Jang W.H., Choi K.D., Yoo O.J. Characterization of *Pseudomonas fluorescens* carboxylesterase: cloning and expression of the esterase gene in *Escherichia coli.* (1991) *Agric. Biol. Chem.* 11:2839-2845.

Hotelier T., Renault L., Cousin X., Negre V., Marchot P., Chatonnet A. ESTHER, the database of the alpha/beta-hydrolase fold superfamily of proteins. (2004) *Nucleic Acids Res.* 32:145-147.

Hummel A., Brüsehaber E., Böttcher D., Trauthwein H., Doderer K., Bornscheuer U.T. Isoenzymes of pig-liver esterase reveal striking differences in enantioselectivities. (2007) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 46:8492-8494.

Hutt A.J., Caldwell J. The importance of stereochemistry in the clinical pharmacokinetics of the 2-arylpropionic acid nonsteroidal anti-inflammatory drugs. (1984) *Clin. Pharmacokin.* 9:371

Ileperuma N.R., Marshall S.D., Squire C.J., Baker H.M., Oakeshott J.G, Russell R.J., Plummer K.M., Newcomb R.D., Baker E.N. High-resolution crystal structure of plant carboxylesterase AeCXE1, from *Actinidia eriantha*, and its complex with a high affinity inhibitor paraoxon. (2007) *Biochemistry* 46:1851-1859.

Imanaka H., Miroyoshi T., Konomi T., Kubochi Y., Hattori S., Kawakit T. Process for the preparation of desacetylcephalosporin C. EP0044736, 1982.

Jaeger K.E, Eggert T. Enantioselective biocatalysis optimized by directed evolution. (2004) *Curr. Opin. Biotechnol.* 15:305-331.

Jaeger K.E, Eggert T. Lipases for biotechnology. (2002) *Curr. Opin. Biotechnol.* 13:390-397.

Jaeger K.E., Dijkstra B.W., Reetz M.T. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. (1999) *Annu. Rev. Microbiol.* 53:315-351.

Jaeger K.E., Ransac S., Dijkstra B.W., Colson C., Van Heuvel M., Misset O. Bacterial lipases. (1994) *FEMS Microbiol. Rev.* 15:29-63.

Jaeger K.E., Reetz M.T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. (1998) *Trends Biotechnol.* 16:396-403.

Moore J.C., Arnold F.H. Directed evolution of a *p*-nitrobenzyl esterase for aqueous-organic solvents. (1996) *Nature Biotechnology* 14:458-467.

Jeffery J.D., Abraham E.P., Newton G.G.F. Deacetylcephalosporin C. (1961) *Biochem. J.* 81:591-596.

Jesenská A., Monincová M., Koudeláková T., Hasan K., Chaloupková R., Prokop Z., Geerlof A., Damborsky J. Biochemical characterization of haloalkane dehalogenases DrbA and DmbC, representatives of a novel subfamily. (2009) *Appl. Environ. Microbiol.* 75:5157-5166.

Johansson P., Unge T., Cronin A., Arand M., Bergfors T., Jones T.A., Mowbray S.L. Structure of an atypical epoxide hydrolase from *Mycobacterium tuberculosis* gives insights into its function. (2005) *J. Mol. Biol.* 351:1048-1056.

Kakugawa S., Fushinobu S., Wakagi T., Shoun H. Characterization of a thermostable carboxylesterase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima.* (2007) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74:584-591.

Kang H.Y., Kim J.F., Kim M.H., Park S.H., Oh T.K., Hur C.G. MELDB: a database for microbial esterases and lipases. (2006) *FEBS Lett.* 580:2736-2740.

Katchalski-Katzir E., Kraemer D.M. Eupergit C., a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. (2000) *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 10:157-176.

Kitchen D.B., Decornez H., Furr J.R., Bajorath J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. (2004) *Nature reviews. Drug discovery* 3: 935-949.

Kleifeld O., Frenkel A., Bogin O., Eisenstein M., Brumfeld V., Burstein Y. Spectroscopic studies of inhibited alcohol dehydrogenase from *Thermoanaerobacter brockii*: proposed structure for the catalytic intermediate state. (2000) *Biochemistry* 39:7702-7711.

