



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

FACULTAD DE QUÍMICA

"ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE
LA ESTERASA StcI INVOLUCRADA EN LA BIOSÍNTESIS DE
ESTERIGMATOCISTINA EN

Aspergillus nidulans"

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

CAROLINA PEÑA MONTES



MÉXICO, D.F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Dr. Sergio Sánchez Esquivel

VOCAL: Dr. Enrique Rudiño Piñera

SECRETARIO: Dr. Arturo Navarro Ocaña

SUPLENTE: Dr. Francisco Ruíz Terán

SUPLENTE: Dr. Felipe Cruz García

Este trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio 312 del Departamento de Alimentos y Biotecnología, Edificio “E” de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Amelia Farrés González Saravia y con apoyo financiero del DAAD (Servicio Alemán de Intercambio Académico) en el ITB (Instituto de Bioquímica Técnica) de la Universidad de Stuttgart en Alemania.

El **COMITÉ TUTORAL** que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Amelia Farrés González Saravia	Facultad de Química, UNAM
Dr. Felipe Cruz García	Facultad de Química, UNAM
Dr. Eduardo Horjales Reboredo	Instituto de Biotecnología, UNAM
Dr. Sergio Sánchez Esquivel	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

PRESENTA: Carolina Peña Montes

TUTOR: Dr. Amelia Farrés González-Saravia

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Amelia Farrés por su asesoría, su confianza, su amistad, su apoyo incondicional y por darme la oportunidad de desarrollar este proyecto. Le agradezco también por ser un ejemplo de fortaleza y voluntad que me impulso a seguir adelante en todo momento.

Al Comité Tutorial por sus acertadas opiniones que enriquecieron el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Felipe Cruz por su asesoría, compromiso y constancia durante todo el desarrollo de este trabajo que ayudaron a fortalecer esta investigación.

Al Dr. Arturo Navarro por sus acertados comentarios en el área de biocatálisis y apoyo en el desarrollo experimental de esa parte.

Al jurado de examen por la revisión de la tesis y sugerencias.

Al Dr. José Luis Nava de la UAM Iztapalapa por facilitar y prestar el equipo “pH stat”.

Al Departamento de la USAI de la Facultad de Química por el servicio otorgado de espectrometría de masas y RMN.

Al Dr. Rolf Schmid por permitirme desarrollar la estancia de investigación en el ITB de la Universidad de Stuttgart en Alemania.

Al Dr. Lange por su asesoría técnica durante mi estancia en el ITB.

Al DAAD (Servicio de Intercambio Alemán) por la beca otorgada para el reforzamiento del idioma alemán y para la estancia de investigación en Alemania.

A las Dras. Quirasco y Gálvez por sus comentarios y apoyo para el desarrollo y terminación de éste trabajo.

A la M. en C. Idalia Flores por su apoyo técnico en el desarrollo de la parte de inmunología de este trabajo.

A la M. en C. Denise Castro por su apoyo técnico en el desarrollo de este trabajo.

A la Química Katia Ruíz Noria por su ayuda en el desarrollo de la parte de biocatálisis.

A mis compañeros del laboratorio 312 (Denise Castro, Norma Ballesteros, Angeles Bazán, Aideé Ibañez, Katia Ruíz, Gabriela López, Verónica Hernández, Verónica García, Abraham Acatzi, Eliana Granados) por su ayuda, comentarios y apoyo invaluable.

DEDICATORIA ESPECIAL

A DIOS, por la vida, por todas sus bendiciones, por permitirme lograr esta meta, porque siempre ha estado a mi lado manifestándose en los momentos más difíciles y bellos de esta vida.

A mis padres, Genoveva y Carlos, por ser el primer impulso y manifestación de amor que tuve en esta vida. No tengo palabras para agradecerles su amor, guía, tiempo y dedicación. Han sido un pilar fundamental para lograr mi desarrollo personal y profesional. Ahora que soy madre sé que es la tarea más difícil en esta vida, espero poder ser para mis hijos todo lo que ustedes han sido para mí. Definitivamente sin ustedes esto no se hubiera logrado. Gracias porque siempre han estado conmigo.

A mi esposo Carlos Manuel Adame, por cruzarse en mi camino, entrar en mi vida y ser mi otra mitad. Te doy gracias por todo tu amor, tu apoyo incondicional, sé lo difícil que ha sido para nosotros este proyecto por la separación durante mi estancia en el extranjero y sin embargo siempre estuviste para darme aliento e impulso y lo sigues haciendo. Gracias por enseñarme una y otra vez lo que es el verdadero amor y por nuestros hijos. Te amo.

A mis pequeños, Carlos Alberto y Montserrat, gracias porque con ustedes estoy redescubriendo el mundo y la magia de la vida y por ser la oportunidad de mejorar como persona. Los amo y los he amado aun desde antes que llegaran a este mundo, mis metas en gran parte han sido encaminadas para que ustedes tengan un mejor futuro y poder darles también un buen ejemplo, así que han sido un gran impulso para el desarrollo de este proyecto.

A mi hermano Carlos Peña y Haydeé, gracias por su apoyo, por su amistad y por ser parte de mi vida y de mi familia. Los quiero mucho.

A la Familia Sánchez Adame por su apoyo y por estar con nosotros en todo momento.

A la Familia Sánchez Nuñez, por su amistad y apoyo en todo momento y en los momentos más difíciles. Por compartir con nosotros también los momentos de alegría. Les deseo siempre salud y felicidad.

A mis invaluable e incondicionales amigos, gracias por estar siempre en todo momento, por escucharme e impulsarme a continuar hacia adelante, por sus consejos, por los momentos de alegría, pero sobre todo por su amistad y compañía en esta vida (Luisa, Mer, Mariana, Ale, Cynthia, Andrea, Ivette, Fátima, Idalia, Ame, Alicia, Paty Wong, Vanesa, Ana María, Anel, Lilia, Tere, Jesús, Denise, Eliana, Crisanto, Mariangela, César, Ana, Ursula, Cristina, Jürgen, Ivan, Nadia, Alexander, Farooq, Frantisek, Peter, Marcel, Carolina, Sonia).

INDICE

Contenido	Página
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
2. MARCO TEÓRICO	
2.1. El género <i>Aspergillus</i>	
2.1.1 Importancia económica del género <i>Aspergillus</i>	5
2.1.2 <i>Aspergillus nidulans</i>	6
2.2. Hidrolasas	7
2.2.1 Generalidades de esterasas	7
2.2.1.1 Aspectos estructurales de esterasas	8
2.2.1.2 Aplicación e importancia económica de las esterasas	10
2.2.2 Generalidades de lipasas	11
2.2.2.1 Aspectos estructurales de lipasas	13
2.2.2.2 Aplicación e importancia económica de las lipasas	14
2.3. Esterasas y lipasas en el género <i>Aspergillus</i>	14
2.4. Biosíntesis de esterigmatocistina y aflatoxinas en el género <i>Aspergillus</i>	17
2.4.1 Generalidades de las vías de biosíntesis de ST y aflatoxinas en el género <i>Aspergillus</i>	18
2.4.2 Regulación de las vías de biosíntesis	19
2.4.3 Esterasas involucradas en la vía de biosíntesis de ST y aflatoxinas	20
2.5 Sistemas de expresión de proteínas heterólogas	21
2.5.1 <i>Pichia pastoris</i> como sistema de expresión	22
2.5.1.1 Metabolismo de metanol en <i>P. pastoris</i>	23
2.6 Otros sistemas catalizados por enzimas	24
2.7 Compuestos bioactivos	25
2.7.1 Ácidos hidroxicinámicos	25
2.7.2 Triterpenos	25
2.7.3 Flavonoides	26

2.7.4	Ácido kójico	26
3.	JUSTIFICACION	27
4.	HIPOTESIS	28
5.	OBJETIVOS GENERALES	29
5.1	Objetivos particulares	29
6.	MATERIAL Y MÉTODOLOGÍA	30
6.1	Microorganismos empleados	30
6.2	Medios y condiciones de cultivo	30
6.3	Producción de anticuerpos anti-StcI	31
6.4	Acondicionamiento de los extractos celulares de <i>A. nidulans</i> para inmunoanálisis	31
6.5	Inmunoanálisis	32
6.6	Determinación de la concentración de proteína	33
6.7	Electroforesis de proteínas	33
6.8	Ensayo de actividad enzimática	33
6.9	Zimogramas para detección de actividad de esterasa	33
6.10	Bioinformática	34
6.11	Aislamiento de ARNm y RT-PCR	35
6.12	Expresión de <i>stcI</i> en <i>E. coli</i>	36
6.12.1	Construcción del plásmido pET <i>stcI</i>	36
6.12.2	Expresión en <i>E. coli</i>	36
6.12.3	Aislamiento de las fracciones periplásmica, citoplasmática soluble e insoluble.	37
6.12.4	Aislamiento de cuerpos de inclusión y replegamiento de la enzima	37
6.13	Clonación y Expresión de <i>stcI</i> y <i>nstcI</i> en <i>Pichia pastoris</i>	38
6.13.1	Construcción de los vectores pPIC <i>stcI</i> y pPIC <i>nstcI</i>	38
6.13.2	Clonación en <i>E. coli</i>	39
6.13.3	Expresión de <i>stcI</i> y <i>nstcI</i> en <i>P. pastoris</i>	40
6.14	Validación de la especificidad de anticuerpos con las enzimas recombinantes	40
6.15	Purificación de anticuerpos Anti-StcI y preparación de la columna de afinidad Anti-StcI	41
6.16	Purificación de las enzimas recombinantes y de la enzima silvestre	41

6.17 Isoelectroenfoco	41
6.18 Caracterización bioquímica de las enzimas recombinantes	42
6.18.1 Determinación de la estabilidad a la temperatura y pH de la enzima y de la temperatura y pH óptimo del ensayo	42
6.18.2 Determinación de la especificidad de sustrato	42
6.19 Reacciones de biocatálisis con compuestos fenólicos	43
6.19.1. Acetilación de compuestos	43
6.19.2 Acondicionamiento de la enzima	44
6.19.3 Desacetilación enzimática	45
6.19.4 Identificación de productos	45
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
7.1 Producción de anticuerpos anti-StcI	46
7.2 Expresión de la proteína StcI en <i>A. nidulans</i>	46
7.3 Secuencias de carboxil-esterasas y lipasas en el genoma de <i>A. nidulans</i>	49
7.4 Estudio de la secuencia de la proteína StcI a partir de las secuencias de expresión (EST) y su relación con otras esterases similares	50
7.5 Clonación y expresión de <i>stcI</i> en <i>E. coli</i>	55
7.5.1 Clonación de <i>stcI</i> en <i>E. coli</i>	55
7.5.2 Inducción de las clonas de <i>E. coli</i> con y sin His-tag en diferentes condiciones	59
7.5.3 Influencia de la adición de agentes reductores y sales durante la lisis de las clonas de <i>E. coli</i> con y sin His-tag en la actividad y solubilidad de la enzima	62
7.5.4 Solubilización de cuerpos de inclusión y replegamiento de la enzima	65
7.6 Clonación en <i>Pichia pastoris</i> de la esterasa NstcI	66
7.7 Clonación y expresión de <i>stcI</i> en <i>P. pastoris</i>	71
7.8 Validación de la especificidad de anticuerpos (anti-stcI) con las proteínas recombinantes	74
7.9 Purificación de las proteínas recombinantes en la columna de afinidad anti-stcI	76
7.10 Expresión de <i>stcI</i> en <i>Aspergillus nidulans</i>	76

7.11 Purificación de la esterasa NstcI expresada en <i>A. nidulans</i>	78
7.12 Biocatálisis	81
7.12.1 Predicción de modelos estructurales	81
7.12.2 Efecto de la temperatura y pH sobre la actividad y estabilidad de las enzimas recombinantes	83
7.12.3 Especificidad de las enzimas sobre ésteres de <i>p</i> -nitrofenilo con diferente largo de cadena	85
7.12.4 Perfil de desacetilación de compuestos fenólicos bioactivos	86
8. CONCLUSIONES	94
9. RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS	97
10. BIBLIOGRAFIA	98
11. ANEXO	110
A) Electroferograma de la secuencia del gen <i>nstcI</i> integrado al genoma de <i>P. pastoris</i>	110
B) Electroferograma de la secuencia del gen <i>stcI</i> integrado al genoma de <i>P. pastoris</i>	112
C) Electroferograma de la secuencia del gen <i>nstcI</i> aislado del genoma de <i>A. nidulans</i>	113

RESUMEN

La esterasa StcI está involucrada en la biosíntesis de esterigmatocistina, un precursor de aflatoxinas en *Aspergillus nidulans*. En el presente trabajo se estudiaron diferentes condiciones de cultivo de *A. nidulans* para evaluar la expresión de la enzima. Se observó que la proteína StcI se expresó en todas las condiciones evaluadas, pero se encontró una mayor cantidad cuando *A. nidulans* se creció en medio sólido con avena. En *A. nidulans* esta enzima con potencial de esterasa/lipasa, está compuesta de 286 aminoácidos que corresponden a una masa molecular teórica de 31 kDa. Sin embargo, nuestros resultados mostraron que la proteína StcI tiene una masa molecular aparente de 35 kDa en todas las condiciones evaluadas. Un análisis de las secuencias de expresión (EST's) disponibles, indicó la presencia de 29 aminoácidos adicionales en la región N-terminal para la proteína StcI. Con el fin de conocer la función de esta región N-terminal, se clonó y expresó a *stcI* (la versión truncada del gen ya reportado) en *Escherichia coli*. Sin embargo, la proteína expresada en *E. coli* se alojó en su mayoría en cuerpos de inclusión. Para resolver esto, se utilizó como alternativa el sistema de expresión de *Pichia pastoris*, en el cual se realizó exitosamente la expresión de ambas enzimas: la versión truncada (StcI) y la completa con la región N-terminal adicional (NstcI).

Las enzimas recombinantes se caracterizaron bioquímicamente y se evaluaron sus actividades sobre ésteres de *p*-nitrofenilo con ácidos grasos de diferente largo de cadena (C2.0-C18.0), obteniéndose diferencias en las propiedades de ambas formas. Además, se estudiaron dos tipos de reacciones catalíticas: la hidrólisis de compuestos con estructura parecida al sustrato original de la enzima (versiconal, intermediario en la síntesis de aflatoxinas) y la desacetilación de compuestos fenólicos bioactivos. Los resultados mostraron que hay diferencias en la quimioselectividad de ésteres de fenoles y flavonoides. También se observaron diferencias en la regioselectividad de ácido kójico y de flavonoides. De esta manera, estos datos permiten concluir que la región N-terminal funciona en la determinación de las propiedades catalíticas de la enzima. Por lo tanto, proponemos que las esterasas estudiadas aquí tienen un alto potencial para usarse en biotransformaciones industriales importantes en comparación con la enzima Novozym 435 utilizada ampliamente en la industria.

I. INTRODUCCIÓN

Aspergillus nidulans es un hongo filamentoso, saprófito, ampliamente distribuido en la naturaleza y muy importante en investigación biológica debido al grado de conocimiento que se tiene sobre este microorganismo como su estructura genética que ofrece la posibilidad de disponer de técnicas que permiten manipular el genoma y la facilidad para obtener mutantes. Adicionalmente su genoma se encuentra secuenciado completamente y se ha generado una base de datos de secuencias de expresión (EST's) que facilitan aun más su estudio (Roe *et al.*, 2001, Galagan *et al.*, 2005)

Existen pocos reportes sobre clonación y caracterización de genes que codifican para proteínas que participan en el metabolismo secundario de *A. nidulans*. La esterigmatocistina (ST) y las aflatoxinas son metabolitos secundarios reportados como los productos naturales más tóxicos, mutagénicos y carcinogénicos conocidos. La esterigmatocistina es el penúltimo intermediario de la vía de biosíntesis de aflatoxinas pero se ha encontrado que dentro del género *Aspergillus*; *A. nidulans*, al igual que *A. ochraceoroseus*, la producen como producto final (Bennet *et al.*, 1989; Branch *et al.*, 1993; Klich *et al.*, 2000). La vía de biosíntesis de ST en *A. nidulans* es muy parecida a la de biosíntesis de aflatoxinas en *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus flavus*. En estos organismos los genes involucrados en la biosíntesis de ST o aflatoxinas se encuentran agrupados (Yu *et al.*, 1995; Feng y Leonard, 1998). En *A. nidulans* el agrupamiento de estos genes ya se ha descrito: tiene un tamaño de 60 kbp, que comprende 25 genes e incluso se propuso una vía de biosíntesis (Brown *et al.*, 1996). Dentro de esta región se ha reportado el gen *stc1* que corresponde a una enzima con potencial de esterasa/lipasa. La secuencia reportada parece ser el gen completo que no contiene intrones y tiene como número de acceso en el GenBankTM, 2869364. Este gen es homólogo al gen *estA* que ya ha sido clonado e identificado dentro del agrupamiento de genes de la vía de biosíntesis de aflatoxinas en *Aspergillus parasiticus* (Yu *et al.*, 2002).

Por otra parte, se ha detectado actividad de esterasa en extractos celulares de *A. parasiticus* (Kusumoto *et al.*, 1989; Anderson y Chung, 1990, Kusumoto y Hsieh, 1996) y la conversión de versiconal hemiacetal acetato (VHA) a versiconal (VAL) y de versiconol acetato (VOAc) a versiconol (VOH) por la esterasa EstA (Chang *et al.*, 2004). Anderson y Chung (1990) también

demonstraron que una esterasa porcina puede catalizar la hidrólisis de VHA a VAL.

Se han realizado algunos estudios sobre la expresión de los genes involucrados en la biosíntesis de aflatoxinas (Motomura *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2002; Kato *et al.*, 2003). La expresión de estos genes es compleja y no se ha estudiado mucho. No se han reportado las propiedades bioquímicas, ni el aislamiento y expresión de enzimas de la biosíntesis de ST. No existe tampoco información sobre la actividad de la enzima StcI, ni de sus propiedades catalíticas o de su especificidad de sustratos. La desacetilación de VHA y VOAc por las esterasa StcI sugiere que la enzima tiene potencial en el área de biocatálisis, ya que podría llevar a cabo reacciones con una alta enantio o regioselectividad con sustratos que no estén estructuralmente relacionados con triglicéridos. Un ejemplo son los compuestos fenólicos, los cuales son de gran interés industrial debido a sus propiedades biológicas como antioxidantes, quelantes, neutralizadores de radicales libres, anti-inflamatorios, antialérgicos, antimicrobianos, antivirales y anticarcinogénicos, entre otras (Serafini *et al.*, 1998; Morishita y Ohnishi, 2001).

Las enzimas microbianas son consideradas como herramientas muy útiles en química orgánica ya que pueden llevar a cabo biotransformaciones de importancia industrial. Dentro de estas enzimas, las lipasas y esterasas son de relevancia particular debido a su capacidad para catalizar reacciones con una alta quimio-, regio- y enantioselectividad (Jaeger *et al.*, 1999; Saxena *et al.*, 1999). Su uso como catalizadores para la síntesis o biotransformación de diversos compuestos ha aumentado debido a su alta eficiencia en sistemas de solventes orgánicos. Es importante contar con enzimas nuevas que puedan catalizar la desacetilación regioselectiva de compuestos fenólicos para poder llevar a cabo la lipofilización de los mismos, así como reacciones de síntesis (Figuroa-Espinoza y Villeneuve, 2005; Fragopolou *et al.*, 2007). La acetilación enzimática de compuestos fenólicos es más regioselectiva que la química y no hay una pérdida de la bioactividad del compuesto (Chebil *et al.*, 2006). Se ha reportado la acetilación enzimática de compuestos fenólicos, especialmente de flavonoides (Ardhaoui *et al.*, 2004^{a,b}; Mellou *et al.*, 2006). Sin embargo, hay pocos reportes sobre la desacetilación de compuestos fenólicos (Natoli *et al.*, 1992; Parmar *et al.*, 1998^{a,b}; Lambusta *et al.*, 2003).

En el presente trabajo se estudiaron primeramente diferentes condiciones de expresión de la esterasa StcI. Nuestros resultados mostraron la presencia de un exón adicional que no había sido reportado en la región N-terminal del gen *stcI* secuenciado por Brown *et al.* (1996). Con el fin de elucidar el papel de esta región, se clonó y expresó el gen *stcI* completo (*nstcI*) y la versión truncada del gen ya reportada (*stcI*) en *Pichia pastoris*. Finalmente se estudiaron la hidrólisis de compuestos con estructura parecida al sustrato original de la enzima, así como la desacetilación de compuestos fenólicos bioactivos.

2. MARCO TEORICO

2.1. El género *Aspergillus*

El género *Aspergillus* se clasifica dentro de los ascomicetos, los cuales se caracterizan por presentar un mecanismo de reproducción sexual y un micelio septado (Ward, 1991), tal es el caso de *A. nidulans*. Pertenecen al orden de los Eurotiales que se refiere a aquellos hongos que producen ascas dentro del cleistotecio, que es un ascocarpo esférico cerrado producido durante la fase sexual del hongo (Powell *et al.*, 1994). Una de las características de este género es que son tolerantes a bajas actividades de agua, lo que los hace capaces de crecer en sustratos de altos potenciales osmóticos y esporular en una atmósfera de baja humedad relativa (Corty *et al.*, 1994).

Los hongos del género *Aspergillus* han evolucionado hasta alcanzar una alta diversidad metabólica, que involucra diferentes sistemas enzimáticos que le permiten sobrevivir en una amplia variedad de hábitats y, como consecuencia, están reconocidos como una fuente rica de enzimas usadas en una amplia variedad de industrias (Bennett y Klich, 1992). Algunas de sus especies son una fuente importante de enzimas extracelulares y ácidos orgánicos ampliamente utilizados en la industria alimentaria, y también intervienen en la obtención de alimentos tradicionales orientales.

2.1.1 Importancia económica del género *Aspergillus*

Este género se divide en subgéneros y secciones. Existen un gran número de especies de importancia económica. Industrialmente, el género *Aspergillus* posee gran relevancia debido a que tiene un alto nivel de secreción de enzimas, lo que facilita su purificación y uso a nivel industrial, además de que hay experiencia en el manejo de este organismo. Dentro de las especies de este género en las que se han encontrado diversas enzimas con aplicación industrial se encuentran *A. awamori*, *A. candidus*, *A. flavus*, *A. sydowii*, *A. foetidus*, *A. niger*, *A. nidulans*, *A. japonicus* y *A. oryzae*.

Sin embargo, también algunas especies producen compuestos con alta toxicidad hacia otros organismos llamados micotoxinas, las cuales pertenecen a un grupo químicamente diverso

de metabolitos secundarios cuya función no es muy clara. *A. flavus* y *A. parasiticus* sintetizan una o más aflatoxinas las cuales son cumarinas sustituidas con características hepatotóxicas, teratogénicas y carcinogénicas (Cotty *et al.*, 1994).

Los Aspergilli también se han empleado como receptores para la clonación de enzimas de otros organismos o de otras especies del mismo género. Las especies que más se han utilizado para estos fines son *A. niger* y *A. oryzae*.

2.1.2 *Aspergillus nidulans*

Aspergillus nidulans es un hongo que se encuentra comúnmente en el suelo, de fácil crecimiento y tiene ciertas características que lo hacen ser el más usado para estudios de genética práctica, como son el tener mutantes con diversas características fenotípicas y bioquímicas, así como ser un microorganismo que se puede manejar fácilmente (Jones y Rickards, 1991). El estilo de vida saprofítico le permite ser capaz de utilizar un amplio rango de sustratos como fuente de nutrición. Además, es un género filogenéticamente relacionado con *Penicillium* y *Cephalosporium* que agrupan especies productoras de metabolitos secundarios y proteínas de gran valor comercial (Powell *et al.*, 1994). *A. nidulans* es, por lo tanto, un hongo muy importante biotecnológicamente; adicionalmente presenta varias ventajas como modelo experimental, entre las que se encuentran:

- Se cuenta con un mapa genético bien definido de este microorganismo. Su genoma ha sido completamente secuenciado y tiene un tamaño de 28.5 Mb, organizado en 8 cromosomas con tamaños entre 4.3-2.7 Mb (Galagan *et al.*, 2005)
- Forma colonias compactas que facilitan la réplica en placa.
- Presenta un gran número de mutantes disponibles en colecciones y la facilidad para obtener más.
- Se dispone de técnicas que permiten manipular su genoma.
- Se pueden realizar estudios de expresión de genes por medio de fusiones
- Tiene conidios uninucleados, que permiten hacer una mutagénesis directamente sobre ellos.

- Presenta un ciclo de vida rápido.
- Los medios de cultivo y condiciones para su crecimiento son simples.

2.2. Hidrolasas

La familia de las hidrolasas está conformada, entre otras enzimas, por esterasas, fosfolipasas, proteasas, amidasas, epoxihidrolasas, nitrilasas y glicosidasas. Este grupo de enzimas puede catalizar la hidrólisis de un enlace en presencia de agua. Las hidrolasas se encuentran clasificadas en el grupo 3 de la comisión de enzimas (EC) y por el tipo de enlace que hidrolizan. Por ejemplo, las esterasas están clasificadas con el número 3.1.1.1 y las lipasas con el número 3.1.1.3. El potencial biotecnológico de las enzimas hidrolíticas es de especial interés, ya que éstas presentan varias ventajas que las hacen ideales para utilizarse como catalizadores en química orgánica

- ✓ Comúnmente aceptan varios intermediarios sintéticos como sustratos, debido a su amplia especificidad de sustratos.
- ✓ Tienen una alta estereoselectividad hacia sustratos no naturales.
- ✓ Pueden catalizar varias reacciones relacionadas como condensación y alcoholisis.
- ✓ Muchas enzimas están disponibles comercialmente.

La mayoría de las enzimas de este grupo que se utilizan en la industria son microbianas, principalmente de bacterias y hongos (Bornscheuer y Kazlauskas, 1999; Patel, 2001).

2.2.1 Generalidades de esterasas

Las esterasas son hidrolasas que catalizan el rompimiento de enlaces éster entre un ácido y un alcohol en presencia de agua y en ausencia de la misma catalizan la reacción inversa (síntesis). Pueden catalizar las reacciones de hidrólisis o síntesis de ésteres carboxílicos, amidas, ésteres de fosfatos entre otros. Existe una gran diversidad de esterasas por lo que hay una nomenclatura muy grande y variada. Se pueden dividir en: hidrolasas de ésteres de ácidos carboxílicos (carboxilesterasas, colinesterasas), deoxiribonucleasa, endonucleasas, exonucleasas, fosfodiesterasas, fosfomonoesterasas, fosfortriesterasas, ribonucleasas, sulfatasas y tioesterasas. Se producen de diferentes maneras y cuando se aplican en algunas

áreas industriales como biocatalisis, no es necesario purificarlas para su uso (Panda y Gowrishankar, 2005).

Las carboxilesterasas, a diferencia de las lipasas, restringen generalmente su acción sobre triglicéridos y ésteres de ácidos grasos de cadena corta solubles en agua. En la figura 1 se muestra la reacción general típica de una serin-esterasa (EC 3.1.1.1). Se diferencian adicionalmente de las lipasas en base a la especificidad de sustratos y en que no presentan activación interfacial. Adicionalmente, en contraste con las lipasas, no presentan una tapa que cubra el sitio activo, por lo que tienen propiedades diferentes. Las estererasas están ampliamente distribuidas en animales, plantas y microorganismos pero para muchas enzimas aun no se han esclarecido sus funciones fisiológicas.

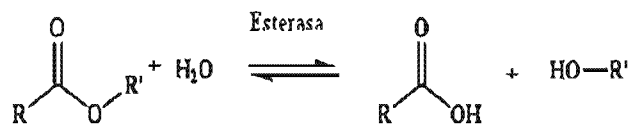


Figura 1- Reacción catalizada por estererasas

2.2.1.1 Aspectos estructurales de estererasas

Las carboxilesterasas tienen la estructura característica α/β , esto es, una estructura de β -plegada central paralela constituida por 8 hojas β ($\beta 1$ - $\beta 8$) conectadas por 6 ó más α -hélices (A-F) (Figura 2). Los estudios hechos por cristalografía de rayos X muestran adicionalmente, que el sitio catalítico está localizado en el carboxilo terminal de la hoja central $\beta 5$. Este sitio se encuentra formado por los residuos: histidina, serina y aspartato o glutamato, donde el papel principal lo desempeña la serina nucleofílica. Esta última se activa por el acoplamiento entre los residuos de aspartato e histidina. En las estererasas el residuo de serina activo se encuentra en una secuencia consenso corta (G-X-S-X-G), aunque el resto de los aminoácidos (aa) de la tríada catalítica proviene de distintas regiones de la proteína. Recientemente, se ha descrito la existencia de un motivo consenso diferente G - X - X - L (Arpigny y Jaeger, 1999)

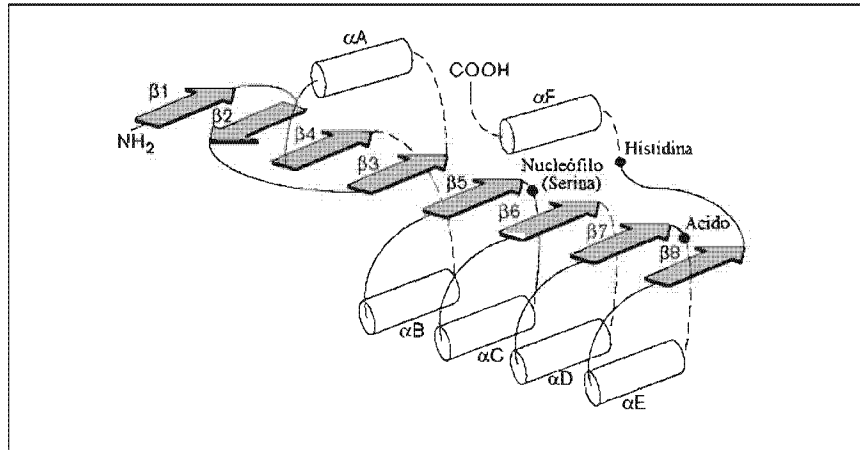


Figura 2- Diagrama de la estructura secundaria del plegamiento $\alpha\beta$. Los puntos negros señalan los residuos de aa de la triada catalítica (Nardini y Dijkstra, 1999).

La hidrólisis del enlace éster es realizada por la triada catalítica, donde la serina es responsable del ataque nucleofílico sobre el carbonilo del enlace éster, el átomo de oxígeno del grupo hidroxilo de la serina del sitio activo ataca el átomo de carbono del grupo carbonilo del enlace éster, todo esto asistido por la formación de un oxianión intermediario tetrahédrico que se forma durante la catálisis y que es estabilizado por los residuos de histidina y ácido aspártico ó glutámico del sitio activo. El anillo de imidazol de la histidina se protona, queda cargado positivamente y es estabilizado por la carga negativa del otro residuo de aminoácido de la triada (Asp ó Glu). El intermediario tetrahédrico se estabiliza por dos puentes de hidrógeno formados con los enlaces amida de residuos que se encuentran en la cavidad oxianiónica. Posteriormente el grupo alcohol es liberado y se forma el complejo acilo-enzima. Luego el grupo hidroxilo de una molécula de agua ataca el átomo de carbono del complejo acilo-enzima y se forma un segundo intermediario tetrahédrico. Finalmente, el grupo acilo es liberado y se regenera la enzima activa (Figura 3) (Derewenda *et al.*, 1994; Longhi *et al.*, 1997; Lang *et al.*, 1998).

Existe mucha variabilidad en los medios que rodean las triadas y aún no se han logrado esclarecer enteramente. Se sabe que a diferencia de las lipasas, las esterasas presentan un

sitio activo accesible al solvente por lo que no existe un mecanismo de activación interfacial. Las esterasas presentan además un sitio de unión del grupo acilo ("acyl binding pocket") (Holmquist, 2000)

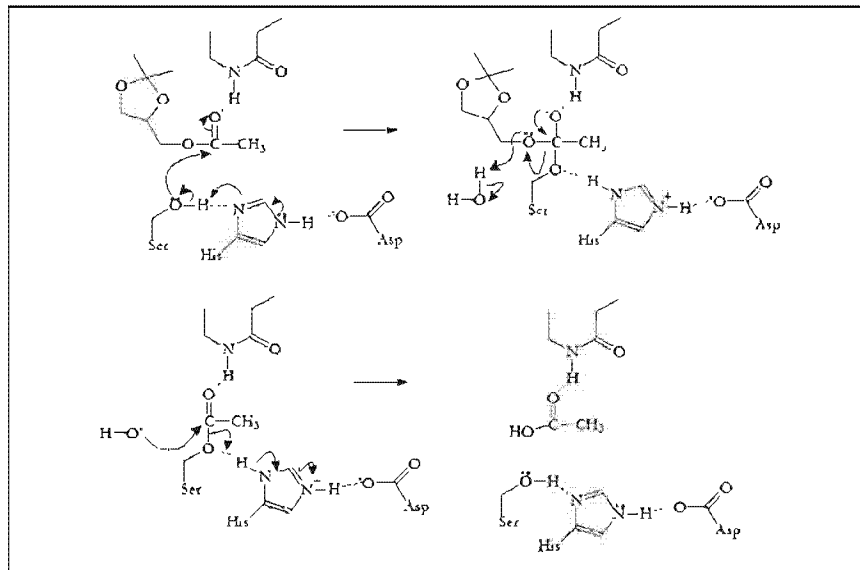


Figura 3– Mecanismo de hidrólisis de un éster catalizado por una esterasa

Se ha encontrado para algunas carboxilesterasas que la región N-terminal es muy importante para definir las propiedades catalíticas de la enzima. En el caso de lipasas sensibles a hormonas, la región N-terminal está conformada por dos α -hélices que restringen la entrada del sustrato al sitio activo y modulan la especificidad, así como otros parámetros de las enzimas (Mandrich *et al.*, 2005, Foglia *et al.*, 2007).

2.2.1.2 Aplicación e importancia económica de las esterasas

Las esterasas tienen un amplio campo de aplicación. Las características que las hacen interesantes como biocatalizadores en la industria residen en su estabilidad, actividad en solventes orgánicos, el hecho de que no requieren cofactores y su alta regio y estereoespecificidad. Sus aplicaciones podemos dividir las de acuerdo al área industrial en

que han sido utilizadas (Panda y Gowrishankar, 2005):

A) Procesamiento de alimentos, bebidas, perfumería y degradación de materiales sintéticos- Se utilizan para la liberación de ácido ferúlico, sinápico, caféico y coumárico de ésteres encontrados en cereales, residuos agroindustriales y biopulpas. Estos compuestos una vez liberados se utilizan en perfumería y alimentos. También se utilizan en reacciones de transesterificación para generar grasas con valor agregado.

B) Ingeniería ambiental- Las esterasas se han utilizado para la degradación de diversos compuestos contaminantes como poliuretano, plásticos y poliésteres

C) Industria farmacéutica- El papel principal de las esterasas en esta área, es la síntesis de fármacos quirales. Las esterasas comunes no pueden llevar a cabo la hidrólisis de ésteres con un grupo voluminoso de alcoholes terciarios, sin embargo, una esterasa de *Burkholderia gladioli* pudo catalizar esta reacción muy importante para la producción de derivados de cefalosporinas (Petersen *et al.*, 2001).

D) Agricultura- Las fosfotriesterasas se utilizan para la degradación de compuestos organofosforados (insecticidas y nematocidas).

E) Industria química- Se utilizan también en la manufactura de pulpa y papel, textiles y pieles

2.2.2 Generalidades de lipasas

Al igual que las esterasas, las lipasas catalizan la hidrólisis de ésteres, pero lo hacen preferencialmente hacia triglicéridos y ésteres de ácidos grasos de cadena larga insolubles en agua (Figura 4). La actividad enzimática “in vitro” de lipasas se puede medir por la hidrólisis de una amplia variedad de ésteres de ácidos carboxílicos (sustratos naturales y no-naturales); así como por la alta especificidad que presentan para el rompimiento de acilglicérols de cadena larga (Jaeger *et al.*, 1994; Beisson *et al.*, 2000)

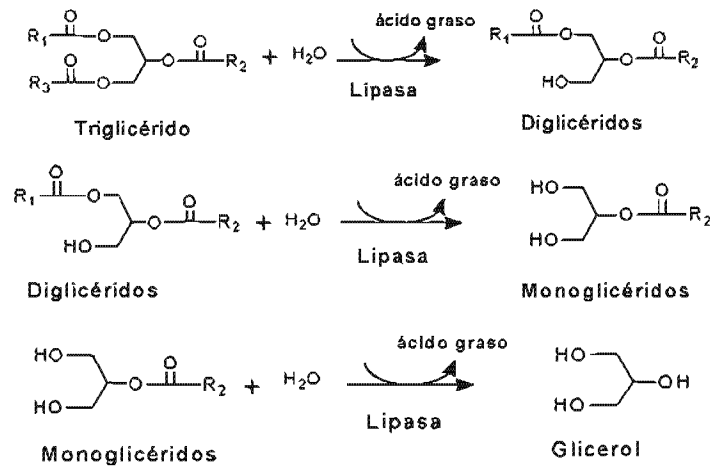


Figura 4. Reacción catalizada por lipasas. Fuente: O'Connor (1988) y Bornscheuer (2000)

Dado que los triacilgliceroles son insolubles en agua, la conversión a productos se lleva a cabo y se ve incrementada en una interfase lípido-agua. Se generan principalmente como productos ácidos grasos libres y glicerol cuando se trata de una hidrólisis total, mientras que cuando la hidrólisis es incompleta generan diglicéridos y monoglicéridos con diferencias en las posiciones finales de esterificación. A este fenómeno se le conoce como activación interfacial y muy probablemente se debe a la presencia de una tapa que cubre el sitio activo y que está presente en la mayoría de las lipasas. Después de la difusión de la lipasa a la interfase, el sitio activo de la enzima es expuesto debido a un cambio conformacional de la tapa (conformación abierta) (Milled *et al.*, 2001). Debido a la activación interfacial, la cinética de hidrólisis de lipasas no puede ser descrita por la cinética tradicional de Michaelis-Menten dado que este modelo es válido sólo para enzimas y sustratos solubles (Verger y de Haas, 1976)

Aunque las lipasas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, se encuentran abundantemente en la flora microbiana (bacterias, hongos y levaduras). También se ha reportado la presencia de estas enzimas en animales y plantas (Pandey *et al.*, 1999). En el caso de plantas, las enzimas son abundantes en los tejidos de reserva

2.2.2.1 Aspectos estructurales de lipasas

En 1990 se determinó la estructura de las lipasas de *Rhizomucor miehei* y la de la lipasa pancreática humana. Desde entonces se han elucidado varias estructuras de lipasas, la mayoría de origen microbiano. Las lipasas comparten con las esterasas la estructura característica α/β antes descrita y, en contraste con esterasas, la mayoría contiene un segmento helicoidal adicional que cubre el sitio activo (tapa). Los estudios hechos por cristalografía de rayos X muestran que el sitio catalítico también está localizado en el carboxilo terminal de la hoja central $\beta 5$ (Jaeger y Reetz, 1998). Este sitio se encuentra formado al igual que en esterasas por los residuos histidina, serina y aspartato o glutamato, donde el papel principal lo desempeña la serina que se encuentra en la secuencia consenso corta similar a la encontrada en esterasas (G-X-S-X-G), aunque el resto de los aminoácidos de la tríada catalítica proviene de distintas regiones de la proteína. La serina que se encuentra dentro del pentapéptido consenso en las lipasas tiene una conformación ($\phi= 62^\circ$, $\psi= 121^\circ$), lo que genera que después de una cadena β se obtenga un giro rígido que contiene el residuo de serina y posteriormente un α -hélice, conocido como β -eSer- α . Un análisis de la secuencia de aminoácidos alrededor de residuos de serina activos de diferentes serin-hidrolasas indica que se puede constituir la unión estructural que relaciona a diferentes enzimas de la familia de las hidrolasas (Derewenda *et al.*, 1993).

La hidrólisis del enlace éster es realizada por la tríada catalítica con un mecanismo de hidrólisis igual al descrito para esterasas, donde existe un ataque nucleofílico por parte de la serina sobre el carbonilo del enlace éster, asistido por la formación del oxianión intermediario tetrahédrico que se forma durante la catálisis. Existe mucha variabilidad en los medios que rodean las tríadas y aún no se han logrado esclarecer enteramente. Se sabe que en la lipasa de *R. miehei* el oxianión se forma completamente después del cambio conformacional debido a la activación interfacial y está compuesto de dos amidas más el grupo hidroxilo de la serina, ambos capaces de ceder protones para formar puentes de hidrógeno (Brockman, 1984). Durante el mecanismo de activación interfacial existe un cambio conformacional en la enzima, que se ajusta por sí mismo a la interfase. En las enzimas que se han estudiado (*G. candidum*, *R. miehei* y la lipasa pancreática humana hpL),

se ha visto que el centro catalítico está por debajo de una o mas hélices superficiales que lo cubren y, para el caso de las lipasas dicha cubierta es una hélice anfipática.

2.2.2.2 Aplicación e importancia económica de las lipasas

En comparación con las esterasas, las lipasas son de interés particular para la producción de compuestos enantiopuros como resultado de su amplia especificidad de sustrato, una alta estabilidad en solventes orgánicos y a menudo mas alta enantioselectividad (Jaeger y Eggert, 2002)

En el área biotecnológica se prefieren las lipasas microbianas debido a sus diversas propiedades enzimáticas, a sus especificidades de sustrato y a que el sistema de producción por fermentación representa un bajo costo. Las especies *Candida sp.*, *Pseudomonas sp.*, y *Rhizopus sp.* son las fuentes mas importantes. *C. rugosa* es el microorganismo mas usado para la producción de lipasas (Pandey *et al.*, 1999).

Existen varias patentes sobre la aplicación industrial de lipasas. El uso principal se asocia con la producción de aceites y grasas modificados, en donde se ha avanzado mucho en la modificación enzimática. En la actualidad las lipasas son una excelente alternativa a las técnicas orgánicas clásicas para la transformación selectiva de moléculas complejas. Estas enzimas poseen muchas características que las hacen excelentes biocatalizadores, como son, impartir especificidad a reacciones en las cuales un proceso químico es no-específico, reducir reacciones colaterales simplificando problemas de separación de productos y reducir costos en comparación con los procesos químicos tradicionales (Pandey *et al.*, 1999).

2.3. Esterasas y lipasas en el género *Aspergillus*

Dentro del género *Aspergillus* se han reportado muchas enzimas con aplicación industrial. Dentro de los microorganismos que producen lipasas se incluyen varias especies de *Aspergillus*. La lipasa de *A. niger* se produce a escala industrial y ha sido extensamente estudiada (Fogarty, 1994). A diferencia de las lipasas no existen muchos reportes de esterasas. Para *Aspergillus niger* se han caracterizado y estudiado ampliamente las feruloil-

esterasas A y B, e incluso se ha reportado la estructura de la feruloil esterasa A (Benoit *et al.*, 2006, 2007). Dichas enzimas son de gran importancia biotecnológica debido a que se pueden utilizar para la producción de ácido ferúlico el cual es un compuesto antioxidante y precursor de vainillina. Se ha reportado y clonado también una esterasa involucrada en la biosíntesis de aflatoxinas en *A. parasiticus* (Yu *et al.*, 2002)

En el caso de *A. nidulans* existen muy pocos reportes sobre lipasas y esterasas. Dentro de las esterasas se ha clonado y caracterizado una feruloil esterasa tipo B (Shin y Chen, 2007). Machado y colaboradores han reportado la presencia varias esterasas en extractos celulares obtenidos de micelios de diferentes cepas de *A. nidulans* (Machado y De Castro-Prada, 1998). También se ha reportado la presencia de una secuencia de esterasa/lipasa putativa dentro de la vía de biosíntesis de esterigmatocistina (Brown *et al.*, 1996). En *A. nidulans* se ha detectado también la presencia de actividad lipolítica y cutinolítica (García-Lepe R. *et al.*, 1997) y se ha reportado la purificación de una lipasa que es activa a bajas temperaturas (Mayordomo *et al.*, 2000).

Se realizó un análisis de las secuencias de lipasas, esterasas y cutinasas en la base de datos del genoma de *A. nidulans* (Galagan *et al.*, 2005). En esta base de datos, estas enzimas están clasificadas de acuerdo al dominio que la proteína presenta en la base de datos Pfam (Protein families database of alignments y HMMs) De este modo se obtuvieron 45 secuencias (Tabla 1).

Tabla 1- Secuencias de carboxilesterasas encontradas en el genoma de *A. nidulans*

Dominio	Secuencias
Lipasa 3	4
Lipasa	4
Lipasa con motivo GDSL	9
Lipasa secretoria	2
Esterasa	1
Cutinasa	4

Carboxilesterasa	18
α/β hidrolasa asociada a lipasa	1
Otras	2
Total	45

Se realizó un estudio de dichas secuencias, obteniéndose algunos datos teóricos como el peso molecular, pI, presencia de péptido señal, secuencias ESTs relacionadas, presencia de intrones y pentapéptido consenso. En la tabla 2 se muestran las secuencias de proteínas en el intervalo de masa molecular de 20-50 kDa, así como algunas características teóricas. Resaltan las tres secuencias marcadas en gris; una corresponde a la StcI y las otras presentan valores de masa molecular y pI teóricos muy cercanos a los valores teóricos de la esterasa/lipasa bajo estudio (StcI), (31.45 kDa y pI 4.91). Sin embargo, es importante resaltar que a diferencia de la StcI, a estas dos lipasas se les predijo un péptido señal

Tabla 2- Secuencias de carboxilesterasas reportadas en el genoma de *A. nidulans* con masa molecular en el rango de 20-50 kDa

RANGO DE PESO MOL. (kDa)	GEN	MASA MOL. TEÓRICO (kDa)	pI	PRESENCIA DE PEPTIDO SEÑAL
20-30 kDa	AN5309.2 CUTINASA	22.41	6.88	SI
	AN7541.2 CUTINASA	21.03	5.03	SI
	AN7180.2 CUTINASA	21.25	5.78	SI
	AN2528.2 LIPASA GDSL	24.17	4.14	SI
	AN4573.2 LIPASA GDSL	27.22	5.81	SI
	AN6064.2 LIPASA GDSL	28.65	5.13	NO
	AN9442.2 LIPASA GDSL	27.70	4.53	NO
	AN7046.2 LIP BRASIL	21.95	5.69	SI
30-40 kDa	AN8046.2 LIPASA 3	31.28	4.25	SI
	AN8782.2 FORMYL G H	31.54	6.45	NO
	AN7816.3 STCI	31.45	4.9	NO
	AN1792.2 LIPASA GDSL	36.54	4.7	SI
40-50 kDa	AN5777.2 LIPASA 3	42.49	4.94	SI
	AN6773.2 LIPASA	48.74	5.33	SI
	AN1799.2 LIPASA	45.98	4.98	SI
	AN9287.2 ESTERASA	43.88	5.24	SI
	AN2602.2 ESTERASA	41.27	9.86	SI
	AN6148.2 ESTERASA	44.36	5.1	SI

En la tabla 3 se muestran las secuencias de proteínas que adicionalmente se encuentran dentro de genotecas de ADNc.

Tabla 3- Secuencias de carboxilesterasas reportadas en el genoma de *A. nidulans* con secuencias EST asociadas de las genotecas de ADNc

GENE	EST	MASA MOL. (kDa)	pI	PRESENCIA DE PEPTIDO SEÑAL
AN5777.2 LIPASA 3	CONTIG1145	42.49	4.94	SI
AN5309.2 CUTINASA	CONTIG 1651	22.41	6.88	SI
AN7816.3 STCI	CONTIG 1592 y CONTIG 452	34.69	4.74	NO
AN1792.2 LIPASA GDSL	NO HAY	36.54	4.7	SI

En la tabla tres llama la atención el hecho de que las secuencias de expresión encontradas para el gen *stcI* muestran en conjunto una proteína con una masa molecular y pI teóricos diferentes a los obtenidos para la secuencia *stcI* reportada por Brown *et al.* (1996) (Tabla 2). En especial la masa molecular teórica aquí obtenida para la proteína StcI (34.69) fue mayor y se observó una secuencia de 29 aa adicional hacia la región N-terminal que no corresponden a una secuencia de péptido señal y parece formar parte de la enzima.

2.4. Biosíntesis de esterigmatocistina (ST) y aflatoxinas en el género *Aspergillus*

Las aflatoxinas son compuestos naturales producidos por el género *Aspergillus* que presentan una alta toxicidad. *A. flavus* y *A. parasiticus* producen las aflatoxinas tipo B, G1 y G2 que se han relacionado con la contaminación de productos agrícolas. Algunas especies de *Aspergillus* como *A. nidulans*, producen como producto final esterigmatocistina (ST), que es el penúltimo precursor de aflatoxinas. Otras especies en las que se ha reportado la producción de ST como producto final son *A. tamarii* y *A. ochraceoroseus* (Klich *et al.*, 2000). La vía de biosíntesis de ST en *A. nidulans* es muy similar a la de aflatoxinas en *A. flavus* y *A. parasiticus* (Yabe y Nakajima, 2004).

2.4.1 Generalidades de las vías de biosíntesis de ST y aflatoxinas en el género *Aspergilli*

En todos estos organismos los genes involucrados en la biosíntesis de ST o aflatoxinas se encuentran agrupados. Al menos se requieren 18 enzimas para la conversión de acetyl CoA hasta aflatoxinas. El agrupamiento de genes para biosíntesis de aflatoxinas es de 70kb en *A. flavus* y *A. parasiticus* (Yabe y Nakajima, 2004). En *A. nidulans* el agrupamiento biosintético está formado por 60 kb, que comprende 25 genes e incluso se ha propuesto una vía de biosíntesis (Figura 5) (Brown *et al.*, 1996). La función de la mayoría de los genes de la vía de biosíntesis aflatoxinas se ha determinado genética ó bioquímicamente y sólo algunos se han clonado y caracterizado (Motomura *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2000; 2002, Kato *et al.*, 2003). Los genes biosintéticos y de regulación para la producción de ST en *A. nidulans* son homólogos a los de la vía de aflatoxinas, muy pocos han sido estudiados. El porcentaje de identidad entre los genes de biosíntesis de ST y aflatoxinas es de 55-75% (Bhatnagar *et al.*, 2006). En *A. parasiticus* se ha detectado la duplicación parcial del agrupamiento de biosíntesis de aflatoxinas (Chang y Yu, 2002).

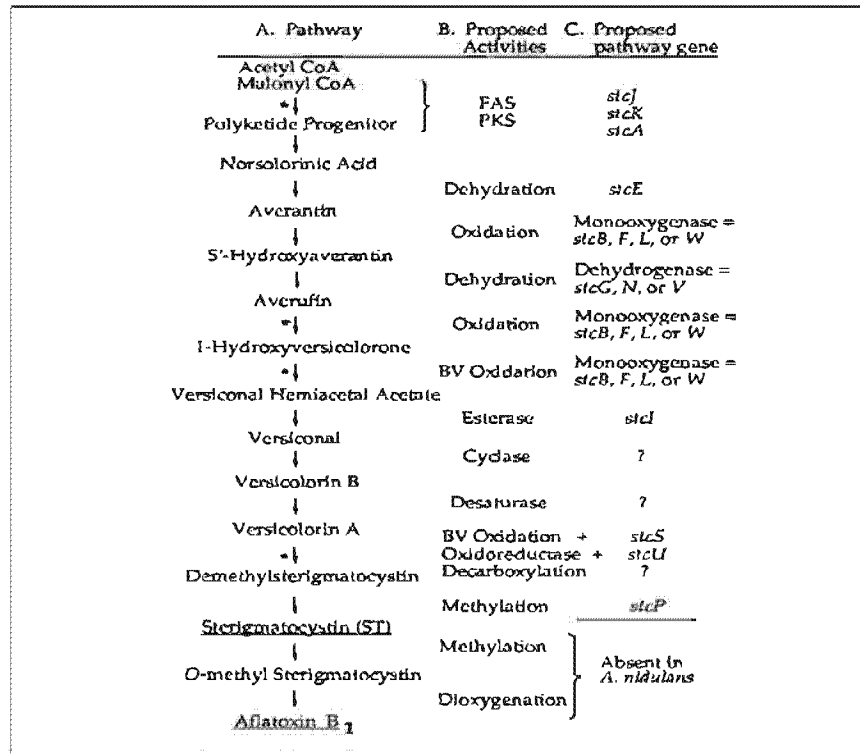


Figura 5- Vía de biosíntesis de esterigmatocistina en *A. nidulans* propuesta por Brown *et al.* (1996).

2.4.2 Regulación de las vías de biosíntesis de ST y aflatoxinas

Existen varios factores que se han relacionado con la regulación de la vía de biosíntesis de ST y aflatoxinas. La mayoría de los genes de la vía biosintética de aflatoxinas se encuentran regulados por la proteína AflR, la cual es una proteína de unión a ADN que se une a la secuencia palindrómica 5' TCGN₅CGA-3' en la región promotora de los genes estructurales. La mayoría de las regiones promotoras de los genes tienen al menos un sitio de unión de AflR a 200 pb antes del inicio de la traducción. Este gen *aflR* posiblemente se encuentra autorregulado (Bhatnagar *et al.*, 2006). Se ha encontrado también una conexión entre la vía de biosíntesis de ST o aflatoxinas y el desarrollo del hongo. Existe una cascada de señales mediada por proteína G en *A. nidulans* que regula la esporulación asexual y la producción de ST (Calvo *et al.*, 2002). El gen regulador de la transcripción *veA* en *A. nidulans* y *A.*

parasiticus controla también la producción de micotoxinas y el desarrollo sexual del hongo (Kato *et al.*, 2003). Adicionalmente, el gen *laeA* que codifica para una enzima con una similitud de secuencia a metiltransferasas, parece ser importante para la expresión de ST. Por otra parte, la localización cromosomal también afecta la expresión de los genes. Finalmente, se ha visto que factores de transcripción globales como los que median la regulación por pH, fuente de carbono o nitrógeno, afectan la organización de la cromatina cercana al sitio de inicio de la transcripción (Bhatnagar *et al.*, 2006).

2.4.3 Esterasas involucradas en la vía de biosíntesis de ST y aflatoxinas

En *A. nidulans*, el gen *stel* que codifica para una enzima con potencial de esterasa/lipasa se encuentra dentro del agrupamiento de la vía de biosíntesis de ST. La secuencia sin intrones tiene el número de acceso al GenBank™, 2869364 y parece incluir el gen completo. Este gene es homólogo del gen *estA* ya clonado e identificado dentro del agrupamiento de genes para la biosíntesis de aflatoxinas en *Aspergillus parasiticus* y de los genes de esterasa reportados para *A. flavus* y *A. nomius* (Kurtzman *et al.*, 1987; Yu *et al.*, 1995; Ehrlich *et al.*, 2004). Las reacciones catalizadas por el gen *stel* dentro de la biosíntesis de ST se muestran en la figura 6.

La actividad de esterasa de la proteína EstA en extractos celulares de *A. parasiticus* ya ha sido confirmada (Anderson y Chung, 1990; Kusumoto y Hsieh, 1996) y también se detectó que la enzima EstA realiza la conversión de versiconal hemiacetal acetato (VHA) a versiconal (VAL) y de versiconol acetato (VOAc) a versiconol (VOH) (Hsieh *et al.*, 1989, Chang *et al.*, 2004). Se sabe que el VHA es un compuesto clave para entender la formación del anillo de bisfurano de la versicolorina A (VA) durante la biosíntesis. Anderson y Chung (1990) evaluaron actividad de una esterasa porcina sobre VHA. Sin embargo, no hay información de la actividad de esterases involucradas en la biosíntesis de ST, ni de su especificidad de sustrato. La expresión de estos genes es compleja y aun no se ha elucidado. Tampoco se ha reportado el aislamiento y expresión de genes de la biosíntesis de ST en *A. nidulans*. La capacidad de estas esterases para desacetilar VHA y VOAc sugieren que estas enzimas tienen un gran potencial de uso biocatalítico importante ya que pudieran desacetilar otros compuestos con una alta enantio o regioselectividad.

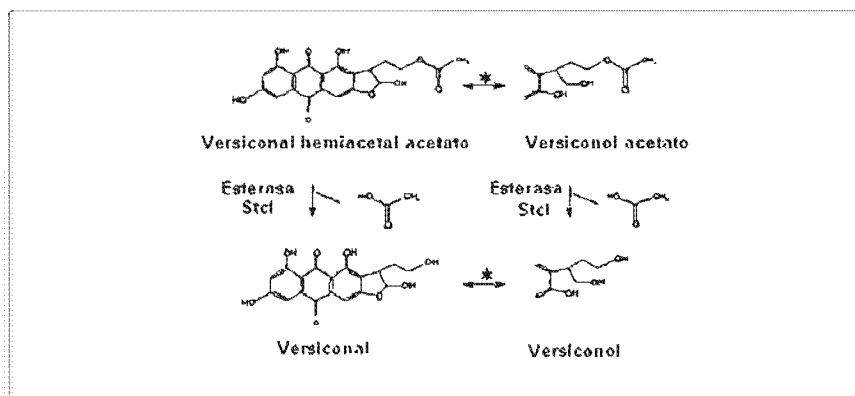


Figura 6- Reacciones catalizadas por la esterasa StcI dentro de la vía de biosíntesis de ST

2.5 Sistemas de expresión de proteínas heterólogas

En los últimos años se ha aumentado de forma exponencial la producción de proteínas recombinantes de interés terapéutico e industrial, de tal forma que ya se ha integrado totalmente en los procesos de producción de las empresas biotecnológicas. El tipo de sistema de expresión se selecciona en función de varios parámetros como son:

- Amplio conocimiento y disposición de técnicas de manipulación del sistema de expresión
- El rendimiento de la producción de la proteína de interés
- En el caso de las enzimas es importante la recuperación de la actividad de la enzima recombinante
- Éxito en las modificaciones y procesamiento post-traduccionales
- Plegamiento correcto y glicosilación de la proteína de interés
- Viabilidad económica
- El proceso posterior de purificación

El uso de bacterias y levaduras como sistemas de expresión ha sido ampliamente estudiado, en especial para levaduras. Las levaduras combinan la facilidad de manipulación genética y cultivo de *E. coli* con la capacidad eucariota de realizar modificaciones post-traduccionales

sobre las proteínas como las glicosilaciones, formación de puentes disulfuro y el procesamiento proteolítico.

2.5.1 *Pichia pastoris* como sistema de expresión

Pichia pastoris es una levadura metilotrófica facultativa que pertenece al grupo de los ascomicetos, se reproduce por gemación, la formación de la espora es homotética y su dotación genómica es haploide. Las principales fuentes de carbono que puede asimilar son glucosa, metanol, glicerol y etanol. Como fuente de nitrógeno asimila amonio (Cerenghino y Cregg, 2000).

El interés por esta levadura surgió en 1969, cuando se descubrió la capacidad de esta especie de crecer en metanol como única fuente de carbono (Higgins y Cregg, 1998). Se utilizó en los años 70 para la producción de proteína unicelular (SCP) a partir de metanol y en la década de los 80's dejó de ser un proceso viable, por lo que los esfuerzos se enfocaron a desarrollar un sistema de expresión de productos heterólogos. Se aisló el gen de la alcohol oxidasa 1 (AOX1) y su promotor, se generaron una serie de vectores, cepas y métodos para la manipulación genética de *P. pastoris*. Estos avances, en conjunto con los que ya se tenían sobre medios de cultivo y operaciones en biorreactor desarrollados para la SCP, desembocaron en un sistema de expresión con el que se obtienen altos niveles de producción de proteínas heterólogas de interés académico e industrial (Cregg *et al.*, 1985). Este sistema de expresión se ha convertido en uno de los más utilizados para la expresión de proteínas heterólogas de eucariotes y es una alternativa eficiente al uso de *S. cerevisiae* por diferentes factores como son:

- ✓ Es un organismo unicelular de fácil manipulación y cultivo.
- ✓ Se pueden aplicar las técnicas de manipulación genética de *S. cerevisiae*.
- ✓ Se consiguen grandes niveles de expresión de proteína heteróloga intra y extracelular en medios sintéticos y baratos.
- ✓ Tiene un promotor fuerte (*aox1*) de fácil manipulación, eficiente, inducible por metanol y fuertemente reprimido por otras fuentes de carbono como son glucosa y glicerol.

- ✓ Dado que es un microorganismo eucariote es capaz de realizar modificaciones post-traduccionales de las proteínas expresadas.
- ✓ Tiene un metabolismo fundamentalmente respiratorio que facilita el desarrollo de cultivos a elevada densidad celular.
- ✓ No produce hiperglicosilación de proteínas, disminuyendo la respuesta inmunogénica de los organismos en donde se han de aplicar.
- ✓ Dado que es haploide cualquier modificación genética se manifiesta genotípicamente en generaciones posteriores.
- ✓ No excreta prácticamente proteínas nativas extracelulares, facilitando la recuperación y purificación de la proteína heteróloga.
- ✓ Es un sistema de expresión rápido, fácil y económico.

2.5.1.1 Metabolismo de metanol en *P. pastoris*

El sistema se basa en la regulación del promotor del gen *aox1*, inducible por metanol. La enzima alcohol oxidasa (AOX) es la responsable de catalizar el primer paso de la ruta de degradación de metanol a formaldehído, obteniéndose como subproducto peróxido de hidrógeno. Este es un componente tóxico para la célula por lo que utiliza catalasas para su degradación. Este proceso consume oxígeno, el cual se utiliza como aceptor final de electrones. Esta reacción se lleva a cabo en el interior de los peroxisomas. La AOX puede llegar a representar hasta el 30% de la proteína total celular soluble. Este hecho es importante, ya que la expresión de la proteína heteróloga bajo el promotor *aox1* puede traducirse en una gran producción de la proteína de interés (Cregg *et al.*, 1993).

En la oxidación completa de metanol en levaduras metilotróficas se diferencian dos vías metabólicas distintas, la vía disimilatoria y la asimilatoria. En la primera, se comienza con la salida del formaldehído del peroxisoma, este compuesto se oxida secuencialmente hasta ácido fórmico y dióxido de carbono, obteniéndose energía en forma de NADH. Esta ruta tiene un papel detoxificador del formaldehído (Ferrer *et al.*, 2001). En la vía asimilatoria, se generan triosas y ATP a partir del formaldehído inicial (Goodman, 1985).

2.6 Otros sistemas catalizados por enzimas

La introducción y/o eliminación adecuada de grupos protectores en la síntesis de compuestos orgánicos es una de las transformaciones sintéticas más utilizadas e importantes en química orgánica. Uno de los problemas principales en la síntesis química es la necesidad de introducir o remover moléculas regioselectivamente, lo cual no se ha podido resolver con las herramientas químicas clásicas. En este sentido las enzimas representan una alternativa muy importante, ya que pueden llevar a cabo transformaciones con una alta quimio- y regioselectividad (Jaeger *et al.*, 1999, Sharma *et al.*, 2005). Enzimas como lipasas y esterasas que puedan actuar en presencia de solventes orgánicos son muy importantes en el área de biocatálisis en química orgánica (Bornscheuer, 2002). Estas enzimas se pueden utilizar en la modificación sustratos aromáticos y alifáticos polihidroxilados. Se han reportado algunos estudios de aplicación de lipasas en biotransformaciones de fenoles, flavonoides y conduritoles. Dentro de estos, los flavonoides representan un grupo muy importante por sus propiedades antes descritas y en este sentido la regioprotección/desprotección de los mismos es muy importante (Kadereit y Waldmann, 2001). Algunos autores han trabajado en el aumento de solubilidad de estos compuestos por la vía de quimio-enzimática de acetilación/desacetilación de flavonoides. Es decir, se acetila completamente la molécula por la vía química, lo cual aumenta la solubilidad en solventes, pero elimina la propiedad antioxidante debido a la acetilación de los grupos funcionales. Se realiza entonces la desacetilación selectiva por la vía enzimática, recuperándose la actividad antioxidante cuando la enzima es capaz de desacetilar en la posición que le confiere esa propiedad a la molécula. En este sentido se ha reportado que las lipasas de *Candida antarctica* y *Mucor miehei* han funcionado exitosamente (Lambusta *et al.*, 2003; Ardhaoui *et al.*, 2004^a). En algunos estudios se ha visto que los compuestos fenólicos acetilados tienen una actividad biológica igual o incluso mayor que la del compuesto sin acetilar. También la aplicación de estos compuestos se encuentra limitada en el área de farmacia y alimentos por su baja solubilidad en ambientes hidrofóbicos. De ahí que la síntesis de compuestos fenólicos lipofílicos (lipofilización) por vía quimio-enzimática sea una alternativa importante (Figuroa-Espinoza y Villeneuve, 2005). También se ha reportado el uso de las lipasas de *Fusarium globulosum* y *Aspergillus carneus* en la acetilación/desacetilación de compuestos polifenólicos intermedarios

importantes para la síntesis de compuestos fenólicos bioactivos (Gulati *et al.*, 2001, Figueroa-Espinoza y Villeneuve, 2005; Fragopolou *et al.*, 2007)

2.7. Compuestos bioactivos

Los compuestos bioactivos neutralizan acciones nocivas de ciertas sustancias en el ser humano. Pueden tener propiedades anticancerígenas, antitumorales, antiinflamatorias y antioxidantes entre otras (Carbonneau *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 2000). Se encuentran ampliamente distribuidos en frutas, verduras, cereales integrales, leguminosas y leche. Dentro de las sustancias químicas que ejercen esta actividad se encuentran los compuestos fenólicos, triterpenos y flavonoides (Andlahuer y Furst, 2002)

2.7.1 Ácidos hidroxicinnámicos

Son compuestos fenólicos con un anillo aromático que contiene uno o más grupos hidroxilo, que le confieren una propiedad antioxidante natural. Los más importantes son ácido sinápico, ácido cafeico, ácido cumárico y ácido ferúlico. Normalmente se encuentran esterificados a azúcar o ácidos orgánicos. El ácido *p*-cumárico (3-fenil-(4-hidroxi)-2-propenoico) se encuentra principalmente en frutas (manzana, ciruela, uva y arándano) y vegetales (tomate, brócoli, zanahoria y espinaca) Le confiere a los alimentos propiedades como estabilidad, color y fragancia (Maldonado *et al.*, 1998). El ácido ferúlico (3-fenil-(4-hidroxi-3-metoxi)-2-propenoico) está en mayor cantidad en la cascarrilla de maíz, en granos de trigo, cebada, sorgo y avena. Se encuentra en vinos, café y cerveza, donde influye en el sabor. Se utiliza en alimentos como inhibidor de sabores amargos, precursor de vainillina, en perfumería y cremas que protegen contra rayos UV, tiene propiedades antitumorales y anticancerígenas (Silva *et al.*, 2000).

2.7.2 Triterpenos

Se encuentran en productos de soya y granos. Dentro de sus actividades biológicas están: prevención de cáncer de pulmones, glándulas mamarias, colon, estómago y próstata, propiedad anti-VIH, antibacterianos y auxiliar en tratamiento de aterosclerosis. Ejemplo de estos compuestos son la β -Amirina y el colesterol. La β -Amirina es uno de los triterpenos más comunes e importantes. Los estudios de actividad biológica revelan

propiedades anti-inflamatorias y antioxidantes. Este compuesto evita la peroxidación de lípidos y el daño a membranas en el sistema biológico, que causan inflamaciones así como el cáncer (Takahashi *et al.*, 1999). El colesterol es un componente muy importante en las membranas plasmáticas de animales y es un precursor de vitamina D y hormonas sexuales.

2.7.3 Flavonoides

Los flavonoides son una clase de compuestos fenólicos y se encuentran en casi todas las plantas. Muchos estudios han reportado que presentan actividades biológicas como: antioxidantes, anticancerígenos y antimicrobianos. En su mayoría los beneficios de los flavonoides son atribuidos a su capacidad de inhibir la peroxidación de los lípidos y a sus propiedades quelantes (Mellou *et al.*, 2005).

2.7.4 Ácido kójico

Aspergillus, *Acteobacter* y *Penicillium* producen el ácido kójico, el cual es un antibiótico. Se ha encontrado en diversas fermentaciones comestibles y en bebidas orientales (frijol de soya, sake y jugo de soya). Se emplea comúnmente en la industria alimenticia como aditivo para prevenir el oscurecimiento enzimático y en cosméticos, ya que posee efectos en el blanqueamiento de la piel y filtración de rayos UV (Synytsya *et al.*, 2007).

3. JUSTIFICACION

El presente trabajo se desarrolló con el fin de caracterizar molecular y bioquímicamente la esterasa StcI, la cual está involucrada en la vía de biosíntesis de esterigmatocistina (ST) que es un precursor de aflatoxinas. Se profundizó en el estudio de la expresión de la enzima, debido a que ya existe una secuencia reportada que codifica para una proteína de 31 kDa, que difiere de las secuencias obtenidas en bases de datos de secuencias de expresión. Se encontró una región N-terminal adicional no reportada que también pertenece a la enzima y se decidió estudiar también el papel que desempeña esa región en las propiedades catalíticas de la enzima por lo que se clonó y expresó tanto el gen *stcI* completo (*NstcI*) como su versión truncada ya reportada (*stcI*) en *Pichia pastoris*.

El análisis *in silico* del genoma de *A. nidulans* mostró la presencia de varias lipasas y esterases. Sin embargo, consideramos que tanto bioquímica como fisiológicamente, la esterasa StcI es un modelo interesante a estudiar que aun no ha sido evaluado. Además, desde un punto de vista biocatalítico, esta enzima es importante dado que se encuentra involucrada naturalmente en la biosíntesis de moléculas cíclicas y puede por tanto utilizarse en reacciones de biocatálisis de importancia industrial.

También es muy importante contar con nuevas enzimas que puedan catalizar reacciones con una alta quimio y regioselectividad. Se exploró por lo tanto el uso de esta enzima en reacciones de desacetilación de compuestos fenólicos bioactivos, los cuales tienen una gran importancia en el área de alimentos y farmacia.

4. HIPOTESIS

- Si el dominio de 29 aminoácidos hacia el extremo N-terminal de la esterasa StcI es parte de la proteína madura, entonces será posible identificar su presencia en el transcrito y en la proteína expresada.

- Si el dominio de 29 aminoácidos hacia el extremo N-terminal de la esterasa StcI influye en sus propiedades bioquímicas, entonces la estabilidad de la enzima, su especificidad de sustrato ó la regioselectividad serán diferentes en la proteína completa (NstcI) con respecto a la proteína truncada (StcI).

5. OBJETIVOS GENERALES:

- Caracterizar molecularmente la esterasa StcI de *Aspergillus nidulans*.
- Determinar la función de la región N-terminal de la esterasa StcI en sus propiedades enzimáticas.
- Establecer el uso potencial de la enzima en biocatálisis.

5.1 OBJETIVOS PARTICULARES:

- Estudiar los patrones de expresión de la StcI bajo diferentes condiciones de cultivo de *Aspergillus nidulans*.
- Clonar y expresar el ADNc completo de *nstcI* y su versión truncada en *Pichia pastoris*.
- Caracterizar bioquímicamente las enzimas recombinantes.
- Establecer la función de la región N-terminal adicional en las propiedades catalíticas de la enzima.
- Evaluar el uso en biocatálisis de las enzimas recombinantes en la desacetilación de compuestos fenólicos bioactivos.

6. MATERIAL Y METODOLOGÍA

6.1 Microorganismos empleados

El microorganismo utilizado fue *Aspergillus nidulans* PW1, cepa auxótrofa por arginina proporcionado por el Dr. Jesús Aguirre, del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Las esporas de *A. nidulans* se cosecharon de placas con medio mínimo (Kafer, 1977). Se colectaron en solución al 0.1% de NaCl y se conservaron a 4°C en sílica gel (Kawasaki *et al.*, 1995)

Para la clonación y expresión en *Escherichia coli* se utilizaron las cepas: *E. coli* DHS α (F⁻ \square 80d*lacZ*DM15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *endA1 recA1 hsdR17* (*rK⁻ mK⁺*) *deoR thi-1 supE44 λ -gyrA96 relA1*) y *E. coli* BL21 (DE3) (F⁻ *ompT hsdSB* (*r_B⁻ m_B⁻*) *gal dcm* (DE3)). Se utilizó el vector pET 20b (+) (Novagen).

Para la clonación y expresión en *Pichia pastoris* se utilizó la cepa silvestre *P. pastoris* X-33 y el vector pPICZ α B (Invitrogen).

6.2 Medios y condiciones de cultivo

A. nidulans se creció en medio mínimo y optimizado como controles de no inducción de ST como ya se ha descrito previamente (Kafer, 1977; Peña-Montes *et al.*, 2008) En condiciones de inducción para ST, *A. nidulans* se creció en medio con avena, medio YES y en medio con jarabe de maíz de la misma forma en que fueron descritos por Keller *et al.* (1994), Keller *et al.* (1997) y Kelkar *et al.* (1997), respectivamente.

E. coli se creció a 37°C en medio Luria-Bertani (LB) (1% extracto de levadura, 0.5% Bacto-triptona y 1% NaCl) y LB bajo en sales (con 0.5% de NaCl) Para selección de clonas recombinantes, a las placas con LB ó LB bajo en sales se les adicionó 100 μ g ampicilina/ml ó 25 μ g zeocina/ml, respectivamente.

P. pastoris se creció en medio "Yeast Extract Peptone Dextrose" (YPD) que contiene 1% (p/v) extracto de levadura, 2% (p/v) peptona y 2% (p/v) dextrosa. Para la selección de

clonas recombinantes, a las placas con YPD se les adicionó 1 M sorbitol y 100 µg/ml zeocina, constituyendo el medio “Yeast Extract Peptone Dextrose Sorbitol” (medio YPDS). Las clonas que secretaron la enzima extracelularmente se seleccionaron en medio YPD con 0.5% (p/v) de dextrosa, 1% (v/v) tributirina y 100 µg /ml zeocina, constituyendo el medio “Yeast Extract Peptone Dextrose Tributyrin” (YPDT). La inducción se mantuvo adicionando 200 µl de metanol cada 24 horas (h). Las clonas positivas que generaron halos se crecieron durante 24 h en medio líquido “Buffered Glycerol Complex Medium” (BMGY), el cual contiene 1% (p/v) extracto de levadura, 2% (p/v) peptona, 100 mM de fosfato de potasio, 1.34% (p/v) bases nitrogenadas sin aminoácidos, 4×10^{-5} % (p/v) biotina y 1% (v/v) glicerol con pH ajustado a 6. Para la inducción, las células crecidas en BMGY se centrifugaron (3000 x g, 10 minutos (min)) y resuspendieron en medio “Buffered Methanol Complex Medium” (BMMY), el cual contiene medio BMGY con 0.5% (v/v) de metanol en lugar de glicerol.

6.3 Producción de anticuerpos anti-StcI

Los anticuerpos se generaron en conejos, utilizando como antígeno un péptido sintético diseñado por Sigma-Genosys (The Woodlands, TX). Dos conejos “New Zealand White”, se inyectaron subcutáneamente con 200 µg de péptido conjugado a KLH en adyuvante “Complete Freund’s” (CFA) en la primera inmunización. Para las inmunizaciones posteriores se utilizó adyuvante “Incomplete Freund’s” (IFA) en una proporción 1:1 (v/v). Después de 14, 28, 42, 56 y 70 días, se inyectó a los conejos con 200 µg de péptido en IFA. Se colectó suero en las siguientes etapas: preinmunización, 49 y 63 días y se evaluó la especificidad por inmunoanálisis. Finalmente después de 77 días de inmunización, se desangraron los conejos y se colectó el suero.

6.4 Acondicionamiento de los extractos celulares de *A. nidulans* para inmunoanálisis

Para la inmunodetección de la proteína StcI en los extractos celulares del micelio de *A. nidulans* crecido en condiciones inducidas y no-inducidas para ST, se prepararon las muestras de la siguiente manera. el micelio en el caso de medios líquidos, se colectó por filtración, se lavó con el amortiguador B (10% glicerol, 25 mM DTT, 0.3 M NaCl, 50 mM amortiguador de fosfatos pH 7.5, una tableta de inhibidor de proteasas para 50ml

“complete” (ROCHE)) y se pulverizó hasta obtener un polvo fino en mortero con nitrógeno líquido. En el caso de medio sólido (avena y avena con *A. nidulans*), se pesaron 20 g de muestra, se adicionaron 2 ml del amortiguador B y se pulverizaron de la forma descrita. Posteriormente, se resuspendieron 10 g de muestra pulverizada en 100 ml de amortiguador B y se agitaron toda la noche a 170 rpm, 4°C. Posteriormente se centrifugó a 8000 rpm, durante 20 min, 4°C. El sobrenadante se colectó y se concentró 1:10 por ultrafiltración con una membrana con límite de exclusión de 10 kDa. Finalmente las muestras con la concentración de proteína deseada se precipitaron con ácido tricloro acético (TCA) y se resuspendieron en el amortiguador de carga. Posteriormente se analizaron por inmunoanálisis (“Western blot”).

6.5 Inmunoanálisis

Después de 77 días de inmunización, el antisuero se probó con la dilución 1:40,000. Para la transferencia de proteínas a membrana de polivinilideno fluoruro (PVDF), los extractos celulares de *A. nidulans* con una concentración de proteína de 30 µg se resuspendieron en amortiguador de carga para condiciones desnaturizantes con dodecilsulfato sódico (SDS) y 100 mmol/L ditioneitol (DTT) y se calentaron de 80°C a 100°C durante 5 min. Las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) al 12% y se transfirieron a una membrana de PVDF (Immobilon P, PerkinElmer) de acuerdo a las técnicas descritas por el proveedor y se utilizó el equipo de transferencia semiseco “Trans-blot Semy-Dry electrophoretic transfer cell” (Bio-Rad). Se utilizaron marcadores preteñidos de bajo peso molecular (Bio-Rad). Después de la transferencia la membrana se sumergió en amortiguador de fosfatos salino (PBS) durante 5 min, posteriormente se transfirió a la solución bloqueadora (amortiguador PBS con 0.1% Tween 20 y 5% leche “Skim Milk”) y se incubó toda la noche a 4°C. La membrana se incubó después con el antisuero (anti-StcI) a la dilución deseada en solución bloqueadora por 3 h (temperatura ambiente). Se lavó posteriormente tres veces con PBS con 0.1% de Tween 20 durante 15 min y se incubó con el anticuerpo secundario “goat anti-rabbit IgG” con fosfatasa alcalina (Bio-Rad) diluido 1:10,000 en solución bloqueadora durante 2 h a temperatura ambiente. Finalmente la membrana se lavó 2 veces con PBS con 0.1% de Tween 20 durante 15 min y se reveló la actividad de la fosfatasa alcalina a pH 9.5 con nitroazul de tetrazolio y 5-

bromo-4-cloro-3-indolil fosfato hasta observar bandas color púrpura. La actividad se detuvo sumergiendo la membrana en 50 mM de ácido etileno diamino tertrasódico (EDTA).

6.6 Determinación de la concentración de proteína

Se determinó con la técnica de Bradford (Bio-Rad) de acuerdo al protocolo descrito por el proveedor y se utilizó albúmina sérica bovina (BSA) como estándar.

6.7 Electroforesis de proteínas

Se prepararon geles de poliacrilamida SDS-PAGE y nativos al 12 % por el método de Laemmli (1970). Se utilizaron estándares de bajo peso molecular (Bio-Rad).

6.8 Ensayo de actividad enzimática

Se determinó por dos técnicas: (i) La actividad de esterasa se midió a 37°C, pH 7.5, a 410 nm con acetato de *p*-nitrofenilo (pNPA) (10 mM en dimetil sulfoxido (DMSO)), se utilizó un coeficiente de extinción molar de 14,500 l mol⁻¹ cm⁻¹ (410 nm, pH 7.5, 50 mM amortiguador de fosfato de sodio). Una unidad de enzima (U) se definió como la actividad que libera 1 μmol de sustrato por minuto (Sugihara y Tani, 1991) y (ii) Actividad de esterasa con α-naftil acetato (α-NA) en microplacas como lo describen Kakariari *et al.* (2000).

6.9 Zimogramas para detección de actividad de esterasa

Después de la electroforesis, el gel SDS-PAGE o nativo se lavó por inmersión en agua destilada 5 min y posteriormente en amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.5 por 30 min a temperatura ambiente con agitación constante. En el caso de los geles SDS-PAGE, se realizó un tercer lavado en las mismas condiciones, pero adicionando 5% Triton X-100 al amortiguador de fosfatos y se dejó en esta solución durante 30 min. Posteriormente, el gel se sumergió en amortiguador de fosfatos con 0.5% Triton X-100 por 6 h y se enjuagó 15 min con amortiguador de fosfatos.

Para revelar la actividad de la enzima “*in situ*” en gel, ya sea nativo o SDS-PAGE, se incubó a temperatura ambiente con la solución A (3 mM α -naftil acetato, 10% (v/v) acetona en 100 mM de amortiguador de fosfatos, pH 7.5) que contiene el sustrato por 10 min y 5 min con la solución B (1 mM “Fast Red TR”, 0.1% (v/v) Triton X-100 en 100 mM de amortiguador de fosfatos, pH 7.5). La actividad de esterasa se detectó por la aparición de bandas de color marrón. Una vez observadas, el gel se transfirió a agua destilada.

6.10 Bioinformática

La secuencia del gen *stcI* se obtuvo del GenBank™ y se realizó una búsqueda de secuencias homólogas al gen *stcI* (BLAST) en la base de datos del genoma de *A. nidulans* en el “Whitehead Institute” (Galagan *et al.*, 2005). También se identificaron secuencias de expresión (EST’s) para el gen *stcI* realizando una búsqueda de secuencias dentro de la base de datos de secuencias de ADNc de *A. nidulans* (Roe *et al.*, 2001). Adicionalmente se identificaron secuencias homólogas a *stcI* en las bases de datos: GenBank™, LED (“The Lipase Engineering database”) y ESTHER (Fischer y Pleiss, 2003; Hotelier *et al.*, 2004). Las secuencias se analizaron con los siguientes programas: DNA strider (Douglas, 1994), ClustalW (Larkin *et al.*, 2007), BioEdit Version 7.0.7 (Hall, 2007), Genefinder (De Caprio *et al.*, 2007), Genescan (Burge y Karlin, 1998) y ExPASy Translate Tool (Gasteiger *et al.*, 2003). La predicción de secuencia señal se realizó con el programa Signal P v 3 (Bendtsen *et al.*, 2004).

Los modelos estructurales se obtuvieron con los programas: ESyPred3D (Lambert *et al.*, 2002) y se verificaron con el programa “WHAT IF” (Vriend, 1990). La selección de estructuras molde se llevó a cabo utilizando el método de reconocimiento de plegamiento e identificación de homólogos distantes (mGen THREADER) (McGuffin y Jones, 2003). Este método utiliza un alineamiento de perfil-perfil y estructura secundaria predicha con el programa PSIPRED (Jones, 1999). Esto aumenta la sensibilidad y la precisión de los alineamientos presentados. De acuerdo a este programa, los homólogos más cercanos a la proteína NstcI son: una esterasa de heroína de *Rhodococcus* sp (19 % de identidad en la secuencia de aa) (Zhu *et al.*, 2003) y una esterasa termofílica de *Alicyclobacillus acidocaldarius* (30% de identidad en la secuencia de aa) (De Simone *et al.*, 2000, 2004).

Ambas estructuras cristalográficas se utilizaron como molde para el modelado por homología de las proteínas Nstcl y Stcl. Los códigos de acceso a la base de datos PDB (“Protein Data Bank”) para las proteínas molde son: 1LZL (esterasa de heroína) y 1QZ3 (esterasa termofílica).

Para el análisis filogenético, las secuencias de aminoácidos se alinearon con el programa ClustalW y en base al alineamiento se construyó el árbol filogenético por el método “neighbor-joining” (Saitou y Nei, 1987). Se verificó por “1,000 bootstrap replicates”. El análisis filogenético se realizó con el programa MEGA version 3 (Kumar *et al.*, 2004). Los números de acceso en el GenBankTM de las secuencias de esterases usadas son:

<i>Aspergillus nomius</i> (AAS90054)	<i>Aspergillus flavus</i> (AAS90006)
<i>Aspergillus oryzae</i> (BAE71321)	<i>Aspergillus parasiticus</i> (AAN76353)
<i>Aspergillus niger</i> (XP_001394825)	<i>Aspergillus fumigatus</i> (XP_749730)
<i>Aspergillus flavus</i> (AAO17921)	<i>Aspergillus nidulans</i> (AN5565 2)
<i>Aspergillus clavatus</i> (XP_001273731)	<i>Penicillium cyclopium</i> (AAF82375)
<i>Oleomonas sagarenensis</i> (BAA82510)	<i>Alysiclobacillus acidocaldarius</i> (1EVQ_A)
<i>Sulfolobus solfataricus</i> (NP_343858)	<i>Sulfolobus solfataricus</i> (NP_343862)
<i>Burkholderia</i> sp. (YP_366466)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (YP_001348220)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (YP_348594)	<i>Frankia</i> sp. (YP_001507469)
<i>Corynebacterium jeikeium</i> (YP_250326)	<i>Sphingopyxis alaskensis</i> (YP_616595)
<i>Gibberella zeae</i> (XP_389288)	<i>Moraxella</i> sp. (P24484)

6.11 Aislamiento de ARNm y RT-PCR

Se colectó por filtración el micelio de *A. nidulans* crecido en condiciones de no inducción (medio mínimo y optimizado) por 24 h y de inducción (medio YES, jarabe de maíz y avena). También se utilizó como control negativo la avena sin *A. nidulans* incubada en las mismas condiciones. El micelio se lavó con el amortiguador A (10 mM EDTA, 0.1 M NaCl, 40 mM Tris-HCl pH 8.0) y se pulverizó en un mortero hasta obtener un polvo fino en presencia de nitrógeno líquido. Se aisló el total con el kit “RNeasy Plant Mini Kit” (Qiagen, Valencia, CA) y se purificó el ARNm con el kit “PolyATrack ARNm isolation system” (Promega, Madison, WI) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se sintetizó ADNc con el kit “cDNA cycle” (Invitrogen) y se usó como templado para las reacciones de PCR. Adicionalmente se utilizó una genoteca de ADNc de *A. nidulans* en λ -ZAPII

construida por R. Aramayo y comprada en el "Fungal Genetics Stock Center", Kansas City, Kans. Se aisló el ADN del fago de acuerdo a los protocolos descritos en el manual para la construcción de genotecas de ADNc en λ ZAP. Para los ensayos de RT-PCR se utilizó la enzima Hotstar Taq ADN polimerasa (Qiagen) y los siguientes oligonucleótidos: Forward-1, *stcI*-F: 5' CCT CTG CAG CAG ATT CCA AGC TAT CAG AGC CAT G 3'; Forward-2, *stcI*-F, 5'-CCT CTG CAG CAC AGG GAT GGA AGA CGA TAG-3' y Reverse *stcI*-R, 5'- TGA GCG GCC GCT TAC TCA CAA ACC CAG C 3'. La amplificación por PCR se realizó de la siguiente manera: 1 ciclo (95°C por 8 min), 30 ciclos (95°C por 1 min, 50-60°C por 40 seg y 72°C por 1.5 min) y un paso final de extensión (10 min a 72°C)

6.12 Expresión de *stcI* en *E. coli*

6.12.1 Construcción del plásmido pET*stcI*

El gen *stcI* se amplificó como se describió en la sección anterior a partir de la genoteca de ADNc construida por R. Aramayo. Los oligonucleótidos usados son: Forward *stcI*-F1, 5'-CCT GAT ATC CAG GGA TGG AAG AGC ATA G -3' y reverse *stcI*-R1, 5'- TGA CTC GAG TTA CTC ACA AAC CCA GC -3', introduciendo los sitios de corte para las enzimas de restricción *Eco* RV en el extremo 5' y *Xho* I en el extremo 3'. Los fragmentos de PCR se digirieron con *Eco* RV y *Xho* I y se insertaron en los sitios respectivos del vector pET 20b (+) generando el vector pET*stcI*.

Se utilizaron las técnicas de ADN recombinante descritas por Sambrook *et al.* (1989)

6.12.2 Expresión en *E. coli*

Se transformaron células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) con el vector pET*stcI* por electroporación en el electroporador "Gene Pulser II" (Bio-Rad) de acuerdo al protocolo descrito por el proveedor en el boletín 3112-7 con un pulso con voltaje de 2.5 kV, capacitancia de 25 μ F y resistencia de 200 Ω . Las clonas recombinantes se crecieron a 37°C en 500 ml medio LB hasta alcanzar la fase exponencial ($OD_{600}=0.4-0.8$). La expresión de la proteína se indujo con la adición de IPTG (con una concentración final de 0.05 mM). Después de 3 h de inducción a 4, 25 ó 37°C, se colectaron las células por centrifugación (8,000 \times g, 15 min) y se lavaron con amortiguador de fosfato de potasio 50 mM, pH 7.5 a

4°C. Posteriormente se resuspendió el botón celular en solución de lisis (amortiguador de fosfato de potasio 50 mM pH 7.5, 1mM EDTA, 0.3 M NaCl, 10% (v/v) glicerol, 0.5 mg/ml lisozima, 0.03 mg/ml ADNasa y 0.5 mM DTT) y se incubó 20 min a 30°C. Los extractos celulares de *E. coli* se sonicaron a 4°C [3 veces por 2 min, potencia 4 y 5, 50% "output", Branson Sonifier 250 (Branson, Dietzenbach, Germany)].

6.12.3 Aislamiento de las fracciones periplásmica, citoplasmática soluble e insoluble.

Se realizaron de acuerdo a las técnicas descritas en el manual del "pET system" (Novagen). Para extracción de la fracción del periplasma se evaluó además la metodología de Sroga y Dordick, (2002). Se realizó la inducción a 25 y 37°C, las células se centrifugaron (8,000 x g, 15 min) y se resuspendieron en la solución osmótica I (20mM Tris pH8, 2.5mM EDTA, 2mM CaCl₂, 20% sacarosa ajustando una DO_{600nm} de 5. Se incubaron 10 min en hielo y se centrifugaron a 4°C en las mismas condiciones. Posteriormente se resuspendieron en el mismo volumen de la solución osmótica II (20 mM Tris pH 8, 2.5 mM EDTA, 2 mM CaCl₂). Se incubaron 20 min en hielo y se centrifugaron en las mismas condiciones.

6.12.4 Aislamiento de cuerpos de inclusión y replegamiento de la enzima

Se realizó de acuerdo a las técnicas descritas por Vuillard *et al.* (1998) Brevemente, para la solubilización de los cuerpos de inclusión se resuspendió el botón celular de 500 ml de cultivo en medio LB, en el amortiguador A (50 mM ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperacinaetanesulfónico (HEPES)-NaOH pH 7.5, 0.5 M NaCl, 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), 5 mM DTT y 0.35 mg/ml lisozima) y se incubó durante 30 min a 20°C. Posteriormente se adicionó Triton X-100 con una concentración final de 1% (v/v) y se sonicó en frío por 30 seg. El extracto se trató con ADNasa I (20 mg/L) por 1 h a 37°C. Los cuerpos de inclusión se sedimentaron por centrifugación a 30,000 g durante 30 min a 4°C. El botón se lavó 2 veces con PBS con 1% triton X-100 (v/v) y se centrifugó a 30,000 g durante 30 min a 4°C después de cada lavado. El botón que contiene los cuerpos de inclusión se solubilizó con 2 ml de amortiguador B (50 mM HEPES-NaOH pH7.5, 6 M guanidina HCl, 25 mM DTT) y se incubó 1 h a 4°C. Finalmente, el material insoluble se removió por centrifugación a 100,000 g durante 10 min. Se determinó la concentración de proteína y se ajustó a 1 mg/ml con amortiguador B para el replegamiento.

Para el repliegamiento, la solución de proteína anterior se diluyó 1:10 rápidamente en amortiguador C pre-enfriado (50 mM HEPES pH 7.5, 0.2 M NaCl, 1 mM DTT, 1 M "non detergent sulfobetaine" (NDSB256 o NDSB201). La concentración final no excedió de 0.05 a 0.1 mg/ml. Se dejó con agitación (100 rpm) durante 1 h a 4°C. Finalmente, se eliminó la guanidina y NDSB por diálisis con amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.5 también se utilizó la técnica descrita por Rudolph y Lilie, (1996).

6.13 Clonación y Expresión de *stcI* y *nstcI* en *Pichia pastoris*.

6.13.1 Construcción de los vectores pPIC*stcI* y pPIC*nstcI*

Para la clonación de *nstcI* en el vector pPICZ α B, se introdujeron al amplicon por RT-PCR los sitios de corte para las enzimas de restricción *Pst* I y *Not* I. El vector se encuentra bajo el control transcripcional del promotor de la alcohol oxidasa (AOX1) y contiene una secuencia codificadora para una señal de secreción del factor α de *S. cerevisiae* que facilita la recuperación de la enzima heteróloga. Aunque el sistema permite la adición de una cola de histidinas en la región C-terminal, se decidió no incorporarla a la proteína para evitar más modificaciones de la misma.

Considerando la presencia de un intrón dentro de la secuencia genómica del gen *nstcI*, existían dos posibilidades para el aislamiento del mismo: utilizar la genoteca de ADNc construida por el Dr. Aramayo ó partir de ADNc obtenido del aislamiento de ARNm. Se utilizó en un primer intento la genoteca de ADNc, partiendo del hecho de que se reportaban dos secuencias EST para la *StcI* en esta genoteca. El gen *nstcI* completo se amplificó del ADNc con los cebadores *nstcI*-F y *stcI*-R a los cuales se les añadieron los sitios de restricción para *Pst* I y *Not* I respectivamente, con el objeto de facilitar su posterior clonación en el vector pPICZ α . Para la extracción y purificación del ARN se utilizó el *kit* RNAeasy (Qiagen) con algunas modificaciones en el tratamiento previo a la extracción de la muestra. Se verificó la concentración del ARN con el equipo Nanodrop, obteniéndose una concentración de 509.7 ng/ μ l. Se realizó la síntesis de ADNc con el *kit* cDNA síntesis (Invitrogen) según las recomendaciones del proveedor con dos ciclos de síntesis. La

concentración de ADNc obtenida fue de 3280.8 ng/μl. El ADNc se utilizó como templado para los siguientes ensayos de PCR con los cebadores previamente descritos. Los fragmentos de PCR se digirieron con las enzimas *Pst* I y *Not* I y se insertaron en los sitios respectivos del vector pPICZαB generando el vector pPIC α stcI.

La versión truncada del gen *stcI* (sin los 29 aa en la región N-terminal) se clonó utilizando los mismos sitios de restricción. Se realizó un PCR con los oligonucleótidos *stcI*-F y *stcI*-R. Se utilizó la polimerasa Pfu (Fermentas).

El producto nstcIF-stcIR ó stcIF-stcIR para la clonación en el vector de expresión pPICZαB se purificó empleando un gel preparativo de agarosa al 1% y posteriormente se purificó empleando el kit *QIAquick* (Quiagene) para purificación de ADN a partir de bandas en agarosa. Posteriormente el producto se digirió con las enzimas *Pst* I y *Not* I en amortiguador naranja de acuerdo al código del proveedor (Fermentas) en el que ambas enzimas tienen el 100% de actividad. Lo mismo se hizo con el vector. Ambos productos de digestión se purificaron nuevamente a partir de un gel de agarosa usando el kit *QIAquick*.

Se realizó la ligación del fragmento correspondiente al gen *nstcI* con el vector pPICZα ambos previamente digeridos. Se utilizó ADN ligasa de T4 (Fermentas) con su amortiguador que contiene 1 mM de ATP. La ligación se realizó durante toda la noche a 16 °C y el producto de ligación (2 μl) se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* DH5α, que seplaquearon en medio LB con zeocina (25 μg/ml). Se purificó el plásmido pPIC α stcI de una de las clonas recombinantes de *E. coli*, se linearizó con la enzima *Pme* I y se utilizó para transformar células de *P. pastoris* X-33 por electroporación.

6.13.2 Clonación en *E. coli*

Se transformaron células competentes de DH5α por electroporación con los vectores pPIC α stcI y pPIC α nstcI en el equipo de electroporación "Gene Pulser II" (Bio-Rad) con un pulso con voltaje de 2.5 kV, capacitancia de 25 μF y resistencia de 200 Ω de acuerdo al protocolo descrito por el proveedor en el boletín 3112-7. Las clonas recombinantes se crecieron a 37°C en 50 ml de medio LB para la extracción de plásmidos con el kit "Plasmid

midi” (Qiagen).