Kim G.J., Choi G.S., Kim J.Y., Lee J.B., Jo D.H., Ryu Y.W. Screening, production and properties of a stereospecific esterase from *Pseudomonas sp.* S34 with high selectivity to (S)-ketoprofen ethyl ester. (2003) *J. Mol. Catal. B.: Enzym.* 17:29-38.

Kim J.Y., Choi G.S., Kim Y.J., Ryu Y.W., Kim G.J. A new isolate *Bacillus stearothermophilus* JY144 expressing a novel esterase with high enantioselectivity to (R)-ketoprofen ethyl ester: strain selection and gene cloning. (2002) *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 18:133-145.

Kim J., Grate J.W., Wang P. Nanobiocataysis and its potential applications. (2008) *Trends Biotechnol.* 11:639-646.

Kim J.T., Kang S.G., Woo J.H., Lee J.H., Jeong B.C., Kim S.J. Screening and its potential application of lipolytic activity from a marine environment: characterization of a novel esterase from *Yarrowia lipolytica* CL180. (2007) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74:820-828.

Kim J.Y., Choi G.S., Kim Y.J., Ryu Y.W., Kim G.J. A new isolate *Bacillus stearothermophilus* JY144 expressing a novel esterase with high enantioselectivity to (R)-ketoprofen ethyl ester: strain selection and gene cloning. (2002) *J. Mol. Catal. B.: Enzym.* 18:133-145.

Kim K.K., Song H.K., Shin D.H., Hwang K.Y., Choe S., Yoo O.J., Suh S.W. Crystal structure of carboxylesterase from *Pseudomonas fluorescens,* an α/β hydrolase with broad substrate specificity. (1997) *Structure* 5:1571-1584.

Kim S., Lee S.B. Thermostable esterase from a thermoacidophilic archaeon: purification and characterization for enzymatic resolution of a chiral compound. (2004) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68:2289-2298.

Kim Y.J., Choi G.S., Kim S.B., Yoon G.S., Kim Y.S., Ryu Y.W. Screening and characterization of a novel esterase from a metagenomic library. (2006) *Protein Expr. Purif.* 45:315-323.

Knauseder F., Schiestl M., Schoergendorfer K. Nucleic acid molecule encoding a cephalosporin acetylesterase. (1999) WO 99/55881.

Korza H.J., Bochtler M. *Pseudomonas aeruginosa* LD-carboxypeptidase, a serine peptidase with a Ser-His-Glu triad and a nucleophilic elbow. (2005) *J. Biol Chem.* 280:40802-40812.

Kostetsky P.V. Location and volume of the active site of chymotrypsin. (2007) *Biochemistry (Moscow)* 72:392-397.

Kousba A.A., Sultatos L.G., Poet T. S., Timchalk C. Comparison of chlorpyrifos-oxon and paraoxon acetylcholinesterase inhibition dynamics: potential role of a peripheral binding site. (2004) *Toxicological Sciences* 80:239-248.

Krebsfänger N., Schierholz K., Bornscheuer U.T. Enantioselectivity of a recombinant esterase from *Pseudomonas fluorescens* towards alcohols and carboxylic acids. (1998) *J. Biotechnol.* 60:105-111.

Kukolja S. Chemistry of cephalosporin antibiotics. XI. Preparation and properties of desacetylcephaloglycin and its lactone. (1968) *J. Med. Chem.* 11:1067-1069.

Kumar D., Bhalla T.C. Microbial proteases in peptide synthesis: approaches and applications. (2005) *Applied Microbiol. Biotechnol.* 68:726-736.

Kumar D., Chand D., Sankhian U.D., Bhalla T.C. *Bacillus sp.* APR-4 protease as a laundry additive. (2004) *Indian J. Biotechnol.* 3:563-567.

Kumar D., Savitri, Thakur N., Verma R., Bhalla T.C. Microbial Proteases and Applications as Laundry Detergent Additive. (2008) *Research J. Microbiol.* 3:661-672.

Kumar S., Dudley J., Nei M., Tamura K. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. (2008) *Briefings in Bioinformatics* 9:299-306.

Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. (1970) *Nature* 227:680-685.