6.13.3 Expresión de los genes *stc1* y *nstc1* en *P. pastoris*

El protocolo detallado y medios de cultivo se describen en el manual “Easysselect *Pichia* expression kit”, versión G de *P. pastoris* (Invitrogen). Brevemente, las células competentes de *P. pastoris* X-33 se transformaron por electroporación en el equipo de electroporación “Gene Pulser II” (Bio-Rad) con un pulso con voltaje de 1.5 kV, capacitancia de 25 μ F y resistencia de 400 Ω de acuerdo al protocolo descrito por el proveedor en el boletín 3112-205 con los vectores pPIC*stc1* y pPIC*nstc1*. Todas las incubaciones se realizaron a 30°C. Las clonas recombinantes se seleccionaron en medio YPDS, descrito en la sección 6.2 y se seleccionaron posteriormente las clonas productoras de halo (positivas) en medio YPDT, en el cual se sustituyó el sorbitol por 1% (v/v) de tributirina. Las transformantes positivas se crecieron en medio líquido BMGY hasta alcanzar una $OD_{600} = 2-6$, se centrifugaron (4,000 x g, 10 min) y el botón celular se transfirió al medio BMMY para inducir la expresión de la proteína. Se adicionó metanol (0.5% v/v) cada 24 h para la inducción. Los extractos inducidos se centrifugaron (4,000 x g, 10 min) y se colectó el sobrenadante.

6.14 Validación de la especificidad de anticuerpos con las enzimas recombinantes

La especificidad de anticuerpos se evaluó por inmunoanálisis. Se corroboró que el suero preinmune no presentara antigenicidad con diluciones 1:500, 1:1000 y 1:5000. El antisuero después de 49, 63 y 77 días de inmunización se probó con las siguientes diluciones 1:1000, 1:5000, 1:10,000, 1:30,000 y 1:40,000. Para la transferencia de proteínas a membrana de PVDF, los extractos crudos con diferentes concentraciones de proteína (65, 30, 20, 10 y 0.5 μ g) de *P. pastoris* silvestre y recombinante (con N*Stc1* y *Stc1*) se precipitaron con TCA de acuerdo a la técnica descrita en el manual del “pET system”. Se resuspendieron en amortiguador de carga para condiciones desnaturizantes con SDS y 100 mmol/l de DTT y se calentaron de 80°C a 100°C durante 5 min ó en el amortiguador de carga para condiciones nativas. Las proteínas se separaron en geles SDS-PAGE al 12% o gel nativo al 12%. Se procedió con la técnica de inmunoanálisis como se describió previamente en la sección 6.5.

6.15 Purificación de anticuerpos Anti-StcI y preparación de la columna de afinidad Anti-StcI

Los anticuerpos se purificaron con el kit "Montage Antibody Purification Prosep-A" (Millipore Corp., Bedford, MA 01730) de acuerdo a la metodología descrita en el manual del proveedor. Posteriormente 20 mg del anticuerpo se inmovilizaron en Affi-Gel-Hz (Bio-Rad) de acuerdo a la técnica descrita en el manual del proveedor.

6.16 Purificación de las enzimas recombinantes y de la enzima silvestre

La purificación de la esterasa StcI se llevó a cabo con la columna de inmunoafinidad previamente descrita. El extracto celular de *A. nidulans* se trató de la forma descrita en la sección 6.4 hasta la ultrafiltración. Los extractos crudos obtenidos de clonas recombinantes de *P. pastoris* después de la inducción, se centrifugaron para eliminar células (4000 rpm, 15 min). 500 ml de sobrenadante se concentraron a 12 ml por ultrafiltración en Anicon (membrana con límite de exclusión de 30 kDa). El concentrado de la enzima recombinante o silvestre se pasó por la columna PD10 para desalar (GE healthcare) equilibrada con amortiguador PBS, pH 7.4. Se colectaron y juntaron las fracciones que presentaron actividad de esterasa. Se inyectó 1 ml de la muestra anterior a la columna de afinidad equilibrada con amortiguador PBS. Las proteínas que no se unieron a la columna se eluyeron con 3 volúmenes de columna de 0.5 % Triton-X 100 en PBS. Para romper la unión antígeno-anticuerpo se utilizó la elución ácida, se pasaron dos volúmenes de columna de 0.15 M de amortiguador de citratos de sodio, pH 3. La elución de la proteína se monitoré por absorbancia a 280 nm. El antígeno eluido se neutralizó a pH 7. Las fracciones con proteína se juntaron y pasaron por una columna PD10 equilibrada con amortiguador PBS. Finalmente se evaluó la actividad de esterasa. La columna de afinidad se regeneró con 5 volúmenes de columna con PBS y 2 volúmenes de PBS con 0.02% de azida de sodio y se almacenó a 4°C para nuevo uso.

6.17 Isoelectroenfoco

Se desarrolló con el equipo "Phast System" (Pharmacia) de acuerdo a las instrucciones proporcionadas por el proveedor. Se utilizaron geles para IEF con un rango de 3-9 (GE Healthcare) y estándares de rango amplio (GE Healthcare). Las proteínas se detectaron por

tinción con Coomassie y de actividad con α -NA de la misma forma ya descrita para geles nativos.

6.18 Caracterización bioquímica de las enzimas recombinantes

6.18.1 Determinación de la estabilidad a la temperatura y pH y de la temperatura y pH óptimo del ensayo

Se determinó con el método espectrofotométrico previamente descrito y con el ensayo "pH-stat" descrito por Peled y Krenz (1981) utilizando 200 mM de butirato de etilo como sustrato, que asegura un exceso de sustrato, en un equipo pH-stat (Titrimo®, Metrohm, Switzerland). El efecto de la temperatura se evaluó a 20, 30, 40, 50 y 60 °C a pH 7.5 (0.1 M, amortiguador de fosfatos) durante 15 min con los controles aplicables para evaluar autohidrólisis del sustrato. La termoestabilidad de la esterasa se investigó midiendo la actividad residual después de una incubación de la enzima sin sustrato en 0.1 M amortiguador de fosfatos, pH 7.5, a diferentes temperaturas durante 30 min y evaluando la actividad remanente a 37°C por ambos métodos. Todas las mediciones se realizaron por triplicado y se corrigieron con los valores de los controles.

El pH óptimo del ensayo se determinó midiendo la actividad durante 30 min a 37°C en un rango de pH de 5 a 10 por ambos métodos. Los amortiguadores de acetato de sodio, fosfato de sodio y Tris-HCl se utilizaron para los pH de 5, 6-7 y 8-10, respectivamente (50 mM). El efecto del pH sobre la estabilidad de la enzima se evaluó utilizando los amortiguadores anteriores incubando la enzima sin sustrato por 12 h a 37 °C al pH establecido. Después de la incubación se midió la actividad residual, por triplicado y se corrigió considerando los valores de los controles.

6.18.2 Determinación de la especificidad de sustrato

Las actividades se determinaron con ésteres de *p*-nitrofenilo por el método espectrofotométrico y ésteres de etilo por pH-stat. (i) *Espectrofotométrico*. En el caso de los ésteres de *p*-nitrofenilo, se utilizaron grupos acilo con largo de cadena de C4 a C18 (Sugihara y Tani, 1991) (ii) *pH-stat* Se utilizaron ésteres de etilo con grupos acilo con

largo de cadena de C4 a C16 y grupos aromáticos. En ambos casos las actividades se determinaron a las condiciones óptimas del ensayo medidas como se describió anteriormente (Peled y Krenz, 1981) Las mediciones se realizaron por triplicado y se corrigieron con los valores de autohidrólisis de los controles.

6.19 Reacciones de biocatálisis con compuestos fenólicos

6.19.1. Acetilación de compuestos

La acetilación de los compuestos se realizó bajo condiciones estándares con anhídrido acético y piridina. Específicamente, se calentaron a 60°C, 45 min; 100 mg del compuesto, anhídrido acético (3 ml) y piridina (3 ml). La mezcla de reacción se evaporó a sequedad con gas N₂. Posteriormente se disolvió en ácido hidrociorídrico diluido y preenfriado en hielo (5 ml) y se extrajo con acetato de etilo (2 x 5 ml). La fase orgánica se recuperó y se evaporó a sequedad a presión reducida. Posteriormente, se utilizó para las reacciones de desacetilación y caracterización de compuestos

Los espectros de RMN (resonancia magnética nuclear) se midieron en CDCl₃ (cloroformo deuterado) a 300 K en un espectrofotómetro Varian VXR-300S operando a 300 MHz (¹H) y 100 MHz (¹³C) Aproximadamente 25 mg de 1a-1j (Figura 49) se disolvieron en CDCl₃, con tetrametilsilano (TMS) como estándar interno Las estructuras se identificaron por comparación directa de las propiedades espectrales Los resultados con espectrometría de masas (EM) y ¹H RMN concuerdan con los observados en la literatura para los compuestos auténticos. Los datos de ¹³C RMN obtenidos para los compuestos acetilados (1a-1j) (Figura 48) fueron también compatibles con los datos reportados en la literatura. Se incluyen a continuación los datos de ¹³C RMN para todos los compuestos acetilados (1a-1j) pero todos ellos se caracterizaron también en las bases de ¹H RMN, EM y punto de fusión.

¹³C NMR para ácido 4-O-acetil-ferúlico (1a): δ=169.12, 167.75, 148.15, 146.43, 145.42, 126.31, 123.22, 115.14, 109.45, 56.07, 20.65.

¹³C NMR para 2-O-acetil-α-naftol (1b): δ =169.51, 146.72, 134.72, 128.12, 126.51, 126.51, 126.09, 121.21, 118.16.

¹³C NMR para 1,4-O-Diacetil-2-*ter*-butil-hidroquinona (1c): δ =169.42, 169.35, 147.81, 142.46, 124.69, 120.35, 119.74, 34.58, 29.97, 21.59, 21.11

¹³C NMR para ácido 4-O-acetil-coumárico (1d). δ =171.30, 169.10, 152.88, 131.75, 129.51, 122.23, 117.27, 21.13.

¹³C NMR para 1,4-O-Diacetil-hidroquinona (1e). δ =169.47, 147.72, 120.75, 21.16.

¹³C NMR para 1-O-Acetil-2-feniletanol (1f). δ =170.96, 137.83, 128.89, 128.50, 126.56, 64.92, 35.10, 20.94.

¹³C NMR para ácido 5, 1'-O-Diacetil-kojico (1g). δ =172.06, 169.53, 167.49, 162.18, 147.69, 141.01, 114.19, 60.72, 20.31, 20.14.

¹³C NMR para 3-O-Acetil- β -amirina (1h). δ = 170.98, 145.19, 121.63, 80.93, 55.25, 47.55, 47.23, 46.78, 41.71, 39.81, 38.26, 37.71, 37.14, 36.84, 34.73, 33.33, 32.59, 32.49, 31.08, 28.39, 28.03, 26.93, 26.14, 23.57, 23.53, 21.30, 18.26, 16.80, 16.69, 15.55.

¹³C NMR para 3-O-Acetil-dihidrocolesterol (1i). δ =170.69, 73.78, 56.42, 56.27, 54.24, 44.66, 42.58, 39.99, 39.52, 36.76, 36.17, 35.48, 35.46, 34.04, 31.96, 28.24, 28.01, 27.48, 24.21, 23.84, 22.81, 22.56, 21.47, 21.20, 18.67.

¹³C NMR para pentaacetato de Quercetina (1j). δ =170.54, 169.76, 168.35, 168.31, 168.29, 168.23, 157.32, 154.75, 154.28, 150.86, 144.86, 142.68, 134.52, 128.19, 126.89, 124.40, 124.31, 115.23, 109.46, 21.64, 21.50, 21.13, 20.98.

¹³C NMR para tetracetato de Hesperetina (1k). δ =189.05, 169.24, 168.84, 167.94, 163.14, 155.89, 151.58, 151.18, 139.89, 130.54, 124.84, 121.02, 112.47, 111.72, 110.51, 109.08, 78.77, 56.01, 44.87, 21.13, 21.02, 20.68.

¹³C NMR para (+) pentaacetato de catequina (1l). δ =170.23, 169.05, 168.46, 168.16, 154.50, 149.99, 149.55, 142.24, 142.22, 136.26, 124.52, 123.83, 121.90, 110.31, 108.90, 107.80, 77.78, 68.40, 24.96, 21.22, 21.08, 20.91, 20.77, 20.75.

¹³C NMR para (-) pentaacetato de Epicatequina (1m). δ =170.42, 168.98, 168.42, 168.09, 168.04, 154.96, 149.73, 149.67, 142.00, 141.88, 135.84, 124.36, 123.29, 122.03, 109.68, 108.74, 108.03, 77.36, 66.64, 26.03, 21.09, 21.05, 20.76, 20.64.

6.19.2 Acondicionamiento de la enzima

Los extractos crudos de la cepa silvestre de *P. pastoris* y las clonas recombinantes se centrifugaron a 4000 rpm durante 15 min, se recuperaron los sobrenadantes y se liofilizaron. Se preparó una solución de la enzima a una concentración de 2 mg/ml de proteína en amortiguador de fosfatos pH 7, 50 mM. Se verificó la actividad de esterasa por

el método espectrofotométrico con acetato de *p*-nitrofenilo.

6.19.3 Desacetilación enzimática

Los compuestos acetilados se dividieron en 3 grupos de acuerdo a su estructura: fenoles (I), alcoholes alifáticos (II) y flavonoides (III) (Tabla 4). La mezcla de reacción contenía: 15 mg del compuesto disuelto en 1.1 ml de solvente (acetona o tolueno), 400 µl de solución enzimática y el volumen se completó a 3.5 ml con 0.05 M de amortiguador de fosfatos, pH 7. La mezcla se incubó por 48 h a 37°C y 200 rpm. El grado de conversión se monitorizó por cromatografía en capa fina (TLC) y HPLC. Se evaluó también una reacción sin enzima para determinar la autohidrólisis de los sustratos en las condiciones evaluadas. Después de la incubación, se adicionaron 2 ml de acetato de etilo y se extrajo el producto. La fase orgánica se separó y se evaporó el solvente a sequedad a 37°C.

6.19.4 Identificación de productos

Todos los productos se caracterizaron de la siguiente manera: a) Los puntos de fusión se determinaron en un equipo MEL-TEM y no están corregidos. b) Se utilizó TLC para visualizar la formación de productos. Los solventes utilizados dependieron de la naturaleza química del sustrato. Las placas se revelaron para el caso de los alcoholes alifáticos con una cámara de iodo ó por aspersión de 10% de H₂SO₄. La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos y flavonoides se determinó por el método de captura de radicales libres, revelando las placas por aspersión del radical libre DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo) (Forgacs, 2002). La cromatografía de gases (CG) se realizó en el equipo “Agilent Technologies 6890N Network GC system”, Inyector 7683, Agilent technologies. Se usó una columna 30 m DB-5MS con diámetro interno de 0.25 mm. El intervalo de temperatura usado fue de 60-325°C. Se evaluaron también los estándares de los compuestos acetilados y sin acetilar. El HPLC se realizó en el equipo “Waters 1525 HPLC system”, la mezcla de reacción se separó en una columna 3.9x155 mm Waters Symmetry ® C185 µm. El sistema de elución consistió de metanol y ácido acético (1%). Los productos se purificaron por cromatografía en una columna de sílica con tamaño de malla de 100-200 µm, se analizaron por resonancia magnética nuclear ¹H (NMR) (AC-300 spectrometer) y se compararon contra estándares comerciales.

7. RESULTADOS Y DISCUSION

7.1 Producción de anticuerpos anti-StcI

Se consideró que la producción de anticuerpos específicos para la proteína StcI podía ayudar a esclarecer puntos importantes sobre la expresión de la misma en *A. nidulans*. Se decidió entonces trabajar en la producción de éstos. A partir de la secuencia de la enzima StcI se localizaron dos secuencias de péptidos con alto potencial antigénico, el péptido 1 (GSIDEEDGFVRTLC) y el péptido 2 (DNRDRGEYTSYEEN). En la figura 7 se observa la ubicación de estas secuencias en un modelo estructural simulado por homología de la proteína StcI como se describe mas adelante.

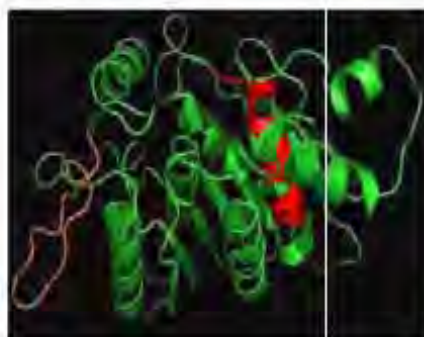


Figura 7- Ubicación de los péptidos que generan antigenicidad en el modelo estructural de la proteína StcI. La hélice roja corresponde a la secuencia del péptido 1 y la estructura marcada en naranja corresponde al péptido 2.

A diferencia del péptido 1, se observa que el péptido 2 (DNRDRGEYTSYEEN) se encuentra expuesto en la superficie de la proteína por lo que éste fue sintetizado y se utilizó para la generación de anticuerpos en conejos New-Zealand macho. Se corroboró que la secuencia del péptido no estuviera presente en otras esterasas similares o en otras proteínas de *Aspergillus nidulans*.

7.2 Expresión de la proteína StcI en *A. nidulans*

Se evaluó inicialmente la expresión de la enzima StcI en extractos de *A. nidulans*. Se colectaron entonces extractos celulares y extracelulares de *A. nidulans* crecido en todas las

condiciones de cultivo (inducidas y no inducidas). Se determinó la actividad de esterasa con α -naftil acetato, no encontrándose en los extractos extracelulares, lo cual coincide con lo reportado para la esterasa de *A. parasiticus*, en cuanto a que la enzima es intracelular (Kusumoto y Hsieh, 1996). En todos los casos se evaluó únicamente para los extractos celulares el perfil de proteínas en geles desnaturalizantes, así como la actividad de esterasa en zimogramas y se identificó la proteína StcI con anticuerpos por ensayos de inmunoanálisis.

En la figura 8 se presenta el perfil de proteínas para los extractos celulares de las diferentes condiciones. Se observan varias bandas de proteína para todas las condiciones en el intervalo de interés (30 a 40 kDa), es decir cercanas a las masas moleculares teóricas obtenidas para la proteína StcI. Se muestran también para fines de comparación las proteínas recombinantes.

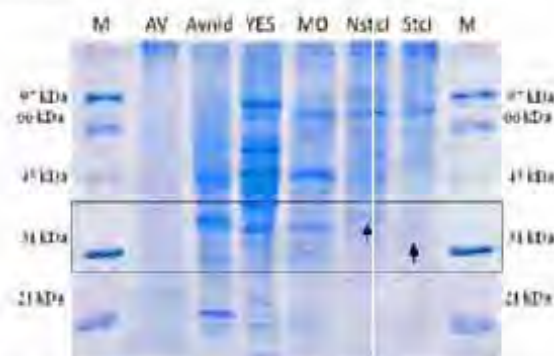


Figura 8- Perfil de proteínas de extractos celulares de *A. nidulans* crecida en diferentes medios y condiciones de cultivo (M, marcador de peso molecular de rango bajo; AV, avena control; Avid, avena con *A. nidulans*; YES, medio YES; MO, medio optimizado; NstcI, clona de *D. ginsengii* recombinante que expresa la proteína NstcI; StcI, clona de *D. ginsengii* recombinante que expresa la proteína StcI. Se enmarca el rango de proteínas en el que se espera encontrar la esterasa StcI en *A. nidulans*. Se señalan con una flecha las esterasas StcI y NstcI.

Los zimogramas de geles nativos mostraron también varias bandas de actividad de esterasa con α -naftil acetato para los extractos celulares de *A. nidulans* crecido en avena y en medio YES. En el caso del medio optimizado se detectó una sola banda de actividad (Figura 9). Es importante mencionar que algunas de las bandas de actividad se encuentran en el rango de

masa molecular esperado (30- 35kDa), como se puede observar al comparar con la banda de actividad para la proteína recombinante NstcI.



Figura 9- Actividad de esterasa en gel nativo: MO, medio optimizado; Avena, avena con *A. nidulans*; YES, medio YES; NstcI, clon de *P. pastoris* recombinante que expresa la proteína NstcI controlada con uno (Scrls).

Dado que se detectaron varias proteínas con actividad de esterasa cercanas a la masa molecular esperada en los extractos celulares de las condiciones evaluadas, la identificación inequívoca de la esterasa se realizó con los anticuerpos anti-stcI. De esta manera, se encontró una sola banda intensa de 35 kDa en el extracto celular de *A. nidulans* crecido en condiciones de inducción (medio avena) (Figura 10). La masa molecular aparente de esta proteína (35 kDa) difiere del valor teórico (31 kDa) esperado para la proteína StcI reportada por Brown *et al.* (1996) (Figura 17). Es interesante que el extracto celular de *A. nidulans* crecido en avena mostró varias bandas de actividad de esterasa, observándose una más intensa que corresponde con la movilidad relativa de la proteína StcI y la observada en inmunanálisis.

En los extractos celulares del medio YES, jarabe de maíz (condiciones inducidas) y optimizado (no inducida) se detectó también la banda tenue en 35 kDa. Para las otras condiciones (medio mínimo y avena control) no se detectó la proteína.

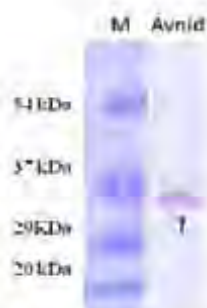


Figura 10- Detección inmunológica de la esterasa Stc1. M, marcador pretilado de punto bajo (Bio-Rad); Avrid, extracto celular de *A. nidulans* crecido en arena. Densidad de suero 1:50 000. Se señala con una flecha la esterasa Stc1.

Kusumoto y Hsieh (1996) reportaron la presencia de al menos 3 VHA esterases en extractos celulares de *A. parasiticus* expresadas en condiciones de inducción de aflatoxinas; sin embargo, no se identificó inequívocamente la presencia de la proteína EstA, aún cuando la masa molecular sea cercana al valor teórico. De acuerdo a los resultados obtenidos para *A. nidulans*, se observan muchas esterases intracelulares que se expresan de acuerdo al medio de cultivo y condiciones utilizadas (Figura 9). Sin embargo, con las técnicas inmunológicas sólo se detectó una banda, la cual no correspondía a la masa molecular teórica para la proteína Stc1 reportada. Por tanto, consideramos que esta técnica es muy útil e importante para la identificación de la enzima. Es importante mencionar que se ha encontrado que la esterasa porcina puede catalizar la hidrólisis de VHA a VAL, por lo que la actividad de VHA esterases tampoco es suficiente para la detección de estas enzimas (Anderson y Chung, 1990).

Estos resultados nos llevaron a realizar un análisis más profundo de la secuencia genómica, así como de las secuencias de expresión (EST's) en las bases de datos de *A. nidulans*. También consideramos importante la clonación y expresión de *stc1* y la validación de la especificidad del anticuerpo con la enzima recombinante.

7.3 Secuencias de carboxil-esterasas y lipasas en el genoma de *A. nidulans*.

Dados los antecedentes encontrados en el análisis preliminar de las secuencias de lipasas y esterases en el genoma de *A. nidulans* (Galagan *et al.*, 2005) (Tablas 1 y 2, sección 2.3), cabe señalar que aunque se tienen 45 secuencias relacionadas con la actividad buscada, a ninguna se le ha evaluado experimentalmente y no todas estas proteínas se expresan en

ciertas condiciones y algunas pueden corresponder a pseudogenes.

En la tabla tres mostrada en la sección 2.3, se encontró una masa molecular teórica para la proteína StcI de 34.69 kDa, la cual corresponde con la observada en los ensayos de inmunodetección y difiere del valor teórico (31.45 kDa) obtenido para la secuencia previamente reportada por Brown *et al.* (1996).

7.4 Estudio de la secuencia de la proteína StcI a partir de las secuencias de expresión (EST) y su relación con otras esterasas similares.

La base de datos "Aspergillus Comparative Database" del genoma de *A. nidulans* cuenta con mucho más datos sobre los supuestos genes en el genoma y se encuentra mejor organizado. Utilizando esta base de datos se hizo un análisis más profundo de la secuencia del gen que codifica la proteína StcI (AN7816.3). Aunque, tanto en esta base de datos como en el GenBank™ dicha secuencia se encuentra reportada como completa e igual a la secuencia reportada por Brown *et al.* (1996), llamaba la atención que la región N-terminal no coincidía con una de las secuencias de la genoteca de ADNc reportada por el Dr. Aramayo (ESTs). Dicha secuencia mostraba 29 aa adicionales en la región N-terminal de la enzima. Se realizó una búsqueda de secuencias con similitud a la secuencia de la proteína StcI en la base de datos de ADNc reportada por Roe *et al.* (2001) y se encontraron dos secuencias EST: Contig 1592, que corresponde a la región C-terminal previamente reportada y el Contig 452, que corresponde a la región N-terminal de la proteína StcI, la cual también mostró una región adicional de 29 aa.

Se revisaron las secuencias de proteínas que presentaban similitud con la proteína StcI con estos 29 aa, la cual denominamos NStcI (Figura 11). Se encontró una secuencia correspondiente a una esterasa de *Aspergillus parasiticus* que se encontraba también dentro de un agrupamiento de genes para la biosíntesis de aflatoxinas. La enzima mostró 49% de identidad con la StcI después de adicionarle los 29 aa faltantes de la secuencia de EST, lo cual indicaba que estos aminoácidos podían formar parte de la proteína StcI. La proteína NStcI mostró 55-50% de identidad en la secuencia de aminoácidos con respecto a esterasas del género *Aspergillus* involucradas en la biosíntesis de aflatoxinas (Figura 11). Las

esterasas/lipasas encontradas en agrupamientos de genes de biosíntesis de aflatoxinas en especies del género *Aspergillus* relacionadas mostraron que éstos homólogos comparten un 90% de identidad en la secuencia de aa (*A. parasiticus*, *A. flavus* y *A. nomius*). Resulta interesante que la esterasa NstcI, que sintetiza ST, comparta sólo un 49% de identidad, lo cual se encuentra dentro del rango de identidad entre las esterasas reportadas de las vías de biosíntesis de aflatoxinas y ST en *A. parasiticus*, *A. flavus*, *A. nomius* y *A. nidulans* (Yu *et al.* 2002). Hasta el momento la secuencia del gen de la esterasa *stcI* es la única reportada para la síntesis de ST en el género *Aspergillus*.

El artículo donde se reportó el estudio del gen de esterasa homólogo a *StcI* en *A. parasiticus*, menciona también que dicho agrupamiento de genes, y por tanto la misma proteína, presenta una copia en el genoma y que el gen se expresa constitutivamente (Yu *et al.*, 2002). En la base de datos del genoma de *A. nidulans*, encontramos sólo una copia del gen. Los mismos autores sugieren que la proteína homóloga en *A. nidulans* puede estar incompleta. Cabe mencionar que todas estas proteínas contienen 314 aa, mientras que la proteína *StcI* reportada contiene 286 aa, si se le suman los 29 aa adicionales, da un total de 315 para la proteína NStcI, como se puede observar en la Figura 11.

Por otra parte, un análisis adicional con la base de datos LED ("Lipase Engineering Database") (Fischer y Pleiss, 2003) nos permitió identificar los aminoácidos de la tríada catalítica, así como los de la cavidad oxianiónica y la secuencia pentapéptido consenso (Figura 11).

NSSt1	MSKALSPWQ QPERRKSPFR ALAMP YRRL NQKSTTVSR LKSTKDFLP ELVYDQKEL	60
A. flavus	..KTFYAA..R..VRL..QF..Q..F..KSLDRI..LA..KGLAIV..AF..G..F..R..YF..VQ	
A. parasiticum	..KTFYAL..R..VRL..QF..Q..F..KSLDRI..LA..KGLAIV..AF..G..F..R..YF..VQ	
A. oryzae	..KTFYAA..R..VRL..QF..Q..F..KSLDRI..LA..KGLAIV..AF..G..F..R..YF..VQ	
A. nidulans	..KTFYAA..Q..VRL..QF..Q..F..KSLDRI..LA..KGLAIV..AF..G..F..R..YF..VQ	
NSSt2	LQVWVWVYF EYRVA DQSL ALPPKALRMY NQKIDRQRP VVPLKRLRY KIPVYDRLA	100
A. flavus	..G..LRL..C.. ..KMATDQ..V..G...G... ..GWR... ..G..VIRKQDQ..LV..R..R..	
A. parasiticum	..G..LRL..C.. ..KMATDQ..V..G...G... ..GWR... ..G..VIRKQDQ..LV..R..R..	
A. oryzae	..G..LRL..C.. ..KMATDQ..V..G...G... ..GWR... ..G..VIRKQDQ..LV..R..R..	
A. nidulans	..G..LRL..C.. ..KMATDQ..V..G...G... ..GWR... ..G..VIRKQDQ..LV..R..R..	
NSSt3	PEPFRNALD ECLTYRQVPL ETVYVQKCP QGLAK QPPA PPTAGSLVYD GLQWVQVVV	160
A. flavus	..F..Y..G..R..GVR..LRL..SR..KIDPFL..R..T... ..L.. ..G...R..IQD..IPAD..R... ..	
A. parasiticum	..F..Y..G..R..GVR..LRL..SR..KIDPFL..R..T... ..L.. ..G...R..IQD..IPAD..R... ..	
A. oryzae	..F..Y..G..R..GVR..LRL..SR..KIDPFL..R..T... ..L.. ..G...R..IQD..IPAD..R... ..	
A. nidulans	..F..Y..G..R..GVR..LRL..SR..KIDPFL..R..T... ..L.. ..G...R..IQD..IPAD..R... ..	
NSSt4	ALAPYVND EYVADKQNS ETVYVQKCP LTIMQWAK EFDKQDAR DQWKLAR	240
A. flavusT... ..A..PKLSE... ..G...A... ..AD... ..V..EKA.. ..G..V... ..R... ..V... ..VVE... ..	
A. parasiticumT... ..A..PKLSE... ..G...A... ..AD... ..V..EKA.. ..G..V... ..R... ..V... ..VVE... ..	
A. oryzaeT... ..A..PKLSE... ..G...A... ..AD... ..V..EKA.. ..G..V... ..R... ..V... ..VVE... ..	
A. nidulansT... ..A..PKLSE... ..G...A... ..AD... ..V..EKA.. ..G..V... ..R... ..V... ..VVE... ..	
NSSt5	NLQKIDRQVY KAVQDARLR DQWKLQAL NALVYVND ETVYVQKCP EFPVQARL	300
A. flavus	..R..LA..P... ..T..KSL... ..A... ..KQ... ..DPAK... ..WY.. ..A... ..T... ..C..F..M... ..PKR..G... ..	
A. parasiticum	..R..LA..P... ..T..KSL... ..A... ..KQ... ..DPAK... ..WY.. ..A... ..T... ..C..F..M... ..PKR..G... ..	
A. oryzae	..R..LA..P... ..T..KSL... ..A... ..KQ... ..DPAK... ..WY.. ..A... ..T... ..C..F..M... ..PKR..G... ..	
A. nidulans	..R..LA..P... ..T..KSL... ..A... ..KQ... ..DPAK... ..WY.. ..A... ..T... ..C..F..M... ..PKR..G... ..	
NSSt6	QALFFQKLS DQWQVY	315
A. flavus	..RT..PQVAK..AVR..RQ..	
A. parasiticum	..RT..LQVAK..AVR..RQ..	
A. oryzae	..RT..PQVAK..AVR..RQ..	
A. nidulans	..KA..LQVAK..AVR..RQ..	

Figura 11- Análisis de la secuencia completa de la esterasa Stc1. Comparación de las secuencias de aa entre NSSt1 y esterasas de agrupamientos de aflatoxinas. Residuos de aa idénticos se representan con puntos y los "gaps" con guiones. Los aminoácidos de la triada catalítica (Ser-152, Asp-255 y His-285) y de la cavidad oximónica (Gly-86 y Ala-153) están en negritas y letras cursivas. La secuencia pentapéptido conservada está subrayada. Los 29 aa. adicionales de la Stc1 están en negritas.

Considerando dichos antecedentes, se procedió a estudiar más detalladamente la secuencia a partir del genoma. Cabe mencionar que no se había encontrado una posible región promotora cercana a la secuencia de la Stc1 que se ha estado manejando. Sin embargo, cuando se analizó una región más extensa río arriba a la que codifica el extremo N-terminal, se localizó una región promotora previa a la región que codifica para esos 29 aa. El análisis mostró que la secuencia completa analizada contenía dos exones y un intrón. El primer exón codifica para un polipéptido de 11 aa, posteriormente se presenta el intrón y el segundo exón codifica para un polipéptido de 18 aa adyacentes a la secuencia Stc1 reportada de 286 aa y se encuentra antes del sitio de inicio de la traducción reportado. La suma de los dos exones corresponde a la proteína NSSt1 de 315 aa (Figura 12). Es importante mencionar que existe una fuerte similitud entre los genes *nstc1* y *estA* de *A. parasiticum*, con respecto a la localización de intrones y de la región promotora (Yu *et al.*, 2002).

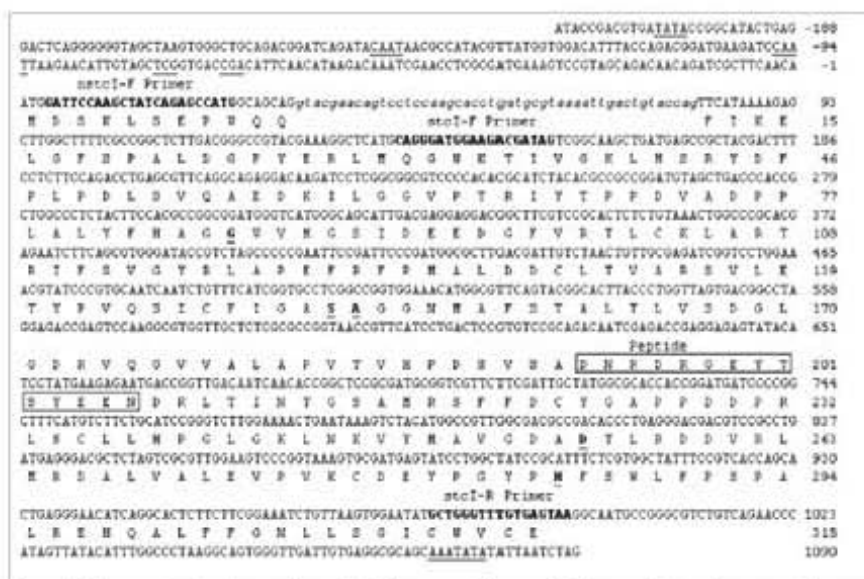


Figura 12- Secuencia genómica para el gen *nStcI* y la secuencia de aa codificada por el mismo. La secuencia de aa se presenta debajo de los codones correspondientes. Ambas secuencias se encuentran numeradas en el lado derecho. En la región promotora, el sitio consenso de unión para aR (TCG_nCGA) y las secuencias CAAT y TATA se encuentran subrayadas. La secuencia del intrón se encuentra en minúsculas cursivas. Los primers para la reacción de PCR están señalados y en negritas. Los aa de la triada catalítica (Ser-152, Asp-255 y His-285) y de la cavidad oximiónica (Gly-86 y Ala-155) se encuentran en negritas y subrayados. La secuencia del péptido para antigenicidad se encuentra enmarcada.

De acuerdo a la base de datos LED, la proteína NStcI pertenece a la familia de las lipasas parecidas a la lipasa 2 de *Moraxella* y comparte un porcentaje de identidad en la secuencia de aminoácidos del 34-27% con las lipasas y esterasas de esta familia (Fischer y Pleiss, 2003). Esta familia, a su vez, se encuentra incluida en la familia de las lipasas parecidas a las lipasas sensibles a hormonas (familia HSL) de acuerdo a la base de datos ESTHER (Hotelier, 2004).

Se realizó un análisis filogenético con el fin de establecer la historia evolutiva de la proteína NStcI con otras esterasas a partir de la secuencia de aminoácidos. El árbol filogenético obtenido se muestra en la figura 13 y se distinguen tres grupos mayores: A, que incluye las esterasas involucradas en la biosíntesis de aflatoxinas; B, que incluye esterasas

de la familia HSL; y el último grupo, C, que corresponde a otras carboxilesterasas lejanamente relacionadas. La proteína NStcI claramente se ubica en el grupo A.

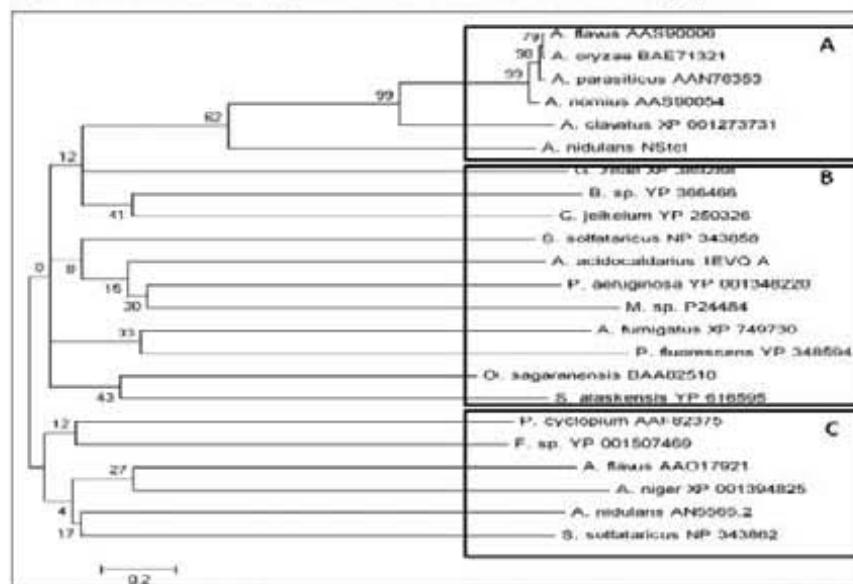


Figura 13. Análisis filogenético de esterasas. Se muestran los valores de bootstrap. Se distinguen tres grupos (A, B, y C) los cuales corresponden respectivamente a esterasas de biosíntesis de aflatoxinas, esterasas de la familia HSL, y otras carboxilesterasas. La historia evolutiva se infirió con el método "neighbor-joining" (Saitou y Nei, 1987). Se muestra el árbol óptimo con la suma del largo de ramas=23.75641994. El porcentaje de replicas de árboles en el cual los taxa asociados se agrupan juntos en el test bootstrap (1000 réplicas) se muestra en las ramas. El árbol está dibujado a escala con los largos de las ramas en las mismas unidades que las de las distancias evolutivas usadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas se estimaron usando el método de corrección de Poisson y están en unidades de número de sustituciones de aa por sitio. Todas las posiciones que contienen gaps y datos perdidos se eliminaron del grupo de datos (opción de delección completa). Hay un total de 243 posiciones en el grupo de datos final. El análisis filogenético se llevó a cabo en MEGA 3 (Kumar *et al.*, 2004).

La secuencia adicional de 29 aa se analizó con el programa SIGFIND 2.1 (Signal Peptide Eucaryotic Prediction Server), con el fin de esclarecer si ésta podría corresponder a una secuencia de péptido señal. El resultado mostró que no se predijo una secuencia de péptido señal y tampoco se predijo ninguna secuencia de tránsito a organelos como peroxisomas. Este hecho indicó que esta secuencia pertenecía a la proteína. En este sentido se consideró que un estudio adicional de la enzima completa (NstcI) podría proporcionar más

información, por lo que se decidió clonar la enzima completa (Nstcl) y la previamente estudiada (Stcl) en el sistema de expresión *E. coli*. Se evaluó primero la expresión del gen *stcl* en *E. coli*.

7.5 Clonación y expresión de *stcl* en *E. coli*

7.5.1 Clonación de *stcl* en *E. coli*

Se probó inicialmente *E. coli* como sistema de expresión, dado que existen reportes de varias lipasas y esterases fúngales que se han expresado exitosamente en este sistema (Benoit *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2009; Zelena *et al.*, 2009). Se utilizó el sistema "pET system", el cual posee un sistema de expresión basado en el promotor de la ARN polimerasa del bacteriófago T7 (Moffatt y Studier, 1986). Se diseñaron cebadores específicos para amplificar el gen de la lipasa/esterasa del cluster de la esterigmatocistina (*stcl*) reportado por Brown *et al.* (1996). El gen se clonó en el vector pET 20 para expresar la enzima con y sin cola de histidinas en la región C-terminal. Este vector incluye una secuencia líder de direccionamiento a periplasma y ha sido eficiente en la expresión de enzimas recombinantes en *E. coli*.

Los ensayos de PCR realizados produjeron un fragmento de ADN del peso molecular esperado (890bp) después de emplear un barrido de temperaturas de alineamiento entre 50.1 y 60.2 °C. Se encontró que la temperatura más adecuada para la amplificación del fragmento deseado fue de 50 °C (Figura 14).

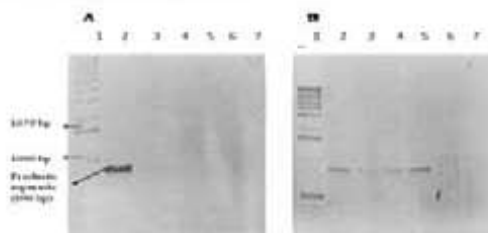


Figura 14 – Análisis de productos de PCR obtenidos después del barrido de temperaturas de 50-60°C. En la figura 1A se muestra de izquierda a derecha: carril 1; marcador (1 kb *ladder*), carriles 2-7; temperaturas 50.1, 56.1, 57.4, 58.6, 59.6 y 60.2°C. En la figura 1B se muestra de izq. a derecha: carril 1; marcador (1 kb *ladder*), carriles 2-7; temperaturas 50.1, 50.4, 51.1, 52.2, 53.4 y 54.7°C.

Este resultado nos llevó a utilizar la temperatura de 50°C para la obtención del amplicón y clonación en el vector de expresión pET 20. Este producto se secuenció y se comprobó que se trataba de *stcI* y se digirió con las enzimas *Eco* RV y *Xho* I al igual que el vector (Figura 15).

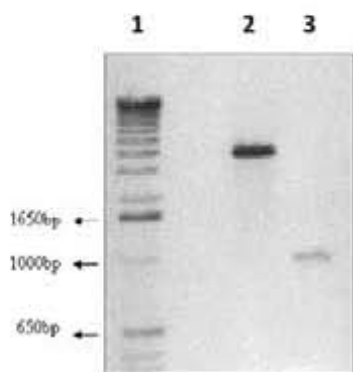


Figura 15 – Productos de digestión purificados. De izquierda a derecha se muestran: Carril 1, marcador (1kb DNA plus ladder), carril 2, vector pET 20 y carril 3, producto *stcI*.

Se realizó la ligación del ADN correspondiente a *stcI* al vector pET 20. El producto de ligación se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* DH5a. Se obtuvieron 108 colonias transformantes recombinantes. Se tomaron 10 colonias, se crecieron y se extrajo el plásmido. Se sometieron a amplificación por PCR usando los cebadores universales para el promotor y terminador de T7, que flanquean el sitio de clonación múltiple del pET 20 (Figura 16). Como resultado del ensayo de PCR se obtuvo un fragmento del peso molecular esperado (aprox. 1000 bp). Se comprobó mediante secuenciación que se trataba del gen *stcI* y que el inserto estuviese dentro del mismo marco de lectura que la secuencia de exportación a periplasma (Figura 17).

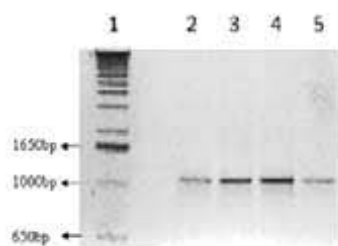


Figura 16 – Productos de PCR obtenidos con los cebadores universales de 4 clonas seleccionadas. Se muestra de izquierda a derecha: carril 1; marcador (1kb, DNA Plus ladder), carriles 2-5, fragmentos de las clonas 1-4.

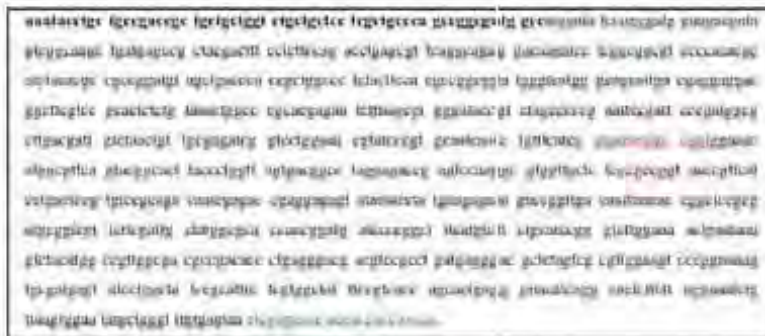


Figura 17 – Secuencia obtenida por uno de los clones, utilizando los estándares universales. La primera parte en negro corresponde al péptido señal de direccionamiento a periplasma, la región marcada en color rojo corresponde al pentapeptido consenso y la última región azul a la cola de histidinas dentro del vector.

Se probó la expresión de las dos construcciones (con y sin cola de histidinas) bajo el control del promotor T7 siguiendo la evolución de sus patrones de proteínas en geles de SDS-PAGE a distintos tiempos de inducción con IPTG en *E. coli* BL21 DE3. Después del crecimiento en medio LB con ampicilina a 37°C durante 3 h de inducción, se aisló la fracción periplásmica de ambos cultivos. Para ambas construcciones es notorio que sin inducción (0 h) no hay proteína sobre-expresada. Sin embargo, conforme avanza el tiempo, aparece una banda a las 2 y a las 3 h que corresponde al peso de la proteína *StcI* (aprox. 33 kDa). Estos geles se renaturalizaron en presencia de Triton X-100 durante 3 h y se probó su actividad al ponerlo en contacto con un sustrato cromogénico, α -naftil acetato. Se encontró que la banda sobre-expresada no posee actividad sobre este sustrato en gel en ningún caso (Figura 18). Sin embargo, se probó la actividad en el periplasma aislado, utilizando un ensayo en pozo, contra α -naftil acetato (Figura 19) y contra palmitato de *p*-nitrofenilo como sustratos (no mostrado). En el caso de la proteína *StcI* sin cola de histidinas se observa actividad de lipasa y esterasa después de 3 h de inducción.

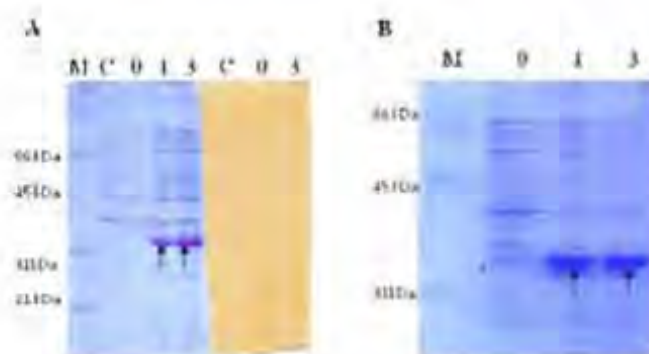


Figura 18 - Patrón de proteínas en SDS-PAGE de las fracciones periplásmicas de *E. coli* BL21 DE3 (pLT-*stc*) con y con cola de histidinas. **A- Panel izquierdo**, patrón de proteínas *E. coli* BL21 DE3 (pLT-*stc*) antes y después de inducir. M=marcador de peso molecular de rango bajo (Bio-Rad), C=control negativo (clona con el vector sin el inserto después de 3 h de inducción), 0, 1 y 3 h de inducción de la clona con el inserto *stc*. **Panel derecho**, gel de acrilamida embebido en α -nitril acetato. **B-** Patrones de proteínas de *E. coli* BL21 DE3 (pLT-*stc*) con cola de histidinas antes y después de inducir. M=marcador de peso molecular de rango bajo (Bio-Rad), 0, 1 y 3 h de inducción de la clona con el inserto *stc*. Se señala con una flecha la proteína *Stc1*.



Figura 19 - Actividad de esterasa de la fracción periplásmica con α -nitril acetato en petri. B= Blanco, reactivo sin esterasa, C=control negativo (clona con el vector sin el inserto después de 3 h de inducción), 0, 1 y 3 h de inducción de la clona con el inserto *stc*. Se marca con una flecha el petri el que se detectó actividad.

La cuantificación mostró una actividad muy baja con acetato de *p*-nitrofenilo (0.02 U/mg proteína), por lo que se decidió explorar otras alternativas para mejorar la producción de la enzima en *E. coli*. Sin embargo, resultaba interesante el hecho de que esta proteína truncada pudiera expresarse con actividad en *E. coli*.

7.5.2 Inducción de las clonas de *E. coli* con y sin cola de histidinas en diferentes condiciones

Se probó la inducción con diferentes concentraciones de inductor y condiciones de incubación, tanto para las clonas que presentaron actividad en *E. coli* con y sin hexapéptido de histidinas fusionada a la proteína, como para la clona control (células transformadas con el vector sin inserto). Lo anterior con el fin de evitar o disminuir la formación de cuerpos de inclusión e incrementar la expresión de la enzima en periplasma. En el caso de la lipasa de *Vibrio harveyi* y de la esterasa de *Acinetobacter* sp. se logró la expresión en *E. coli* con 0.5 mM y 1 mM de IPTG, respectivamente, a 28°C después de 12 h de incubación (Suzuki *et al.*, 2002; Teo *et al.*, 2003). La lipasa 4 (lip4) de *Candida rugosa* se expresó en *E. coli* con 0.05 mM a 8°C, después de 3 a 5 días de incubación (Tang *et al.*, 2000). Sin embargo, la expresión de la esterasa de *Pseudomonas* sp. fue la misma en un intervalo de temperatura de 15-37°C (Suzuki *et al.*, 2003).

En un primer intento se analizó el crecimiento de las clonas StcI-His, StcI y control (C) en placas con medio LB con ampicilina, adicionándose tributirina (0.5 %) e IPTG (0.1 mM y 0.4 mM). Las placas se incubaron a 4, 25, 30 y 37°C. A las 24 h de incubación a 4° y 25°C, se observó un crecimiento leve en todos los casos. A 30° y 37°C las cepas crecieron normalmente, pero no se observó la formación de halos. Estas últimas se almacenaron a 4°C y tampoco desarrollaron halos después de 5 días a esta temperatura. Después de 48 h se observaron halos pequeños de hidrólisis sólo en las placas de las clonas StcI y StcI-His que habían sido incubadas a 25 °C con 0.4 mM de IPTG (Figura 20).



Figura 20- Halos de hidrólisis de tributirina después de 48 h de incubación a 25°C. Los halos se señalan con una flecha.

Se estudió la inducción en medio líquido a diferentes condiciones de las tres clonas. Las clonas se crecieron a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica (DO_{600nm}) de 0.5 y

posteriormente se realizó la inducción con IPTG (0.4 mM) a 4°C, 25°C y 30°C. Después de 3 h de inducción, se realizó el ensayo con α -naftil acetato para el extracto crudo extracelular, y para el obtenido después de la lisis de las células, no encontrándose actividad alguna. Se alargó el tiempo de inducción hasta 18 h y se cuantificó nuevamente la actividad. Los resultados mostraron una actividad leve en el extracto crudo obtenido después de la lisis de las células para las clones Stel-His y Stel inducidas a 25°C y 30°C. Después de la inducción a 4°C no se encontró actividad y tampoco se detectó actividad extracelular para ninguno de los casos (Fig. 21)

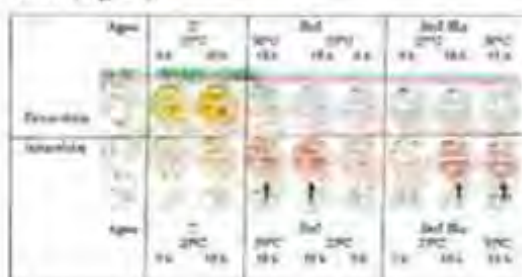


Figura 21 - Actividad sobre α -naftil acetato para las clones Stel-His y control después de 18 h de inducción con IPTG a 25 y 30°C. Se señalan con flechas los puntos en los que se detectó actividad.

Las fracciones periplásmicas de las clones después de las 18 h de inducción no mostraron actividad. Las clones que se indujeron a 4°C se dejaron 3 días más y no se detectó actividad en ninguna fracción.

Se analizó entonces el patrón de proteínas en cada uno de los casos. El patrón de las células completas de la clona Stel mostró, después de la inducción a 4°C durante 72 h, la aparición de una banda tenue correspondiente a un peso molecular de 33 kDa, la cual es cercana al valor esperado. Para la fracciones extracelular y periplásmica no se encontró la banda correspondiente (Fig. 22A). Ninguna de estas fracciones presentó actividad.

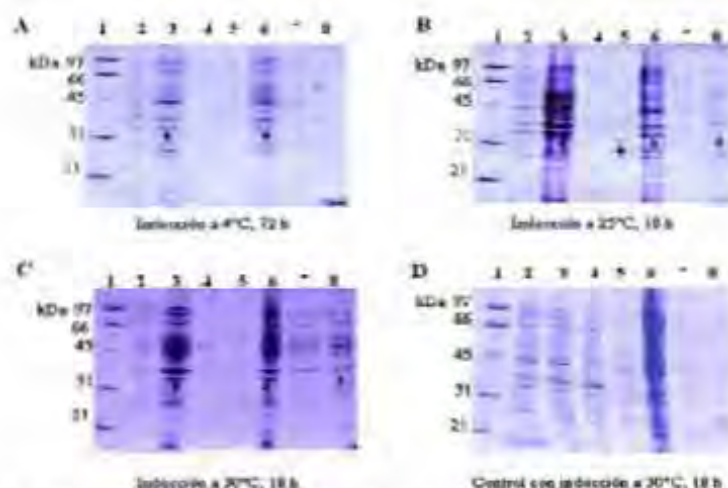


Figura 22 - Análisis por SDS-PAGE de la expresión de *stcI* sin heptapéptido de His en el C-terminal (StcI) después de inducir a diferentes temperaturas. A, B, y C) Patrón de proteínas de las diferentes fracciones después de inducir a las condiciones señaladas. D) Patrón de proteínas de las diferentes fracciones del control (transformado con el vector). En todos los casos las carrilas corresponden a: carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, células completas a 0 h de inducción; carril 3, células completas después de la inducción; carril 4, extracto crudo extracelular después de la inducción; carril 5, fracción periplásmica después de la inducción; carril 6, células completas después de la extracción de la fracción periplásmica después de la inducción; carril 7, fracción soluble del citoplasma después de la inducción y carril 8, fracción insoluble del citoplasma después de lisis sólo con lisozima después de la inducción. Para el panel A, la inducción fue de 72 h y para los paneles B-D, la inducción fue de 18 h. Se señala con una flecha la banda correspondiente a la proteína StcI.

Los patrones de proteínas de las células completas de la misma clona inducida a 25 y 30°C durante 18 h mostraron una banda de mayor intensidad a 33 kDa. En las fracciones periplásmica y soluble del citoplasma, después de inducir a 25°C, se encontró una banda tenue correspondiente al peso molecular esperado (31 kDa), la cual se observa más claramente en la fracción periplásmica (Fig. 22B). Después de la inducción a 30°C, se observó una banda con un peso molecular cercano a 31 kDa solo en la fracción soluble del citoplasma (Fig. 22C). Esto coincide con la leve actividad intracelular obtenida para esta clona en las mismas condiciones (Fig. 21). En la figura 22D se observa el patrón de proteínas para las células completas de la clona control, así como las fracciones extra e intracelular del extracto crudo de la misma. No existe una banda de expresión en este caso.

En la clona StcI-His el comportamiento de los patrones de proteínas fue similar al encontrado para la clona StcI (Fig. 22) en las diferentes condiciones, con la excepción de que la inducción a 25°C mostró una banda de 33 kDa aun más fuerte que en los casos

anteriores. De la misma manera, las fracción periplásmica mostró una banda correspondiente al mismo valor (Fig. 23). Esta clona dio mayor actividad después de la lisis de las células (0.07 U/mg proteína)

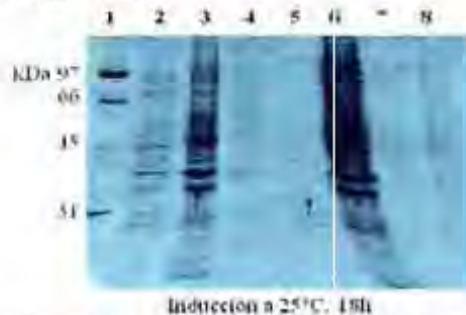


Figura 23. Análisis por SDS-PAGE de la expresión de *stcI-his* con el fusopéptido de His en el C-terminal después de inducir a 25°C a $t=18$ h. Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, células completas a 0 h de inducción; carril 3, células completas; carril 4, extracto crudo extracelular; carril 5, fracción periplásmica; carril 6, células completas después de la extracción de la fracción periplásmica; carril 7, fracción soluble del citoplasma y carril 8, fracción soluble del citoplasma después de lisis sólo con lisozima. Carriles 3 al 8 después de 18 h de inducción. Se señala con una línea la banda correspondiente a la proteína StcI.

Los resultados anteriores muestran que en ambas clonas la enzima se produce sin actividad y en bajas cantidades a 4°C después de 3 días de inducción y que ésta no se dirige a periplasma. En la inducción a 25°C se observa la aparición de una banda de aproximadamente 32 kDa (menor al valor obtenido para la proteína StcI sobreexpresada a 37°C en las células completas) en la fracción periplásmica, lo cual puede corresponder a la proteína StcI sin la secuencia de dirección a periplasma. Sin embargo, no se encontró actividad en placa para esta fracción, aunque sí en la fracción soluble del citoplasma.

7.5.3 Influencia de la adición de agentes reductores y sales durante la lisis de las clonas de *E. coli* con y sin His-tag en la actividad y solubilidad de la enzima.

Se decidió analizar la influencia del amortiguador de lisis en la actividad enzimática; así como en la solubilidad de la enzima, dado que la mayor parte de la enzima recombinante se encontró como cuerpos de inclusión. Se probó la adición de NaCl (0.3 M) para solubilizar la proteína, así como EDTA 1 mM, glicerol 10% y varios agentes reductores (DTT, β -mercaptoetanol, cisteína y glutatión reducido). En un primer análisis se estudió la influencia

del agente reductor en el ensayo de actividad. Se encontró que el glutatión reducido y cisteína *per se* en todas las concentraciones probadas (0.5, 1, 2.5 y 5 mM) provocaban el oscurecimiento de la solución a un color ámbar intenso. Esto mismo se observó con el β -mercaptoetanol y DTT en concentraciones 2.5 y 5 mM. El DTT en concentración 0.5 y 1 mM no afectó el color de la solución, por lo que se utilizó éste como agente reductor en concentración 1 mM para el amortiguador de lisis.

Se ajustó la densidad óptica después de la inducción y las células fueron colectadas por centrifugación, se resuspendieron en el amortiguador de lisis, se incubaron 10 min a 30°C y finalmente se rompieron por sonicación. Después se dejaron 24 h a 4°C y se determinó la actividad.



Figura 24. Actividad intracelular con α -nifil acetato para la clona 5Cl-11a y control después de 18 h de inducción con DTT y 3 h de inducción a 37°C. Se notan los cambios los paros en los que se detecta actividad.

De acuerdo a la figura 24, la inducción a 25°C por 18 h y resuspensión en el amortiguador de lisis adicionado con DTT, EDTA, glicerol y NaCl antes de la ruptura de las células aumentó la actividad de la enzima, lo cual puede ser debido a una mayor estabilidad y solubilidad de la misma. Este amortiguador de lisis se utilizó en los experimentos subsecuentes (0.13 U/mg proteína).

A estas mismas fracciones se les determinó actividad con acetato de *p*-nitrofenilo y palmitato de *p*-nitrofenilo. La actividad con acetato de *p*-nitrofenilo mostró el mismo patrón que en la figura 24 y con palmitato de *p*-nitrofenilo no se detectó actividad. Esto demuestra que la actividad enzimática de la proteína 5Cl1 es de esterasa.

En la figura 25 se muestra el patrón de proteínas de las diferentes fracciones después de la inducción a 25 y 37°C con y sin la adición de NaCl en el amortiguador de lisis. Para la

fracción de citoplasma soluble inducida a 25°C y extraída con el amortiguador de lisis con NaCl (Fig. 25B), se observa la aparición de una banda correspondiente al valor de la StcI. De la misma forma para las células completas inducidas en las mismas condiciones la banda correspondiente a la StcI sobreexpresada es más delgada después de la adición de NaCl en comparación con la obtenida para las mismas condiciones sin adicionar NaCl (Fig. 25A). Este hecho indica que el NaCl aumenta la solubilidad de la enzima en la fracción soluble del citoplasma. En el caso de la inducción a 37°C no sucedió lo mismo debido, quizá, a una mayor cantidad de cuerpos de inclusión.

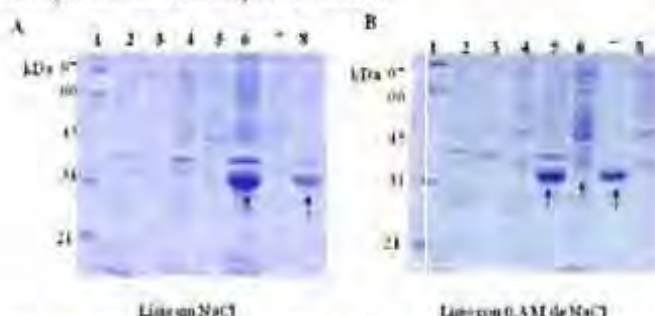


Figura 25. Expresión del gen *stcIhis* después de inducir a 25°C, 18 h y a 37°C, 3 h y de realizar la ruptura de las células en amortiguador de lisis con y sin NaCl. A) Patrón de proteínas después de lisis sin NaCl. Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, células del control a 25°C, 18 h después de inducción; carril 3, fracción citoplásmica soluble del control a 25°C, 18 h; carril 4, células de la clona StcI-His inducida a 25°C, 0 h; carril 5, fracción citoplásmica soluble de StcI-His a 25°C, 0 h; carril 6, células de la clona StcI-His a 25°C, 18 h; carril 7, fracción citoplásmica soluble de StcI-His a 18 h y carril 8, células completas de la clona StcI-His a 37°C, 3 h. B) Patrón de proteínas después de lisis con 0.3 M de NaCl. Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, células del control a 25°C, 18 h de inducción; carril 3, células de la clona StcI-His inducida a 25°C, 0 h; carril 4, fracción citoplásmica soluble de StcI-His a 25°C, 0 h; carril 5, células de la clona StcI-His a 25°C, 18 h; carril 6, fracción citoplásmica soluble de StcI-His a 18 h; carril 7, células de la clona StcI-His a 37°C, 3 h y carril 8, fracción de citoplasma soluble de StcI-His a 37°C, 3 h.

El hecho de haber encontrado una banda tenue en la fracción periplásmica después de la inducción a 25°C, llevó a probar la metodología para extracción del periplasma de Sroga y Dordick, (2002). Se cuantificó la actividad con α -naftil acetato y se encontró una actividad baja (0.01 U/mg proteína) para las células inducidas a 25°C a un tiempo de 18 h.

De acuerdo a los resultados anteriores se puede decir que la inducción a 25°C, 18 h favorece el direccionamiento de la enzima a periplasma y disminuye la formación de

cuerpos de inclusión. El amortiguador de lisis juega un papel muy importante en la estabilidad y solubilidad de la enzima, lo cual repercute en la actividad de la misma, sin embargo, los valores de actividad son bajos.

7.5.4 Solubilización de cuerpos de inclusión y replegamiento de la enzima

Se probó la solubilización de los cuerpos de inclusión, para lo cual se utilizó un protocolo basado en la desnaturalización con agentes caotrópicos y posteriormente su replegamiento. Partiendo del hecho de que las lipasas y esterasas son enzimas con plegamiento de α/β abierto, su replegamiento no parece ser complicado. En el protocolo de solubilización se utiliza cloruro de guanidina y DTT, con éste último se obtuvo la disolución del material insoluble. El material solubilizado se presenta como una banda predominante correspondiente al peso molecular de la proteína StcI (Figura 26A).

Tras la solubilización se probaron tres condiciones de replegamiento. En la primera (Vuillard *et al.*, 1998) se diluye el agente caotrópico con un amortiguador hasta alcanzar una concentración de proteína de 0.04 mg ml^{-1} y una concentración del agente caotrópico menor a 15 mM . La muestra diluida se incuba a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 h, para que ocurra un replegamiento espontáneo. Usando este protocolo no se encontró actividad lipolítica. En el segundo ensayo de replegamiento usado (Rudolph y Lilie, 1996) se adiciona glutatión y glutatión oxidado, tampoco se encontró actividad alguna. Estos ensayos preliminares no permitieron recuperar la enzima activa. Esto no quiere decir que la enzima no se puede replegar, si no que no se han encontrado las condiciones adecuadas para su replegamiento. Dado que esta enzima contiene 7 residuos de cisteína, es posible que parte de su plegamiento se deba a la formación de puentes disulfuro específicos que no se forman aunque se tengan las condiciones de potencial redox adecuadas. Se observó claramente que al diluir los agentes caotrópico y reductor se formó un precipitado que no se ve cuando se hace la dilución con el amortiguador que contiene DTT. Existe también la posibilidad de que el plegamiento de esta enzima requiera de asistencia enzimática. Por esta razón, se decidió lisar las células con lisozima (0.1 mg ml^{-1}) y con un proceso de sonicación posterior por intervalos de tiempo muy cortos. Después del proceso de ruptura celular, se determinó actividad cualitativamente, la cual no se encontró. Sin embargo, tras una incubación de las

celulas completas durante 24 h a temperatura ambiente; se encontró actividad, aunque aun baja (0.09 U/mg proteína) (Figura 26B), se consideró entonces evaluar la clonación de la enzima en un sistema de expresión eucariote.

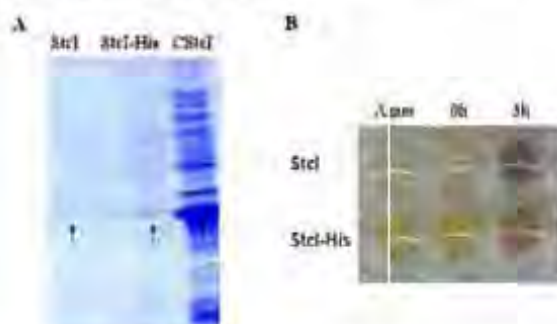


Figura 26–A. Patrón de proteínas en gels SDS-PAGE después de la utilización de cuerpos de inclusión. Stc1 y Stc1-His, cuerpos de inclusión de las células Stc1 y Stc1-His, de células con 3 h de inducción. CStc1, células de la línea Stc1. B. Actividad de la enzima después del repliegamiento de los cuerpos de inclusión a temp. ambiente durante 24 h. Fila superior, línea con el sustrato Stc1. Fila inferior, línea con el sustrato Stc1-His. 0 h, células sin inducción. 3 h, células después de la inducción durante 3 h. Se señala con una flecha la proteína Stc1.

7.6 Clonación en *Pichia pastoris* de la esterasa Nstc1

Se decidió utilizar *P. pastoris* como sistema de expresión eucariote dado que se ha reportado que varios genes de origen fúngal se han expresado exitosamente en *P. pastoris* (Mimming *et al.*, 2001; Koseki *et al.*, 2005; Xiong *et al.*, 2005). *Pichia pastoris* presenta además varias ventajas como sistema de expresión eucariote como son, a) la presencia en el vector de expresión de un promotor fuerte de fácil manipulación derivado del gen de la alcohol oxidasa I, b) capacidad de llevar a cabo un plegamiento correcto, procesamiento y modificación post traduccional de proteínas de origen eucariote, c) es un sistema de fácil manipulación en laboratorio como *E. coli* o *S. cerevisiae*, d) dado que también es una levadura, comparte las ventajas de manipulación genética y molecular con *Saccharomyces*, y como ventaja adicional los niveles de expresión heteróloga son 10 a 100 veces más altos que los obtenidos con *Saccharomyces*. Por lo que este sistema de expresión de proteínas heterólogas se ha utilizado mucho en los últimos años (Illgen *et al.*, 2005)

En la figura 20 se muestra la secuencia completa del gen *nstcl* y su traducción a proteína. También se señalan los cebadores diseñados para la amplificación del gen (*nstcl*-F y *stcl*-R). En este caso, el amino terminal se obtiene con 2 o 4 residuos de aminoácido adicionales, que podían afectar la actividad o el plegamiento de la enzima si se encuentra en una región crítica de la misma. Sin embargo, este hecho no se observó como se muestra más adelante.

Inicialmente se realizó un ensayo de PCR utilizando como templado los fagos de la genoteca de ADNc de *A. nidulans* con un tratamiento previo de 10 min a 95°C. Sin embargo, no se logró obtener producto de amplificación. Se decidió entonces reamplificar la librería de ADNc y realizar una extracción de ADN del fago para usarse como templado. Los ensayos de PCR realizados con los cebadores produjeron un fragmento de ADN del peso molecular esperado (cerca de 1000 pb) al emplear una temperatura de 58°C en el paso de alineamiento. Sin embargo, esta banda era muy tenue. Se variaron las condiciones del ensayo y no se logró obtener una banda bien definida (resultado no mostrado). Se intentó una reamplificación usando como templado el fragmento obtenido y tampoco se obtuvo una banda de intensidad fuerte.

Se procedió a realizar un RT-PCR a partir del ARNm de *A. nidulans*. Se realizó la extracción del ARNm de *A. nidulans* después de 24 h de crecimiento en medio mínimo, considerando que la expresión de un gen homólogo en *A. parasiticus* era constitutiva y además las condiciones utilizadas para construir la genoteca de ADNc. El resultado de la reacción de PCR mostró la existencia de una banda del peso molecular esperado (945 bp), similar a la obtenida anteriormente a partir del ADN del fago. Sin embargo, la banda obtenida se observa más definida (resultado no mostrado).

Se generó el vector *pPICnstcl* y se transformó *E. coli*. Se obtuvieron varias colonias transformantes y se tomaron 14, las cuales se crecieron en agitación toda la noche a 37 °C en medio LB con zeocina. A estos cultivos se les extrajo el plásmido y éste se sometió a amplificación por PCR usando los cebadores universales, para el promotor y terminador de AOX, que flanquean el sitio de clonación múltiple del *pPICZα* (Figuras 27 y 28). Como

resultado del ensayo de PCR se obtuvo un fragmento del peso molecular esperado (aprox. 1200 pb) para 3 clonas (Figura 28). Se comprobó que se trataba del gen *nstc1* mediante secuenciación. El alineamiento con secuencias en el GenBank™ y la obtenida de las secuencias EST mostró una secuencia idéntica a la del gen *nstc1* mostrada en la figura 12 sin el intrón. También se observó que el gen estaba en el marco de lectura de la señal de secreción (factor α).

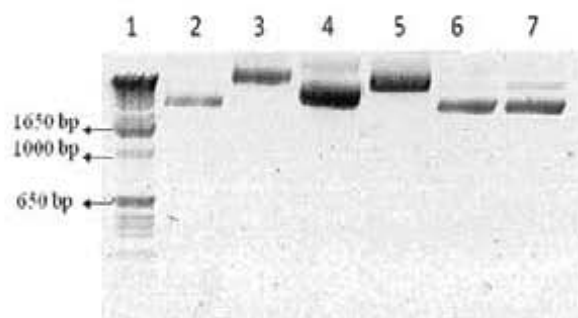


Figura 27 – Plásmidos purificados de diferentes clonas recombinantes. De izquierda a derecha se muestran: Carril 1; marcador (1kb *DNA plus ladder*), carril 2; vector pPICZa y carriles 3-7; plásmidos de clonas transformadas con el vector pPICZa-*nstc1*.

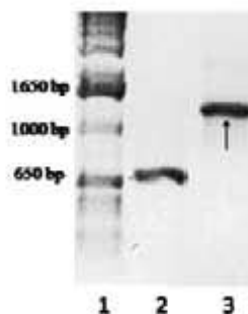


Figura 28 – Producto de PCR con cebadores universales AOX y plásmidos purificados como templado. De izquierda a derecha se muestran: Carril 1; marcador (1kb *DNA plus ladder*), carril 2; PCR con vector pPICZa y carril 3; PCR con plásmido de una clona transformada con el vector pPICZa-*nstc1*. Se marca con una flecha el producto de PCR AOX del tamaño esperado.

Se utilizó el plásmido pPIC*nstc1* de una de las clonas recombinantes para transformar células de *P. pastoris* X-33. Las clonas recombinantes se seleccionaron por la formación de

halos de hidrólisis en el medio de selección con tribonina después de 24 h. Se obtuvieron varias clonas que formaron halos y una clona que formó un halo más grande (Fig. 29).



Figura 29- Halos de hidrólisis de tribonina (señalado con la flecha) después de 24 h de incubación a 30°C. Otra clona recombinante con halo (marcado con una flecha), aber clona con halo.

Se corroboró la presencia del gen *nstcI* en la clona recombinante, para lo cual se realizó una extracción de ADN que se utilizó como templado para la reacción de PCR, donde se utilizaron cebadores universales y específicos (Fig. 30). El producto de PCR tuvo la secuencia esperada para el gen *nstcI* (Fig. 12) (Anexo A).

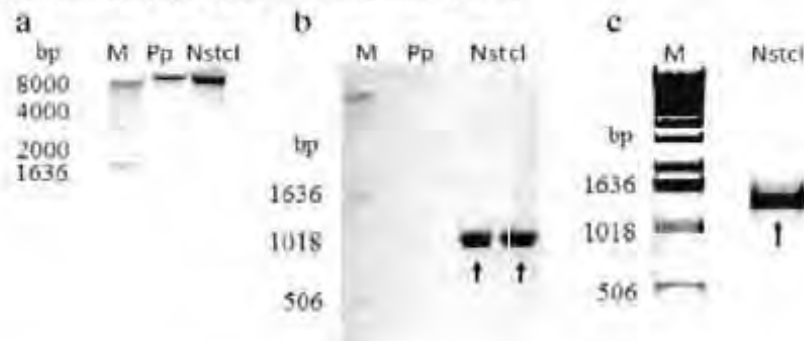


Figura 30.- Gen *nstcI* en *P. pastoris* a ADN de clona de *P. pastoris* X33 transformada con pPICZα (Pp) y ADN de clona transformada con pPICZα-*nstcI* (NstcI). b Productos de PCR obtenidos con cebadores específicos y ADN de *P. pastoris* transformada con pPICZα (Pp) y pPICZα-*nstcI* (NstcI). c Productos de PCR obtenidos con cebadores universales y ADN de *P. pastoris* transformada con pPICZα-*nstcI* (NstcI). M, marcador 10 kb DNA plus ladder. Los productos de PCR se señalan con flechas.

La clona recombinante de *P. pastoris* con *nstcI* se cultivó en medio líquido de la forma descrita en la metodología. Después de 24 h de inducción, se detectó actividad de esterasa

alta (360 U/mg proteína), la cual se mantuvo durante 72 h y finalmente se redujo a las 96 h (Figura 31). En la fase de inducción con metanol, la actividad máxima medida en el extracto crudo extracelular fue de 189.7 U/ml con 0.527 mg proteína/ml después de 24 h de inducción.

El perfil de proteínas en geles SDS-PAGE mostró una banda intensa en 35 kDa, la cual correspondía con la masa molecular teórica 34.56 kDa (Figura 32A). No se pudo detectar actividad en geles SDS-PAGE reconstituidos. Sin embargo, si se vio en zimogramas con geles nativos con una migración cercana a 35 kDa (Figura 32B).

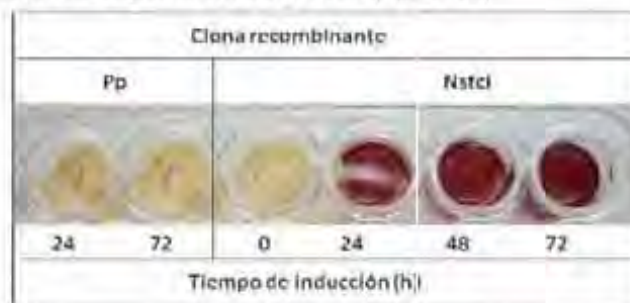


Figura 31- Actividad extracelular de esterasa de las clones recombinantes después de la inducción con metanol. **Pp.** Clona de *P. pastoris* transformada con el vector pPIC2α (α-ami) + **Nstcl.** Clona de *P. pastoris* transformada con el vector pPIC2α-*nstcl*.

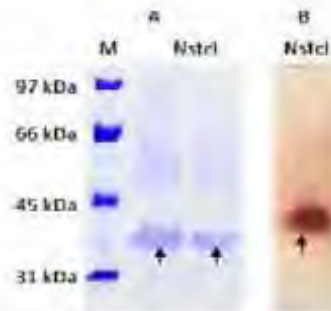


Figura 32- **A.** Perfil de proteínas extracelulares de *P. pastoris* con *nstcl* después de 24 h de inducción con metanol en gel SDS-PAGE. **B.** Actividad extracelular de esterasa de la clona recombinante *Nstcl* después de 48 h de inducción en gel nativo. Se marca la proteína heteróloga (*Nstcl*) con una flecha.

El punto isoeléctrico (pI) de la proteína pura es 4.7 y es cercano al teórico (4.84) (Figura 44). La expresión de la proteína heteróloga Nstcl se confirmó con anticuerpos específicos.

7.7 Clonación y expresión de *stcI* en *P. pastoris*.

Con el fin de comparar la actividad y propiedades de la proteína Stcl con la de la Nstcl, y una vez sabiendo que el sistema de *P. pastoris* funcionó para esta última, se procedió a subclonar la *StcI* en el mismo sistema de expresión. No se adicionó la cola de histidinas en el carboxilo terminal.

Se hizo la construcción, la transformación y se observó la formación de halos de hidrólisis por algunas colonias en placas con 1.0 % de tributirina, el cual se utilizó como criterio de selección (Figura 33). Cabe mencionar que a diferencia de las clonas recombinantes obtenidas con Nstcl, ninguna colonia forma un halo tan grande como el observado en la figura 29.



Figura 33- Halos de hidrólisis en tributirina (después de 24 h de incubación a 30°C). Se marca con una flecha el halo.

A las colonias seleccionadas se les extrajo ADN para probar por PCR la presencia de *stcI* (Figura 34). Se obtuvo un amplicón del tamaño esperado (858 bp) y la secuencia correspondió con la mostrada en la figura 11 de la base 138 a la 993 (Anexo B).

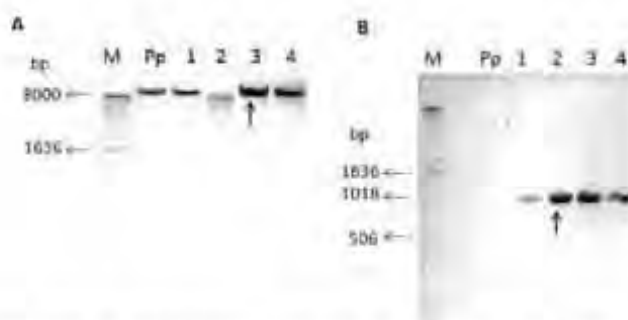


Figura 34. Confirmación por PCR de la presencia de *stc1* en las colonias de *P. pastoris* seleccionadas. A) ADN cromosómico de *P. pastoris* extraído de distintas colonias (1-4). Se señala con una flecha. B) Producto de PCR correspondiente a *stc1*. Se señala con una flecha. En el carril Pp de ambos paneles se encuentra el control negativo (células transformadas con el vector sin el inserto). M, marcador 1-kb *DNA* 1 plus ladder.

Cuatro de las colonias que presentaron halo en tributirina dado que expresaban a *stc1* fueron usadas para crecerse en medio líquido y evaluar su actividad. Primero se obtiene biomasa en el medio BMGY, que contiene glicerol como fuente de carbono. Posteriormente se recupera la biomasa producida y se pone en un medio EIMMY, que no contiene la fuente de carbono y a este se le adiciona el inductor del promotor *AON1* (metanol). La actividad fue evaluada cualitativamente cada 24 h durante 96 h. Se encontró que tres de las colonias seleccionadas no presentaban actividad. Sin embargo, una de ellas tuvo actividad después de 48 h (Figura 35). La actividad de esta última se cuantificó y fue de 39 U/mg proteína, se mantuvo constante hasta las 96 h y después desapareció. En el sobrenadante después de 48 h de inducción se detectó la máxima actividad, la cual fue de 13.9 U/ml con 0.355 mg proteína/ml. Esta colonia se utilizó para los experimentos posteriores.

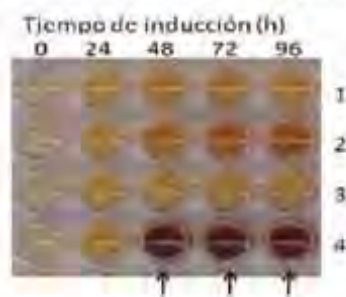


Figura 35. Actividad extracelular de esterasa de las clones transformadas después de la inducción con metanol. 1-4. Clonas de *P. pastoris* transformadas con el vector pPICZa-stc1. Se señalan con flecha los puntos donde se ve actividad.

Se analizó el perfil de proteínas y la actividad de la enzima por zimografía (Figura 36) Se encontró una sola banda de actividad en gel SDS-PAGE renaturalizado, la cual corresponde a una masa molecular de 31 kDa, igual a la calculada teóricamente (31.19 kDa). A diferencia de la proteína NstcL, si se logró la renaturalización de la enzima StcI y el zimograma en gel nativo mostró dos bandas: una muy fuerte en la parte superior del gel, la cual puede corresponder a un agregado de la enzima, y una más débil en una masa cercana a 31 kDa.

El inmunoanálisis reveló también una banda en 31 kDa. El pI experimental fue de 5.3, cercano al estimado teóricamente (4.91), (Figura 37).

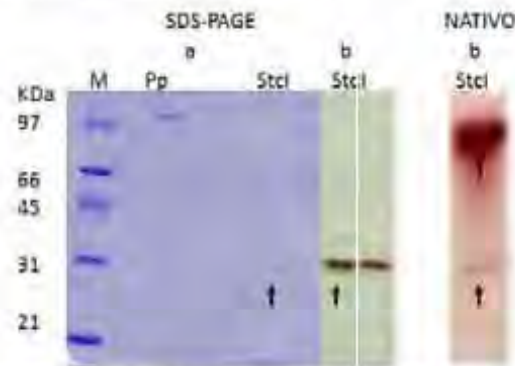


Figura 36- a. Perfil de proteínas extracelulares de *P. putida* con el gen *stcI* después de 48 h de inducción con metano en gel SDS-PAGE. Se señalan con flechas las bandas correspondientes a la proteína StcI. b. Actividad extracelular de esterasa de la clona recombinante StcI después de 48 h de inducción en gel renaturalizado y nativo. Se marca la proteína heteróloga con una flecha (StcI).

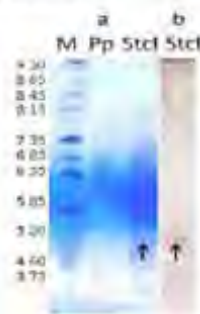


Figura 37- pI de la proteína StcI recombinante en gel de actividad de esterasa. a. tinción con azul de coomassie. b. tinción con α -naftil acetato. M, marcador de pI de amplio rango (3-9). Se señalan con flechas las bandas correspondientes a la proteína StcI.

Las evidencias experimentales demostraron que se clonaron los genes *stcI* y *nstcI*. Ambos se expresaron exitosamente en *P. pastoris*. Se observa que el peso molecular de StcI expresada en *P. pastoris* es menor al de StcI expresada en la fracción citoplásmica de *E. coli*. Esto seguramente obedece a que al formarse cuerpos de inclusión en el sistema bacteriano, no se elimina la señal de exportación a periplasma que contiene la construcción en el vector pET 20. Independientemente de este hecho, no se requiere de glicosilaciones para que las enzimas presenten actividad.

Contrario a lo que pasa con muchas proteínas heterólogas expresadas en *P. pastoris*, ninguna de las proteínas clonadas presenta glicosilaciones (resultados no mostrados).

La esterasa recombinante NstcI se visualizó como una sola banda en gel nativo (Figura 32B), contrario a lo que se encontró en *A. parasiticus*, donde se reportó que EstA actúa como homodímero (Kusumoto y Hsieh, 1996). Sin embargo, para la esterasa StcI sí se observaron dos bandas de actividad en gel nativo, aunque no corresponden al peso aproximado para un homodímero (Figura 36b).

Una vez identificada la actividad de esterasa esperada para cada enzima recombinante, se procedió a corroborar la identidad de las mismas con el anticuerpo específico (anti-stcI) y a su vez estos ensayos servirían para validar la especificidad del anticuerpo.

7.8 Validación de la especificidad de anticuerpos (anti-stcI) con las proteínas recombinantes

Los sueros colectados en diferentes etapas de la inmunización se analizaron por inmunoanálisis, se evaluaron las etapas: preinmunización, 49, 63 y 77 días después de la inmunización, utilizando las siguientes diluciones del suero; 1:1000, 1:5000, 1:10,000, 1:30,000 y 1:40,000. Para el suero pre-inmune sólo se evaluaron las diluciones de 1:500, 1:1000 y 1:5000. De la misma manera se evaluaron los extractos crudos de *P. pastoris* silvestre y clonas recombinantes (con NStcI y StcI) con diferentes concentraciones de proteína 65, 30, 20, 10 y 0.5 µg). Los resultados mostraron que el suero preinmune no presentaba reacción con ninguna de las proteínas de los extractos crudos evaluados con

ninguna dilución (Figura 38A). Los extractos crudos de las clonas recombinantes mostraron reacción con la proteína NStel ó Stel con todos los sueros después de la inmunización en todas las diluciones. En la figura 38B se muestran como ejemplo los resultados para la clona NStel. Es importante mencionar que con el suero de la primera inmunización (33 días) se observaron reacciones cruzadas en las diluciones de 1:1000 y 1:5000.

Los resultados obtenidos corroboraron la alta especificidad del anticuerpo y la presencia inequívoca de las proteínas NStel y Stel en las clonas recombinantes. El anticuerpo es capaz de detectar ambas esterasas. Además, se determinó que el título del anticuerpo es de 1:40,000 y que la mínima cantidad detectable de proteína es 20 µg (Figura 38C).

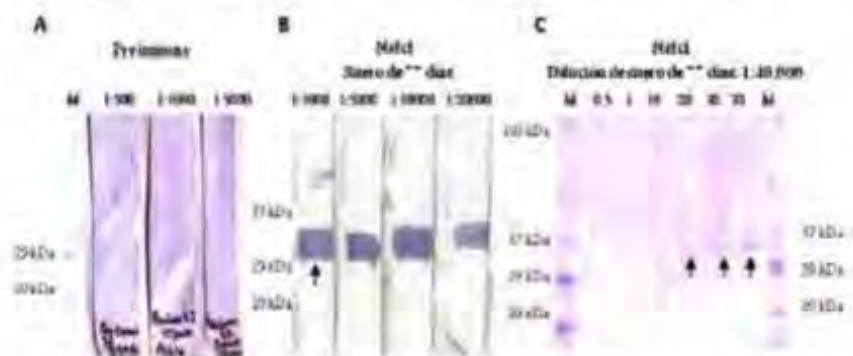


Figura 38. Titulación y especificidad del anticuerpo anti-NStel. **A.** Inmunoblots con las proteínas del extracto crudo de la clona NStel y suero primario utilizando diferentes diluciones del suero. **B.** Inmunoblots de las proteínas del extracto crudo de la clona NStel y suero de 77 días de inmunización utilizando diferentes diluciones del suero. **C.** Inmunoblots de las proteínas del extracto crudo de la clona NStel y suero de 77 días de inmunización utilizando diferentes concentraciones de proteína (µg) y la dilución del suero de 1:40,000. M, marcador de peso rango predefinido (kDa). Se señalan con flechas las bandas correspondientes a la proteína NStel.

Los ensayos anteriores se realizaron en geles desnaturizantes (SDS-PAGE), sin embargo, se consideró también necesario realizar los ensayos para ambas esterasas con geles nativos, con el fin de elucidar si el anticuerpo podía detectar a ambas enzimas en su estado nativo. En la figura 39 se observan los resultados en geles nativos. El anticuerpo reconoció a ambas enzimas en su estado nativo. Se observa también que aunque se usó la misma cantidad de proteína, se tiene una mayor intensidad para la proteína NStel, lo cual coincide con los resultados de expresión en *P. pastoris*.



Figura 39- Identificación de las proteínas NstcI y StcI con el anticuerpo anti-stcI por inmunoblotting de gels nativos. Se señalan con flechas las proteínas heterólogas.

7.9 Purificación de las proteínas recombinantes en la columna de afinidad anti-stcI.

Una vez que se corroboró la especificidad del anticuerpo, se procedió a realizar una columna de afinidad con anticuerpos anti-stcI inmovilizados con el fin de utilizarla para purificar ambas enzimas. La pureza de las enzimas se verificó en gel desnaturalizante y se realizó un inmunoanálisis para identificación de las enzimas. En la Figura 40 se observan los resultados para la proteína NstcI. Cabe mencionar que en ambos casos se perdió actividad enzimática (30% para NstcI y 50% para la StcI).

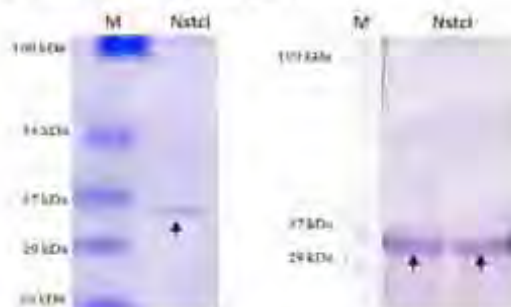


Figura 40. Proteína NstcI después de la purificación en columna de afinidad con anti-stcI. A. gel SDS-PAGE y B. inmunoanálisis. La proteína NstcI se señala con una flecha.

7.10 Expresión de stcI en *Aspergillus nidulans*

No existen estudios previos de la expresión de *stcI* en *A. nidulans* y considerando además el hecho teórico de que la enzima contiene una región N-terminal adicional, resulta importante estudiar la expresión del mismo en diferentes condiciones de cultivo. Para este

fin, se aisló el ARN total de micelio de *A. nidulans* crecido en condiciones de inducción y no inducción de producción de esterigmatocistina, las cuales fueron descritas previamente. El ARN se utilizó como templado para la detección del transcrito por RT-PCR (Figura 41). Los cebadores utilizados fueron los descritos anteriormente para *nstcI*.

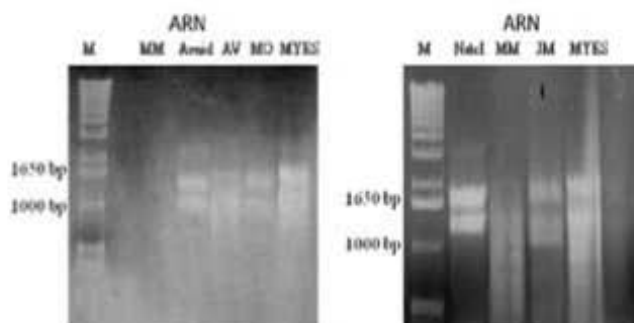


Figura 41 – ARN de *A. nidulans* crecido en diferentes condiciones de cultivo. M, marcador 1 kb *DNA plus ladder*; MM, medio mínimo; MO, medio optimizado; MYES, medio YES; JM, medio jante de maíz; Avn1, avena con *A. nidulans*; Av, avena sola control.

En la figura 42 se observa que *nstcI* (950 bp) se expresa en todas las condiciones evaluadas incluso para las condiciones no inducidas (MM y MO). Las secuencias de los amplicones se secuenciaron y fueron idénticas a *nstcI* (sin el intrón), la cual corresponde a la secuencia de ADNc en la base de datos de ESTs (Anexo C). Este resultado por sí mismo constituye una evidencia de la expresión a nivel de transcripción de *nstcI* en *A. nidulans*. Es importante recordar lo que se describió inicialmente: la proteína NstcI también se expresa en todas las condiciones evaluadas con una masa molecular aparente de 35 kDa que corresponde al valor teórico de la proteína completa. Esto muestra que el péptido de 29 aa en la región N-terminal forma parte de la enzima. De acuerdo a su secuencia genómica, se tienen dos codones que pueden ser el punto de inicio de la traducción: el AUG en la posición 136-138 (MQGW₁₃₆₋₁₃₈, reportado previamente como inicio de la traducción de la proteína StcI) (Brown *et al.*, 1996) y el AUG en la posición 1-3 (MDSK₁₋₃) (Figura 11). Nuestros resultados confirman que este último funciona como inicio de la traducción, lo cual concuerda con lo sugerido por Yu *et al.* (2002), después de comparar las secuencias de los genes *stcI* y *estA*. Además en la figura 12 se observa la secuencia consenso Kozak para

la identificación del sitio inicio de la traducción: una purina (A) localizada 3 bases antes del codón de inicio en la posición 1-3 y una G después del codón de inicio (Kozak, 1987). Esta secuencia consenso no se observa para el codón de inicio reportado previamente por Brown *et al.* (1996).

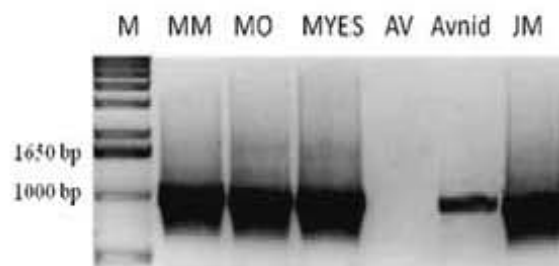


Figura 42 – RT-PCR con ARN de *A. nidulans* crecido en diferentes condiciones de cultivo. M, marcador 1 kb *DNA plus ladder*; MM, medio mínimo; MO, medio optimizado; MYES, medio YES; JM, medio jarabe de maíz; Avnid, avena con *A. nidulans*; AV, avena sola control.

7.11 Purificación de la esterasa NstcI expresada en *A. nidulans*

Se procedió con la purificación de las esterasa NstcI del extracto celular de *A. nidulans* crecido en avena, dado que ahí se encontró una expresión mayor de la proteína. Se utilizó la columna de inmunoafinidad con anticuerpos anti-stcI. La pureza de la enzima se verificó en gel desnaturizante y se realizó un inmunoanálisis para identificación de la misma. En la Figura 43 se observan los resultados obtenidos. Resulta interesante el hecho de que después de la inmunopurificación, además de la banda esperada para NstcI (35kDa), se observa en algunas fracciones en inmunoanálisis la aparición de una segunda banda en una masa molecular cercana a 31 kDa. Dicha banda no se pudo observar al teñir con azul de Coomassie. Considerando el hecho de que el anticuerpo anti-StcI tiene una alta especificidad para ambas enzimas, se puede considerar que el microorganismo expresa ambas enzimas (StcI y NstcI), o que la StcI se puede derivar del procesamiento de la proteína NstcI.

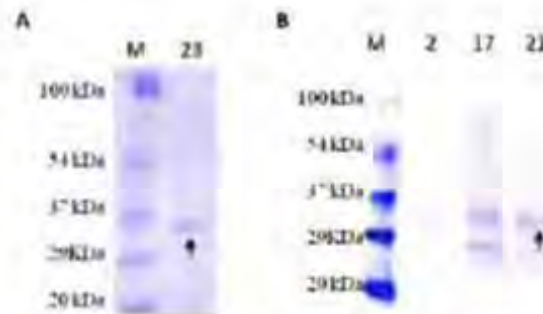


Figura 43 : A, Fracción 23 después de su purificación tñida con coomassie. B, Detección inmunológica de la enzima Nstc1 después de su purificación. M, marcador proteico de rango bajo (Bio- Rad) 2, 17 y 21, fracciones de la purificación. Dilución de suero 1:40000. Se señalan con flechas las bandas correspondientes a la proteína Nstc1.

Se realizó un isoelectroenfoque para la fracción que sólo contiene la proteína Nstc1 con el fin de verificar si su pI correspondía con el teórico (4.8). En la figura 44, se observa que el pI de la proteína Nstc1 silvestre coincide con el teórico, mientras que la proteína recombinante muestra un pI cercano al teórico (4.7).