Larsen M.W., Bornscheuer U.T., Hult K. Expression of *Candida antarctica* lipase B in *Pichia pastoris* and various *Escherichia coli* systems Protein. (2008) *Expression and Purification* 62:90-97.

Laskowski R.A., MacArthur M.W., Moss D.S., Thornton, J.M. PROCHECK: A program to check the stereochemical quality of protein structures. (1993) *J. Appl. Cryst.* 26:283-291.

Legler P. M., Kumaran D., Swaminathan S., Studier F.W., Millard C.B. Structural characterization and reversal of the natural organophosphate resistance of a D-type esterase, *Saccharomyces cerevisiae* S-formylglutathione hydrolase. (2008) *Biochemistry* 47:9592-9601.

Levisson M., Sun L., Hendriks S., Swinkels P., Akveld T., Bultema J.B., Barendregt A., Van Den Heuvel R.H., Dijkstra B.W., Van Der Oost J., Kengen S.W. Crystal structure and biochemical properties of a novel thermostable esterase containing an immunoglobulin-like domain. (2009) *J. Mol. Biol.* 385:949-962.

Leytus S.P. Toledo D.L., Mangel W.F. Theory and experimental method for determining individual kinetic constants of fast-acting, irreversible proteinase inhibitors. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 788:74-86.

Li J., Szittner R., Meighen E.A. Hyperactivity and interactions of a chimeric myristoryl-ACP thioesterase from the lux system of luminescent bacteria. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* 1481:237-246.

Liederer B.M., Borchardt R.T. Enzymes involved in the bioconversion of ester-based prodrugs. (2006) *J. Pharm. Sci.* 95:1177-1195.

Liu F., Tachibana S., Taira T., Ishihara M., Yasuda M. Purification and characterization of a new type of serine carboxypeptidase from *Monascus purpureus.* (2004) *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 31:23-28.

Liu P., Wang Y.F., Ewis H.E., Abdelal A.T., Lu C.D., Harrison R.W., Weber I.T. Covalent reaction intermediate revealed in crystal structure of the *Geobacillus stearothermophilus* carboxylesterase Est30. (2004) *J. Mol. Biol.* 342:551-561.

Liu W., Tsou C.L. Determination of rate constants for the irreversible inhibition of acetylcholine esterase by continuously monitoring the substrate reaction in the presence of the inhibitor. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* 870:185-190.

Liu Y.Y., Xu J.H., Hu Y. Enhancing effect of tween-80 on lipase performance in enantioselective hydrolysis of ketoprofen ester. (2000) *J. Mol. Catal. B Enzym*. 10: 523-529.

López-Nicolás J., Bru R., García-Carmona F. Enzymatic oxidation of linolenic acid by lipooxigenase forming inclusion complexes with cyclodextrins as starch model molecules (1997) *J. Agric. Food Chem.* 45:1144-1148.

López-Serrano P., Cao L., van Rantwijk F., Sheldon R.A., Cross-linked enzyme aggregates with enhanced activity: Application to lipases. (2002) *Biotechnol. Lett.* 24:1379-1383.

Lucas-Abellán C., Gabaldón-Hernández J.A., Penalva J., Fortea M.I., Núñez-Delicado E. Preparation and characterization of the inclusion complex of chlorpyrifos in cyclodextrins to improve insecticide formulations. (2008) *J. Agric. Food Chem.* 56:8081-8085.

Main A.R. Kinetic evidence of multiple reversible cholinesterases based on inhibition by organophosphates. (1969) *J. Biol. Chem.* 244:829-840.

Main A.R. The differentiation of the A-type esterases in sheep serum. (1960) *Biochem. J.* 75:188-195.

Maladkar N.K. Enzymatic production of cephalexin. (1994) *Enzyme Microb. Technol.* 16:715-718.

Mancheño J.M., Pernas M.A., Martínez J., Ochoa B., Rúa M.L., Hermoso J.A. Structural insights into the lipase/esterase behavior in the *Candida rugosa* lipases family: crystal structure of the lipase 2 isoenzyme at 1.97A resolution. (2003) *J. Mol. Biol.* 332:1059-1069.