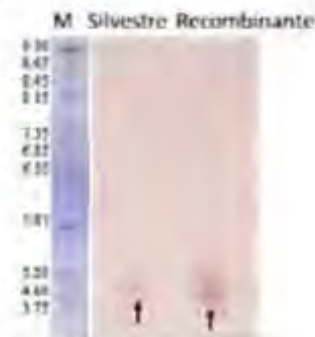


Figura 44 - pI de la proteína Nstc1 silvestre y recombinante para su pI de actividad de enzima. M, marcador de pI de rango amplio (3-9). La proteína Nstc1 se señala con una flecha.

Los resultados obtenidos para la expresión del gen y de la proteína confirman que el sitio dominante del inicio de la traducción está en la posición 1-3 (Figura 12) y el producto de este gen es la proteína Nstc1 con una masa molecular aparente de 35 kDa y un pI de 4.8, los que concuerdan con los valores teóricos. La identidad de la enzima Nstc1 se vio reforzada

también por el hecho de que el pI de la esterasa inmunopurificada del micelio de *A. nidulans* crecido en medio con avena (condiciones de inducción) fue igual al obtenido teóricamente (4.8).

El gen *nstcI* y la proteína se expresan constitutivamente, lo cual también se ha observado para otros genes homólogos como *estA* (Yu *et al.*, 2002) y se ha reportado que probablemente este gen es el único dentro de la vía de biosíntesis de aflatoxinas que no se encuentra bajo la regulación de *afR* (Yu *et al.*, 1995; 2002; Price *et al.*, 2005). Otros autores también han detectado la proteína EstA en condiciones no inducidas (Yabe *et al.*, 1991).

Por otra parte, es interesante notar que la masa molecular teórica se encuentra cercana a 35 kDa en todas las esterases involucradas en la biosíntesis de aflatoxinas, sin embargo, se ha reportado únicamente la purificación de una esterasa de 32 kDa (Kusumoto y Hsieh, 1996). Los resultados de inmunopurificación de la esterasa StcI a partir de extracto celular concentrado de *A. nidulans* mostraron dos bandas por inmunoanálisis: la proteína NstcI de 35 kDa previamente observada en el extracto intracelular no concentrado de *A. nidulans* y otra proteína de 30 kDa. A partir de estos resultados sería importante determinar si estas bandas se derivan del procesamiento de la proteína NstcI, de un *splicing* alternativo, como se ha reportado para algunos genes en *A. nidulans* (Paukstelis y Lambowitz, 2008) o del uso selectivo de sitios de inicio de la transcripción, como se ha reportado para algunos genes de la conidiación de *A. nidulans* (Wu y Miller, 1997).

Las enzimas recombinantes NstcI y StcI pueden hidrolizar sustratos típicos de esterases, por lo que se puede decir que *nstcI* codifica para una esterasa con amplia especificidad de sustrato. Con el fin de verificar este hecho, como se muestra más adelante, se realizó una caracterización más amplia.

Se ha encontrado en algunas carboxilesterasas que la región N-terminal puede tener un papel importante en el plegamiento adecuado de la enzima, su estabilidad, sus propiedades bioquímicas o su especificidad de sustrato (Mandrich *et al.*, 2005; Sayari *et al.*, 2005). Por

tanto, los siguientes estudios se centraron en la función de la región N-terminal de la proteína NstcI en las propiedades catalíticas de la enzima.

7.12 Biocatálisis

7.12.1 Predicción de modelos estructurales

En un primer acercamiento para evaluar las diferencias estructurales entre las dos enzimas recombinantes y esclarecer la función del péptido adicional de 29aa, se generaron modelos estructurales para cada enzima. Se emplearon como estructuras molde, la heroína-esterasa de *Rhodococcus* sp., la cual presenta un 19% de identidad de secuencia de aminoácidos con la proteína NstcI (Zhu *et al.*, 2003) y la esterasa termofílica de *Alicyclobacillus acidocaldarius* con 30% de identidad (De Simone *et al.*, 2000; 2004); para el modelado por homología de las proteínas NstcI y StcI. El procedimiento es justificado y correcto por el hecho de que las proteínas NstcI y StcI también son una α/β abierta del mismo tamaño que las estructuras molde. Además, los aminoácidos de la triada catalítica quedan en las mismas posiciones que en las estructuras molde.

Como ya se mencionó, se realizó un análisis de las secuencias de aminoácidos de las enzimas StcI y NstcI en la base de datos LED ("Lipase Engineering Database") (Fischer y Pleiss, 2003), el cual permitió identificar los aminoácidos característicos de la triada catalítica encontrada en las α/β hidrolasas. Estos son: Ser-152, Asp-255 e His-285; así como los aminoácidos de la cavidad oxianiónica: Gly-86 y Ala-153. La serina catalítica en ambas enzimas (Ser-152) se encuentra ubicada en la secuencia pentapéptido consenso: Gly-Ala-Ser-Ala-Gly (residuos 150–154). Los modelos estructurales predichos para ambas enzimas se encuentran claramente relacionados a otras esterasas (Figura 45). Las proteínas NstcI y StcI tienen únicamente un dominio correspondiente al plegamiento canónico α/β hidrolasa, el cual es común en esterasas que presentan la triada catalítica Ser/Cys-Asp/Glu-His.

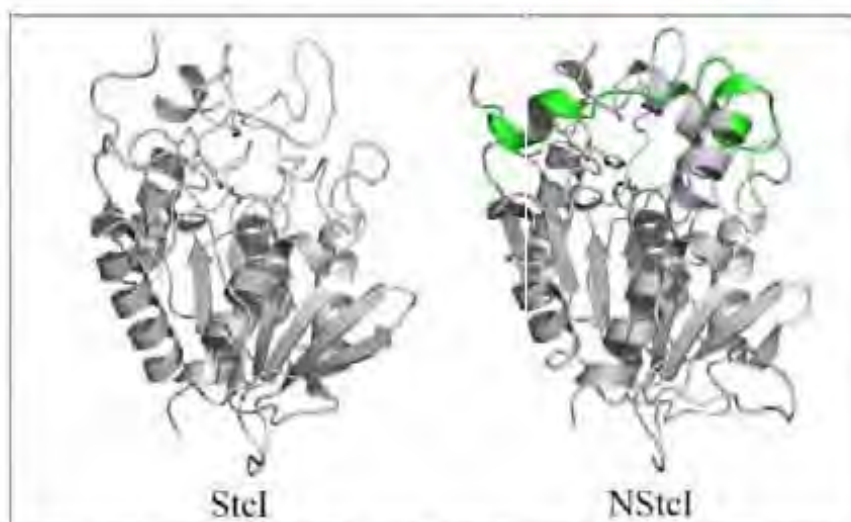


Figura 45. Modelos estructurales por homología obtenidos para las proteínas NstcI y StcI. Se resalta en color verde la región correspondiente a los 29 aa adicionales hacia el N-terminal. Se resaltan en rojo y en azul los residuos de la triada catalítica.

En la figura 45, se observan los dos modelos estructurales para las variantes de la proteína StcI. La comparación de estos muestra que para el caso de la proteína NstcI, el péptido adicional de 29 aa en la región N-terminal forma un motivo hélice-giro-hélice que cubre parcialmente el sitio activo de la enzima. El motivo encontrado en la región N-terminal de la NstcI cubriendo el sitio activo es característico de varias esterasas como la heroína-esterasa (PDB 1LZL), de algunas esterasas termofílicas de *Archaea* (PDBs 1EVQ, 1QZ3, 2C7B, 1JH) y otras como la esterasa brefeldina-A de *B. subtilis* (1JKM). En contraste, el modelo de la enzima StcI, no presenta dicho motivo, por lo cual queda expuesta una larga superficie hidrofóbica compuesta por los residuos del giro 88-92 y de la región 216-223. En este punto es importante mencionar que la hélice 216-223 que se encuentra en la proteína NstcI se pierde en la proteína StcI, posiblemente por la falta de contactos con los residuos de la región N-terminal en NstcI. También, los giros 188-204 y 156-171 se encuentran completamente desordenados en la proteína StcI como resultado del colapso de la hélice 216-233.

Los resultados de la clonación de las variantes de la proteína en StcI en *P. pastoris*, mostraron que ambas enzimas pueden ser expresadas en este sistema con actividad. Sin embargo, si se observó notoriamente que la proteína NstcI se expresaba con una actividad específica mayor que la proteína StcI (9.2 veces más). Este hecho, junto con el análisis de los modelos estructurales presentados anteriormente, reforzó la idea de que la región N-terminal adicional en la proteína NstcI le podía conferir propiedades bioquímicas diferentes como una mayor estabilidad, pero sobre todo, una especificidad de sustratos diferente.

7.12.2 Efecto de la temperatura y pH sobre la actividad y estabilidad de las enzimas recombinantes

En las condiciones de ensayo evaluadas, la esterasa NstcI presentó una mayor actividad en un intervalo de temperatura de 30 a 50°C, mostrando la máxima actividad a 40°C; mientras que la esterasa StcI fue más activa en un intervalo de temperatura de 20 a 40°C, mostrando la máxima actividad a 30°C (Figura 46A). La termoestabilidad de cada enzima se examinó midiendo la actividad residual después de mantener a la enzima 30 min a la temperatura indicada en un pH de 7.5. En estas condiciones, ambas enzimas retuvieron hasta un 70% de su actividad inicial en un intervalo de temperatura de 20 a 40°C. Sin embargo, cuando la temperatura se elevó a 50°C, la enzima NstcI perdió 50% de su actividad inicial, mientras que la StcI mantuvo sólo el 20% de su actividad. A temperatura de 60°C, ambas enzimas perdieron el 100% de la actividad. Las dos presentaron mayor estabilidad a las temperaturas donde también alcanzaron el máximo de actividad, esto es, 40°C para la NstcI y 30°C para la StcI (Figura 46B). Se obtuvieron resultados similares al evaluar con el método del pH-stat (Peled y Krenz, 1981).

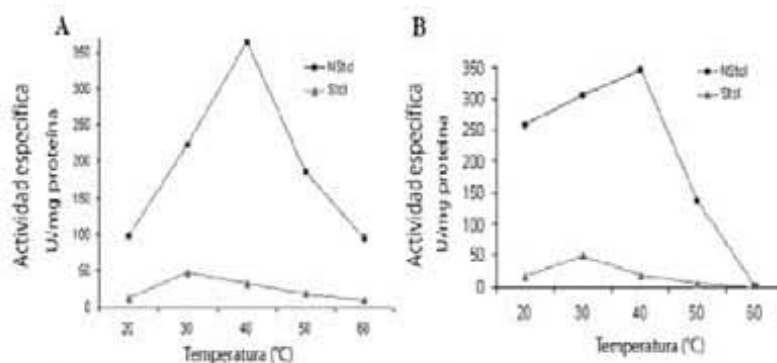


Figura 46- Efecto de la temperatura en la actividad y estabilidad de las enzimas. Evaluación de actividad con el método espectrofotométrico a pH 7.5. **A**, efecto de la temperatura en la actividad de las enzimas. **B**, efecto de la temperatura en la estabilidad de las mismas enzimas. Se reporta la actividad residual. Los resultados son el promedio de tres réplicas.

■ NstcI y ▲ StcI.

También se evaluó el efecto del pH en la actividad y estabilidad de las enzimas. Cabe mencionar que los resultados que se muestran a continuación se obtuvieron utilizando el método pH-stat para la medición de actividad con acetato de etilo como sustrato. La enzima NstcI presentó actividad en un rango de pH de 7 a 9; mientras que la StcI se mantuvo activa en un rango de pH de 6 a 8. Las actividades más altas se observaron a pH 9 para la NstcI y pH 8 para la StcI. También, se observó que la NstcI perdió 80% de su actividad a pH 10 (Figura 47A). En cuanto a la medición de estabilidad al pH, los resultados mostraron que la enzima NstcI se mantuvo estable en un intervalo de pH de 8-10 durante 12 h a 37°C, observándose la máxima actividad a pH de 9. Los resultados para la enzima StcI, mostraron que durante 12 h a la misma temperatura, la enzima conserva mejor actividad a pH de 9 y se mantiene estable en un rango de pH de 7 a 9 (Figura 47B). Estos resultados se obtuvieron con el método espectrofotométrico; sin embargo, en este método sólo se evaluó la actividad y estabilidad en un intervalo de pH de 5-9 por la interferencia de autohidrólisis del sustrato a valores de pH mayores.

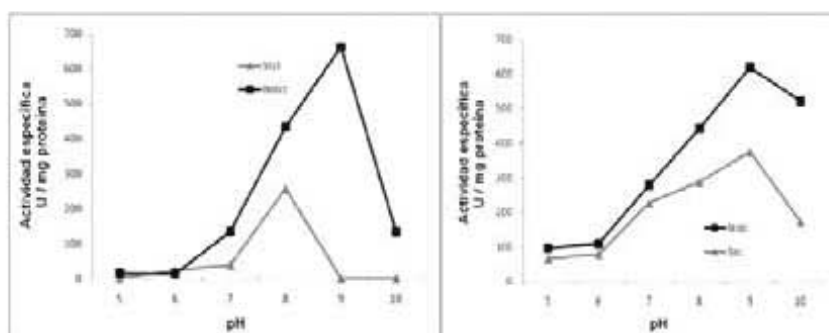


Figura 47- Efecto del pH en la actividad y estabilidad de las enzimas recombinantes. Evaluación de actividad con el método pH-stat a 40°C. **A,** efecto del pH en la actividad de las enzimas. **B,** efecto del pH en la estabilidad de las mismas durante 12 h a 37°C. ■ Nstcl y ▲ Stcl. Los resultados son el promedio de tres réplicas.

7.12.3 Especificidad de las enzimas sobre ésteres de *p*-nitrofenilo con diferente largo de cadena

Se encontró que ambas enzimas pueden hidrolizar los sustratos evaluados, sin embargo en todos los casos la actividad de la enzima Nstcl fue mayor. El resultado más interesante obtenido en estos ensayos es la diferencia encontrada en la especificidad sobre el largo de cadena de los ésteres de *p*-nitrofenilo evaluados. La enzima Nstcl presentó mayor actividad sobre ésteres de cadena corta (acetato de *p*-nitrofenilo, C2:0) obteniéndose el máximo valor de 366 U/mg proteína. En contraste, la enzima Stcl mostró una mayor actividad hacia ésteres de cadena larga (palmitato de *p*-nitrofenilo, C16:0 y estearato, C18:0), mostrando el máximo valor con estearato de *p*-nitrofenilo (104 U/mg proteína), (Figura 48).

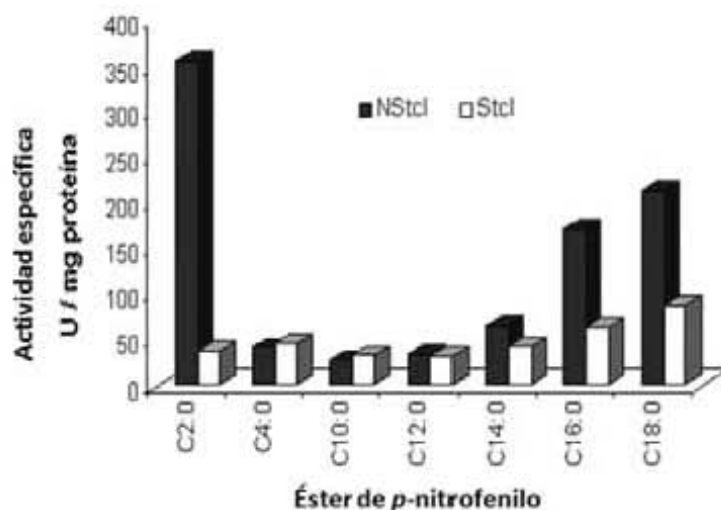


Figura 48- Actividad de las enzimas sobre ésteres de *p*-nitrofenilo con diferente largo de cadena. La actividad se midió con el método espectrofotométrico a pH 7.5, 37°C. ■ NstcI, □ StcI. Los resultados son el promedio de tres réplicas.

7.12.4 Perfil de desacetilación de compuestos fenólicos bioactivos

Como primer sustrato a evaluar se consideró utilizar el sustrato que la enzima utiliza naturalmente en la vía de biosíntesis de esterigmatocistina (versiconal hemiacetal acetato (VHA) ó versiconal acetato). Sin embargo, para su producción y extracción era necesario contar con una mutante hiperproductora de dicho sustrato, previamente obtenida por el grupo de Yabe, la cual no fue posible obtener. Se procedió entonces a evaluar la desacetilación de compuestos que tienen una estructura similar a VHA por ambas enzimas (NstcI y StcI). La estructura de estos compuestos, los cuales se dividieron en 3 grupos, se muestra en la Figura 49 y los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 4. Se observa que las dos enzimas tienen una amplia especificidad de sustrato, pero la afinidad por los mismos es diferente.

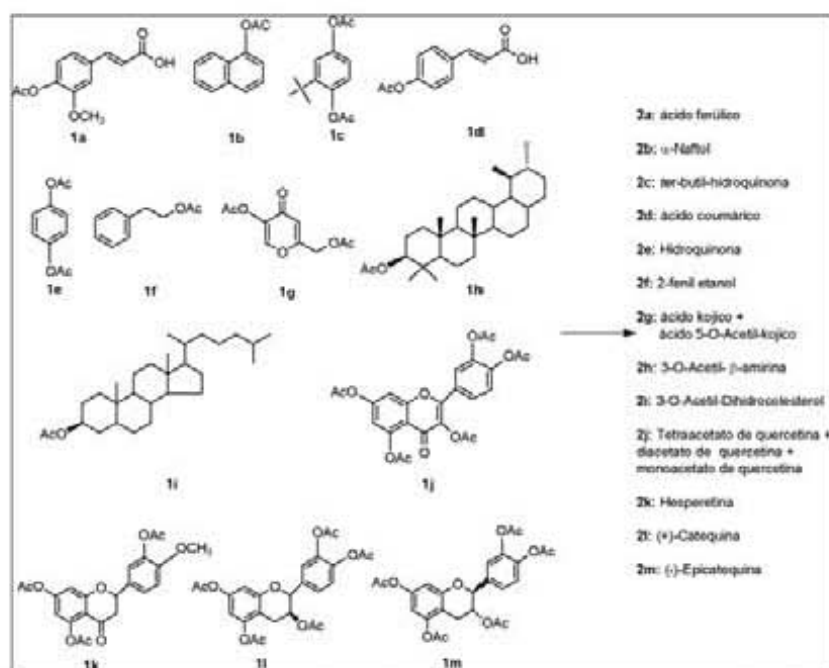


Figura 49- Estructura de los compuestos fenólicos acetilados evaluados (1a-1m) y de los productos obtenidos (2a-2m).

El grupo I lo constituyen los fenoles, algunos compuestos de este grupo tienen la estructura más parecida al sustrato natural de la enzima (VHA) como son: acetato de *p*-nitrofenilo, α -naftil acetato y acetato de hidroquinona. Todos los compuestos fueron desacetilados completamente (100%) por las dos enzimas (NstcI y StcI) como se esperaba. En este grupo también se incluyen ácidos hidroxicinámicos. Para estos compuestos si se encontró una diferencia en la hidrólisis: sorprendentemente la enzima NstcI hidrolizó únicamente el ácido 4-O-acetil-ferúlico eficientemente (96% de conversión), mientras que la enzima StcI hidrolizó únicamente el ácido 4-O-acetil-coumárico (25% de conversión). En ambos casos se recuperó la actividad antioxidante después de la desacetilación de los compuestos (Figura 50). La hidrólisis del compuesto 1,4-O-Diacetil-2-*ter*-butil-hidroquinona (TBHQ), incluido también en este grupo, no se detectó en las condiciones ensayadas.

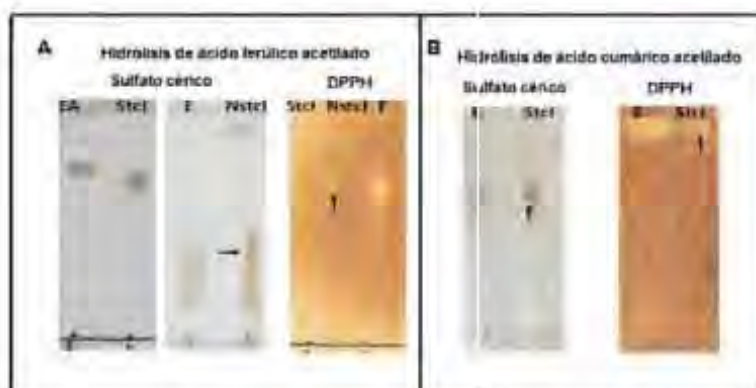


Figura 50- Cromatografía en capa fina (CCF) de los productos de hidrólisis enzimática con las enzimas NstcI y StcI de: A, ácido ferúlico acetilado y B, ácido cumárico acetilado. Se utilizaron como reactivos: sulfato cénico y DPPH para evaluar la capacidad antioxidante. E, estándar sin acetilar y E/A, estándar acetilado. Se sellaron los productos de reacción con una lámina.

En el caso de la desacetilación de fenoles, es claro que la presencia del grupo *tert*-butil es un impedimento estérico para su hidrólisis, dado que los resultados fueron negativos para las dos variantes y, en la ausencia de este grupo la hidrólisis fue eficiente para las dos enzimas. Otro grupo funcional importante es el metoxilo en el caso de los ácidos ferúlico y cumárico. La ausencia del mismo en el ácido cumárico evita la desacetilación por la NstcI.

Para los sustratos del grupo II se observó que las dos enzimas pueden hidrolizar la 3-O-acetil- β -amirina con un porcentaje bajo de conversión, 47% para NstcI y 33% para StcI. Ninguna de las enzimas hidrolizó el 3-O-Acetil-dihidrocolesterol en las condiciones evaluadas. La enzima NstcI desacetiló el 1-O-Acetil-2-feniletanol con bajo rendimiento (30%) y; esta misma enzima hidrolizó el ácido 5, 1'-O-Diacetil-kójico con un porcentaje de conversión del 75%. Con respecto a este último resultado, es muy interesante el hecho de que la enzima no realizó una desacetilación completa de este compuesto. El análisis de los productos de hidrólisis por RMN reveló una desacetilación incompleta, la cual fue regioselectiva para la posición del carbono 5 (C5), obteniéndose el producto ácido 5-O-acetil kójico. Se ha reportado para el ácido kójico acetilado que la desacetilación del carbono 5, es la que se considera importante para la recuperación de la actividad antioxidante; lo cual se pudo observar también en cromatografía en capa fina (Figura 51)

(Ho Sik Rho *et al.*, 2007). Es importante destacar que el producto de reacción observado tiene un R_f diferente al obtenido para el estándar de ácido kójico sin acetilar, lo cual concuerda con la desacetilación incompleta indicada por RMN (Figura 51). También en la placa revelada con DPPH se visualizó la recuperación de la capacidad antioxidante (mancha amarilla), la cual concuerda con lo reportado para el carbono 5 del ácido kójico por Ho Sik Rho *et al.* (2007) (Figura 51).

En el caso de alcoholes alifáticos y fenoles, los resultados fueron más heterogéneos para ambas formas enzimáticas. El núcleo de colesterol y TBHQ no fueron reconocidos por ninguna enzima. La amirina presenta el grupo más voluminoso y fue hidrolizado por ambas enzimas en proporciones similares. Es importante realizar estudios de cristalización de ambas enzimas para esclarecer mejor estos resultados.



Figura 51. Cromatografía en capa fina (CCF) de los productos de hidrólisis enzimática con la enzima Nstcl del ácido 5-[(³-*O*-acetil)-kójico]. Se utilizaron como reveladores sulfato cerico y DPPH para evaluar la capacidad antioxidante. E: estándar sin acetilar. Se señala el producto de reacción con una flecha.

Finalmente, para el grupo de los flavonoides (grupo III), se observó que todos los sustratos probados fueron hidrolizados eficientemente por la enzima Nstcl con porcentajes de conversión del 95 al 100%, observándose el porcentaje de conversión más bajo para la epicatequina acetilada (60%). En contraste, la enzima Stcl desacetiló dichos compuestos con porcentajes de conversión bajos (15-20%), y el valor más alto se encontró para la catequina acetilada (63%).

Cabe resaltar que para la desacetilación de quercetina se obtuvieron diferentes patrones de productos para cada enzima y que en todos los casos se observó en CCF (la recuperación de la capacidad antioxidante después de la desacetilación al revelar con DPPH (Figura 52)

Los porcentajes de conversión fueron claramente más altos para todos los flavonoides cuando se utilizó la esterasa NstcI. Estos compuestos presentan un grupo voluminoso en su estructura (al menos tres anillos), de manera similar a lo observado en la estructura del VHA, que es el sustrato que la enzima utiliza en la vía de biosíntesis de esterigmatocistina. Como se observó en las placas de CCF, para los compuestos del grupo III, se obtienen diferentes productos, por lo que se considera que es necesario determinar el patrón exacto de desacetilación. En CCF se observó que este patrón era diferente del obtenido con *C. antarctica* (resultados no mostrados).

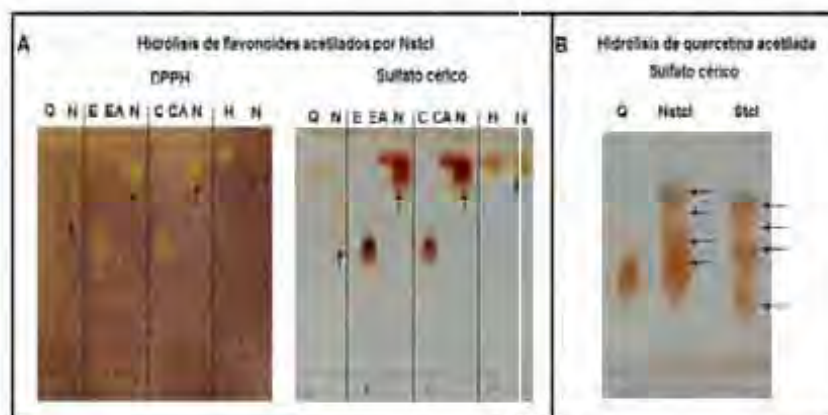


Figura 52- Cromatografía en capa fina (CCF) de los productos de hidrólisis enzimática de los flavonoides acetilados. Se utilizaron como reveladores: sulfato cérico y DPPH para evaluar la capacidad antioxidante. **A.** Hidrólisis con la enzima NstcI. Q, estándar quercetina, E, estándar epicatequina, EA, estándar epicatequina acetilada, C, estándar catequina, CA, estándar catequina acetilada, H, estándar hesperetina, N, muestra hidrolizada con la enzima NstcI. **B.** Hidrólisis de quercetina acetilada por NstcI y SstcI. Se señalan los productos de transacilación con una flecha.

TABLA 4. Deacetilación de los diferentes compuestos fenólicos bioactivos por las esterasas recombinantes Nst1 y St1 de *A. nidulans**

Grupo	Compuesto	Estructura acetilada (Figura 4B)	Punto de fusión del compuesto acetilado (°C)	m% compuesto acetilado (g/mol)	m% compuesto desacetilado (g/mol)	% Conversión	
						Nst1	St1
I Fenoles	Ácido ferúlico	1a	187	236	194	96	0
	<i>o</i> -nifol TBHQ	1b	113	186	144	100	100
	(<i>tert</i> -butil hidroquinona)	1c	49	250	NH	0	0
	Ácido coumárico	1d	198	206	164	0	25
	Hidroquinona	1e	50	194	110	100	98
II Alcoholes alifáticos	Fenil etanol	1f	105	164	122	0	30
	Ácido kojico	1g	75	226	184	75	0
	β -Amirina	1h	220	408	426	47	33
	Dihidrocolesterol	1i	87	428	NH	0	0
III Flavonoides	Quercetina	1j	181	512	302	95	15
	Hesperidina	1k	108	485	302	100	20
	(+) Catequina	1l	102	300	290	100	63
	(-) Epicatequina	1m	135	444	290	60	23

*El tiempo de reacción fue de 48 h a 37°C.
NH = No hidroliza por las variantes de St1.

Los modelos estructurales mostraron que el sitio activo en la proteína StcI se encuentra completamente accesible al solvente, mientras que en la proteína NstcI se encuentra cubierto parcialmente por los residuos adicionales en el N-terminal, formando parte de una tapa o una hendidura elaborada donde se encuentra el sitio activo. Considerando además las diferencias en actividad obtenidas hacia varios sustratos, se puede decir que se confirma la hipótesis planteada inicialmente y que se refiere a que una de las funciones de la región N-terminal adicional de la proteína NstcI es modular o discriminar el acceso del sustrato al sitio activo. Por tanto, la ausencia de este motivo modifica la quimio-, regio-, y estereoespecificidad de la enzima. Además, esta región puede tener una función importante en la estabilidad.

Por otra parte, la superficie hidrofóbica expuesta en la StcI puede inducir agregación de la proteína como resultado de interacciones hidrofóbicas, como se vio en los geles nativos. La pérdida de la estructura en la proteína StcI puede reducir el empaquetamiento interior de la molécula que mantiene a la enzima plegada por largo tiempo. Esta idea es sustentada por las diferencias observadas en los niveles de expresión de las dos clonas y las diferencias de respuesta a cambios de pH y temperatura. Además, los rendimientos para todos los productos acetilados evaluados y la actividad sobre los sustratos utilizados comúnmente para esterasas siempre fueron mayores para la forma NstcI.

No existen reportes sobre las propiedades bioquímicas y catalíticas de la proteína StcI. Únicamente se ha reportado como una lipasa/esterasa putativa por Brown *et al.* (1996). En este trabajo se encontró que la variante NstcI es una esterasa; mientras que la variante StcI como fue reportado por Brown presenta características de lipasa. Esto se correlaciona con el papel del N-terminal. Existen pocos reportes sobre la función de la región N-terminal en la especificidad de sustrato de enzimas. Sayari y colaboradores (2005) encontraron una variante más corta de una lipasa de 32 kDa de *Rhizopus oryzae* después de almacenar el medio de cultivo a 0°C por varios meses. La variante tiene un peso molecular de 29 kDa y resulta de la pérdida de 28 aa en la región N-terminal de la lipasa de 32 kDa. Estos autores encontraron que las dos enzimas presentaban diferente regio- y estereoselectividad. Por otra parte, Mandrich y colaboradores (2005) reportaron un estudio estructural muy interesante sobre el papel de la región N-terminal en la familia de las lipasas sensible a hormonas (HSL), destacando la importancia de este dominio en varias propiedades de las enzimas.

Dichos autores encontraron diferentes propiedades catalíticas en una mutante de una esterasa termofílica que pertenece a la familia HSL, a la cual se le removieron 35 aa de la región N-terminal. Esta región de 35 aa se encuentra formando una tapa ("cap domain") que cubre el sitio activo en la enzima silvestre. Después de removerlo observaron que esta delección abre el acceso al sitio activo y favorece la actividad de la enzima hacia triglicéridos de cadena larga, lo que le confiere características de lipasa. Es interesante, que estos últimos resultados reportados por Mandrich *et al.* (2005), concuerdan con lo observado en el presente trabajo para la enzima NstcI, donde se encontraron diferencias en la hidrólisis de ésteres de *p*-nitrofenilo, después de eliminar los residuos de aa 1-29 de la enzima NstcI. Se observó que contrario a lo detectado para la enzima NstcI, la cual tuvo la mayor actividad hacia sustratos de cadena corta (acetato de *p*-nitrofenilo), la variante StcI mostró la mayor actividad hacia sustratos de cadena larga (estearato de *p*-nitrofenilo). Se obtuvieron resultados similares en la hidrólisis de ésteres de etilo con grupo acilo de largo de cadena C4:0 a C16:0 por el método del pH-stat. Cabe recordar que en los modelos estructurales obtenidos para las enzimas StcI y NstcI se encontró también una tapa ("cap domain") en la región N-terminal que cubre el sitio activo. Además, se ha reportado que en las enzimas de la familia de las hidrolasas se han observado comúnmente inserciones en la estructura canónica, ya sea en la región amino o carboxilo terminal. Se cree que dichas inserciones pueden modular la especificidad de sustrato de las enzimas (Zhu *et al.*, 2003). En este trabajo se muestra que la enzima NstcI puede presentar una inserción de 29 aa, predominantemente helicoidal, en la región N-terminal, la cual puede modular la especificidad de sustrato.

Finalmente, la diferencia en quimioselectividad de las enzimas puede ser útil para procesos biotecnológicos. Un ejemplo claro de esto es la diferencia en selectividad entre los sustratos del grupo II (ácidos hidroxicinámicos).

En el caso de la desacetilación de flavonoides, la cual es una transformación muy importante a nivel industrial, pocas enzimas pueden llevar a cabo este tipo de reacciones (Basak *et al.*, 2003; Lambusta *et al.*, 2003; Basak *et al.*, 2008). Más aún, las condiciones de reacción en todas las desacetilaciones evaluadas se pueden optimizar para incrementar los rendimientos.

8. CONCLUSIONES

- Se encontraron dos secuencias de expresión para la proteína StcI que corresponden a la región N y C-terminal. Una de ellas codifica un péptido adicional de 29 aminoácidos en la región N-terminal que forma parte de la enzima, contrario a lo que se había reportado para la esterasa StcI
- La proteína StcI con el polipéptido adicional de 29 aminoácidos en la región N-terminal generó una proteína de 315 aminoácidos, la cual denominamos NstcI con una masa molecular teórica de 34.81 kDa y un pI de 4.8.
- Se clonó la esterasa StcI de *Aspergillus nidulans* PW1 en *E. coli* pero la enzima expresada se dirige mayoritariamente como un agregado insoluble en cuerpos de inclusión. Sólo una parte se recuperó como proteína soluble con baja actividad.
- La inducción de StcI a 25°C durante 18h favorece el direccionamiento de la enzima a periplasma y disminuye la formación de cuerpos de inclusión. Además, el amortiguador de lisis juega un papel muy importante en la estabilidad y solubilidad de la enzima, lo cual repercute en la actividad de la misma. Sin embargo, sólo una parte se recuperó como proteína soluble con baja actividad
- La proteína StcI solubilizada de cuerpos de inclusión tiene actividad baja tras una incubación a temperatura ambiente durante 24 h en presencia de la biomasa, probablemente debido a un mal plegamiento de StcI
- El análisis filogenético mostró que las esterasas involucradas en la biosíntesis de aflatoxinas y ST se agrupan y pertenecen a la familia de las HSL
- Las proteínas StcI y NstcI se expresaron correctamente sin glicosilaciones en el sistema eucariote (*P. pastoris*) con una actividad mayor a la observada en la enzima recombinante en *E. coli*

- La proteína recombinante NstcI se expresa con una actividad de 360 U/mg proteína después de 24 h de inducción en *P. pastoris*. Su masa molecular aparente es de 35 kDa y un pI de 4.7.
- La proteína recombinante StcI se expresa con una actividad de 39 U/mg proteína después de 48 h de inducción en *P. pastoris*, tiene una masa molecular aparente de 31 kDa y un pI de 5.3. En geles nativos se observa que esta enzima se encuentra principalmente formando agregados.
- Los anticuerpos anti-StcI generados tienen una alta especificidad por ambas enzimas, el título del anticuerpo es de 1:40,000 y la cantidad mínima de proteína detectable con este anticuerpo es de 20 µg. El anticuerpo es capaz de reconocer a ambas enzimas en su estado nativo.
- Se corroboró la expresión de *nstcI* en *A. nidulans*, lo cual nos confirmó el hecho de que la región N-terminal adicional encontrada forma parte de la enzima.
- La enzima NstcI se expresa constitutivamente en los diferentes medios y condiciones evaluadas en este trabajo.
- En medio sólido con avena se observa más claramente la producción de la esterasa silvestre NstcI en *A. nidulans* con una masa molecular aproximada de 35 kDa y pI de 4.8.
- Después de la concentración y purificación de la proteína NstcI a partir del extracto celular de *A. nidulans* crecido en avena, se observó una segunda banda con una masa molecular aproximada de 31 kDa, que corresponde al reportado para la proteína StcI.
- Las variantes mostraron una amplia especificidad de sustrato y diferencias entre ellas en la especificidad hacia los grupos de sustratos hidrolizados.

- Las dos enzimas muestran diferente regioselectividad, dado que generaron diferentes productos después de la hidrólisis de algunos sustratos del grupo III y de ácido kójico.
- Las diferencias estructurales observadas entre las variantes en los modelos obtenidos, conllevan a las diferencias observadas en las propiedades bioquímicas de ambas enzimas.
- Se corroboró experimentalmente que la región adicional en la Nstcl modifica algunas propiedades bioquímicas de la enzima como el acceso del sustrato al sitio activo.
- La desacetilación parcial realizada por ambas enzimas sobre flavonoides y ácido kójico generó productos que conservan el poder antioxidante y muy posiblemente con mejores propiedades de estabilidad y solubilidad.
- La hidrólisis de ésteres de *p*-nitrofenilo con diferente largo de cadena mostró un comportamiento típico de esterasa para la enzima Nstcl y de lipasa para la proteína Stcl.
- La región adicional de 29 aminoácidos es importante para la estabilidad de la enzima, dado que siempre se observó una mayor actividad para la esterasa Nstcl y para la respuesta a pH y temperatura donde se observaron ligeras diferencias.
- La ingeniería de proteínas puede ser utilizada para modificar el segmento N-terminal de la esterasas Nstcl para cambiar la regio- o quimioselectividad de esta u otras enzimas semejantes.

9. RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS

- A partir de las secuencias de carboxilesterasas encontradas en el genoma de *A. nidulans*, en la base de datos de secuencias EST y en la genoteca del Dr. Aramayo, se pueden aislar genes con actividad lipasa/esterasa o cutinasa que pueden corresponder a nuevas e interesantes enzimas lipolíticas.
- Una parte de la secuencia adicional encontrada en la enzima NstcI se encuentra codificada por un exón distinto al del resto de la proteína, esto lo convierte en un dominio interesante para modificar las propiedades bioquímicas de la proteína por modificación de su espacio de secuencia en futuros estudios.
- Determinar si las dos proteínas observadas en el inmunoanálisis después de la inmunopurificación de la esterasa a partir del extracto celular concentrado de *A. nidulans*, se derivan del procesamiento postraduccional de la proteína NstcI “*in vivo*” ó del uso selectivo de sitios de inicio de la transcripción.
- Es interesante determinar la estructura de cada proteína ya sea por cristalografía ó resonancia magnética nuclear, con el fin de validar los modelos estructurales obtenidos.
- Caracterizar por espectrometría de masas y RMN cada uno los productos obtenidos después de la hidrólisis de flavonoides.
- Optimizar las condiciones de hidrólisis de los sustratos que presentaron un bajo porcentaje de conversión a producto.
- Evaluar la capacidad de las enzimas para llevar a cabo reacciones de lipofilización de flavonoides y ácido kójico y su aplicación en alimentos.
- Inmovilizar las enzimas recombinantes, caracterizar los biocatalizadores y evaluar el uso de estos en biocatálisis industrial.

10. BIBLIOGRAFIA

- Anderson, J. A. y Chung, C. H. 1990. Conversion of versiconal acetate to versiconal and versicolorin C in extracts from *Aspergillus parasiticus*. *Mycopathol* 110: 31-35.
- Andlauer, W. y Furst, P. 2002. Nutraceuticals a piece of history, present status and outlook. *Food Research Int.* 35: 171-176.
- Ardhaoui, M; Falcimaigne, A; Engasser, J. M; Moussou, P; Pauly G. y Ghoul M. 2004^a. Enzymatic synthesis of new aromatic and aliphatic esters of flavonoids using *Candida antarctica* lipase as biocatalyst *Biocatal Biotransform* 22(4): 253-259.
- Ardhaoui, M; Falcimaigne, A; Ognier, S; Engasser, J. M; Moussou, P; Pauly, G. y Ghoul, M. 2004^b. Effect of acyl donor chain length and substitutions pattern on the enzymatic acylation of flavonoids. *J Biotechnol.* 110: 265-272
- Arpigny, J. L. y Jaeger, K. E. 1999. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem J.* 343: 177-183.
- Aspergillus Comparative Database* 2008. Broad Institute of MIT and Harvard. http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/aspergillus_group/MultiHome.html
- Basak, A; Mandal, S. y Bandyopadhyay, S. 2003 Regioselective hydrolysis of pentaacetyl catechin and epicatechin by porcine liver esterase *Bioorg Med Chem Lett* 13(6): 1083-1085.
- Basak, A; Das, S. y Bisai, S. 2008 Studies on the porcine liver esterase-catalyzed hydrolysis of pentaacetyl catechin and epicatechin: Application to the synthesis of novel dimers and trimers. *Bioorg Med Chem Lett.* 18(17): 4900-4903.
- Bhatnagar, D; Cary, J. W; Ehrlich, K; Yu, J. y Cleveland, T. 2006. Understanding the genetics of regulation of aflatoxin production and *Aspergillus flavus* development. *Mycopathol* 162(3): 155-166.
- Beisson, F; Tiss, A; Riviere, C. y Verger, R. 2000 Methods for lipase detection and assay: a critical review. *Eur J Lipid Sci Technol* 2: 133-153.
- Bennett, J. W; Henderberg, A. y Grossman, K. 1989. Sterigmatocystin production on complex and defined substrates. *Mycopathol* 105(1): 35-38.
- Bennett, J. W. y Klich, M. A. 1992 *Aspergillus* Biology and Industrial Applications. Ed. Butterworth-Heinemann. p p. 3-14.
- Bendtsen, J. D; Nielsen, H; von Heijne, G. y Brunak, S. 2004. Improved prediction of

- signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol.* **340**: 783-795.
- Benoit, I; Navarro, D; et al.** 2006. Feruloyl esterases as a tool for the release of phenolic compounds from agro-industrial by-products. *Carbohydr Res.* **341(11)**: 1820-1827.
- Benoit, I; Coutard, B; Oubelaid, R; Asther, M. y Bignon, C.** 2007. Expression in *Escherichia coli*, refolding and crystallization of *Aspergillus niger* feruloyl esterase A using a serial factorial approach. *Protein Expr Purif* **55(1)**: 166-174.
- Bornscheuer, U. T. y Kazlauskas, R. J.** 1999. *Hydrolases in organic chemistry. Regio- and stereoselective biotransformations* Ed. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany
- Bornscheuer, U. T; Pleiss, J; Schmidt-Dannert, C. y Schmid, R. D.** 2000. Lipases from *Rhizopus* species: genetics, structure and applications. In: *Protein Engineering in Industrial Biotechnology*. L. Alberghina, ed. Ed. Amsterdam: Harwood Academic Publishers. pp. 115 - 134.
- Bornscheuer, U. T.** 2002. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiol Rev.* **26**: 73–81.
- Brauch, K. R; Bennett, J. W. y Bhatnagar, D.** 1993. Sterigmatocystin production by *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Newsl.* **40**: 20–21.
- Brockman, H. L.** 1984. General features of lipolysis: reaction scheme, interfacial structure and experimental approaches. In: *The Lipases* Ed Elsevier Science Publishers B.V. p.p. 4-37
- Brown, D. W; Yu, J. H; Kelkar, H. S; Fernandes, M; Nesbitt, T. C; Keller, N. P; Adams, T. H. y Leonard, T. J.** 1996. Twenty-five coregulated transcripts define a sterigmatocystin gene cluster in *Aspergillus nidulans*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93(4)**: 1418–1422.
- Burge, C. B. y Karlin, S.** 1998. Finding the genes in genomic DNA. *Curr Opin Struct Biol.* **8**: 346-354.
- Calvo, A. M; Wilson, R. A; Bok, J. W. y Keller, N. P.** 2002. Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiol Mol Biol Rev* **66(3)**: 447-459.
- Carbonneau, M. A; Le'ger, C. L; Descomps, B; Michel, F. y Monnier, L.** 1998. Improvement in the antioxidant status of plasma and low-density lipoprotein in subjects receiving a red wine phenolics mixture. *J Am Oil Chem Soc.* **75**: 235-240

- Cerenghino, J. L. y Cregg, J. M. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. FEMS Microbiol Rev. 24(1): 45-66.
- Chang, P. K. y Yu, J. 2002. Characterization of a partial duplication of the aflatoxin gene cluster in *Aspergillus parasiticus* ATCC 56775. Appl Microbiol Biotechnol. 58(5): 632-636.
- Chang, P. K.; Yabe, K. y Yu, J. 2004. The *Aspergillus parasiticus* estA-encoded esterase converts versiconal hemiacetal acetate to versiconal and versiconol acetate to versiconol in aflatoxin biosynthesis. Appl Environ Microbiol. 70: 3593-3599.
- Chebil, L.; Humeau, C.; Falcimaigne, A.; Engasser, J. M. y Ghoul, M. 2006. Enzymatic acylation of flavonoids. Process Biochem. 41: 2237-2251.
- Cotty, P. J.; Bayman, P.; Egel, D. S. y Elias, K. S. 1994. Agriculture, Aflatoxins and *Aspergillus*. In: The Genus *Aspergillus*. Powell y Peberdy eds. 1-29.
- Cregg, J. M.; Barringer, K. J.; Hessler, A. Y. y Madden, K. R. 1985. *Pichia pastoris* as a host system for transformations. Mol Cell Biol. 5(12): 3376-3385.
- Cregg, J. M.; Vedvick, T. S. y Raschke, W. C. 1993. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. Bio/Technology 11: 905-910.
- De Caprio, D.; Vinson, J. P.; Pearson, M. D.; Montgomery, P.; Doherty, M. y Galagan, J. E. 2007. Conrad: Gene prediction using conditional random fields. Genome Res 17(9): 1389-1398.
- Derewenda, Z. S. y Sharp, A. M. 1993. News from the interface: The molecular structures of triacylglyceride lipases. Trends Biochem Sci. 18: 20-25.
- Derewenda, U.; Swenson, L.; Green, R.; *et al.* 1994. An unusual buried polar cluster in a family of fungal lipases. Nat Struct Biol. 1: 36-47.
- De Simone, G.; Galdiero, S.; Manco, G.; Lang, D.; Rossi, M. y Pedone, C. 2000. A snapshot of a transition state analogue of a novel thermophilic esterase belonging to the subfamily of mammalian hormone-sensitive lipase. J Mol Biol. 303(5): 761-771.
- De Simone, G.; Mandrich, L.; Menchise, V.; Giordano, V.; Febbraio, F.; Rossi, M.; Pedone, C. y Manco, G. 2004. A Substrate-induced Switch in the Reaction Mechanism of a Thermophilic Esterase. J Biol Chem 279: 6815-6823.
- Douglas, S. E. 1994. DNA Strider. A macintosh program for handling protein and nucleic acid sequences. Methods Mol Biol 25: 181-194.

- Ehrlich, K. C; Chaug, P. K; Yu, J. y Cotty, P. J. 2004. Aflatoxin biosynthesis cluster gene *cypA* is required for G aflatoxin formation. *Appl Environ Microbiol.* 70 (11): 6518-6524.
- Feng, G. H. y Leonard, T. J. 1998. Culture conditions control expression of the genes for aflatoxin and sterigmatocystin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus* and *A. nidulans*. *Appl Environ Microbiol.* 64(6): 2275-2277
- Ferrer, P; Montesinos, J. L; Valero, F. y Solà, C. 2001. Production of native and recombinant lipases by *Candida rugosa*: a review. *Appl Biochem Biotechnol.* 95: 221-255.
- Figueroa-Espinoza, M. C. y Villeneuve, P. 2005. Phenolic acids enzymatic lipophilization. *J Agric Food Chem.* 53(8): 2779-2787.
- Fischer, M. y Pleiss, J. 2003. The Lipase Engineering Database: a navigation and analysis tool for protein families. *Nucleic Acids Res.* 31(1): 319-321.
- Fogarty, W. 1994. Enzymes of the Genus *Aspergillus*. In *Aspergillus*. (Smith, J. E). Eds. Plenum Press. p.p. 177-218.
- Foglia, F; Mandrich, L; Pezzullo, M; Graziano, G; Barone, G; Rossi, M; Manco, G. y Del Vecchio, P. 2007. Role of the N-terminal region for the conformational stability of esterase 2 from *Alicyclobacillus acidocaldarius*. *Biophys Chem.* 127(1-2): 113-22
- Forgacs, E. y Cserhati, T. 2002. Thin-layer chromatography of natural pigments: new advances. *J Liq Chrom & Rel Technol.* 25: 1521-1541.
- Fragopolou, E; Nomikos, T; *et al.* 2007. Biological activity of acetylated phenolic compounds. *J Agric Food Chem.* 55(1): 80-89.
- Galagan, J. E. *et al.* 2005. Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature.* 438:1105-1115.
- García-Lepe, R; Nuero, O. y Reyes, F. 1997. Lipases in autolysed cultures of filamentous fungi. *Lett Appl Microbiol.* 25: 127-130.
- Gasteiger, E; Gattiker, A; Hoogland, C; Ivanyi, I; Appel, R. D. y Bairoch, A. 2003. ExpASY: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res.* 31: 3784-3788.
- Goodman, J. M. 1985. Dihydroxyacetone synthase is an abundant constituent of the methanol-induced peroxisome of *Candida boidinii*. *J Biol Chem.* 260(11): 7108-7113.
- Gulati, R; Bhattacharya, A; Prasad, A. K; Gupta, R. Parmar, V. S. y Saxena, R. K.

2001. Biocatalytic potential of *Fusarium globulosum* lipase in selective acetylation/deacetylation reactions and in ester synthesis J Appl Microbiol. **90**(4): 609-613.
- Hall, T. 2007 BioEdit Biological Sequence Alignment Editor for Win95/98/NT/2K/XP. Available via <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html> Accessed 29 Jan 2007.
- Higgings, D. R. y Cregg, J. M. 1998. *Pichia* protocols. No. 103. In: Methods in molecular biology. pp. 270
- Holmquist, M. 2000 Alpha/Beta-hydrolase fold enzymes: structures, functions and mechanisms Curr Protein Pept Sci. **1**(2): 209-35.
- Ho, Sik Rho; Heung, Soo Baek; Jae, Won You; *et al.* 2007 New 5-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-4H-pyran-4-one derivative has both tyrosinase inhibitory and antioxidant properties. Bull Korean Chem Soc. **28** (3): 471-73.
- Hotelier, T. *et al.* 2004. ESTHER, the database of the alpha/beta-hydrolase fold superfamily of proteins. Nucleic Acids Res. **32**: D145.
- Hsieh, D. P; Wan, C. C. y Billington, J. A. 1989 A versiconal hemiacetal acetate converting enzyme in aflatoxin biosynthesis. Mycopathol. **107**(2-3): 121-126
- Ilgel, C; Cereghino, J. L. y Cregg, J. M. 2005 *Pichia pastoris* In: Production of recombinant proteins: Novel microbial and eukaryotic expression systems Gerg Gellisen ed. Ed. Wiley-VCH Verlag GmbH. p p. 143-160
- Jaeger, K. E; Ransac, S; Dijkstra, B. W; *et al.* 1994. Bacterial lipases. FEMS Microbiol. Rev. **15**. 29-63.
- Jaeger, K. y Reetz, M. 1998. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology Trends Biotechnol. **16**(9): 396-403
- Jaeger, K; Dijkstra, B. W. y Reetz, M. T. 1999. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. Annu Rev Microbiol. **53**: 315-351
- Jaeger, K. y Eggert, T. 2002. Lipases for biotechnology. Curr Opin Biotechnol. **13**: 390-397
- Jones, D. T. 1999 Protein secondary structure prediction based on position- specific scoring matrices. J Mol Biol. **292** 195-202.
- Jones, R. N. y Rickards, G. K. 1991. Practical Genetics Open University Press. USA. p.p

228.

Kadereit, D. y Waldmann, H. 2001. Enzymatic protecting group techniques. *Chem Rev.* **101(11)**: 3367-96.

Kafer, E. 1977. Meiotic and mitotic recombination in *Aspergillus* and its chromosomal aberrations. *Adv Genet.* **19**: 33-131.

Kakariari, E.; Georgalaki, M. D.; Kalantzopoulos, G. y Tsakalidou, E. 2000. Purification and characterization of an intracellular esterase from *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *freudenreichii* ITG 14. *Le Lait.* **80**: 491-501

Kato, N.; Brooks, W. y Calvo, A. M. 2003. The expression of sterigmatocystin and penicillin genes in *Aspergillus nidulans* is controlled by *veA*, a gene required for sexual development *Eukaryot Cell.* **2(6)**: 1178–1186

Kawasaki, L; Farrés, A. y Aguirre, J. 1995. *Aspergillus nidulans* mutants affected in acetate metabolism isolated as lipid nonutilizers. *Exp Mycol.* **19(1)**: 81-85.

Kelkar, H. S; Skloss, T. W; Haw, J. F; Keller, N. P. y Adams, T. H. 1997. *Aspergillus nidulans stel* encodes a putative cytochrome P-450 monooxygenase required for bisfuran desaturation during aflatoxin/sterigmatocystin biosynthesis *J Biol Chem.* **272(3)**: 1589-1594

Keller, N. P; Kantz, N. J. y Adams, T. H. 1994. *Aspergillus nidulans* *veA* is required for production of the mycotoxin sterigmatocystin *Appl Environ Microbiol.* **60(5)**: 1444-1450.

Keller, N. P; Nesbitt, C; Sarr, B; Phillips, T. D. y Burow, G. B. 1997. pH Regulation of sterigmatocystin and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus* spp. *Phytopathol.* **87(6)**: 643-648.

Klich, M. A; Mullaney, E. J; Daly, C. B. y Cary, J. W. 2000. Molecular and physiological aspects of aflatoxin and sterigmatocystin biosynthesis by *Aspergillus tamarii* and *A. ochraceoroseus*. *Appl Microbiol Biotechnol.* **53(5)**: 605-609.

Koseki, T; Miwa, Y. *et al.* 2005. Biochemical characterization of recombinant acetyl xylan esterase from *Aspergillus awamori* expressed in *Pichia pastoris*: mutational analysis of catalytic residues. *Biochim Biophys Acta.* **1749(1)**: 7-13.

Kozak, M. 1987. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.* **15 (20)**: 8125-8148.

Kumar, S; Tamura, K. y Nei, M. 2004. MEGA3: Integrated software for molecular

- evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform.* 5: 150-163.
- Kurtzman, C. P; Horu, B. W. y Hesseltine, C. W.** 1987. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 53(3): 147-158.
- Kusumoto, K; Goto, T. y Manabe, M.** 1989. Evaluation of activity for conversion of sterigmatocystin to aflatoxins in koji-molds. *Rep Natl Food Res Inst* 54: 14-17.
- Kusumoto, K. y Hsieh, D. P.** 1996. Purification and characterization of the esterases involved in aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus*. *Can J Microbiol* 42(8): 804-810
- Laemmli, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685
- Lambert, C; Leonard, N; De Bolle, X. y Depiereux, E.** 2002. ESYPred3D: Prediction of proteins 3D structures. *Bioinformatics.* 18(9): 1250-1256.
- Lambusta, D; Nicolosi, G; Patti, A. y Sanfilippo, C.** 2003. Application of lipase catalysis in organic solvents for selective protection-deprotection of bioactive compounds. *J Mol Cat B.* 22: 271-277
- Lang, D. A; Mannesse, M. L; Haas, G. H; Verheij, H. M. y Dijkstra, B. W.** 1998. Structural basis of the chiral selectivity of *Pseudomonas cepacia* lipase. *Eur J Biochem.* 254: 333-340.
- Larkin, M. A; Blackshields, G; Brown, N. P; Chenna, R. et al.** 2007. ClustalW and Clustal X version 2. *Bioinformatics.* 23(21): 2947-2948
- Liu, Z; Li, X; Chi, Z; Wang, L; Li, J. y Wang, X.** 2008. Cloning, characterization and expression of the extracellular lipase gene from *Aureobasidium pullulans* HN2-3 isolated from sea saltern. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 94(2): 245-55.
- Longi, S; Czjzek, M; Lamzin, V; Nicolas, A. y Cambillau, C.** 1997. Atomic resolution (1.0 Å) crystal structure of *Fusarium solan* cutinase: stereochemical analysis. *J Mol Biol.* 268: 779-799.
- Machado, M. F. y De Castro-Prada, M. A.** 1998. Differential esterase expression in developmental mutants of *Aspergillus nidulans*. *Biochem Genet* 39(11-12): 357-68
- Maldonado, E; Ramirez, M. y Perez, A.** 1998. Anti-inflammatory activity of phenyl propanoids from *Cereopsis mutia* var *mutia*. *Planta Med* 64: 660-661.

- Mandrich, L; Merone, L; *et al.* 2005. Role of the N terminus in enzyme activity, stability and specificity in thermophilic esterases belonging to the HSL family. *J Mol Biol.* 345(3): 501-512.
- Mayordomo, I; Randez-Gil, F. y Prieto, J. 2000. Isolation, purification and characterization of a cold-active lipase from *Aspergillus nidulans*. *J Agric Food Chem.* 48: 105-109.
- McCuffin, L. J. y Jones, D.T. 2003. Improvement of the GenTHREADER method for genomic fold recognition. *Bioinformatics* 19: 874-881
- Mellou, F; Lazari, D; Skaltsa, H; Tselepis, A; Kolisis, F. N. y Stamatis, H. 2005. Biocatalytic preparation of acylated derivatives of flavonoid glycosides enhances their antioxidant and antimicrobial activity. *J Biotechnol.* 116: 295-304
- Mellou, F; Loutrari, H; Stamatis, H; Roussos, C. y Kolisis, F. N. 2006. Enzymatic esterification of flavonoids with unsaturated fatty acids: Effect of the novel esters on vascular endothelial growth factor release from K562 cells. *Process Biochem.* 41: 2029-2034.
- Milled, N; Beisson, F; De Caro, J; *et al.* 2001. Interfacial catalysis by lipases. *J Mol Cat B.* 11: 165-171.
- Minning, S; Serrano, A; Ferrer, P; Solá, C; Schmid, R. D. y Valero, F. 2001. Optimization of the high-level production of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*. *J Biothecnol.* 86(1): 59-70.
- Moffatt, B. A. y Studier F. W. 1986. Use of bacteriophage T-7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol.* 189(1):113-130.
- Morishita, H. y Ohnishi, M. 2001. Absorption, metabolism and biological activities of chlorogenic acids and related compounds. In *Studies in natural products chemistry, Bioactive natural products, Part F*, Ed. Elsevier Science: Oxford, U K. Vol. 25: 919-953.
- Motomura, M; Chihaya, N; Shinozawa, T; Mamazaki, T. y Yabe, K. 1999. Cloning and characterization of the O-methyltransferase I gene (*dmtA*) from *Aspergillus parasiticus* associated with the conversions of demethylsterigmatocystin to sterigmatocystin and dihydrodemethylsterigmatocystin to dihydrosterigmatocystin in aflatoxin biosynthesis. *Appl Environ Microbiol* 65(11): 4987-4994
- Nardini, M. y Dijkstra, B. W. 1999. Alpha/beta hydrolase fold enzymes: the family keeps

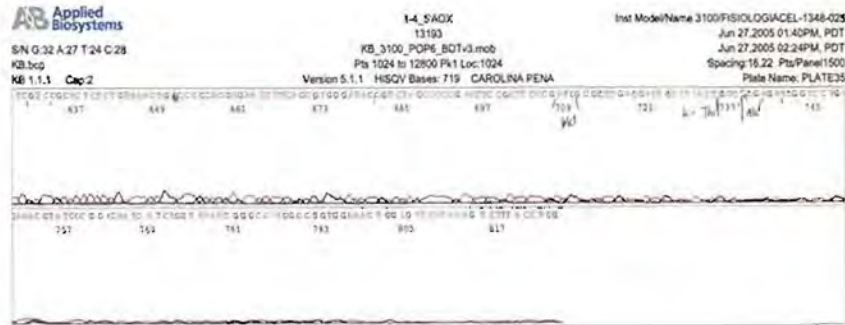
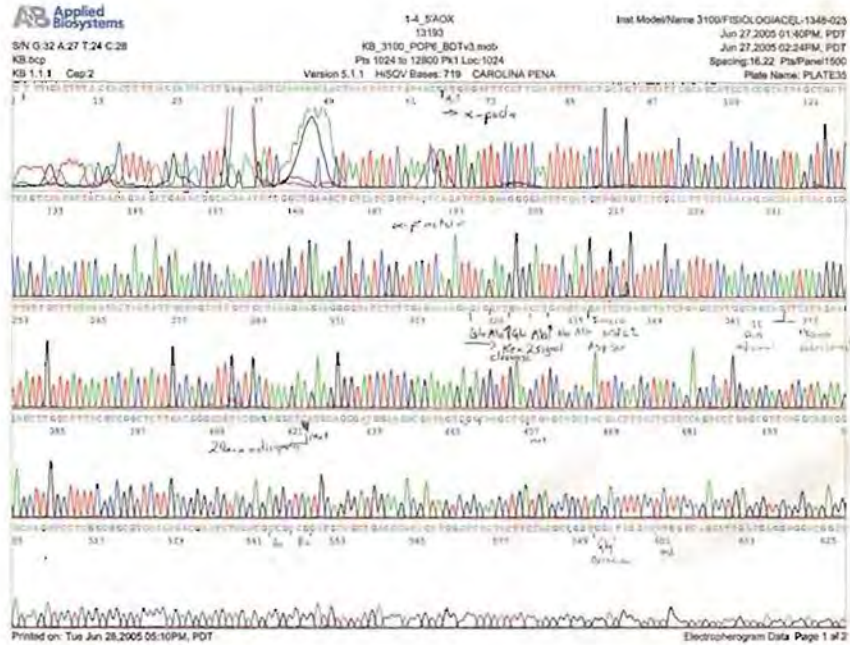
- growing. *Curr Opin Struct Biol.* 9(6): 732-737.
- Natoli, M; Nicolosi, G. y Piatelli, M. 1992. Regioselective alcoholysis of flavonoid acetates with lipase in an organic solvent. *J Org Chem.* 57: 5776-5778.
- O'Connor, K. C. y Bailey, J. E. 1988. Hydrolysis of emulsified tributyrin by porcine pancreatic lipase. *Enzyme Microb Technol.* 10: 352-356.
- Panda, T. y Gowrishankar, B. S. 2005. Production and applications of esterases. *Appl Microbiol Biotechnol.* 67(2): 160-9.
- Pandey, A; Benjamin, S. y Soccol, S. 1999. The realm of microbial lipases in biotechnology *Biotechnol Appl Biochem* 29: 119-131.
- Park, C. G; Kim, T. W; Oh, I. S; Song, J. K. y Kim, D. M. 2009. Expression of functional *Candida antarctica* lipase B in a cell-free protein synthesis system derived from *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog.* 25(2): 589-93.
- Parmar, V. S; Pati, H. N; Azim, A; Kumar, R; Bisht, K. S; Prasad, A. K. y Errington, W. 1998^a. Lipase-catalysed selective deacetylation of phenolic/enolic acetoxy groups in peracetylated benzyl phenyl ketones. *Bioorg Med Chem.* 6: 109-118.
- Parmar, V. S; Kumar, A; Pooman, R; Saxena, R. K. y Gupta, R. 1998^b. Potential use of a novel lipase from *Aspergillus carneus* in deacetylation reactions. *Biochim Biophys Acta* 1387(1-2): 325-30
- Patel, R. N. 2001 Biocatalytic synthesis of intermediates for the synthesis of chiral intermediates *Curr Opin Biotechnol* 12: 587-604
- Paukstelis, P. J. y Lambowitz, A. M. 2008. Identification and evolution of fungal mitochondrial tyrosyl-tRNA synthetases with group I intron splicing activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105(16): 6010-6015.
- Peled, N. y Krenz, M. C. 1981. A new assay of microbial lipases with emulsified trioleoyl glycerol. *Anal Biochem.* 112(2): 219-222.
- Peña-Montes, C; Gonzalez, A; Castro-Ochoa, D. y Farrés, A. 2008. Purification and biochemical characterization of a broad substrate specificity thermostable alkaline protease from *Aspergillus nidulans*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 78(4): 603-612.
- Petersen, E. I; Valinger, G; Sölkner, B; Stubenrauch, G. y Schwab, H. 2001. A novel esterase from *Burkholderia gladioli* which shows high deacetylation activity on cephalosporins is related to beta-lactamases and DD-peptidases. *J Biotechnol* 89(1): 11-25

- Powell, K. A; Renwick, A. y Peberdy, J. F. 1994. The genus *Aspergillus*: From taxonomy and genetics to industrial application. Ed. Plenum Press. p.p. 147-154.
- Price, M. S; Connors, S. B; Tachdjian, S; Kelly, R. M. y Payne, G. A. 2005 Aflatoxin conducive and non-conducive growth conditions reveal new gene associations with aflatoxin production. *Fungal Genet Biol.* 42(6): 506-518.
- Roe, B. A; Kupfer, D; Zhu, H; Gray, S. Cliftou, R; Prade, J; Loros, J; Dunlap, J. y Nelson, M. 2001. The *Aspergillus nidulans* and the *Neurospora crassa* cDNA Sequencing Project. http://www.genome.ou.edu/asper_blast.html.
- Rudolph, R. y Lilie, H. 1996. In vitro folding of inclusion body proteins. *FASEB J.* 10(1): 49-56.
- Saitou, N. y Nei, M. 1987. The neighbor-joining method a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 4: 406-425.
- Sambrook, J; Fritsch, E. F. y Maniatis, T. 1989. In *Molecular Cloning: A laboratory manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, Vol. 1, 2, 3.
- Saxena, R. K; Ghosh, P. K; Gupta, R; Davidson, W. S; Bradoo, S. y Gulati, R. 1999. Microbial lipases: potential biocatalysts for the future industry. *Current Science* 77: 101-115.
- Sayari, A; Frikha, F. *et al.* 2005. N-terminal peptide of *Rhizopus oryzae* lipase is important for its catalytic properties. *FEBS Lett.* 579(5): 976-82.
- Serafini, M; Maiani, G. y Ferro-Luzzi, A. 1998. Alcohol-free red wine enhances plasma antioxidant capacity in humans. *J Nutr.* 128(6): 1003-1007.
- Sharma, S. K; Husain, H. M; Kumar, R; Samuelson, L. A; Kumar, J; Watterson, A. C. y Parmar, V. S. 2005. Biocatalytic routes toward pharmaceutically important precursors and novel polymeric systems. *Pure Appl Chem.* 77(1): 209-226.
- Shin, H. D. y Chen, R. R. 2007. A type B feruloyl esterase from *Aspergillus nidulans* with broad pH applicability. *Appl Microbiol Biotechnol* 73(6): 1323-1330.
- Silva, F. A. M; Borges, F; Guimaraes, C; Lima, J. F; Matos, C. y Reis, S. 2000. Phenolic acids and derivatives: studies on the relationship among structure, radical scavenging activity, and physicochemical parameters. *J Agric Food Chem* 48: 2122-2126.
- Sroga, G. E. y Dordick, J. S. 2002. A strategy for in vivo screening of subtilisin E reaction specificity in *E. coli* periplasm. *Biotechnol Bioeng* 78(7): 761-769.

- Sugibara, A. y Tsui, T. 1991. Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Bacillus sp.* J Biochem. **109**: 211-216.
- Suzuki, T; Nakayama, T; *et al.* 2002 Primary structure and catalytic properties of a cold-active esterase from a psychrotroph, *Acinetobacter sp.* Strain No. 6 Isolated from siberian soil Biosci Biotechnol Biochem. **66 (8)**: 1682-1690
- Suzuki, T; Nakayama, T; *et al.* 2003 Cloning, heterologous expression, renaturation, and characterization of a cold-adapted esterase with unique primary structure from a psychrotroph *Pseudomonas sp* strain B11. Protein Expr Purif **30**: 171-178
- Synytysya, A; Blafková, P; Copikova, J. y Michal, U. 2007. Conjugation of kojic acid with chitosan. Carbohydrate Polym **72(1)**: 21-31
- Takahashi, H; Fujita, M; Minami, H. y Fukuyama, Y. 1999 Coumaroyl triterpenes from *Casuarina equisetifolia*. Phytochem. **51**: 543-550.
- Tang, S. J; Sun, K. H; Sun, G. H; Chang, T. Y. y Lee, G. C. 2000. Recombinant expression of the *Candida rugosa* lip4 lipase in *Escherichia coli*. Protein Expr Purif **20(2)**: 308-313.
- Teo, W. P; Lian-Hui, Z. y Chit Laa, P. 2003 Cloning and characterization of a novel lipase from *Vibrio harveyi* strain AP6. Gene. **312**: 181-188.
- Verger, R. y Haas, D. E. 1976 Interfacial enzyme kinetics of lipolysis. Annu Rev Biophys Bioeng. **5**: 77-117.
- Vriend, G. 1990. WHAT IF: a molecular modelling and drug design program. J Mol Graph. **8(1)**: 52-56.
- Vuillard, L; Rabilloud, T. y Goldberg, M. E. 1998. Interactions of non-detergent sulfobetaines with early folding intermediates facilitate in vitro protein renaturation. Eur J Biochem **256(1)**: 128-135.
- Ward, M. 1991. *Aspergillus nidulans* and other filamentous fungi as genetic systems. In Modern Microbial Genetics (Wiley-Liss, Inc). p.p. 455-496.
- Wu, J. y Miller, B. L. 1997 *Aspergillus* asexual reproduction and sexual reproduction are differentially affected by transcriptional and translational mechanisms regulating stunted gene expression Mol Cell Biol. **17(10)**: 6191-6201
- Xiong, A. S ; *et al.* 2005 High level expression of a recombinant acid phytase gene in *Pichia pastoris*. J Appl Microbiol. **98(2)**: 418-428.

II. ANEXO

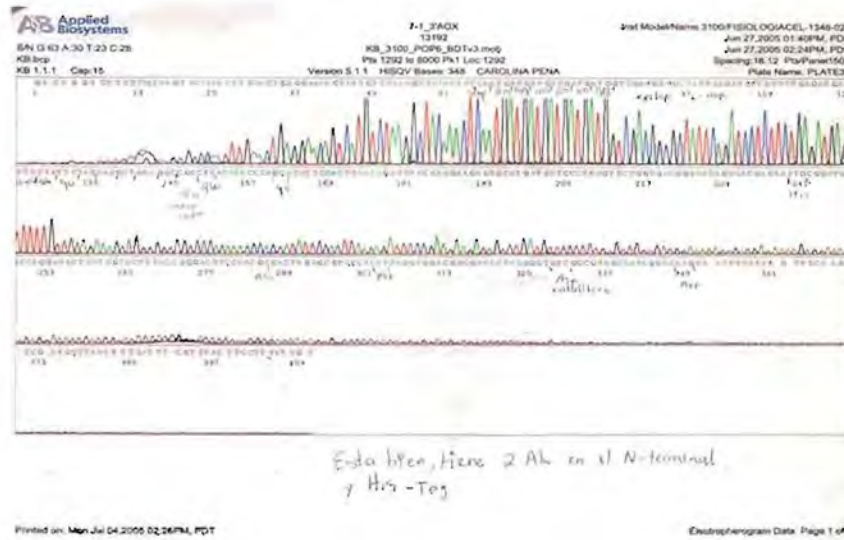
A) Electroferograma de la secuencia del gen *nstc1* integrado al genoma de *P. pastoris* Forward



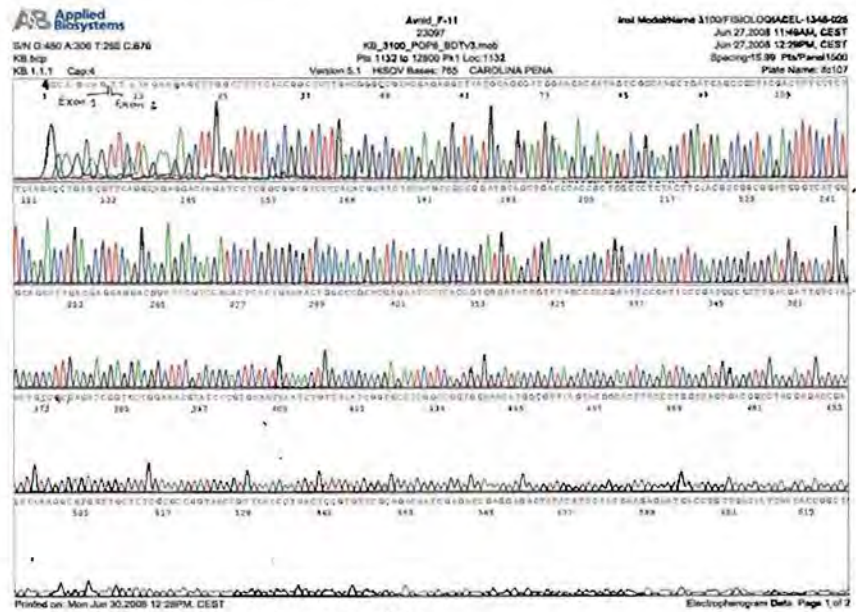
B) Electroferograma de la secuencia del gen *stcI* integrado al genoma de *P. pastoris* Forward



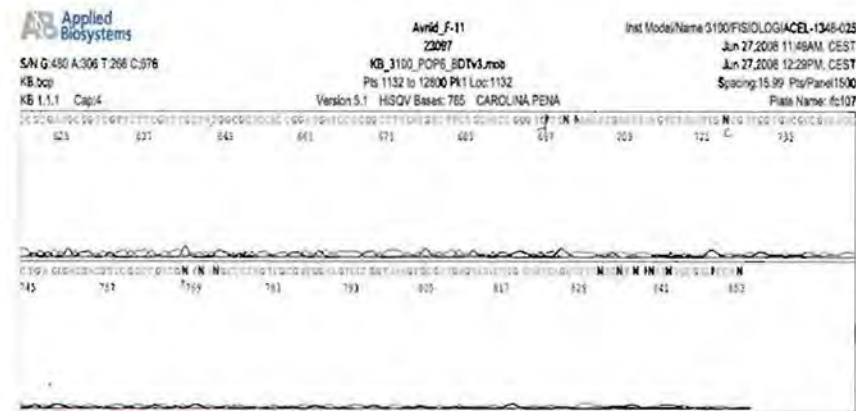
Reverse



C) Electroferograma de la secuencia del gen *nstcl* aislado del genoma de *A. nidulans*
 Forward



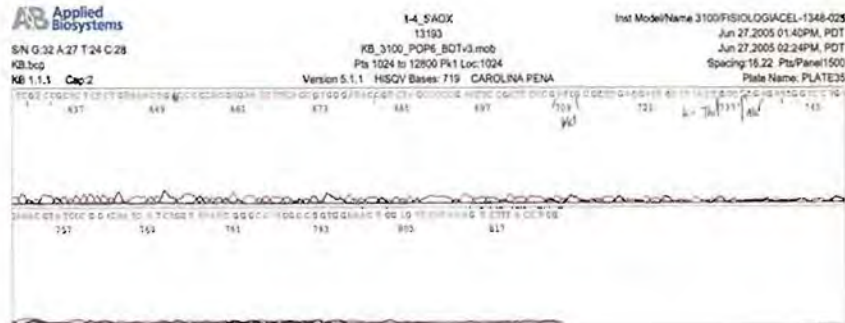
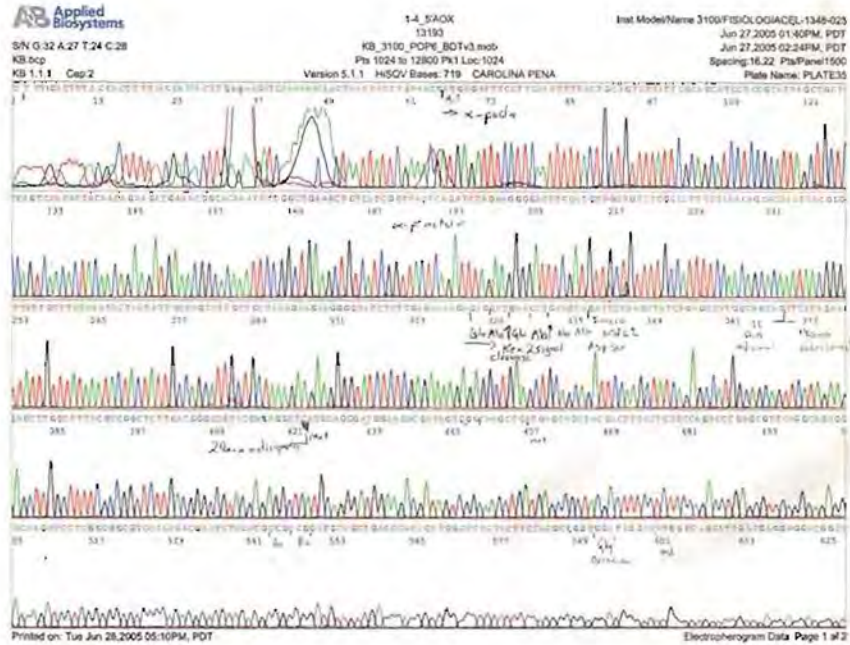
La secuencia corresponde a la *nstI* y está en el orden



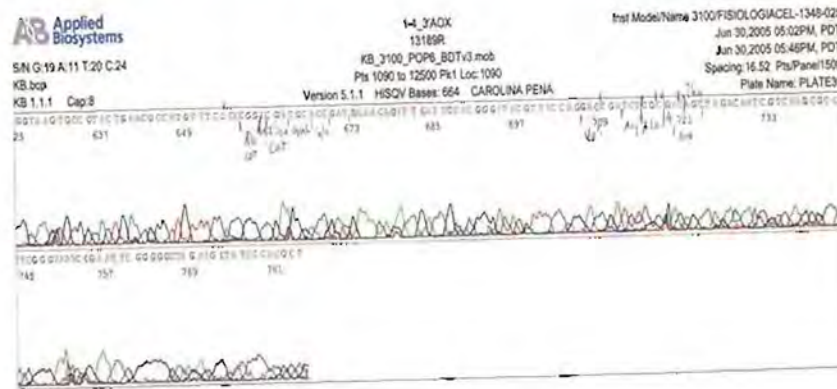
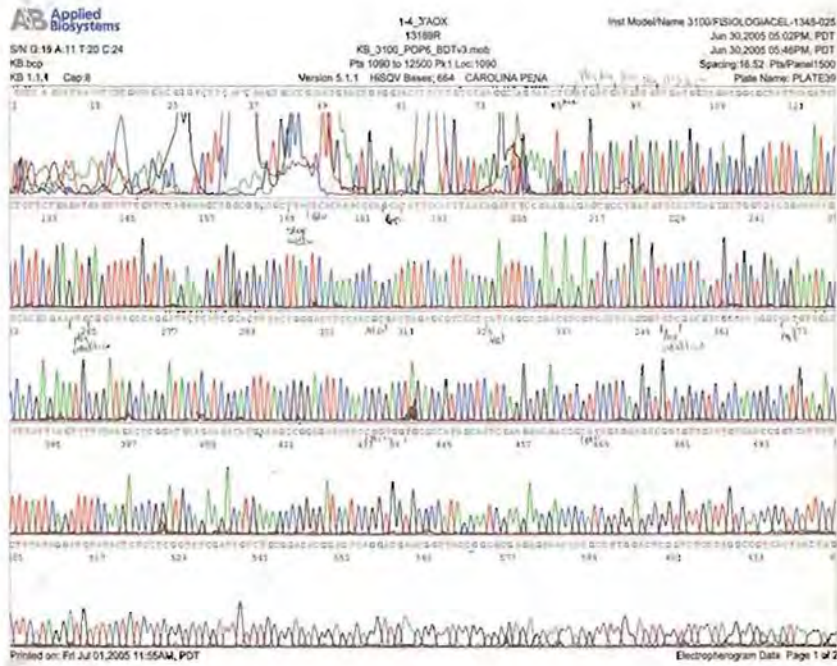
- Yabe, K; Ando, Y. y Hamasaki, T.** 1991. A metabolic grid among versiconal hemiacetal acetate, versiconol acetate, versiconol and versiconal during aflatoxin biosynthesis. *J Gen Microbiol.* **137**: 2469-2475.
- Yabe, K. y Nakajima, H.** 2004. Enzyme reactions and genes in aflatoxin biosynthesis. *Appl Microbiol Biotechnol.* **64(6)**: 745-755.
- Yu, J. et al.** 1995. Comparative mapping of aflatoxin pathway gene clusters in *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*. *Appl Environ Microbiol.* **61**: 2365–2371.
- Yu, J; Woloshuk, C. P; Bhatnagar, D. y Cleveland, T. E.** 2000. Cloning and characterization of *avfA* and *omtB* genes involved in aflatoxin biosynthesis in three *Aspergillus* species. *Gene.* **248(1-2)**: 157-167.
- Yu, J; Chang, P. K; Bhatnagar, D. y Cleveland, T. E.** 2002. Cloning and functional expression of an esterase gene in *Aspergillus parasiticus*. *Mycophatol.* **156(3)**: 227-234.
- Zelena, K; Krügener, S; Lunkenbein, S; Zorn, H. y Berger R. G.** 2009. Functional expression of the lipase gene *Lip2* of *Pleurotus sapidus* in *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett.* **31(3)**: 395-401.
- Zhu, X; Larsen, N. A; Basran, A; Bruce, N. C; y Wilson, I. A.** 2003. Observation of an arsenic adduct in an acetyl esterase crystal structure. *J Biol Chem.* **278**: 2008-2014.

II. ANEXO

A) Electroferograma de la secuencia del gen *nstc1* integrado al genoma de *P. pastoris* Forward



Reverse

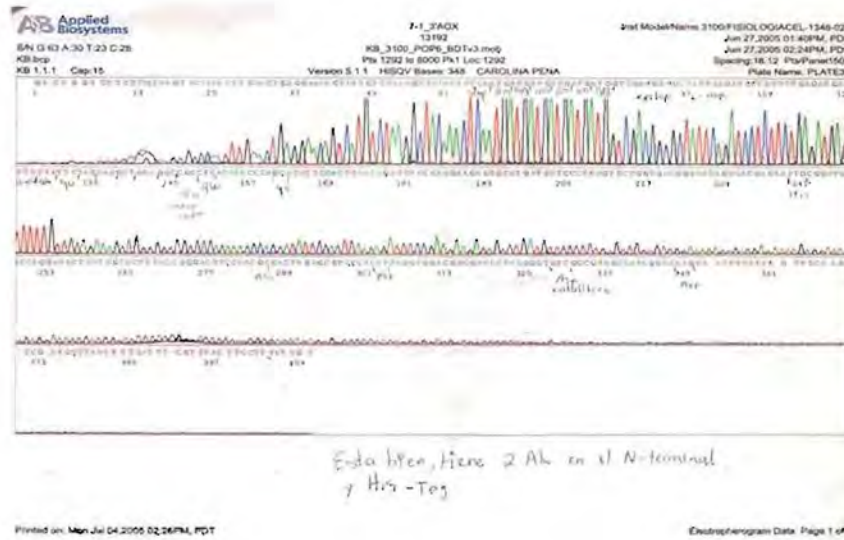


Esta muy bien, toda correcta. 1.4 ✓ = P8

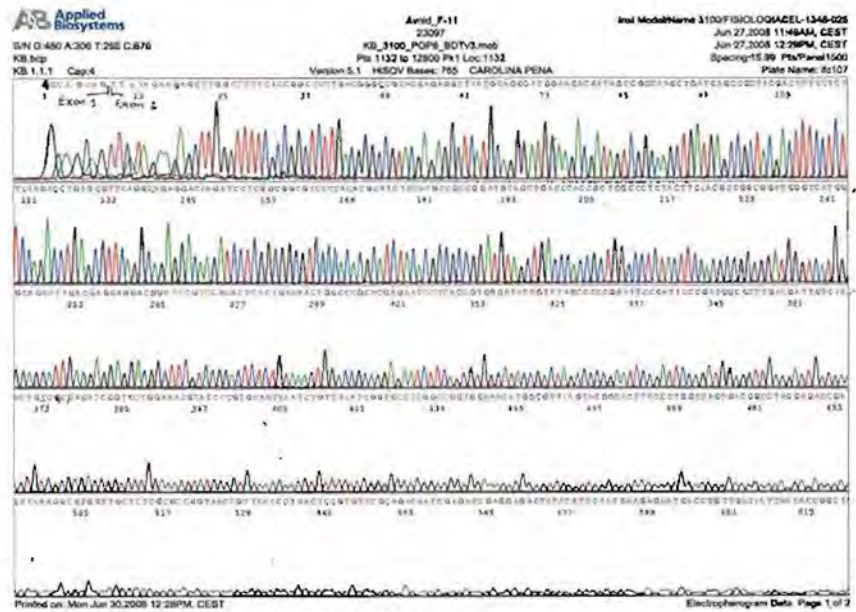
B) Electroferograma de la secuencia del gen *stcI* integrado al genoma de *P. pastoris*
Forward



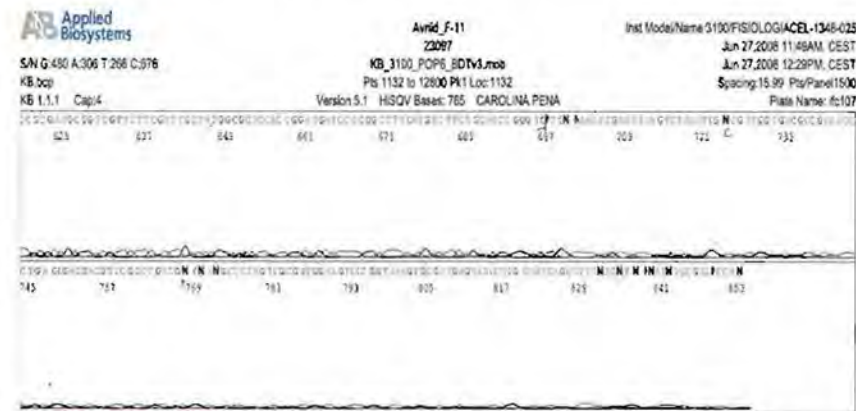
Reverse



C) Electroferograma de la secuencia del gen *nstc1* aislado del genoma de *A. nidulans*
 Forward



La secuencia corresponde a la *nstc1* y está en el orden



Molecular characterization of StcI esterase from *Aspergillus nidulans*

Carolina Peña-Montes · Stefan Lange · Idalia Flores ·
Denise Castro-Ochoa · Rolf Schmid ·
Felipe Cruz-García · Amelia Farrés

Received: 20 January 2009 / Revised: 1 April 2009 / Accepted: 7 April 2009
© Springer-Verlag 2009

Abstract *Aspergillus nidulans* produces StcI esterase, which is involved in the biosynthesis of sterigmatocystin, a precursor of aflatoxins. Previous reports of this esterase in *A. nidulans* suggest that it is composed of 286 amino acid residues with a theoretical molecular mass of 31 kDa. Various conditions were evaluated to determine the optimal expression conditions for StcI; the highest level was observed when *A. nidulans* was cultured in solid out media. Various esterases were expressed differentially according to the culture media used. However, specific antibodies designed to detect StcI reacted with a protein with an unexpected molecular mass of 35 kDa in cell extracts from all expression conditions. Analysis of the gene sequence and already reported expressed sequence tags indicated the presence of an additional 29-amino-acid N-terminal region of StcI, which is not a signal peptide and which has not been previously reported. We also detected the presence of this additional N-terminal region using reverse-transcriptase polymerase chain reaction. The complete protein (NStcI) was cloned and successfully expressed in *Pichia pastoris*.

Keywords *Aspergillus nidulans* · Esterase · Cloning · Sterigmatocystin · N terminus

Introduction

Aspergillus nidulans is a saprophytic fungus that is widely distributed in nature. Its complete genome has been sequenced, and an expressed sequence tag (EST) database has been generated (Galagan et al. 2005; Roe et al. 2001). Some of the genes involved in the biosynthetic machinery of the secondary metabolism of *A. nidulans* have been detected, cloned, and characterized (Schneider et al. 2008; Spröte et al. 2008; Yu and Leonard 1995). Sterigmatocystin (ST) and aflatoxins, which are related fungal secondary metabolites, are among the most toxic mutagenic and carcinogenic natural products known. *A. nidulans* produces ST, the penultimate intermediate in the aflatoxin pathway, as an end product (Bennett et al. 1989; Branch et al. 1993). The pathway of ST biosynthesis in *A. nidulans* is identical to that of aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*. In these organisms, the genes involved in either the biosynthesis of ST or aflatoxin lie in a gene cluster (Feng and Leonard 1998; Yabe and Nakajima 2004). In *A. nidulans*, this cluster was previously described, and the biosynthetic pathway has been proposed; the cluster spans 60 kb, totalling 25 genes (Brown et al. 1996). Within this region, an esterase/lipase putative gene (*stcI*) has been reported. The intronless sequence (GenBank accession no. 2869364) appears to be a complete esterase/lipase gene. This gene is a homolog of the previously cloned *estA* gene, which was identified within the aflatoxin pathway gene cluster in *A. parasiticus* (Yu et al. 2002). Moreover, esterase activities have been confirmed in *A. parasiticus* cell extracts (Anderson and Chung 1990;

C. Peña-Montes · I. Flores · D. Castro-Ochoa · A. Farrés (✉)
Food and Biotechnology Department, Chemistry Faculty,
National Autonomous University of Mexico (UNAM),
Ciudad Universitaria,
Mexico City, DF 04510, Mexico
e-mail: farrés@servidor.unam.mx

C. Peña-Montes · S. Lange · R. Schmid
Institute of Technical Biochemistry, University of Stuttgart,
Stuttgart, Germany

F. Cruz-García
Biochemistry Department, Chemistry Faculty,
National Autonomous University of Mexico (UNAM),
Ciudad Universitaria,
Mexico City, DF 04510, Mexico

Kusumoto and Hsieh 1996), and it has been reported that the esterase EstA converts versiconal hemiacetal acetate (VHA) to versiconal (VAL) and versiconol acetate to versiconol (Chung et al. 2004). Few expression studies of the aflatoxin biosynthesis cluster genes have been done and, consequently, their regulation is poorly understood (Kato et al. 2003; Motomura et al. 1999; Yu et al. 2000). There is no evidence of the expression of StcI in *A. nidulans*. No information is available about the biochemical properties, isolation, and expression of enzymes involved in ST biosynthesis in *A. nidulans*. In this work, we have analyzed the available information on StcI using multiple databases. Specific antibodies were designed to detect the StcI protein under different culture conditions. We found that the StcI protein contains an additional N-terminal region. We have cloned and expressed the complete StcI protein in *Pichia pastoris*.

Experimental procedures

Microorganisms, plasmid, media, and culture conditions *A. nidulans* PW1 (*bla1*; *argB2*; *methG1*; *veA1*) was kindly provided by Dr. Jesus Aguirre, Institute of Cell Physiology, UNAM, and it has been obtained from the Fungal Genetics Stock Center (Kansas City, KS, USA). *Escherichia coli* DH5 α (F^- ϕ 80/*lacZ*DM15 Δ (*lacZYA-argF*)U169 *endA1* *recA1* *hsdR17(r_K-m_K+) deoR thi-1 supE44 λ -gyrA96 *relA1*) was used for cloning. *P. pastoris* X-33 (wild type; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was used for enzyme expression. Plasmid pPICZ α B was supplied from Invitrogen.*

A. nidulans stock culture was maintained on silica gel slants at 4°C and spores were produced as previously described (Kafer 1977; Kawasaki et al. 1995). As a control for the sterigmatocystin induction conditions, *A. nidulans* was grown on minimal nitrate and optimized medium as previously described (Peña-Montes et al. 2008). For induction conditions, *A. nidulans* was grown on YES medium, corn steep liquor, and oat as described respectively by Keller et al. (1997), Kellkar et al. (1997), and Keller et al. (1994).

E. coli cells were grown at 37 °C in low-salt Luria-Bertani medium (LB; 1% yeast extract–0.5% Bacto-tryptone–0.5% NaCl). For selection of recombinant clones, low-salt LB plates were supplemented with 25 μ g Zeocin per milliliter.

P. pastoris growth, media, and selection of recombinant clones were conducted according to the techniques described in the manual from the *Pichia* expression kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Enzyme-producing clones were selected on YEPD medium supplemented with 0.5% (v/v) dextrose, 1% (v/v) tributyrin, and 100 μ g/ml Zeocin (YEPT medium). To maintain the induction of gene expression, 200 μ l of methanol was added every 24 h.

Positive clones were grown for 24 h in liquid BMGY medium. For induction, cells grown in BMGY medium were centrifuged (3,000 \times g, 10 min), and the cell pellet was resuspended in BMMY medium, which is BMGY medium in which glycerol was replaced by 0.5% (v/v) methanol.

Bioinformatics *StcI* gene sequence data were manually compiled from GenBank. BLAST searches were conducted within the *A. nidulans* initiative genome database of the Whitehead Institute (Galagan et al. 2005). *StcI* ESTs were identified using BLAST searches within the *A. nidulans* cDNA Sequencing Project (Roc et al. 2001). Predicted sequences of *stcI* homologs were identified using BLAST searches within GenBank, the Lipase Engineering database (LED) and the ESTHER database (Fischer and Pleiss 2003; Hotelier et al. 2004). The sequences were analyzed using the following programs: DNA strider (Douglas 1994), ClustalW (Larkin et al. 2007), BioEdit version 7.0.7 (Hall 2007), GeneFinder (DeCaprio et al. 2007), GeneScan (Burge and Karlin 1998), and ExPASy Translate Tool (Gasteiger et al. 2003). The prediction of signal peptides was done using Signal P v3 (Bendtsen et al. 2004). For phylogenetic analysis, amino acid sequences of the esterases were aligned with ClustalW. Based on the alignment, a phylogenetic tree was constructed via the neighbor-joining method (Saitou and Nei 1987). A phylogenetic test was done based on 1,000 bootstrap replicates. A phylogenetic analysis was conducted using MEGA v3 (Kumar et al. 2004). The GenBank™ accession numbers used for this analysis were: *Aspergillus nomius* (AAS90054), *A. flavus* (AAS90006), *Aspergillus oryzae* (BAE71321), *A. parasiticus* (AAN76353), *Aspergillus niger* (XP_001394825), *Aspergillus fumigatus* (XP_749730), *A. flavus* (AAO17921), *A. nidulans* (AN55652), *Aspergillus clavatus* (XP_001273731), *Penicillium cyclospium* (AAF82375), *Oleomonas sagaranensis* (BAA82510), *Alycidobacillus acidocaldarius* (1EVQ_A), *Sulfolobus solfataricus* (NP_343858), *Sulfolobus solfataricus* (NP_343862), *Burkholderia* sp. (YP_366466), *Pseudomonas aeruginosa* (YP_001348220), *Pseudomonas fluorescens* (YP_348594), *Frankia* sp. (YP_001507469), *Corynebacterium jeikeium* (YP_250326), *Sphingopyxis alaskensis* (YP_616595), *Gibberella zeae* (XP_389288), and *Moraxella* sp. (P24484).

Isolation of mRNA and reverse-transcriptase polymerase chain reaction for transcript detection and isolation of the *stcI* gene *A. nidulans* strain PW1 was grown in non-sterigmatocystin-conducive media (minimal and optimized) for 24 h and in induction media (YES, corn steep liquor, and oat) during 8, 15, and 30 days, respectively. The resulting mycelium was harvested, washed with buffer A (10 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 0.1 M NaCl, 40 mM Tris-HCl, pH 8.0), and pulverized to a fine powder

in liquid nitrogen. Total RNA was isolated from the mycelia by the column purification method using the RNeasy Plant Mini-Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). Poly-A mRNA was purified from the total RNA by the PolyATrack mRNA isolation system (Promega, Madison, WI, USA) according to the instruction manual. This procedure effectively removes DNA to prevent contamination. First-strand cDNA was synthesized with the cDNA cycle kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and used as the template in the subsequent polymerase chain reactions (PCR). We have also used a 24-h developmental *A. nidulans* cDNA library in λ -ZAPII constructed by R. Aramayo, available from the Fungal Genetics Stock Center, Kansas City, KS, USA. The Hotstar Taq DNA polymerase (Qiagen, Valencia, CA, USA) was used in RT-PCR experiments. The following primers were used for the *nst1* gene: Forward-1, *nst1-F*: 5' CCT CTG CAG CAG ATT CCA AGC TAT CAG AGC CAT G 3', and Reverse *nst1-R*, 5' TGA GCG GCC GCT TAC TCA CAA ACC CAG C 3'. The PCR amplification was carried out at 95 °C for 8 min, one cycle; a second step, 95 °C for 1 min, 55 °C for 40 s, and 72 °C for 1.5 min, 30 cycles; and a final extension step of 10 min at 72 °C.