Maqbool QU, Johri S, Rasool S, Riyaz-ul-Hassan S, Verma V, Nargotra A, Koul S, Qazi G.N. Molecular cloning of carboxylesterase gene and biochemical characterization of encoded protein from *Bacillus subtilis* (RRL BB1). (2006) *J. Biotechnol.* 125:1-10.

Margolin A.L. Enzymes in the synthesis of chiral drugs. (1993) *Enzyme Microb. Technol.* 15:266-280.

Margolles-Clark E., Tenkanen,M., Söderlund H, Penttilä M. Acetyl Xylan Esterase from *Trichoderma reesei* contains an active-site serine residue and a cellulose-binding domain. (1996) *Eur. J. Biochem.* 237:553-560.

Martínez- Martínez I., Navarro-Fernández J., Lozada-Ramírez J.D., García-Carmona F., Sánchez-Ferrer A. YesT: a new rhamnogalacturonan acetyl esterase from *Bacillus subtilis*. (2008) *Proteins* 71:379-388.

Martínez- Martínez I., Navarro-Fernández J., García Carmona F., Takami H., Sánchez-Ferrer A. Characterization and structural modelling of a novel thermostable Glycine oxidase from *Geobacillus kaustophilus* HTA426. (2008) *Proteins* 70:1429-1441.

Martínez-Martínez I., Montoro-García S., Lozada-Ramírez J. D., Sánchez-Ferrer A., García-Carmona F. A colorimetric assay for the determination of acetyl xylan esterase or cephalosporin C acetyl esterase activities using 7-amino cephalosporanic acid, cephalosporin C, or acetylated xylan as substrate. (2007) *Anal. Biochem.* 369:210-217.

Martinou A., Koutsioulis D., Bouriotis V. Cloning and expression of a chitin deacetylase gene (CDA2) from *Saccharomyces cerevisiae* in *Escherichia coli:* Purification and characterization of the cobalt-dependent recombinant enzyme (2003) *Enzyme and Microbial Technology* 20:757-763.

Matsunaga A., Koyama N., Nosoh Y. Purification and properties of esterase from *Bacillus stearothermophilus* (1974) *Archives of Biochemistry and Biophysics* 160:504-513.

Michalopoulus I., Torrance G.M., Gilbert D.R., Westhead D.R. TOPS: An enhanced database of protein structural topology. (2004) *Nucleic Acid Res.* 1:251-254.

Miled N., Beisson F., de Caro J., de Caro A., Arondel V., Verger R. Interfacial catalysis by lipases. (2001) *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 11:165-171.

Miller K.D., Weaver-Feldhaus J., Gray S.A., Siegel R.W., Feldhaus M.J. Production, purification, and characterization of human scFv antibodies expressed in *Saccharomyces cerevisiae, Pichia pastoris,* and *Escherichia coli.* (2005) *Protein Expression and Purification* 42:255-267.

Mine Y., Fukunaga K., Itoh K., Yoshimoto M., Nakao K., Sugimura Y. Enhanced enzyme activity and enantioselectivity of lipases in organic solvents by crown ethers and cyclodextrins. (2003) *Journal of Bioscience and Bioengineering* 95:441-447.

Moher P., Rosslein L, Tamm C. Kinetic resolution of racemic β-γ epoxy esters with pig esterase. (1989) *Tetrahedron Lett.* 3:2513-2516.

Mølgaard A., Kaupinnen S., Larsen S. Rhamnogalacturonan acetylesterase elucidates the structure and function of a new family of hydrolases. (2000) *Structure* 8:373-383.

Morin R.B., Jackson B.G., Mueller R.A., Lavagnino E.R., Scanlon W.B., Andrews S.L. Chemistry of cephalosporin antibiotics. XV. Transformations of penicillin sulfoxide. A synthesis of cephalosporin compounds. (1969) *J. Am. Chem. Soc.* 91:1401-1407.

Morris G.M., Goodsell D.S., Halliday R.S., Huey R., Hart W.E., Belew R.K., Olson A.J. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and empirical binding free energy function (1998) *J. Computational Chemistry* 19:1639-1662.

Nam K.H., Kim M.Y., Kim S.J., Priyadarshi A., Lee W.H., Hwang K.Y. Structural and functional analysis of a novel EstE5 belonging to the subfamily of hormone-sensitive lipase. (2009) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 379:553-556.

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

Navarro-Fernández J., Martínez-Martínez I., Montoro-García S., García-Carmona F., Takami H., Sánchez-Ferrer A. Characterization of a new Rhamnogalacturonan Acetyl Esterase from *Bacillus halodurans* C-125 with a new putative carbohydrate binding domain. (2008) *J. Bacteriol.* 190:1375-1382.

Newcomb R.D., Campbell P.M., Ollis D.L., Cheah E., Russell R.J., Oakeshott J.G. A single amino acid substitution converts a carboxylesterase to an organophosphorus hydrolase and confers insecticide resistance on a blowfly. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:7464-7468.

Nicolet Y., Lockridge O., Masson P., Fontecilla-Camps J.C., Nachon F. Crystal structure of human butyrylcholinesterase and of its complexes with substrate and products. (2003) *J. Biol. Chem.* 278:41141-41147.

Nishimura M., Inouye S. Inhibitory effects of carbohydrates on cholesterol esterase biosynthesis in *Streptomyces lavendulae* H646-SY2. (2000) *J. Biosci. Bioeng.* 90:564-566.

Ollis D.L., Cheah E., Cygler M., Dijkstra B., Frolow F., Franken S.M., Harel M., Remington S.J,. Silman I., Schrag J. The alpha/beta hydrolase fold. (1992) *Protein Eng.* 5:197-211.

Ong A.L., Kamaruddin A.H., Bhatia S. Current technologies for the production of (S)-ketoprofen: process perspective. (2005) *Process Biochemistry* 40:3526-3535.

Ossipov M.H., Jerussi T.P., Ren K., Sun H., Porreca F. Differential effects of spinal (R)-ketoprofen and (S)-ketoprofen against signs of neuropathic pain and tonic nociception: evidence for a novel mechanism of action of (R)-ketoprofen against tactile allodynia. (2000) *Pain.* 87:193-199.

Park S.Y., Kim J.T., Kang S.G., Woo J.H., Lee J.H., Choi H.T., Kim S.J. A new esterase showing similarity to putative dienelactone hydrolase from a strict marine bacterium, *Vibrio sp.* GMD509. (2007) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77:107-115.

Park Y.J., Choi S.Y., Lee H.B. A carboxylesterase from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* P1; purification, characterization, and expression. (2006) *Biochim. Biophys. Acta* 1760:820-828.

Pearcy J.O., Lee T.D. MoWeD: A computer program to rapidly deconvolute low resolution electrospray liquid chromatography/mass spectrometry runs to determine component molecular weights. (2001) *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 12:599-606.

Potter P.M., Wadkins R.M. Carboxylesterases-detoxifying enzymes and targets for drug therapy. (2006) *Curr. Med. Chem.* 13:1045-1054.

Prim N. Pastor F.I., Diaz P. Cloning and characterization of a bacterial cell-bound type B carboxylesterase from *Bacillus sp.* BP-7. (2001) *Curr. Microbiol.* 42:237-240.

Puchart V., Gariépy M.C., Shareck F., Dupont C. Identification of catalytically important amino acid residues of *Streptomyces lividans* acetylxylan esterase A from carbohydrate esterase family 4. (2006) *Biochim. Biophys. Acta* 1764:263-724.

Qian Z., Fields C.J., Yu Y., Lutz S. Recent progress in engineering alpha/beta hydrolase-fold family members. (2007) *Biotechnol. J.* 2:192-200.

Quax W.J., Broekhuizen C.P. Development of a new *Bacillus* carboxyl esterase for use in the resolution of chiral drugs. (1994) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41:425-431.

Rajendran S., Radha C., Prakash V. Mechanism of solvent-induced thermal stabilization of alpha-amylase from *Bacillus amyloliquefaciens*. (1995) *Int. J. Pept. Protein Res.* 45:122-128.

Ramírez-Zavala B., Mercado-Flores Y., Hernández-Rodríguez C., Villa-Tanaca L. Purification and characterization of a serine carboxypeptidase from *Kluyveromyces marxianus*. (2004) *Int. J. Food Microbiol.* 9:245-252.

Rawlings N.D., Morton F.R., Kok C.Y., Kong J., Barrett A.J. MEROPS: the peptidase database. (2008) *Nucleic Acids Res.* 36:D320-D325.