Construction of the plasmid pPICnst1 To clone the *nst1* gene into the pPICZ α B vector, which allows its expression in *P. pastoris*, two restriction sites (*Pst*I/*Not*I) were introduced by PCR into the fragment. The *stc1* gene was amplified from cDNA with the primers *nst1-F* and *nst1-R*. In this case, the complete protein with the native N-terminal end was generated. The PCR fragments were cleaved with *Pst*I and *Not*I and inserted into the respective pPICZ α B sites, resulting in pPICnst1. The recombinant Pfu polymerase (Fermentas, Hanover, MD, USA) was used in PCR experiments. A PCR gradient was done with the following cycle conditions: first step, 95 °C for 2 min, one cycle; second step, 95 °C for 1 min, 50–60 °C gradient for 40 s and 72 °C for 1 min 30 s, 25 cycles; and third step, 72 °C for 10 min.

Recombinant DNA techniques Standard recombinant DNA methods were used, as described by Sambrook et al. (1989).

Cloning into *E. coli* DH5 α -competent cells were freshly transformed with the pPICnst1 vector by electroporation. Selected recombinant clones were grown at 37 °C in 50-ml LB media for vector extraction with a plasmid mini-kit (Qiagen, Valencia, CA, USA).

Expression of Nst1 in *P. pastoris* *P. pastoris* X-33 cells were freshly transformed with the expression vector pPICnst1 through electroporation. All cultures were carried out at 30 °C. Recombinant clones were selected on YEPS medium; halo-producing clones were selected on YEPT

medium. Positive transformants were selected and grown in BMGY medium until they reached an OD₆₀₀ = 2–6 and then transferred to BMMY medium for the induction of protein expression. Methanol (0.5%) was added daily to induce expression. After induction, the extracts were centrifuged (3,000 \times g) and supernatants were collected.

Fast hydrolase activity assay (1) The esterase activity of the crude extracts and purified enzymes was measured spectrophotometrically on microtiter plates as compared to *p*-nitrophenyl acetate (*p*NPA; 10 mM dissolved in dimethyl sulfoxide), using a molar absorption coefficient of 14,500 l mol⁻¹ cm⁻¹ (410 nm, pH 7.5, 50 mM sodium phosphate buffer). One enzyme unit (U) is defined as the activity that liberates 1 μ mol of substrate per minute (Sugihara et al. 1991) and (2) esterase activity towards α -naphthyl acetate (α -NA) on microtiter plates as described by Kakariari et al. (2000).

Protein determination Protein concentration was determined by Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) using the enhanced method according to the manufacturer's instructions and bovine serum albumin as a standard.

Polyacrylamide gel electrophoresis Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) on a 12% polyacrylamide slab gel was used to assess the purity and molecular weight of the enzyme according to the method proposed by Laemmli (1970). Low-molecular-weight markers (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) were used as standards.

Zymograms Esterase activity was assayed and visualized using zymograms. After SDS-PAGE, the acrylamide gel was washed by immersion in phosphate buffer 0.1 M, pH 7.5 for 30 min with constant agitation. A second wash was performed in the same conditions, except the buffer contained 5% Triton X-100. Finally, the gel is subjected to a third wash in the same buffer with only 0.5% Triton X-100 for 4 h. The gels were incubated at room temperature (RT) in substrate solution for 10 min (3 mM α -naphthyl acetate, 10% (v/v) acetone and 100 mM sodium phosphate buffer, pH 7.5) and then incubated for 5 min in developing solution (1 mM Fast Red TR, 0.1% (v/v) Triton X-100 and 100 mM sodium phosphate buffer, pH 7.5). Esterase activity was detected by the appearance of purple-colored bands in the gels.

Isoelectric focusing Electrofocusing was performed on a PhastSystem (Pharmacia, Uppsala, Sweden) according to the instructions of the manufacturer. IEF 3-9 PhastGels (GE Healthcare, Pittsburgh, PA, USA) and high range standards (GE Healthcare, Pittsburgh, PA, USA) were used. Proteins

were detected by Coomassie staining and zymography using (α -NA) as described before.

Stc1 antibody production Stc1 PAb were generated in rabbits, using a synthetically designed peptide by Sigma-Genosys as the antigen (The Woodlands, TX; Fig. 2a). Stc1 antibody was prepared in rabbits by Sigma-Genosys and targeted to the Stc1 sequence. Each of two rabbits (New Zealand White) were injected subcutaneously with 200 μ g of peptide conjugated to KLH in complete Freund's adjuvant for the first immunization; incomplete Freund's adjuvant (IFA) was used for all subsequent immunizations at a 1:1 (vol/vol) ratio. After 14, 28, 42, 56, and 70 days, the animals received a booster injection with 200 μ g of protein in IFA adjuvant. Serum was obtained 7 days after each boost.

Western blot assays Specificity was assayed by Western blotting, and preimmune serum had no reactivity. Stc1 antiserum after 49, 63, and 77 days of immunization was tested at 1:1,000, 1:5,000, 1:10,000, 1:30,000, and 1:40,000 dilutions. For blotting, crude extracts from recombinant *P. pastoris* were placed in SDS loading buffer containing 100 mmol/l dithiothreitol at 80 °C to 100 °C (5 min). Proteins were separated on 12% SDS-PAGE and native gels and transferred to a polyvinylidene membrane, which was rinsed with PBS and incubated in PBS containing 0.1% Tween 20 and 5% milk overnight at 4 °C. The membrane was incubated in Stc1 antiserum for 3 h (RT) followed by washes in PBS and incubation in goat antirabbit IgG alkaline phosphate-secondary antibody (1:10,000; Bio-Rad, Hercules, CA, USA) for 2 h, RT. Membranes were developed for alkaline phosphatase activity. Assays were done in the same way for mycelium extracts under sterigmatocystin-inducing and noninducing conditions. The resulting mycelia were harvested and washed with buffer A (10% glycerol, 25 mM dithiothreitol, 0.3 M NaCl, 50 mM phosphate buffer, pH 7.5). We then added one complete protease inhibitor tablet for 50 mL (Roche, Mannheim, Germany) and pulverized it to a fine powder in the presence of liquid nitrogen. The powder was resuspended in 100 mL buffer A, mixed overnight at 170 rpm, 4°C, and then centrifuged at 8,000 rpm for 20 min at 4°C. The supernatant was collected and concentrated by ultrafiltration to 5 mL. In this case, Stc1 antiserum after 77 days of immunization was tested at 1:30,000 and 1:40,000 dilutions.

Purification of anti-Stc1 antibody and Stc1 gel affinity column Antibodies were purified using the Montage Antibody Purification Prosep-A kit, according to the techniques described in the manual (Millipore Corp., Bedford, MA, USA). Antibodies (20 mg) were immobilized to Affi-Gel-10 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), as recommended by the manufacturer.

Results

Identification of the stc1 gene in the *A. nidulans* genome The *Aspergillus* genome database was analyzed with BLAST and two putative esterase proteins were identified, AN7816.2 and AN5565.2. The first sequence (AN7816.2) is identical to the *stc1* gene within the ST cluster reported by Brown et al. (1996). The putative protein consists of 286 amino acid residues. The second sequence shares only 43% amino acid identity with the Stc1 protein and it is annotated like another esterase that is unrelated to aflatoxin biosynthesis sequences. The putative Stc1 esterase (AN7816.2) shares 55–50% amino acid identity with esterases from the *Aspergillus* genus that are involved in aflatoxin biosynthesis (Fig. 1). According to analysis performed in the LED database, this protein belongs to the *Moraxella* lipase 2-like family and shares 34–27% amino acid identity with lipases and esterases in this family (Fischer and Pleiss 2003). This family is included in the hormone-sensitive lipase-like family (HSL), according to the ESTHER database (Hotelier et al. 2004).

The Stc1 protein contains an additional 29-amino acid N-terminal region BLAST searches on the *A. nidulans* cDNA sequencing project reported by Roe et al. (2001) found two EST sequences: Contig 1592, which corresponds to the previously reported C-terminal region, and Contig 452, which corresponds to the N-terminal region of the Stc1 protein and an additional 29-amino-acid region at the N terminus of the protein. An analysis of the putative AN7816.2 fragment from the genome database, including upstream and downstream sequences, was performed. The analysis showed an additional sequence that encodes for two exons and one intron. The first exon encodes a short polypeptide of 11 amino acids followed by the intron, and the second one encodes a small polypeptide of 18 amino acids adjacent to the reported 286-amino-acid Stc1 sequence and lies upstream of the reported translation start site. The sum of the small exons results in a 29-amino-acid region at the N terminus of the Stc1 protein (NStc1; Fig. 2a). Sequence analysis of the additional N-terminal region did not suggest any homology with known signal peptides (data not shown). In addition, a promoter region upstream of the sequence that encodes the N-terminal peptide was found (Fig. 2a).

An analysis of the LED database revealed the presence of the typical amino acid residues of the catalytic triad found in α/β hydrolases (Ser-152, Asp-255, and His-285) and the amino acid residues of the oxyanion hole (Gly-86 and Ala-153; Fig. 1). To identify the type of esterase encoded by the NStc1 cDNA, a phylogenetic analysis using the deduced NStc1 amino acid sequence and other esterases sequences was performed. The phylogenetic tree depicted

Fig. 1 Analysis of the complete StcI esterase. Comparison of amino acid sequences among NStcI and esterases from aflatoxin clusters. Identical amino acid residues are represented by *dots* and gaps by *hyphens*. Amino acids from the catalytic triad (Ser-152, Asp-255, and His-285) and oxyanion hole (Gly-86 and Ala-153) are in *bold* and *curly letters*, respectively. The conserved pentapeptide sequence is enclosed. The additional N-terminal 29 amino acids belonging to StcI are shown in *bold type*

NStcI	MDELSEEPWQ	QFIERLQSP	ALDGF-YEEL	HQKRTIVGE	LSHRYDFPLP	SLVGVARDKI	60
<i>A. flavus</i>	..ETFFAA..H	..VED..QT	C.P.KDLDEI	LA..QLLAGT	.AT..G..P	..E..TT..VQ	
<i>A. parasiticum</i>	..ETFFAA..H	..VED..QT	C.P.KDLDEI	LA..QLLAGT	.AT..G..P	..E..AT..VQ	
<i>A. oryzae</i>	..ETFFAA..H	..VED..QT	C.P.KDLDEI	LA..QLLAGT	.AT..G..P	..E..TT..VQ	
<i>A. nidulans</i>	..ETFFAA..Q	..VED..QT	C.P.KDLKEV	LT..QLLAGT	.AT..G..P	..E..TT..VQ	
NStcI	LGQVPTRIYV	PPQVA-DFPL	ALYFNAGQV	HQSIDKEDGF	VRLTCLKART	KIFVQVYKLA	120
<i>A. flavus</i>	..D..LNL..C..	..PMATQGE.V	G...G....	..GVN....	..C.VISRQQCM	..LV..E..E..	
<i>A. parasiticum</i>	..D..LNL..C..	..AMATQGE.V	G...G....	..GVN....	..C.VISRQQCM	..LV..E..E..	
<i>A. oryzae</i>	..D..LNL..C..	..PMATQGE.V	G...G....	..GVN....	..C.VISRQQCM	..LV..E..E..	
<i>A. nidulans</i>	..D..LNL..C..	..PMATQGE.V	G...G....	..GVN....	..C.IISRQQCM	..LV..E..E..	
NStcI	PEFRFPHALD	DCLTVRSEVL	KTYFVQICF	ITDSEAD SHQA	FETALTIVED	QLGDRVQGVV	180
<i>A. flavus</i>	..T.Y.G..H	..GVRA..LWAL	SR..ENQPLFL	M.T....L	..G...R..IDQ	DNADK..S...	
<i>A. parasiticum</i>	..T.Y.G..H	..GVRA..LWAL	SR..ENQPLFL	M.T....L	..G...R..IDQ	DNADK..S...	
<i>A. oryzae</i>	..T.Y.G..H	..GVTA..LWAL	SR..ENQPLFL	M.T....L	..G...R..IDQ	DNADK..S...	
<i>A. nidulans</i>	..T.Y.G..H	..GVRA..LWAL	SR..ENQPLFL	M.T....L	..G...R..IDQ	DNADK..S...	
NStcI	ALAPVTQHPD	EVSADNRDRO	EYVEYRERW	LTINTGZANK	SFFDCVYAPF	QDFRLSCLLH	240
<i>A. flavus</i>	...I.....	A..PEHLKE--	Q..A...AE	..V.SRA..Q	V....K..V	..VVT.....	
<i>A. parasiticum</i>	...I.....	A..PEHLKE--	Q..A...AE	..V.SRA..Q	V....K..V	..VVT.....	
<i>A. oryzae</i>	...I.....	A..PEHLKE--	Q..A...AE	..V.SRA..Q	V....K..V	..VVT.....	
<i>A. nidulans</i>	...I.....	A..PEHLKE--	Q..A...AE	..V.SRA..Q	V....K..V	..VVT.....	
NStcI	PHGLKLNKVV	HAVGSHADTLR	DEVELMHDAL	VALRVPVQCD	EYNGVWDSH	LPPGDALESH	300
<i>A. flavus</i>	..R..LA..P...	..I..ELGL....	..A...EG..	DTAK...NY	A...Y..C.F.H.	..PES.G...	
<i>A. parasiticum</i>	..R..LA..P...	..I..ELGL....	..A...EG..	DTAK...NY	A...Y..C.F.H.	..PES.G...	
<i>A. oryzae</i>	..R..LA..P...	..I..ELGL....	..A...EG..	DTAK...NY	A...P..C.F.H.	..PES.G...	
<i>A. nidulans</i>	..R..LA..P...	..I..ELGL....	..A...EG..	DTAK...NY	A...Y..C.F.H.	..PES.G...	
NStcI	QALFPQELLS	GICWVCE					315
<i>A. flavus</i>	..RT..PQGVAK	AVR..NE-					
<i>A. parasiticum</i>	..RT..LQGVAK	AVR..NE-					
<i>A. oryzae</i>	..RT..PQGVAK	AVR..NE-					
<i>A. nidulans</i>	..KA..LEAVAK	AVR..NE-					

in Fig. 2b displays three major groups: group *A* includes esterases involved in aflatoxin biosynthesis; group *B* corresponds to esterases from the HSL family; and the last group, *C*, corresponds to other carboxylesterases. The NStcI protein sequence clearly belongs to the cluster of esterases involved in aflatoxin biosynthesis.

stcI gene expression in *A. nidulans* There were no previous reports of StcI esterase expression in *A. nidulans*. To investigate the expression pattern of this enzyme under different culture conditions, total RNA from mycelium was used as a template to detect the *stcI* transcript by RT-PCR. Expression of *stcI* was detected in all assayed conditions; *stcI* mRNA was also detected under conditions that were not conducive to ST expression (Fig. 3). RT-PCR products obtained from mycelium grown under inductive (YES, corn steep liquor, and oat medium) and noninductive conditions (minimal and optimized medium) were sequenced. These cDNAs were identical to the *stcI* genomic sequence shown in Fig. 2a, without the intron which corresponds to cDNA sequences in the ESTs database. By itself, this result constitutes evidence of the existence of the *stcI* mRNA, which strongly suggests that the additional N-terminal peptide is part of the biological form of the enzyme. According to the genomic sequence shown in Fig. 2a, there are two AUG codons that could serve as the starting point for translation: the AUG at position 136–138

(previously reported as the translation start site of StcI; Brown et al. 1996) and the AUG at position 1–3. Our results confirm that the dominant translation start site is the latter of these.

StcI protein expression in *A. nidulans* Cellular extracts of *A. nidulans* mycelium were obtained from all culture conditions; either induced or not, they were obtained and tested for StcI expression by Western blotting and were evaluated for the presence of esterase activity. In Fig. 4a, several Coomassie protein bands appear in the range of 30 to 40 kDa in an SDS-PAGE gel in extracts of different culture conditions. The antiserum detected a single protein band of approximately 35 kDa from induced mycelium extracts of *A. nidulans* that were grown in oat media, which is not expected according to the sequence reported by Brown et al. (1996; Fig. 4c). Extracts of cells grown in YES and optimized medium showed also a weak band of approximately 35 kDa after Western blot assay (data not shown). Esterase activity, as evaluated by zymograms of native gels, showed one activity band for extract from *A. nidulans* cells grown in optimized media and many activity bands for extracts from cells grown in oat and YES media (Fig. 4b).

Expression of the *stcI* gene in *P. pastoris* In order to study NStcI protein and corroborate antibody specificity, we have

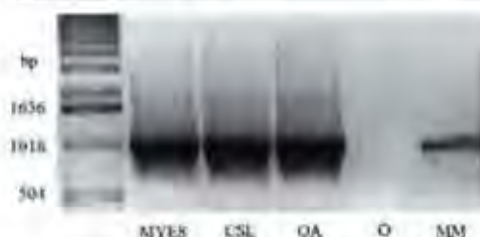


Fig. 3 *Scl1* transcriptional expression in different culture conditions. Marker, 1-kb DNA plus RT-PCR products obtained with *scl1* primers and cDNA of *A. nidulans* growing on YES medium (MYES), corn steep liquor (CSL), oat medium (QA), oat without *A. nidulans* as natural inoculum in the same conditions (O), and minimal medium (MM)

cloned the gene. Many fungal genes have been successfully expressed in *P. pastoris*, so we have used this microorganism as host system (Kosicki et al. 2005; Mitting et al. 2001; Xiang et al. 2005). The RT-PCR product (945 bp for *scl1*) was ligated into the pPICZα vector, generating the pPICZα/*scl1* plasmid. The identity of the cloned products was verified by sequencing. BLAST analysis revealed that the sequences of the RT-PCR products were identical to the corresponding *scl1* gene sequence (Fig. 2a).

P. pastoris X-33 cells were transformed with linearized pPICZα/*scl1* plasmid. The colonies were grown on selection plates and deployed hydrolysis holes. The presence of the *scl1* gene in the recombinant colonies of *P. pastoris* was corroborated by PCR and sequencing (Fig. 3). The PCR product has the sequence shown in Fig. 2a without the intron and with the AUG at position 1–3 serving as the translation start site. It was cloned in frame with the α-factor secretion signal.

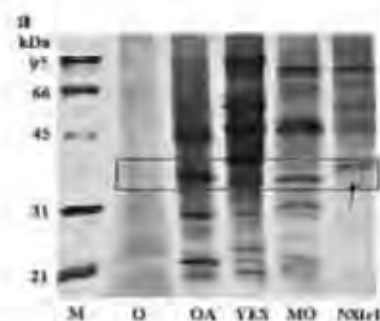
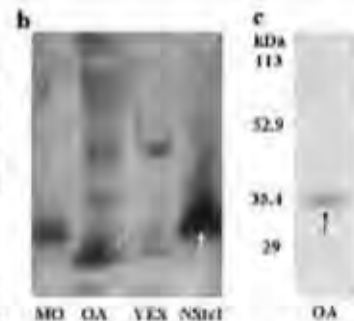


Fig. 4 *Scl1* protein expression pattern in cell-free extracts of *A. nidulans* growing in different culture conditions. **a** Protein pattern on SDS-PAGE gels of *A. nidulans* cell-free extracts from different culture media. MO, optimal medium; YES, YES medium; O, oat medium; O, oat without *A. nidulans*; and NSc1, recombinant extract from

transformed *P. pastoris* cells harboring the *scl1* gene were cultivated as described before. After 24 h of induction, high esterase activity with pNPA (360 U/mg protein) appeared, persisted for 72 h, and decreased thereafter (data not shown). SDS-PAGE revealed a strong band with a molecular mass of 35 kDa, which corresponds to the theoretically calculated mass 34.5 kDa (Fig. 4a). Nevertheless, no activity was detected after renaturation from SDS-PAGE gels. Activity was detected only on a native gel as a single band close to 35 kDa (Fig. 4b). Expression of the recombinant protein and the specificity of the designed antibody were confirmed by Western blotting on SDS-PAGE gel with the specific antibodies designed to recognize the synthetic peptide (DNRDRGEYTSVEEN) included in the encoded protein and which is not present in other similar esterases or in other proteins of the *Aspergillus* genome (Fig. 5). Specificity of the antiserum for recombinant NSc1 on native gel was also confirmed by Western blot (data not shown). The calculated antibody titer was 1:40,000 and the minimum detectable amount of protein was 20 μg. The observed pI for this recombinant protein was approximately 4.7, which is close to the theoretically calculated pI (4.8). The immunopurified wild protein from *A. nidulans* extracts displayed a pI of 4.3 (Fig. 7).

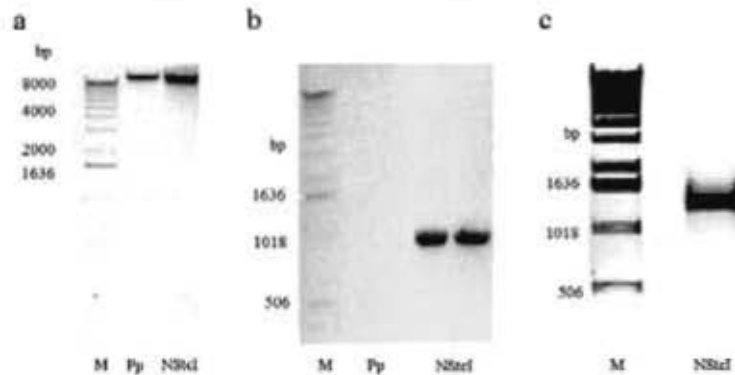
Discussion

The analysis *in silico* of the genome of *Aspergillus* showed a high number of putative lipases and esterases. An interesting model from the biocatalytic point of view is the *Scl1* esterase, which is involved in sterigmatocystin biosynthesis, as its natural substrates are cyclical molecules. The esterases found in aflatoxin gene clusters are closely



recombinant clone of *P. pastoris*. **M**, low-molecular-weight marker. Proteins from 32 to 37 kDa are enclosed. **b** Esterase activity on native gels of cellular extracts of *A. nidulans* and extracellular extract from recombinant clone (NSc1). **c** Western blot analysis against *A. nidulans* cell-free extract from oat medium (QA)

Fig. 5 *Stc1* gene in *P. pastoris*. **a** DNA from wild *P. pastoris* (*Pp*) and from recombinant clone (*NStc1*). **b** PCR products obtained with specific primers and DNA from *P. pastoris* transformed with *pPICNstc1*. **c** PCR product obtained with AOX universal primers and DNA from *P. pastoris* transformed with *pPICNstc1*. *M*, marker 1-kb DNA plus



related species show homologous genes that share more than 90% amino acid identity (*A. parasiticus*, *A. flavus*, and *A. nomius*). Interestingly, NStc1 shares only 50% amino acid identity with the reported esterases, which is within the range of homology between aflatoxin and ST biosynthetic pathway genes in *A. parasiticus*, *A. flavus*, *A. nomius*, and *A. nidulans*.

In *A. nidulans* genome database, we found only one copy of the *stc1* gene, even if some species, like *A. parasiticus*, have a second copy of some genes involved in this biosynthetic pathway like *estA* (Yu et al. 1995). There is a similarity between the *stc1* gene and the *estA* gene in *A. parasiticus*, with respect to the intron location and promoter region; however, NStc1 consists of 315 amino acids, just one more than the esterases in the biosynthetic pathways for aflatoxin and ST in other species of *Aspergillus*. In Fig. 2a, we note that the dominant translation start site of the *stc1* gene (MDSKL) is upstream of the previously described

translation start site (MQGW). This was suggested by Yu et al. (2002), after their comparison of sequences of the *estA* genes in *A. parasiticus* and *stc1* in *A. nidulans*. Moreover, the Kozak consensus sequence for a translation initiation site was observed: a purine (A) is present three bases upstream of the start codon (AUG) at position 1–3, and this codon is followed by another G (Kozak 1987). This consensus sequence was not observed for the previously reported start codon. The obtained results for gene and protein expression confirm that the dominant translation start is at position 1–3 and the product, the NStc1 protein, has a molecular weight of 35 kDa and pI of 4.8. It is expressed under induction and noninduction conditions, results that agree with those obtained for expression of esterases belonging to aflatoxin clusters. It must be noted that the *estA* gene from *A. parasiticus* is also constitutively expressed and is probably the only gene in the aflatoxin cluster that is not under the regulation of *aflR* (Price et al. 2005; Yu et al. 1995; Yu et al. 2002), while Yabe et al. (1991) detected the EstA protein from *A. parasiticus* in nonaflatoxigenic conditions.

Fig. 6 Antibody specificity. Western blot analysis against the recombinant NStc1 on SDS-PAGE; gel

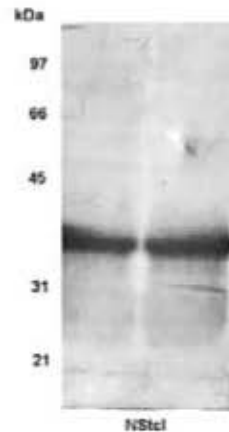
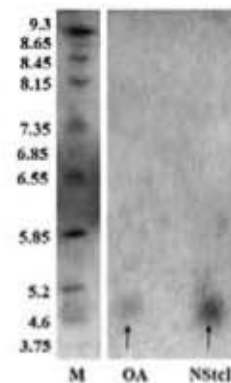


Fig. 7 pI of NStc1 protein. Esterase activity after isoelectrofocusing of immunopurified NStc1 esterase from oat medium (OA) and from extracellular extract of *P. pastoris* containing NStc1



Kusumoto and Hsieh (1996) reported the presence of at least three VHA esterases. As we have shown, there are many intracellular esterases that can be expressed depending on the culture media used. Immunologic techniques have solved this problem. Figure 4 shows that, under different culture conditions, different esterases are expressed as several activity bands; however, only one was detected with Western blotting by the specific antibody, which has a molecular mass of 35 kDa and corresponds to NStel. Other authors have also detected several esterases under aflatoxigenic conditions in *A. parasiticus* but they did not unequivocally identify the presence of the EstA protein, even if the molecular mass of 32 kDa is close to the theoretical one (Kusumoto and Hsieh 1996). It is important to note that Anderson and Chung (1990) have shown also that porcine esterase can catalyze the hydrolysis of VHA to VAL; then, the VHA esterase activity is not enough to identify this protein. The identity of this enzyme to the recombinant NStel is reinforced by the fact that the zymogram of the isoelectric focusing gel of immunopurified esterase from *A. nidulans* cells grown in oat media displayed one esterase activity with a pI of 4.8, which is close to the pI obtained for recombinant NStel (4.7) expressed in *P. pastoris*. The recombinant NStel esterase was observed as a single band on native and SDS-PAGE gels. In *A. parasiticus*, EstA acts as homodimer, something that did not occur throughout our experiments (Kusumoto and Hsieh 1996).

It is interesting to note that the theoretical molecular weight is close to 35 kDa in all esterases involved in aflatoxin biosynthesis, but it has been purified only an esterase of 32 kDa (Kusumoto and Hsieh 1996). However, we have preliminary results that show two reactive bands after immunopurification and concentration: the already detected protein of 35 kDa and another one of 30 kDa. It would be interesting to determine whether these bands are derived from processing of the translated Stel protein or from alternative splicing, as has been shown for some genes in *A. nidulans* (Paukstelis and Lambowitz 2008) or from a selective use of start sites as reported for conidiation genes of *A. nidulans* (Wu and Miller 1997).

As this enzyme can hydrolyze typical esterase substrates, the *stel* gene involved in the biosynthesis of ST in *A. nidulans* encodes an esterase gene, which may have broader substrate specificity. The N-terminal region plays different roles in other carboxylesterases, including contributing to correct folding, stabilization, and stereospecificity (Mandrach et al. 2005; Sayari et al. 2005). Its role in Stel protein dynamics must be verified.

Acknowledgments CPM received a scholarship from DAAD (German Academic Exchange Service) that allowed collaboration with the ITB, University of Stuttgart, Germany. We appreciate the help of American Journal Experts with the English revision of this manuscript.

References

- Anderson JA, Chung CH (1990) Conversion of versiconal acetate to versiconal and versicolorin C in extracts from *Aspergillus parasiticus*. *Mycopathologia* 110:31–35
- Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* 340:783–795
- Bennett JW, Henderberg A, Grossman K (1989) Sterigmatocystin production on complex and defined substrates. *Mycopathologia* 105(1):35–38
- Branch KR, Bennett JW, Bhatnagar D (1993) Sterigmatocystin production by *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet News* 40:20–21
- Brown DW, Yu JH, Kellur HS, Fernandes M, Neshitt TC, Keller NP, Adams TH, Leonard TJ (1996) Twenty-five coregulated transcripts define a sterigmatocystin gene cluster in *Aspergillus nidulans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(4):1418–1422
- Burge CB, Karlin S (1998) Finding the genes in genomic DNA. *Curr Opin Struct Biol* 8:346–354
- Chang PK, Yabe K, Yu J (2004) The *Aspergillus parasiticus* estA-encoded esterase converts versiconal hemiacetal acetate to versiconal and versiconol acetate to versiconal in aflatoxin biosynthesis. *Appl Environ Microbiol* 70:3593–3599
- DeCaprio D, Vinson JP, Pearson MD, Montgomery P, Doherty M, Galagan JE (2007) ConRAD: gene prediction using conditional random fields. *Genome Res* 17(9):1389–1398
- Douglas SE (1994) DNA Strider: a Macintosh program for handling protein and nucleic acid sequences. *Methods Mol Biol* 25:181–194
- Feng GH, Leonard TJ (1998) Culture conditions control expression of the genes for aflatoxin and sterigmatocystin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus* and *A. nidulans*. *Appl Environ Microbiol* 64(6):2275–2277
- Fischer M, Pleiss J (2003) The Lipase Engineering Database: a navigation and analysis tool for protein families. *Nucleic Acids Research* 31(1):319–321
- Galagan JE, Calvo SE, Cuomo C, Ma LJ, Wortman JR, Batoviglu S, Lee SL, Bapatirakman M, Spevak CC, Clutterbuck J, Kapitonov V, Jurka J, Sczzozochio C, Farman M, Butler J, Purcell S, Harris S, Braus GH, Draht O, Busch S, D'Enfert C, Boschier C, Goldman GH, Bell-Pedersen D, Griffiths-Jones S, Doonan JH, Yu J, Vanden K, Pann A, Freitag M, Selker EU, Archer DB, Peñalva MA, Oakley HR, Momany M, Tanaka T, Kusumoto T, Asai K, Machuga M, Nieman WC, Denning DW, Caddick M, Hynes M, Paoloni M, Fischer R, Miller B, Dyer P, Sachs MS, Osmani SA, Birren DW (2005) Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* 438(7071):1105–1115
- Gastegger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi L, Appel RD, Bairoch A (2003) ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res* 31:3784–3788
- Hall T (2007) BioEdit Biological Sequence Alignment Editor for Win95/98/NT/2K/XP. <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>. Accessed 29 Jan 2007
- Hotelier T, Renault L, Cousin X, Negre V, Marchot P, Chatonnet A (2004) ESTHER, the database of the alpha/beta-hydrolase fold superfamily of proteins. *Nucleic Acids Research* 32:D145–D147
- Kafer E (1977) Meiotic and mitotic recombination in *Aspergillus* and its chromosomal aberrations. *Adv Genet* 19:33–131
- Kakariari E, Georgalaki MD, Kalantropoulos G, Tsakalidou E (2000) Purification and characterization of an intracellular esterase from *Protonobacterium freudenreichii* ssp. *freudenreichii* ITG 14. *Le Lait* 80:491–501
- Kato N, Brooks W, Calvo AM (2003) The expression of sterigmatocystin and penicillin genes in *Aspergillus nidulans* is controlled

- by *svt1*, a gene required for sexual development. *Eukaryot Cell* 2(6):1178–1186
- Kawasaki I, Farrés A, Aguirre J (1995) *Aspergillus nidulans* mutants affected in acetate metabolism isolated as lipid nonutilizers. *Exp Mycol* 19(1):81–85
- Kelkar HS, Skloss TW, Haw JF, Keller NP, Adams TH (1997) *Aspergillus nidulans svt1* encodes a putative cytochrome P-450 monooxygenase required for bisfuran desaturation during aflatoxin/sterigmatocystin biosynthesis. *J Biol Chem* 272(3):1589–1594
- Keller NP, Kamz NJ, Adams TH (1994) *Aspergillus nidulans* *verA* is required for production of the mycotoxin sterigmatocystin. *Appl Environ Microbiol* 60(5):1444–1450
- Keller NP, Nesbitt C, Sarr B, Phillips TD, Burow GH (1997) pII Regulation of sterigmatocystin and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus* spp. *Phytopathology* 87(6):643–648
- Koseki T, Mitsu Y, Fushimizu S, Hashizume K (2005) Biochemical characterization of recombinant acetyl xylan esterase from *Aspergillus awamori* expressed in *Pichia pastoris*: mutational analysis of catalytic residues. *Biochim Biophys Acta* 1749(1):7–13
- Kozak M (1987) An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res* 15(20):8125–8148
- Kumar S, Tamura K, Nei M (2004) MEGA3: integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinformatic* 5:146–163
- Kusumoto K, Hsieh DPH (1996) Purification and characterization of the esterases involved in aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus*. *Can J Microbiol* 42(8):804–810
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R et al (2007) ClustalW and Clustal X version 2. *Bioinformatics* 23(21):2947–2948
- Mandrich L, Menone L, Pezzullo M, Cipolla L, Nicotra F, Rossi M, Manco G (2005) Role of the N terminus in enzymic activity, stability and specificity in thermophilic esterases belonging to the HSL family. *J Mol Biol* 345(3):501–512
- Mining S, Serrano A, Ferrer P, Solà C, Schmid RD, Valero F (2001) Optimization of the high-level production of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*. *J Biotechnol* 86(1):59–70
- Motomura MN, Chihaya T, Shinozawa T, Hamazaki T, Yabe K (1999) Cloning and characterization of the O-methyltransferase I gene (*omtA*) from *Aspergillus parasiticus* associated with the conversions of demethylsterigmatocystin to sterigmatocystin and dihydrodemethylsterigmatocystin to dihydrosterigmatocystin in aflatoxin biosynthesis. *Appl Environ Microbiol* 65(11):4987–4994
- Pandakelis PI, Lambowitz AM (2008) Identification and evolution of fungal mitochondrial tyrosyl-tRNA synthetases with group I intron splicing activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(16):6010–6015
- Pelo-Montes C, Gonzalez A, Castro-Ochoa D, Farrés A (2000) Purification and biochemical characterization of a broad substrate specificity thermostable alkaline protease from *Aspergillus nidulans*. *Appl Microbiol Biotechnol* 78(4):603–612
- Price MS, Connors SB, Tachdjian S, Kelly RM, Payne GA (2003) Aflatoxin conducive and non-conductive growth conditions reveal new gene associations with aflatoxin production. *Fungal Genet Biol* 42(6):506–518
- Roe BA, Kupfer D, Zhu H, Gray S, Clifton R, Prade J, Loms J, Dunlap J, Nelson M (2001) The *Aspergillus nidulans* and the *Neurospora crassa* cDNA Sequencing Project. University of Oklahoma *Aspergillus nidulans* cDNA Blast Server: http://www.genome.ou.edu/asper_blast.html. Accessed 23 Jan 2008
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbour joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406–425
- Sambrook JE, Fritsch F, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
- Sayani AF, Fräha F, Miled N, Milhau H, Ben Ali Y, Verger R, Gargouri Y (2005) N-terminal peptide of *Rhizopus oryzae* lipase is important for its catalytic properties. *FEBS Lett* 579(5):976–982
- Schneider P, Weber M, Hoffmeister D (2008) The *Aspergillus nidulans* enzyme TdD catalyzes prenyltransfer to the precursor of bioactive sterigmatocystin. *Fungal Genet Biol* 45(3):302–309
- Sprete P, Hynes MJ, Hortschansky P, Shelesty E, Scharf DH, Wolke SM, Brakhage AA (2008) Identification of the novel penicillin biosynthesis gene *antB* of *Aspergillus nidulans* and its putative evolutionary relationship to this fungal secondary metabolism gene cluster. *Mol Microbiol* 70(2):445–461
- Sugihara A, Tani T, Tomimaga Y (1991) Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Bacillus* sp. *J Biochem* 109:211–216
- Wu J, Miller BL (1997) *Aspergillus* asexual reproduction and sexual reproduction are differentially affected by transcriptional and translational mechanisms regulating stunted gene expression. *Mol Cell Biol* 17(10):6191–6201
- Xiong AS, Yao QH, Peng BH, Han PL, Cheng ZM, Li Y (2005) High level expression of a recombinant acid phosphatase gene in *Pichia pastoris*. *J Appl Microbiol* 98(2):418–428
- Yabe K, Nakajima H (2004) Enzyme reactions and genes in aflatoxin biosynthesis. *Appl Microbiol Biotechnol* 64(6):743–755
- Yabe K, Ando Y, Hamasaki T (1991) A metabolic grid among versiconal hemiacetal acetate, versiconol acetate, versiconol and versiconol during aflatoxin biosynthesis. *J Gen Microbiol* 137:2469–2475
- Yu J, Leonard TJ (1995) Sterigmatocystin biosynthesis in *A. nidulans* requires a novel type I polyketide synthase. *J Bacteriol* 177(16):4792–4800
- Yu J, Chang PK, Cary JW, Wright M, Bhatnagar D, Cleveland TE, Payne GA, Linz JE (1995) Comparative mapping of aflatoxin pathway gene clusters in *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*. *Appl Environ Microbiol* 61:2365–2371
- Yu J, Woloshuk CP, Bhatnagar D, Cleveland TE (2000) Cloning and characterization of *svtA* and *omtB* genes involved in aflatoxin biosynthesis in three *Aspergillus* species. *Gene* 248(1–2):157–167
- Yu J, Chang PK, Bhatnagar D, Cleveland TE (2002) Cloning and functional expression of an esterase gene in *Aspergillus parasiticus*. *Mycopathologia* 156(3):227–234



Differences in biocatalytic behavior between two variants of StcI esterase from *Aspergillus nidulans* and its potential use in biocatalysis

Carolina Peña-Montes^{a,b}, Stefan Lange^b, Denise Castro-Ochoa^a, Katia Ruiz-Noria^a, Felipe Cruz-García^c, Rolf Schmid^b, Arturo Navarro-Ocaña^a, Amelia Farrés^{a,*}

^aChemistry and Biology Department, ^bBiological Faculty, National Autonomous University of Mexico (UNAM), Ciudad Universitaria, México (C.U.), D.F., México

^cInstitute of Technical Biotechnology, University of Stuttgart, Stuttgart, Germany

* Biochemistry Department, ^cBiology Faculty, National Autonomous University of Mexico (UNAM), Ciudad Universitaria, Ciudad Universitaria, México (C.U.), D.F., México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 April 2009

Received in revised form 11 July 2009

Accepted 11 July 2009

Available online xxx

Keywords:

Aspergillus nidulans

lipase

biocatalysis

sterigmatocystin

N-terminus

biocatalytic compounds

ABSTRACT

Aspergillus nidulans produces the esterase StcI, which is involved in the biosynthesis of sterigmatocystin, a precursor of aflatoxins. Analysis of ESTs indicated the presence of an additional 29-amino acid N-terminal region of the already reported *stcI* gene. Predicted structural models suggest that this N-terminus modifies substrate access to the active site. In order to elucidate the role of this N-terminal region, the complete gene (*stcI*) and the truncated reported version of the gene (*stcI*) were cloned and expressed in *Pichia pastoris*. Both recombinant enzymes were tested for their ability to hydrolyze *p*-nitrophenyl esters and compounds having a structure similar to the original substrate. We observed differences in the abilities of these two enzymes to hydrolyze *p*-NPE. The ratios between the activity of the two esterase variants (NstcI/StcI) towards different acyl chain-length *p*-NPE were: 0.3 towards *p*-NPA (C2:0), 0.70 towards *p*-NPB (C4:0) and *p*-NPD (C10:0); 1 towards *p*-NPL (C12:0) and *p*-NPM (C14:0); 2.7 towards *p*-NPF (C16:0) and 2.2 towards *p*-NPS (C18:0). Interestingly, NstcI esterase showed the highest activity (360 U/mg protein) towards *p*-NPA (C2:0) and StcI towards *p*-NPS (C18:0) (77 U/mg protein). Different deacetylation reactions of bioactive compounds were also assayed. The results indicated differences in chemoselectivity for deacetylation of phenols, logic acid and flavonoid esters. Acetylated ferulic acid was efficiently hydrolyzed (86%) only by NstcI, while deacetylation of coumaric acid was done only by StcI (25%). Deacetylation of kojic acid was carried out only by NstcI (75%). Almost all flavonoids were efficiently deacetylated by NstcI with 100% of conversion with the exception that epicatechin was hydrolyzed 60%. In contrast, low conversion of acetylated flavonoids was obtained with StcI (15–20%), the highest value was observed with catechin, G3. We also observed differences in regioselectivity for the deacetylation of kojic acid and flavonoids. This behavior suggests an important role for the N-terminus in the catalytic properties of this enzyme. In addition, these enzymes showed different versatile catalytic potential in terms of chemo- and regioselectivity in carrying out a variety of industrially important biotransformations of phenolic compounds.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

An esterase/lipase putative gene (*stcI*) has been reported in the sterigmatocystin pathway gene cluster in *Aspergillus nidulans* [1]. This gene is homolog to the *estA* gene, which was identified within the aflatoxin pathway gene cluster in *Aspergillus parasiticus*. The esterases encoded by the *estA* and *stcI* genes share 49% amino acid identity which is within the range of homology between aflatoxin and sterigmatocystin biosynthetic pathway genes in *A. parasiticus* and *A. nidulans* [2]. The esterase *EstA* converts versiconal hemiacetal acetate (VHA) to versiconal (VM) and versiconal acetate (VOAc) to versiconol (VOH) [3]. The nature of the reaction catalyzed by this enzyme, i.e. deacetylation, suggests that StcI may have the biocatalytic potential to perform reactions with high enantio- or regioselectivity for cyclic substrates.

* Corresponding author. E-mail addresses: afarr@quimica.unam.mx (A. Farrés), carolina@quimica.unam.mx (C. Peña-Montes), stefan.lange@stuttgart.de (S. Lange), denise@quimica.unam.mx (D. Castro-Ochoa), katia@quimica.unam.mx (K. Ruiz-Noria), felipe@quimica.unam.mx (F. Cruz-García), rolf.schmid@stuttgart.de (R. Schmid), arturo@quimica.unam.mx (A. Navarro-Ocaña).

^a Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Unidad Mérida, Facultad de Química, Instituto Nacional Autónomo de México, Ciudad Universitaria, Mérida, Yucatán, México. Tel.: +52 931 5022530; fax: +52 931 50225200.

^b Institut für Technische Biologie, Universität Stuttgart, Germany.

In the cDNA Atlas Sequencing Project [4], there are two EST sequences for Sst1 protein: CONTIG1592, which corresponds to the previously reported C-terminal region [1], and CONTIG452, which corresponds to the N-terminal region. We found an additional 29-amino acid region at the N-terminus of the protein, which is not homologous to any signal peptide [3]. Predicted structural models for the already reported protein (Sst1) and Sst1 with the additional 29-amino acid region (Nst1) suggest that HisN-terminus can modify the substrate access to the active site. In order to elucidate the role of this N-terminal domain, we have cloned and characterized both esterase forms in *Pichia pastoris*.

Phenolic derivatives are found in both edible and non-edible plants, may act as antioxidants, chelating agents, and free radical scavengers, and may have anti-inflammatory, anti-allergic, anti-microbial, antiviral, anti-carcinogenic, and UV filtration properties [6,7]. Along with flavonoids, they have been considered important agents in the prevention of cancer and heart disease [8,9]. Applications for these natural antioxidants in oil-based food processing and cosmetics are limited because of the relatively low solubility of phenolic acids in aprotic media. To increase biological activity, it is necessary to chemically modify the naturally found compounds by acetylation, deacetylation or glycosylation. As such, the hydrophobicity of phenolic acids can be enhanced by chemical or enzymatic lipophilization by esterifying the carboxylic acid function of the phenolic acid with a fatty alcohol to obtain an amphiphilic molecule, which should keep its original functional properties [10]. Chemical modification is not highly selective, while among industrially important enzymes lipases and esterases are particularly valuable because of their chemo-, regio- and enantioselective capabilities [11–13] with the added advantage that unwanted functionalization of phenolic hydroxyl groups is avoided [14]. This enzyme reaction has been reported specifically for some flavonoids, but only a few biocatalysts can deacetylate phenolic compounds, to render them more bioactive [15–19]. As such, the most widely used enzyme is produced by *Candida antarctica* (Novozym 434). Therefore, it is important to evaluate new enzymes to perform lipophilization, regioselective reactions and potential reverse reactions to obtain more interesting compounds or to increase yields. In this work, the behavior of both recombinant forms of Sst1 esterase during the deacetylation of interesting individual compounds is also analyzed.

2. Materials and methods

2.1. Microorganisms, plasmid, media and culture conditions

The *sst1* and *nst1* genes were isolated from a 24h developmental *A. nidulans* cDNA library (nA-ZAPII constructed by R. Aramayo, available from the Fungal Genetics Stock Center, Kansas City, KS).

E. coli DH5 α (*F'* ϕ 80 Δ lacZDM15 Δ [*lacZYA-argP*] U169 *endA*) recA1 *hsdR*(7(*r_g*–*m_g*)) *deoR* *thi-1* *mpE44* λ -*gyrA90* *rna1*) was used for cloning. *P. pastoris* X-33 (wild type) (Invitrogen, Carlsbad, CA) was used for enzymatic expression. Plasmid pPICZ α B was supplied from Invitrogen (Carlsbad, CA).

P. pastoris growth, media and selection of recombinant clones were performed according to the techniques described in the manual of EasySelect *Pichia* expression kit [Version G] (Invitrogen, Carlsbad, CA). Enzyme-producing clones were selected on YEPT medium supplemented with 0.5% (w/v) dextrose, 1% (v/v) tributyrin and 100 μ g/mL zeocin (YEPT medium).

2.2. Construction of the plasmids pPICZ α st1 and pPICZ α st1

The vector pPICZ α B was used to achieve extracellular expression in *P. pastoris*. Two restriction sites (PstI/NotI) were introduced into the fragment by PCR. The *nst1* gene was amplified from cDNA

with the primers *nst1-F* and *nst1-R* to generate the desired gene region which contains the additional 29 amino acids in the N-terminal end. The HotStart Taq DNA polymerase (Qiagen, Valencia, CA) was used in these PCR experiments. The sequences of the primers were: forward-1, *nst1-F*, 5'-CCT CTG CAG CAG ATT CCA AGC TAT CAG AGC CAT G-3' and reverse, *nst1-R*, 5'-TGA GCG GCC GCT TAC TCA CAA ACC CAG C-3'. The PCR amplification was carried out as follows: an initial denaturation step at 93 °C for 2 min, followed by 95 °C for 1 min, 55 °C for 40 s and 72 °C for 1.5 min for 30 cycles, and a final extension step at 72 °C for 10 min. The PCR fragments were cleaved with restriction endonucleases PstI and NotI and inserted into the respective sites of pPICZ α B, resulting in pPICZ α st1 vector.

In order to clone the truncated version of the *stc1* gene (without the additional 29 amino acids in the N-terminal region) into *P. pastoris*, the same restriction sites were used. For PCR amplification, the forward primer *stc1-F* was used instead of *nst1-F*. Primers had the following sequences: forward-2, *stc1-F*, 5'-CCT CTG CAG CAG AGG GAT GGA AGA CGA TAG-T' and reverse, *stc1-R*, 5'-TGA GCG GCC GCT TAC TCA CAA ACC CAG C-3'. Recombinant PlU polymerase (Fermentas, Hanover, USA) was used in these PCR experiments. A gradient PCR was performed with the following cycle conditions: an initial denaturation step at 95 °C for 2 min, followed by 95 °C for 1 min, 50–60 °C gradient for 40 s and 72 °C for 1 min 30 s for 25 cycles; and a final extension step at 72 °C for 10 min.

2.3. Recombinant DNA techniques

Standard recombinant DNA methods were carried out as described by Sambrook et al. [20].