Rea D., Fülöp V. Structure-function properties of prolyl oligopeptidase family enzymes. (2006) *Cell. Biochem. Biophys.* 44:349-365.

Redinbo M.R., Potter P.M. Keynote review: Mammalian carboxylesterases: From drug targets to protein therapeutics. (2005) *Drug Discovery Today* 10:313-325.

Reis P., Holmberg K., Watzke H., Leser M.E., Miller R. Lipases at interfaces: a review. (2009) *Adv. Colloid. Interface Sci.* 147-148:237-250.

Renault L., Nègre V., Hotelier T., Cousin X., Marchot P., Chatonnet A. New friendly tools for users of ESTHER, the database of the alpha/beta-hydrolase fold superfamily of proteins. (2005) *Chem. Biol. Interact.* 157-158:339-343.

Roberge C., Amos D., Pollard D., Devine D. Preparation and application of cross-linked aggregates of chloroperoxidase with enhanced hydrogen peroxide tolerance. (2009) *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 56:41-45.

Roldán-Tapia L., Parrón,T., Sánchez-Santed F. Neuropsychological effects of long-term exposure to organophosphate pesticides. (2005) *Neurotoxicol. Teratol.* 27:259-66.

Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. (1987) *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.

Sambrook J., Fritsch E. P., Maniatis T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd edn. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Sangeetha K., Abraham TE. Preparation and characterization of cross-linked enzyme aggregates (CLEA) of subtilisin for controlled release applications. (2008) *Int. J. Biol. Macromol.* 43:314-319.

Satoh T., Hosokawa M. Structure, function and regulation of carboxylesterases. (2006) *Chem. Biol. Interact.* 262:195-211.

Schmid R.D., Verger R. Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. (1998) *Angew. Chem. Int. Ed.* 37:1608-1633.

Schmidt M., Henke E., Heinze B., Kourist R., Hidalgo A., Bornscheuer U.T. A versatile esterase from *Bacillus subtilis*: cloning, expression, characterization, and its application in biocatalysis. (2007) *Biotechnol. J.* 2:249-253.

Schoevaart R., Wolbers M.W., Golubovic M., Ottens M., Kieboom,A.P.G., Van Rantwijk F., Van der Wielen L.A.M., Sheldon R.A. Preparation, optimization, and structures of cross-linked enzymes aggregates (CLEAs). (2004) *Biotechnol. Bioeng.* 87:754-762.

Schrag J.D., Li Y.G., Wu S., Cygler M. Ser-His-Glu triad forms the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*. (1991) *Nature* 351:761-764.

Schwede T., Kopp J., Guex N., Peitsch M.C. SWISS-MODEL: An automated protein homology-modelling server. (2003) *Nucleic Acids Res.* 31:3381-3385.

Scorer C.A., Clare J.J., McCombie W.R., Romanos M.A., Sreekrishna K. Rapid selection using G418 of high copy number transformants of *Pichia pastoris* for high-level foreign gene expression. (1994) *Technology* 12:181-184.

Shi Y., Yu H., Sun X., Tian Z., Shen Z. Cloning of the nitrile hydratase gene from *Nocardia sp.* in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris* and its functional expression using site-directed mutagenesis. (2004) *Enzyme and Microbial Technology* 35:557-562.

Sih C.J., Chen CS. Microbial asymmetric catalysis-enantioselective reduction of ketones. (1984) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 23:570-578.

Simon L.M., Laszlo K., Vertesi A., Bagi K., Szajani B. Stability of hydrolytic enzymes in water-organic solvent systems (1998) *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* 2:41-45.

Skjøt M., De Maria L., Chatterjee R., Svendsen A., Patkar S.A., Ostergaard P.R., Brask J. Understanding the plasticity of the alpha/beta hydrolase fold: lid swapping on the *Candida antarctica* lipase B results in chimeras with interesting biocatalytic properties. (2009) *Chembiochem.* 10:520-537.

Soliman N.A., Knoll M., Abdel-Fattah Y.R., Schmid R.D., Lange S. Molecular cloning and characterization of thermostable esterase and lipase from *Geobacillus thermoleovorans* YN isolated from desert soil in Egypt. (2007) *Process Biochem.* 42:1090-1100.

Soreq H., Seidman S. Acetylcholinesterase--new roles for an old actor. (2001) *Nat. Rev. Neurosci.* 2:294-302.

Spiller B., Gershenson A., Arnold F.H., Stevens R.C. A structural view of evolutionary divergence. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96:12305-12310.

Steenkamp L., Brady D. Optimisation of stabilised carboxylesterase NP for enantioselective hydrolysis of naproxen methyl ester. (2008) *Proc. Biochem.* 43:1419-1426.

Suesa N., Fernandez M.F., Gutierrez M., Rufat, M.J. Rotllan E., Calvo L., Mauleon D., Carganico G. Stereoselective cyclooxygenase inhibition in cellular models by the enantiomers of ketoprofen. (2004) *Chirality* 5:589-595.

Sussman J.L., Harel M., Frolow F., Oefner C., Goldman A., Toker L., Silman I. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. (1991) *Science* 25:3872-3879.

Takami H., Horikoshi K. Analysis of the genome of an alkaliphilic *Bacillus* strain from an industrial point of view. (2000) *Extremophiles* 4:99-108.

Takami H., Inoue A., Fuji F., Horikoshi K. Microflora in the deepest sea mud of the Mariana Trench. (1997) *FEMS Microbial. Lett.* 152:279-285.

Takami H., Nakasone K., Hirama C., Takaki Y., Masui N., Fuji F., Nakamura Y., Inoue A. An improved physical and genetic map of the genome of alkaliphilic *Bacillus sp.* C-125. (1999) *Extremophiles* 3:21-28.

Takami H., Nakasone K., Takaki Y., Maeno G., Sasaki R., Masui N., Fuji F., Hirama C., Nakamura Y., Ogasawara N., Kuhara S., Horikoshi K. Complete genome sequence of the alkaliphilic bacterium *Bacillus halodurans* and genomic sequence comparison with *Bacillus subtilis*. (2000) *Nucleic Acids Res.* 28:4317-4331.

Takami H., Nishi S., Lu J., Shimamura S., Takaki Y. Genomic characterization of thermophilic *Geobacillus* species isolated from the deepest sea mud of the Mariana Trench. (2004) *Extremophiles* 8:351-356.

Takami H., Takaki Y., Chee G.J., Nishi S., Shimamura S., Suzuki H., Matsui S., Uchiyama I. Thermoadaptation trait revealed by the genome sequence of thermophilic *Geobacillus kaustophilus*. (2004) *Nucleic Acids Res.* 32:6292-6303.

Takami H., Takaki Y., Nakasone K., Sakiyama T., Maeno G., Sasaki R., Hirama C., Fuji F., Masui N. Genetic analysis of the chromosome of alkaliphilic *Bacillus halodurans* C-125. (1999) *Extremophiles* 3:227-233.

Takano K., Tsuchimori K., Yamagata Y., Yutani K. Effect of foreign N-terminal residues on the conformational stability of human lysozyme. (1999) *Eur. J. Biochem.* 266:675-682.

Takimoto A., Mitsushima K., Yagi S., Sonoyama T. Purification, characterization and partial amino acid sequences of a novel cephalosporin-C deacetylase from *Bacillus subtilis*. (1994) *J. Ferment. Bioeng.* 77:17-22.

Tayade P.T., Vavia P.R Inclusion complexes of Ketoprofen with β-cyclodextrins: Oral pharmacokinetics of Ketoprofen in human (2006*) I. J. Pharmac. Sc.* 68:164-170.

Thompson J. D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTAL-W: Improving the sensity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. (1994) *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680.

Tian W., Tsou C.L. Determination of the rate constant of enzyme modification by measuring the substrate reaction in the presence of the modifier. (1982) *Biochemistry* 21:1028-1032.

Tischer W., Kasche V. Immobilized enzymes: crystals or carriers? (1999) *Trends Biotechnol.* 17:326-335.

Tudela J., García-Canovas F., García-Carmona F., Iborra J.L., Lozano J.A. Irreversible inhibition of Trypsin by TLCK. A continuous method for kinetic study of irreversible enzymatic inhibitors in the presence of substrate. (1986) *Int. J. Biochem.* 18:285-288.