2.4. Cloning into *E. coli*

DH5 α competent cells were freshly transformed with the vectors pPICZ α st1 and pPICZ α st1 by electroporation. Selected recombinant clones were grown at 37 °C in 50 mL LB media for vector extraction with a plasmid mini kit (Qiagen, Valencia, CA).

2.5. Expression of Sst1 and Nst1 in *P. pastoris*

P. pastoris X-33 cells were freshly transformed with the expression vectors pPICZ α st1 and pPICZ α st1 by means of electroporation. Negative control cells were also transformed with pPICZ α B. All cultures were incubated at 30 °C. Recombinant clones were selected on YEPT medium, and halo-producing clones were selected on YEPT medium. For negative control cells, we have obtained methanol-producing clones. Negative control cells and positive transformants were cultured in 25 mL of buffered glycerol-complex medium (BMGY) shaken at 200 rpm in 250 mL glass flasks. When cultures reached an OD₆₀₀ = 2–6, the cells were centrifuged (3600 \times g, 15 min) and resuspended in 50 mL buffered methanol-complex medium (BMMY) to an OD₆₀₀ of 1, shaken at 200 rpm and 250 rpm in 250 mL glass flasks for 96 h. Induction of esterase expression was achieved by daily addition of 100% methanol to a final concentration of 0.5%. After induction, *Pichia* cells were removed by centrifugation (3000 \times g, 15 min), and supernatant was collected. Desalting, concentration (42-fold) and buffer exchange to PBS, pH 7.4 of supernatant was done by ultrafiltration (Amicon, Beverly, MA) through a 10-kDa membrane (Millipore, USA). The concentrated solution was used for SDS-PAGE and esterase activity assay.

2.6. Purification of recombinant proteins by immunoaffinity column

Sst1 FAb were generated in rabbits by Sigma-Genosys and targeted to the Sst1 sequence, using a synthetically designed peptide



Fig. 1. Intronless and deduced amino acid sequences of *stc1* cDNA and coding sequence. The deduced amino acid sequence is presented under the corresponding codons. They are numbered on the right side. In the promoter region, the -35 binding consensus (the canonical TGACA/CA binding site), CMAT sequences are underlined. Intron sequence is divided by common bovine and human PCR primers are bold and labeled. The amino acids from the catalytic triad (Ser-132, Asp-159 and His-285) and oxyanion hole (Gly-116 and Ala-152) are bold and underlined. Deduced peptide sequence is enclosed.

as the antigen by Sigma-Genosys (The Woodlands, TX) (Fig. 1). Specificity was assayed by western blotting as described in manual of polyscreen PVDF transfer membrane improved (Perkin-Elmer Life Sciences, Boston, MA), using semi-dry method. Stc1 antiserum after 77 days of immunization was tested at dilution of 1:40,000. Preimmune serum had no reactivity. Antibodies were purified using the Montage Antibody Purification Prosep-A kit, according to the techniques described in the manual (Millipore Corp., Bedford, MA). Purified antibodies (20 mg) were immobilized to Affi-Gel-10 (Bio-Rad, Hercules, CA), as recommended by the manufacturer. Purification of recombinant proteins was done according to the manual for activated immunoaffinity supports (Bio-Rad, Hercules, CA) using an acid elution with sodium citrate, 0.15 M, pH 3. Briefly, 1 mL of concentrated supernatant was applied to immunoaffinity column pre-equilibrated with PBS buffer. Non-bound proteins were eluted with 3 bed volumes of Triton X-100 (0.5%) in PBS. Recombinant protein was eluted with 2 bed volumes of sodium citrate buffer. Collected fractions were neutralized to pH 7. Desalting, concentration and buffer exchange to sodium phosphate, 0.1 M, pH 7.5 of the collected fractions was done by ultrafiltration using a membrane with a molecular mass exclusion limit of 10 kDa (Millipore Corp., Bedford, MA). Sample was assayed for esterase activity. Affinity column was regenerated by 5 bed volumes of PBS and 2 of sodium azide (0.02%) in PBS.

2.7. Fast hydrolase activity assay

Esterase activity of the crude extracts and purified enzymes was measured spectrophotometrically towards *p*-NPA in accordance with Isobe et al. with some modifications [21]. Esterase, 100 μ L, was added to 900 μ L of reaction buffer containing 50 mM potassium phosphate, pH 7.2, 1% Triton X-100 and 2.5 μ M of *p*-NPA. The reaction was carried out at 25 °C and 1 U of enzyme activity was defined as the quantity of enzyme that releases 1 μ mol of *p*-nitrophenol per minute at 37 °C. Absorbance was continuously measured at 410 nm.

2.6. Protein determination

Protein concentration was determined by Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, CA) using the enhanced method according to the manufacturer's instructions and bovine serum albumin as the standard.

2.8. Polyacrylamide gel electrophoresis

SDS-PAGE on a 12% polyacrylamide slab gel was used to assess the purity and molecular weight of the enzyme according to the method proposed by Laemmli [22]. Low molecular weight markers (BioRad) were used as standards.

2.10. Zymogram

Esterase activity was assayed and visualized using zymograms. After SDS-PAGE, the acrylamide gel was washed by immersion in phosphate buffer 0.1 M, pH 7.5 for 30 min with constant agitation. For renaturation of the enzyme, a second wash was performed in the same conditions, with the exception that the buffer contained 5% Triton X-100. Finally, the gel was subjected to a third wash in the same buffer with only 0.5% Triton X-100 for 4 h. For detection of esterase activity, the gels were incubated at RT in substrate solution for 10 min (3 mM *n*-naphthyl acetate, 10% (v/v) acetone and 100 mM sodium phosphate buffer, pH 7.5) and then incubated for 5 min in developing solution (1 mM Fast Red TR, 0.1% (v/v) Triton X-100 and 100 mM sodium phosphate buffer, pH 7.5). Esterase activity was visualized by the appearance of purple-colored bands in the gels.

2.11. Bioinformatics

stc1 gene sequence data were manually compiled from GenBank. BLAST searches were performed within the *A. nidulans* interactive genomic database of the Whitehead Institute [23]. Stc1 ESTs

were identified using BLAST searches within the *A. nidulans* cDNA Sequencing Project [4]. The sequences were analyzed using the following programs: DNA strider [24], ChazalW [25], BioEdit Version 7.0.7 [26], GeneFinder [27], GeneScan [28] and ExPASy Translate Tool [29]. The prediction of signal peptides was done using SignalP v3 [5]. Prediction of the structure model was performed using the EspPred3D Program [30]. The predicted structure was verified with the program WHAT IF [31].

The selection for the template was performed using the fold recognition and identification of distant homologues method: mGenTHREADER [32]. This program makes use of profile-profile alignments and predicted secondary structure (using PSIPRED) as inputs [33]. This increases both the sensitivity of the method and enhances the accuracy of alignments. According to this program the closest homologues of Nstc1 are the heroin esterase from *Rhodococcus* sp. (18% amino acid sequence similarity) [34] and a thermophilic esterase from *Alicyclobacillus acidophilarius* (30% amino acid sequence similarity) [35]. Therefore, the crystallographic structure of the heroin esterase and carboxylesterase (PDB code 1L2L and 1QZ3) were used as templates for homology modeling of Nstc1 and Sstc1 enzymes.

2.12. Biochemical characterization

Temperature and pH optima for the assayed conditions were determined by a spectrophotometric method as previously described by Isobe et al. [21] and by a pH-stat assay according to Peled and Krenz [36], using 200 mM ethyl butyrate, which ensured a large excess of substrate, in a pH-stat apparatus (Titrino[®], Metrohm, Switzerland). To study the effect of temperature, enzymatic activity was assayed at 20, 30, 40, 50 and 60 °C at pH 7.5 (0.1 M phosphate buffer) for 15 min with applicable controls. Thermostability of the esterase was investigated by quantifying the remaining activity after incubating the enzyme without substrate in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.5, at various temperatures (20–60 °C) during 30 min and then assaying its activity at 25 °C. Triplicates were performed for each reaction, and the values were corrected for the non-catalyzed hydrolysis of the substrate.

The pH optimum was assayed during 30 min at 37 °C in a pH range from 5 to 10 in the following buffers: 50 mM acetate (pH 5), 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6–7) and 50 mM Tris-HCl (pH 8–10). The effect of the pH on enzyme stability was determined by incubating esterase solution in buffers (50 mM, pH 5–10) for 12 h at 37 °C. After incubation, the pH values remained constant, and residual activity was evaluated by spectrometric and pH-stat methods. Triplicates were performed for each reaction, and the values were corrected for the non-catalyzed hydrolysis of the substrate.

2.13. Chain-length specificity of recombinant esterases

Fatty acid *p*-nitrophenyl derivatives and ethyl esters were used as substrates. (i) Spectrophotometric analysis: For *p*-nitrophenyl-acyl esters, acyl group chain-lengths from C2:0 to C18:0 were tested as previously described [21]. (ii) pH-stat assay: It was performed using different ethyl esters with acyl group chain-lengths from C4:0 to C18:0 and aromatic groups at optimum assay conditions as described previously [36]. Triplicates were performed for each reaction and were corrected for the non-catalyzed hydrolysis of the substrate.

2.14. Preparation of acetylated compounds

The acetylated compounds were prepared under standard conditions using acetic anhydride and pyridine. Specifically, a mixture of phenolic compound (100 mg), acetic acid anhydride (3 mL) and

pyridine (3 mL) was warmed at 60 °C for 45 min. The reaction mixture was evaporated to dryness under N₂, was poured into ice-cold dilute hydrochloric acid (5 mL) and was extracted with ethyl acetate (2 × 5 mL). A fraction was used for the hydrolysis reactions.

2.15. Enzyme conditioning

The crude extracts from recombinant *P. pastoris* (transformed with pPICZastc1, pPICZantc1 and pPICZα0) were centrifuged at 3000 × g for 15 min and the supernatant was collected and lyophilized. An enzyme solution containing 2 mg/mL of protein was prepared by the dissolution of the lyophilized extract in phosphate buffer pH 7 at a concentration of 50 mM and was tested for its esterase activity by spectrophotometry using *p*-NPA as substrate.

2.16. Enzymatic deacetylation

Acetylated compounds were divided into three groups according to their structure: phenols (I), aliphatic alcohols (II) and flavonoids (III). For this, 15 mg of the acetylated compound were dissolved in 1.1 mL of solvent (acetone or toluene), and 400 μL of enzyme was then added. The volume was adjusted to 3.5 mL with 0.05 M sodium phosphate buffer, pH 7. The reaction mixture was stirred for 48 h at 37 °C and 200 rpm. The degree of conversion was monitored by thin layer chromatography and HPLC. A reaction without enzyme was evaluated for autohydrolysis of all tested acetylated compounds. Upon completion, 2 mL of ethyl acetate was added for product extraction. The organic phase was separated, and the solvent was evaporated to dryness at 37 °C.

2.17. Identification of compounds

All reaction products were fully characterized on the basis of their physical and spectral data. Melting points were determined using a MEL-TEM and were uncorrected. Thin layer chromatography (TLC) was used for analysis of product formation. A solvent system was chosen according to the substrate. The plates were developed using a saturated iodine chamber or by spraying with 10% H₂SO₄, when aliphatic alcohols were tested. A free radical scavenging assay to test antioxidant activity of phenols was performed using the stable free radical DPPH[•] (1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) [37]. Gas chromatography (GC) was performed in an Agilent Technologies 6890N Network GC system, Injector 7683, using a 30 m DB-5MS column with 0.25 mm inner diameter and 0.25 μm film thickness. The temperature range was 50–125 °C. Acetylated and non-acetylated standards were also assayed. HPLC was performed in a Waters 525 HPLC system, and the reaction mixture was separated on a 3.9 mm × 155 mm Waters Symmetry[®] C18 5 μm column. An elution system consisting of methanol and acetic acid (1%) was used. The products were purified by silica column chromatography (mesh size 100–200 μm) and analyzed on the basis of nuclear magnetic resonance (NMR). The nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were measured in CDCl₃ at 300 K on a Varian VXR-300S spectrometer operating at 300 MHz (¹H) and 100 MHz (¹³C). Approximately 25 mg of **1a–1j** (Fig. 8) were dissolved in CDCl₃ with tetramethylsilane (TMS) as internal standard. The structures were identified by direct comparison of spectral properties. MS and ¹H NMR are in agreement with those of the authentic compounds in the literature. The ¹³C NMR data obtained for acetylated compounds (**1a–1j**) (Fig. 8) were compatible with the literature data. We include the ¹³C NMR data for all acetylated compounds (**1a–1j**) but they were characterized also on the basis of ¹H NMR, EM and melting point.

¹³C NMR for 4-O-acetyl-ferulic acid (**1a**): δ = 169.12, 167.75, 148.15, 146.43, 145.42, 126.11, 123.22, 115.14, 109.45, 56.07, 20.65.

¹³C NMR for 2-O-acetyl- α -naphthol (**1b**): δ = 169.51, 146.72, 134.72, 128.12, 126.51, 126.51, 126.09, 121.21, 119.16.

¹³C NMR for 1,4-O-diacetyl-2-ter-butyl-hydroquinone (**1c**): δ = 169.42, 169.35, 147.81, 142.46, 124.69, 126.35, 119.74, 34.58, 29.97, 21.59, 21.11.

¹³C NMR for 4-O-acetyl-coumaric acid (**1d**): δ = 171.30, 169.40, 152.88, 131.75, 129.51, 122.23, 117.27, 21.13.

¹³C NMR for 1,4-O-diacetyl-hydroquinone (**1e**): δ = 169.47, 147.72, 120.75, 21.16.

¹³C NMR for 1-O-acetyl-2-phenylethanol (**1f**): δ = 170.96, 137.83, 129.89, 128.50, 126.56, 64.92, 35.10, 20.94.

¹³C NMR for 5,1'-O-diacetyl-kojic acid (**1g**): δ = 172.06, 169.53, 167.49, 162.18, 147.09, 141.01, 114.19, 60.72, 20.31, 20.14.

¹³C NMR for 3-O-acetyl- β -myricin (**1h**): δ = 170.99, 145.19, 121.61, 80.93, 55.25, 47.55, 47.23, 46.78, 41.71, 39.81, 38.26, 37.71, 37.14, 36.84, 34.73, 33.33, 32.50, 32.40, 31.08, 28.39, 28.03, 26.69, 26.14, 23.57, 23.51, 21.30, 18.26, 16.80, 16.69, 15.55.

¹³C NMR for 3-O-acetyl-dihydrocholesterol (**1i**): δ = 170.89, 73.78, 56.42, 56.27, 54.24, 44.66, 42.58, 39.99, 39.52, 36.76, 36.17, 35.48, 35.46, 34.04, 31.96, 28.24, 28.01, 27.48, 24.21, 23.84, 22.81, 22.56, 21.47, 21.20, 18.67.

¹³C NMR for quercetin pentaacetate (**1j**): δ = 170.54, 160.26, 168.35, 168.31, 168.29, 168.23, 157.32, 154.75, 154.28, 150.86, 144.06, 142.68, 134.52, 128.19, 126.89, 124.40, 124.31, 115.23, 109.46, 21.64, 21.50, 21.14, 20.98.

¹³C NMR for hesperetin tetraacetate (**1k**): δ = 180.05, 160.24, 168.94, 167.94, 167.14, 155.89, 151.58, 151.18, 139.89, 130.54, 124.84, 121.02, 112.47, 111.72, 110.51, 109.88, 78.77, 36.01, 44.87, 21.13, 21.02, 20.89.

¹³C NMR for (+)-catechin pentaacetate (**1l**): δ = 170.23, 169.65, 168.46, 168.16, 154.50, 149.99, 149.55, 142.24, 142.23, 136.28, 124.52, 123.83, 121.90, 110.31, 109.90, 107.80, 77.78, 68.40, 24.96, 21.22, 21.08, 20.91, 20.77, 20.75.

¹³C NMR for (-)-epicatechin pentaacetate (**1m**): δ = 170.42, 168.98, 168.42, 168.09, 168.04, 154.36, 149.73, 149.67, 142.39, 141.28, 135.84, 124.36, 123.29, 122.03, 109.68, 106.74, 100.03, 72.36, 66.64, 36.01, 21.09, 21.05, 20.76, 20.64.

3. Results

3.1. Prediction of structural models

The closest homologues of Nstcl were used as templates for homology modeling of Nstcl and Stcl enzymes. They were a bacterial esterase from *Rhodococcus sp.* with 18% amino acid sequence similarity to Nstcl [54] and a thermophilic esterase from *A. acidithiobacillus* with 30% amino acid sequence similarity [35]. In spite of no significant sequence identity, this procedure was justified by the fact that all esterases belong to the same α/β hydrolase fold superfamily. Additionally, the positions of the amino acids from catalytic triad are in agreement with templates. This suggests that folding of both variants is correct.

Sequence analysis of Stcl and Nstcl performed at Lipase Engineering Database, LED [38] indicates the presence of the typical amino acid residues of the catalytic triad found in α/β hydrolases (Ser-152, Asp-255 and His-285) and the amino acid residues of the oxyanion hole (Gly-86 and Ala-153). The putative catalytic serine of both enzymes is predicted to reside in the amino acid sequence Gly-Ala-Ser-Ala-Gly (residues 150–154). The predicted structural models of the enzymes are clearly related to other esterases. Nstcl has a single domain displaying the canonical α/β hydrolase fold, common in esterases with a Ser/Cys-Asp/Glu-His catalytic triad. The comparison of the putative structural models for both forms shows that the additional N-terminal peptide forms a helix-loop-helix motif that partially covers the active



Fig. 2 Predicted structure models of Stcl and Nstcl. The additional 20 amino acids forming α -helix are denoted in green. Amino acids from the active site catalytic triad and oxyanion hole are shown in blue and red. For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.

site of Nstcl (Fig. 2). The N-terminal motif covering the active-site pocket is characteristic of several esterases, as the liprot esterase (PDB 1LZL), some thermophilic esterases from Archaea (PDB 1EVQ, 1QZ3, 2C7B, 1JJ) and other esterases as lipofoldin-A esterase from *B. subtilis* (1JRM). The structural model of Stcl, in contrast, has not this motif covering the active site, thus exposing a large hydrophobic surface composed by residues from loop 66 to 92 and helix 216 to 223. Furthermore, helix 216–223 found in Nstcl is lost in Stcl, presumably by the lack of contacts with the N-terminal residues. In addition, loops 188–204 and 156–171 are completely disordered as a result of the collapse of helix 216–223 in Stcl.

3.2. Expression in *P. pastoris* of stcl and nstcl genes

The RT-PCR products (545 bp for *nstcl* and 858 bp for *stcl*) were ligated into the pPIC2a vector, generating pPIC2a/*nstcl* and pPIC2a/*stcl* plasmids. The identity of the cloned products was verified by sequencing. BLAST analysis revealed that the sequences of the RT-PCR products were identical to the corresponding *nstcl* and *stcl* gene sequences in Fig. 1. In the case of *nstcl*, we found the cDNA sequence without intron.

While high catalytically active protein was never obtained despite several attempts in *E. coli* (data not shown), an alternative host for heterologous expression was sought. *P. pastoris*. Plasmids were linearized with *PmeI* and *P. pastoris* X-33 was transformed. On the plates containing tributyrin, colonies harboring *nstcl* gene showed a bigger halo ring than clones harboring *stcl* gene. The presence in *P. pastoris* of the *stcl* or *nstcl* genes was corroborated by PCR using DNA from clones as template with AOX universal primers and sequencing. The results showed that the fragments corresponded to the *stcl* gene and *nstcl* gene and that they were in frame with the α -factor secretion signal sequence on the vector for extracellular expression.

For Stcl expression, *P. pastoris* harboring the plasmid pPIC2a/*stcl* as integrating in its genomic DNA was cultivated in BMGY medium and then transferred to BMMY medium. At different times, samples were taken from the culture and assayed for cell growth and esterase activity (data not shown). After 48 h of induction, low esterase activity towards p-NFA (30 U/mg protein) was found and it was constant up to 72 h, and then decreased (data not shown). In the supernatant collected after 48 h of methanol induction, we have measured 13.9 U/ml with 0.355 mg protein/ml.

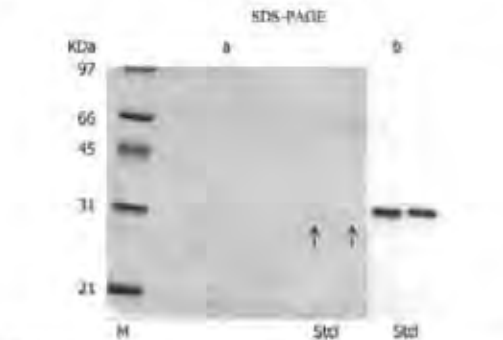


Fig. 3. Protein pattern and synthesis of extracellular extracts of recombinant clone expressing *Stc1* protein. (a) Protein pattern on SDS-PAGE gel after renaturation staining. M, low molecular weight marker; S1c1, crude extract of the recombinant clone expressing *Stc1* protein. (b) Esterase activity after renaturation of *Stc1* protein expressed by recombinant clone.

The ultrafiltered preparation was used for the purification of the recombinant enzyme. SDS-PAGE and zymogram analysis showed a single protein band having a molecular mass of 31 kDa which corresponds to the theoretically calculated value (31.19 kDa) with esterase activity (Fig. 3). The identity of the enzyme was corroborated also by western blot of native gel using specific antibodies (anti-*Stc1*), which confirmed also the antibody specificity (Fig. 5). The enzyme has a pI of 5.3 which differs slightly from theoretically calculated value (4.91) (data not shown). Zymograms of native gel revealed two esterase activity bands, a stronger band with higher molecular mass and a weak band near to 31 kDa (Fig. 5).

For *Nstc1* expression, *P. pastoris* harboring plasmid pPICZn*Nstc1* was cultivated as before described. After 24 h of induction, high esterase activity towards *p*-NPA (300 U/mg protein) was detected and it was constant up to 96 h and then decreased (data not shown). In methanol induction phase, the maximum esterase activity mea-

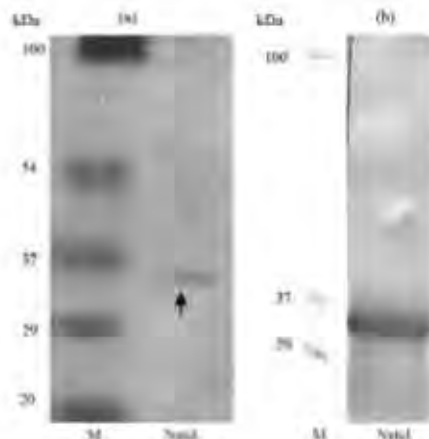


Fig. 4. Purified *Nstc1* protein of *in vitro* soluble extracts of recombinant clone. (a) Purified protein on SDS-PAGE gel after renaturation staining. M, low molecular weight marker; Nstc1, purified recombinant *Nstc1* protein. (b) Western blot analysis against recombinant *Nstc1* protein on SDS-PAGE gel.

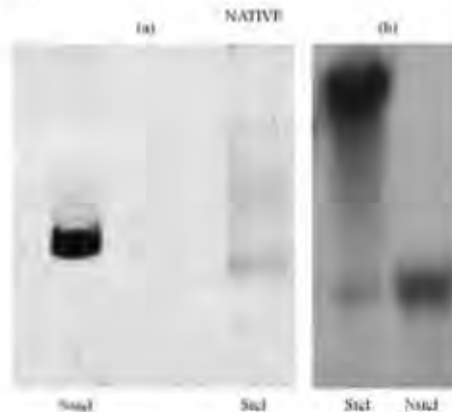


Fig. 5. Analysis of purified recombinant *Nstc1* and *Stc1* proteins on native gels. (a) Western blot analysis against purified recombinant *Nstc1* and *Stc1* proteins on native gels. (b) Esterase activity of purified recombinant proteins on native gels.

sured in the supernatant was 189.7 U/ml with 0.527 mg protein/ml after 24 h of induction. SDS-PAGE and western blot analysis showed a single protein band having a molecular mass of 35 kDa which corresponds to the theoretical mass, 34.558 kDa (Fig. 4). The observed pI was approximately 4.5 lower to theoretical pI (4.84) (data not shown). Activity was detected only on native gels as a single band near to 35 kDa (Fig. 5).

3.3. Effect of temperature and pH on esterase activity and stability

Nstc1 esterase was more active in temperature ranges of 30–50 °C, showing a maximum activity at 40 °C, while *Stc1* esterase was more active in a range of 20–40 °C, showing a maximum activity at 30 °C. The thermostability of each enzyme was examined by measuring its residual activity after 30 min at pH 7.5. In these conditions, both enzymes retained up to 70% of their initial activity in the range of 20–40 °C. However, when the temperature was elevated to 50 °C, *Nstc1* lost 50% of its initial activity, and *Stc1* kept only 20% of its initial activity. Both enzymes were stable throughout 30 min incubation at the temperature where maximum activity was reached, 40 °C for *Nstc1* and 30 °C for *Stc1* (Fig. 6).

The effect of pH on *Nstc1* activity at 37 °C was studied with *p*-NPA as the substrate. *Nstc1* was active in the pH range of 7–9, while *Stc1* was active between pH 6 and 8; the highest activity was found at pH 9 for *Nstc1* and pH 8 for *Stc1*. Using the pH-stat method for measuring activity, *Nstc1* lost 80% of its activity at pH 10 (data not shown). The *Nstc1* enzyme showed the highest activity at 37 °C, following 12-h incubation at pH 9, and was more stable in the pH range of 8–10. On the other hand, following 12-h incubation, *Stc1* conserved its activity better at pH 9 than at other pH values, while its stability was better in the pH range from 7 to 9.

3.4. Different chain-length specificity for recombinant enzymes

The *Nstc1* esterase was able to hydrolyze all *p*-nitrophenyl synthetic substrates evaluated showing higher activity than *Stc1* in all cases. The highest activity (360 U/mg protein) was observed towards C2:0 chain-length *p*-nitrophenyl ester (*p*-NPA). In contrast, *Stc1* esterase was able to hydrolyze all *p*-nitrophenyl synthetic sub-

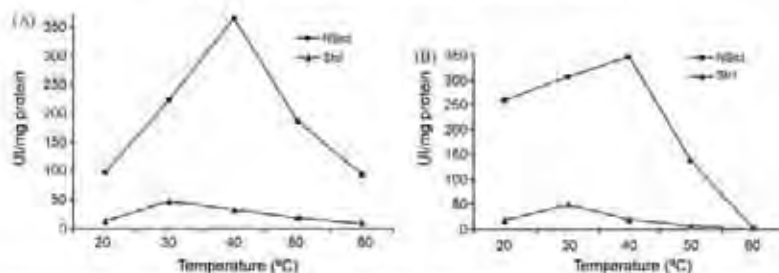


Fig. 6. Dependence of enzyme activity on temperature. Nstcl (■) and Stcl (▲). (A) Effect of temperature on esterase activity. (B) Effect of temperature on stability of the enzyme. Effects were determined by the spectrophotometric method using 50 mM phosphate buffer, pH 7.5. Results are the mean of three replicates.

Table 1
A mixture esterase-mediated deacetylation of different compounds in 30 h at 37 °C.

Group	Compound	Acetylated structure (Fig. 8)	Melting point (°C) of acetylated compound	μg acetylated compound (2/mg)	μg deacetylated compound (2/mg)	% conversion Nstcl	% conversion Stcl
Phenols I	Ferulic acid	1a	107	236	191	96	0
	α -Naphthol	1b	113	186	144	100	100
	TBHQ (tert-butyl hydroquinone)	1c	80	250	500	0	0
	coumaric acid	1d	106	206	164	0	25
	Hydroquinone	1e	50	194	110	100	98
Aliphatic alcohols II	Phenylethanol	2f	105	164	123	0	80
	Kojic acid	2g	75	226	180	25	0
	β -Amyrin	2h	220	468	426	47	33
	Dihydrocholesterol	2i	87	428	N/A	0	0
Flavonoids III	Quercetin	3j	181	312	300	95	15
	Isopuerarin	3k	108	305	312	100	30
	(-)-Catechin	3l	102	500	290	100	62
	(-)-Epicatechin	3m	175	444	290	100	23

N/A = no hydrolysis by Stcl variant.

strates displaying the highest activity towards long chain-length *p*-nitrophenyl ester (*p*-NPS) (C18:0) (Fig. 7).

3.5. Deacetylation profile

Compounds having a structure similar to VHA (the original substrate of the enzyme) were tested as substrates for recombinant Nstcl and Stcl proteins. The structures of acetylated compounds are shown in Fig. 8. The results indicate that both recombi-

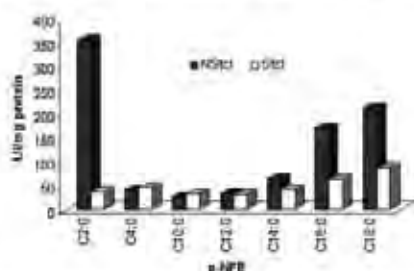


Fig. 7. Substrate preference. Substrate preference towards *p*-NP esters by Nstcl (black) and Stcl (grey bars). Esterase activity on *p*-NPE was determined by the spectrophotometric method using 50 mM phosphate buffer, pH 7.5. Results are the mean of three replicates.

nant enzymes, Nstcl and Stcl, have broad substrate specificity, but their substrate affinities are different. The results are summarized in Table 1, where the substrates are divided into three groups.

Group I (phenols), consists of compounds having higher structure similarity to VHA like *p*-NPA, α -naphthyl acetate and hydroquinone acetate. They were deacetylated with high efficiency (100%) by Stcl and Nstcl enzymes, as expected. This group includes also hydroxycinnamic acids. A difference in hydrolysis of these compounds was found: surprisingly, acetylated ferulic acid was hydrolyzed efficiently only by Nstcl (96%), while Stcl was shown to hydrolyze only acetylated coumaric acid (25%). In both cases, antioxidant activity was recovered after deacetylation of the compounds (data not shown). Hydrolysis of acetylated TBHQ was not detected under our assay conditions.

Among the substrates found in group II, both enzymes hydrolyzed β -amyrin with low yield. None of them hydrolyzed dihydrocholesterol. Pheryl ethyl acetate was hydrolyzed only by Stcl with low yield (30%) and; interestingly, only Nstcl hydrolyzed kojic acid (75%). This hydrolysis product was not fully deacetylated (data not shown); NMR analysis revealed that incomplete deacetylation was regioselective at position C3, which is the position that is regarded as important for recovery of antioxidant activity [39], a behavior that was observed with the stable free radical DPPH.

Flavonoids (group III) were efficiently hydrolyzed by Nstcl (95–100%), with the lowest yield observed for epicatechin (60%).

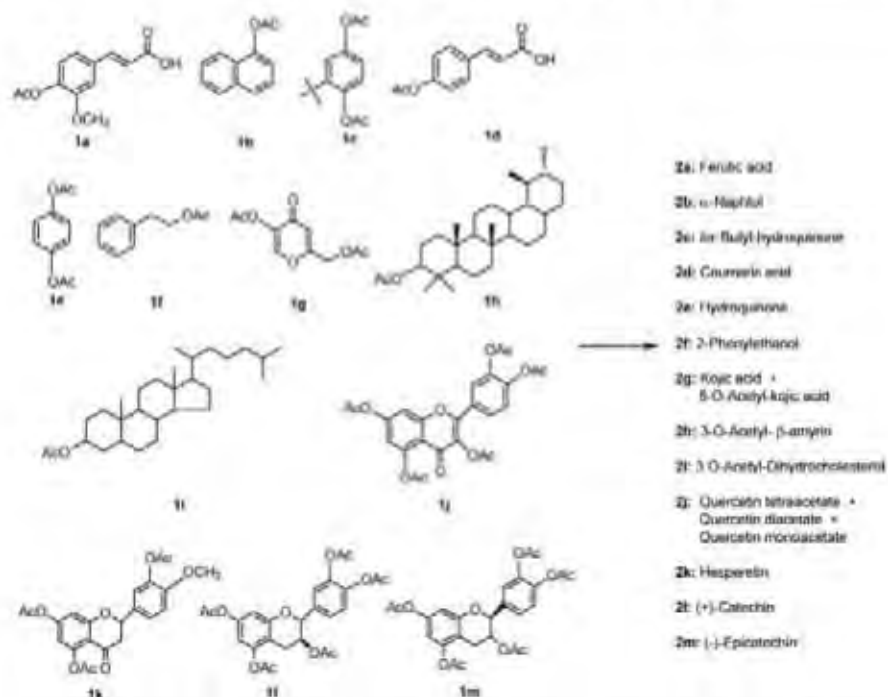


Fig. 8. Structures of compounds modified by Ntcd and Stcd. (1) Structure of acetylated compounds. (2) Structure of products obtained after deacetylation.

Stcd deacetylated flavonoids less efficiently (15–20%), and the highest yield was found for catechin (63%). TLC experiments showed that the hydrolysis of quercetin produced different patterns of products for each enzyme. Antioxidant activity of flavonoids was recovered after deacetylation (data not shown).

4. Discussion

The structural models suggest that the active site of Stcd is completely accessible to the solvent, while that of Ntcd is partially covered by the additional residues at the N-terminus that builds up part of a lid or an elaborate active site cleft. These findings, together with the differences in activity towards several substrates, confirm that one of the roles of the N-terminus in Ntcd is to modulate or discriminate substrate access to the active site. Thus, the lack of this motif will modify the chemo-, regio- and stereospecificity of the enzyme. In addition, this N-terminal motif may also play an essential role in stability. The hydrophobic surface exposed in Stcd may induce protein aggregation as a result of hydrophobic interactions, as we have seen on native gels. Above and beyond, the overall loss of structure predicted for the Stcd may dramatically reduce the core packing of the molecule, which keeps the enzyme folded for long time. Differences in expression levels for both clones and slight differences in their response to pH and temperature changes support this idea. Furthermore, yields for almost all acetylated products tested and activity on typical esterase substrates were higher for the Ntcd form.

There were no reports about biochemical and catalytic properties Stcd enzyme. It has been reported by Brown as a putative lipase/esterase [1]. We have found that the Ntcd variant is an esterase, while the Stcd as reported by Brown present lipase-like features. This finding is strongly correlated with the role of the N-terminus. Few investigations have been undertaken on the role of N-terminal region in enzyme substrate specificity. Sayari et al. found a shorter form of the 32 kDa lipase of *Rhizopus oryzae* after storing the culture medium at 0 °C for several months. This 29 kDa lipase (lacked 28 amino acids from the N-terminal region and showed different regio- and stereospecificity from the 32 kDa form [40]). Mandrew et al. reported an interesting structural study on the role of the N-terminus in the hormone sensitive lipase family highlighting the importance of the cap domain in several enzyme functions. They found different catalytic properties for a mutant of a thermophilic esterase belonging to the hormone sensitive lipase family, in which 15 amino acids from its N-terminal end were removed. This 35-amino acid region formed a cap domain that covered the active site in the wild type enzyme. They have found that after the removal of a cap domain it was clear that this deletion open the access to the active site and therefore should favor activity against long chain triglycerides which confers lipase-like features [41]. Interestingly, we have found also differences in the hydrolysis of p-NPE after removal of residues 1–29 of Ntcd as Ntcd displayed the highest activity towards short chain-length p-NPE (p-NPA) while Stcd displayed the highest activity (towards long chain-length p-NPE (p-NPS). Similar results were obtained with ethyl esters with acyl group chain-lengths from

C49 to C160. Our results are in accordance with the previously obtained by Mandrich with other esterase. The structural model for NstcI showed also this gap domain at the N-terminus covering the active site. Moreover, it has been reported that in the hydrolase family of enzymes, insertions are commonly observed in the canonical structure at the amino and carboxyl termini. Such insertions are believed to modulate the substrate specificity of the enzyme [34]. NstcI has one predominantly helical 29- amino acid insertion at the amino terminus and it modulate substrate specificity.

In the case of phenols, it was clear that the presence the *tert*-butyl group is a steric impediment for the hydrolysis, as the results were negative for both forms and in the absence of this, the hydrolysis was very efficient. Another important functional group is the hydroxyl group in the case of ferulic and coumaric acids. Its absence in aromatic founders deacetylation by NstcI.

The yield percentages were generally higher for flavonoid compounds, and in all cases, the complete form (NstcI) displayed more activity. Interestingly, these compounds have at least three rings (bulky part), which have a structure similar to VHA, the substrate in the biosynthetic via. As TLC showed different products for this group, the pattern of deacetylation needs to be determined. In TLC we could observe that this was different from *C. antarctica*.

In the case of aliphatic alcohols and phenols, the results were more heterogeneous for both enzymatic forms. As such, cholesterol and the TBHQ nucleus were not recognized by either. Amino is the bulkier form, and this was hydrolyzed by both enzymes in similar proportions. In order to clarify the differences in these behaviors, it is important to carry out crystallization of the enzyme and perform docking experiments.

The difference in chemoselectivity of these enzymes may be useful for biotechnological processes, and an interesting example is the selectivity difference found between substrates of group II (hydroxyaromatic acids). This result strongly suggests that protein engineering may be used to modify the N-terminal segment of NstcI to change the regio- or chemoselectivity of this or other enzymes. In case of flavonoid deacetylation, an industrially important biotransformation, where few enzymes capable of this function have been reported, it must be noted that the products obtained with the NstcI form are comparable to those reported for *C. antarctica* lipase [16]. Assay conditions may be manipulated in order to increase yields.

5. Conclusions

We found an additional 29- amino acid N- terminal region of the already reported *stfI* gene. Predicted structural models suggested that this N-terminus modifies substrate access to the active site. This was corroborated after experimental work; as we observed differences in the hydrolysis of *p*-NPE, in chemoselectivity for deacetylation of phenols, kojic acid and flavonoid esters and aserin regioselectivity for the deacetylation of kojic acid and flavonoles. Moreover, this region is also important for the stability of the enzyme, as we have always obtained higher activity for NstcI protein and we observed slight differences in their response to pH and temperature.

Acknowledgments

EPM received a scholarship from DAAD, Germany which allowed collaboration with the ITB, University of Stuttgart. We appreciate the help of American Journal Experts (www.journalexperts.com) for their assistance with the English revision of this manuscript.

References

- [1] D.W. Brown, J.H. Yu, H.S. Kellam, M. Ferrnandes, L.C. Novillo, M.F. Keller, L.H. Adams, L.J. Leonard, Proc. Natl Acad. Sci. USA 91 (1994) 1418–1422.
- [2] J. Yu, K.K. Chang, G. Bhattacharya, L.F. Cleveland, Mycophthalogen 176 (2002) 227–234.
- [3] J.K. Chang, K. Yabe, J. Yu, Appl. Environ. Microbiol. 70 (2004) 1031–1035.
- [4] B.A. Wu, D. Taylor, M. Zhu, S. Wang, R. Collins, J. Prank, J. Jones, J. Dunlop, M. Nelson, Available via: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ncbi/blast/blast.cgi> (accessed 23/01/06).
- [5] J.D. Brindley, M. Nelson, G. von Hellermann, E. Frusadi, L. Mol. Biol. 170 (2004) 787–797.
- [6] H. Morishita, M. Ohnishi (Eds.), Absorption, Metabolism and Biological Activities of Chitinous, Amino and Related Compounds, Elsevier Science, Oxford, UK, 2001, pp. 919–953.
- [7] F.A.M. Silva, F. Borges, C. Guimarães, J. J. C. Sousa, Mater. Sci., Lett., Agric. Food, Chem. 49 (2000) 2129–2136.
- [8] M.A. Carballido, C.L. López, B. Delgado, F. Molero, J. Mol. Biol. 150 (1999) 215–240.
- [9] M. Sevilin, G. Maitani, A. Ferrero (Eds.), Biol. 129 (1998) 1000–1009.
- [10] M.C. Hinojosa-Gonzalez, V. Villanueva, J. Acuña, Food Chem. 51 (2000) 2779–2787.
- [11] K.E. Jensen, B.W. Hjeltnes, M.T. Iselt, Avian. Rev. Microbiol. 31 (1999) 145–153.
- [12] G.F. Hernandez, JEMS Microbiol. 26 (2003) 73–81.
- [13] R.C. Srinivas, S. Verjee, Angew. Chem. Int. Ed. 37 (1998) 1006–1011.
- [14] V. Gotoh, Y. Nakamura, H. Ohya, Y. Gotoh, J. Mol. Catal. B: Biotechnol. 40 (2004) 111–120.
- [15] J. Corbiel, C. Barrelet, A. Takizawa, L.M. Krutman, M. Chem. Process. Biotechnol. 41 (2006) 2231–2251.
- [16] D. Lamasara, C. Alvarado, A. Páez, C. Santibáñez, J. Mol. Catal. B: Biotechnol. 32 (2001) 221–227.
- [17] V.S. Bhatnagar, H.H. Patel, A. Azim, K. Kumar, K.S. Bhat, A.K. Prasad, W. Jongsomjit, Bioproc. Mod. Chem. 11 (1998) 101–108.
- [18] Y.S. Bhatnagar, A. Kumar, H.H. Patel, K.S. Bhat, S. Bhatnagar, S. Gupta, Biochim. Biophys. Acta 1197 (1999) 175–180.
- [19] M. Kato, G. Nishimura, M. Hiroh, J. Org. Chem. 52 (1987) 5146–5178.
- [20] J. Santibáñez, E.T. Fidalgo, T. Matyjas, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.
- [21] K. Kato, T. Akita, S. Yamaguchi, Agric. Biol. Chem. 52 (1988) 41–47.
- [22] H.K. Lammi, Nature 227 (1970) 680–685.
- [23] J.E. Galagan, S.E. Cahoon, C. Gamm, L.J. Ma, J.R. Warriman, S. Ruzoski, S.L. Lee, M. Bergstrom, et al. Spewak, J. Chromatogr. V. Kapteina, Nature 438 (2005) 1105–1115.
- [24] M. Douglas, Methods Mol. Biol. 25 (1994) 101–104.
- [25] M.A. LaRoche, C. Blackledge, N.P. Brown, E. Gnanou, Biotechnol. 23 (2007) 2919–2930.
- [26] T. Hall, Bioinformatics Sequence Alignment Filter for Windows, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi> (accessed 29/01/07).
- [27] D. Beránek, J.P. Vinson, M.J. Prasad, P. Mounyovany, M. (ed.), J. Chromatogr. 1250 (2005) 1399–1408.
- [28] K. B. Oller, S. Kato, Chrom. Sci. 39 (1998) 100–104.
- [29] K. Oller, A. Saitoh, C. Hoshino, C. Otsu, H. Akai, R. Hama, Nature Acad. Sci. 71 (2002) 1784–1788.
- [30] E. Lippert, H. Leonard, S. De Nolle, E. Siqueros, Biotechnol. 18 (2000) 1250–1256.
- [31] G.J. Vriend, Mol. Cryst. Liq. Cryst. 199 (1991) 51–58.
- [32] L.J. McGilchrist, D.T. Jones, Biotechnol. 19 (2001) 874–881.
- [33] D.T. Jones, J. Mol. Biol. 292 (1999) 195–207.
- [34] H. Zhu, N.A. Larson, A. Gnan, N.A. Boley, C.A. Wilson, J. Mol. Catal. 176 (2001) 203–214.
- [35] P. De Simone, L. Mandrich, V. Merello, V. Gaudenzi, F. Imbriani, M. Rossi, C. Pedone, G. Manno, J. Mol. Catal. 179 (2000) 687–692.
- [36] M. Peled, M.A. Kivric, Acad. Biochem. 112 (1981) 210–222.
- [37] E. Demers, T. Corbiel, L. Du, Chromatogr. Biotechnol. 25 (2000) 153–164.
- [38] M. Fisher, J. Pleks, Biotech. Acad. Res. 31 (2003) 119–121.
- [39] H.S. Kuo, H.S. Bao, J.W. Yau, Bull. Korean Chem. Soc. 28 (1997) 878–879.
- [40] A. Sagar, F. Giladi, R. Mlot, H. Mittal, Y. Ben-Zur, B. Shargel, Y. Gargovet, 1996, Lett. 579 (2005) 420–482.
- [41] L. Mandrich, L. Merino, M. Pizzullo, L. Corbiel, P. Hinojosa, M. Rossi, G. Manno, J. Mol. Catal. 180 (2005) 501–512.



Carolina Peña-Morales she studied Food Chemistry at the National Autonomous University of Mexico (UNAM), later in Faculty of Chemistry (UNAM), where she obtained her MSc. In Biochemistry and Biotechnology degree. She worked as post-doctoral researcher at the Institute of Industrial Biotechnology for PhD studies, she obtained a grant from DAAD for working as Post-Doctoral laboratory in the Institute of Technical Biotechnology at the University of Stuttgart, where she worked for 2 years. She is in process to obtain her PhD in Biochemistry Sciences degree. Actually, she works at UNAM as academic technician at the food and biotechnology department.



Dr. Stefan Lange Dr. Stefan Lange is Senior Team leader at Roche Molecular Diagnostics in Rotkreuz, Switzerland where he focuses on test development, e.g. the recently launched CE marked MRSA Advanced test. Before joining Roche Diagnostics in 2007, Stefan worked for more than a decade at the Institute of Technical Biochemistry at the University of Stuttgart, Germany where he received a Diploma (1993) and a PhD (2002) in "Technical Biology". Research interests and topics of numerous publications in international journals and congresses include recombinant expression and directed evolution of enzymes and antibodies, exploration of metagenomes for industrial enzymes, biocatalysis, and systems biology.



Dr. Rolf Schmid Rolf's final studies Chemistry at the University of Münster, later in Freiburg, where he obtained his Dr. rer. nat. degree in 1970 for thesis work done in Hans Genschel's laboratory. After postdoctoral studies in France and the USA, he joined the research laboratories of Henkel KGaA in Düsseldorf where he became Director of the Biotechnology Laboratories. In 1987, he moved to the Technische Universität Braunschweig (TU) in Braunschweig where he headed the Division of Enzyme Technology and Natural Products Research. In 1993, he built up the Institute for Technical Biochemistry at the University of Stuttgart.



Denise Castro-Ochoa Denise Castro studied Biochemical Engineering at UNAM's Institute of Technology, Mexico, later she obtained her MSc Biochemical Engineering Sciences degree at Veracruz Institute of Technology, Veracruz, México. Thesis title: Screening, purification and characterization of the thermophilic lipase produced by *Bacillus thermophilus* CCR11. Actually she is studying at the National Autonomous University of Mexico (UNAM) to obtain her PhD in Biochemistry Sciences degree, working under the supervision of Dr. Amelia Farrés.



Dr. Arturo Navarro-Ocaña Arturo Navarro Ocaña, born in Mexico City, received his PhD in Food Biology from Mexico National University (UNAM), in his PhD working under the supervision of Eduardo Rizzani García in the area of biocatalysis/biotransformations. In 1998 after stay in Iowa University, Laboratory of Biocatalysis in USA, he joined the chemistry faculty in the food and biotechnology department at the UNAM. His research is currently studying the fundamental and applied aspects of the food chemistry: food colorant, antioxidant, microflora and functional food, biocatalysis and biotransformations in organic synthesis; bioreduction of nitro and carbonyl groups and saponification with lipases the hydroxycinnamic acids and other natural molecules.



Katia Ruiz-Noelia Katia Ruiz Noelia studied Food Chemistry at the National Autonomous University of Mexico (UNAM). Her thesis work was done in Amelia Farrés's laboratory focused in enzymatic biocatalysis. She has experience in HPLC and Gas Chromatography. Actually she is working for the food industry.



Dr. Amelia Farrés Amelia Farrés is a biologist from UNAM, Mexico, and a graduate in Biotechnology at the same University. Her research interests include several aspects in Food Biotechnology. Most of her publications are related to enzyme production and regulation. She works at the Chemistry Faculty from UNAM, where she headed the Department of Food and Biotechnology. 21 graduate students have obtained their degree under her supervision.



Dr. Felipe Cruz-García Felipe Cruz studied Biology at UNAM, later he obtained his Dr. Chemistry Sciences (Biochemistry) degree in 1997 at UNAM. He worked in the Department of Molecular Genetics of the University of Missouri-Columbia (USA) from 1997 to 1999 during his postdoctoral studies in Bruce McClure's laboratory. Actually he works at the Biochemistry Department of Chemistry Faculty, UNAM. 12 graduate students have obtained their degree under his supervision. His research work is focused in plant biochemistry.