Turner N.A., Needs E.C., Khan J.A., Vulfson E.N. Analysis of conformational states of *Candida rugosa* lipase in solution: implications for mechanism of interfacial activation and separation of open and closed forms. (2001) *Biotechnol. Bioeng.* 72:108-118.

Turner N.J. Enzyme catalysed deracemisation and dynamic kinetic resolution reactions. (2004) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 8:114-119.

Unsworth L.D., van der Oost J., Koutsopoulos S. Hyperthermophilic enzymes-stability, activity and implementation strategies for high temperature applications. (2007) *FEBS J.* 274:4044-4056.

Urquhart E. Analgesic agents and strategies in the dental pain model. (1994) *J. Dent.* 22:336-341.

Uttamkumar S., Bahnson B.J. Crystal structure of human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase. Structural implication to lipoprotein binding and catalysis. (2008) *J. Biol. Chem.* 283:31617-31624.

Vafiadia C., Topakasa E., Christakopoulos P. Preparation of multipurpose cross-linked enzyme aggregates and their application to production of alkyl ferulates. (2008) *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 54:35-41.

Vagin A., Tepliakov A. MOLREP: An Automated Program for Molecular Replacement.

van der Laan J.M., Teplyakov A.V., Lammers A.A., Dijkstra B.W. Preliminary X-ray study of naproxen esterase from *Bacillus subtilis*. (1993) *J. Mol. Biol.* 230:681-683.

Vincent F., Charnock S.J., Verschueren K.H., Turkenburg J.P., Scott D.J., Offen WA, Roberts S., Pell G., Gilbert H.J., Davies G.J., Brannigan J.A. Multifunctional xylooligosaccharide/cephalosporin C deacetylase revealed by the hexameric structure of the *Bacillus subtilis* enzyme at 1.9 Å resolution. (2003) *J. Mol. Biol.* 330:593-606.

Walker C.H. The development of an improved system of nomenclature and classification of esterases, in Enzymes Hydrolyzing Organophosphorous Compounds (1989) Ellis Horwood Ltd., New York. (Reiner E., Aldrige W.N., Hoskin F.C.G., Eds.) 236-245.

Walker C.H., Mackness M I. Esterases: problems of identification and classification. (1983) *Biochem. Pharmacol.* 32:3265-3269.

Weber K., Pringle J.R., Osborne M. Measurement of molecular weight by electrophoresis on SDS-acrylamide gel. (1972) *Meth. Enzymol.* 260:3-27.

Wei Y., Contreras J.A., Sheffield P., Osterlund T., Derewenda U., Kneusel R.E., Matern U., Holm C., Derewenda Z.S. Crystal structure of brefeldin A esterase, a bacterial homolog of the mammalian hormone-sensitive lipase. (1999) *Nat. Struct. Biol.* 6:340-345.

Williams J.D., Weiner B.E., Ormand J.R., Brunner J., Thornquest A.D. Jr, Burinsky D.J. Automated molecular weight assignment of electrospray ionization mass spectra. (2001) *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15:2446-2455.

Wong C.H., Whitesites G.M. Enzymes in synthetic organic chemistry. (1994) Pergamon Tarryton, NY.

Yamagami S., Iida T., Nagata Y., Ohta A., Takagi M. Isolation and characterization of acetoacetyl-CoA thiolase gene essential for n-decane assimilation in yeast *Yarrowia lipolytica*. (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282:832-838.

Yoshida H., Iizuka M., Norioka N., Norioka S. Cloning and sequencing of cDNA and genomic DNA encoding serine carboxypeptidase of *Fusarium moniliforme* that was copurified with phosphatase. (2007) *J. Biosci. Bioeng.* 103:521-528.

Zhang M., Wang J.D., Li Z.F., Xie J., Yang Y.P., Zhong Y., Wang H.H. Expression and characterization of the carboxyl esterase Rv3487 from *Mycobacterium tuberculosis.* (2005) *Protein Expr. Purif.* 42:59-66.

Zhou Y., Cao W., Wang J., Ma Y., Wei D. Comparison of expression of monomeric and multimeric adenoregulin genes in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. (2005) *Protein Pept. Lett.* 12:349-355.