

CLONING, EXPRESSION, BIOCHEMICAL PARTIAL
CHARACTERIZATION AND MODELING OF ESTERASE FROM
ACINETOBACTER CALCOACETICUS SP DSM587

CLONACION, EXPRESIÓN, CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA
PARCIAL Y MODELADO DE UNA ESTERASA DE
ACINETOBACTER CALCOACETICUS SP DSM587

Inmaculada Navarro-González

Facultad de Biología, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular-A, Universidad de Murcia,
Campus Espinardo, E-30100 Murcia, Spain.

ABSTRACT

The aim of this paper has been to clone, express, purify and characterization the EstB from *Acinetobacter calcoaceticus* encoded by the gen X8895. The esterase was cloned in Pet28a and partially purified. The molecular mass of the purified enzyme was 36 kDa (by SDS) and 68.9 KDa (by gel filtration chromatography). The EstB showed a maximum activity at 35°C and pH 8 and towards shorter acyl chain lengths (PNPA, PNPB, PNPC) and showed activity about S-methyltiobutanoate, too. The catalytic triad has been predicted by aminoacid sequence alignment and the structure modeling was performed used esterase 1QoR as template.

Keywords: Recombinant esterase, over expression, microorganisms, kinetic characterization.

Correspondence to author:

inmaculada.navarro@um.es

Escrito recibido el 22 de febrero de 2013, aceptado el 14 de mayo de 2013.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo ha sido clonar, expresar, purificar y caracterizar la EstB de *Acinetobacter calcoaceticus* codificada por el gen X8895. La esterasa se clonó en el sistema de expresión pET28a+ y fue purificada parcialmente. El peso molecular de la esterasa fue de 36kDa (estimado por SDS-PAGE) y 68.9 kDa (estimado por cromatografía de filtración en gel). La esterasa mostró su máxima actividad a pH 8 y a 35°C hacia sustratos de cadena corta (PNPA, PNPB y PNPC) y también mostró actividad sobre el S-metilbutanoato. Empleando la proteína 1QoR se predijo su estructura y los aminoácidos del centro activo.

Palabras clave: Esterasa recombinante, sobre expresión, microorganismos, caracterización cinética.

INTRODUCCIÓN

Acinetobacter es un género de bacterias Gram-negativas que presentan una morfología de tipo cocobacilo y son estrictamente aerobios no fermentativos e inmóviles. La mayoría de las bacterias del género *Acinetobacter* son una fuente importante de infección en los hospitales para los pacientes debilitados y ocasionalmente son aisladas de los productos alimenticios. Estas bacterias son capaces de sobrevivir en diversas superficies (tanto húmedas como secas) en el ámbito hospitalario (Silva et al., 1999).

Las especies ahora clasificadas como miembros del género *Acinetobacter* han sufrido cambios taxonómicos a lo largo de la historia, lo que ha impedido su adecuado estudio. La primera descripción de este género bacteriano, la hizo W Von Lingelsheim en 1908 con el nombre *Diplococcus mucosus*. Tres años más tarde, M W Beijerinck describió una especie a la que hoy se le denomina *Acinetobacter calcoaceticus*. En 1939 perteneció a la familia *Mimeae*. En 1940 Alice Audureau la ubicó en el género *Moraxella*, en 1954, tras una revisión, Brisou y Prevot volvieron a denominarlas *Acinetobacter*. Y fue en 1986 cuando los microbiólogos y taxonomistas, Bouvet y Grimont, realizando estudios genéticos de hibridación del ADN, establecieron 12 grupos entre las 85 cepas de *Acinetobacter* estudiadas (Lederhann, 2007).

Taylor y Juni (1961) aislaron del aceite una bacteria a la que en un principio se denominó BD4 y la introdujeron en el género *Neisseria*, y hoy día se la conoce como *Acinetobacter calcoaceticus* BD4. Estos investigadores observaron que la bacteria tenía la peculiaridad de utilizar el acetato y otros ácidos grasos como fuente de carbono y producir hidratos de carbono que segregaban al exterior formando una cápsula a su alrededor. El polisacárido capsular estaba formado por L-ramnosa y D-glucosa en una relación 4:1.

Kaplan et al., (1985), encontraron la cepa BD413. Estos, observaron que la tasa de formación del polisacárido capsular era cuatro veces mayor en la cepa salvaje, pero la tasa de excreción era del 50% en la BD413 y tan solo del 10% en la BD4. Geißdörfer et al., (1999), estudiaron los genes de *A. calcoaceticus* ADP1 (BD413) involucrados en la degradación de n-alcenos, encontraron una esterasa que denominaron EstB y que no caracterizaron.

Debido a sus características ecológicas, taxonómicas, fisiológicas y genéticas, las especies del género *Acinetobacter* están siendo explotadas en diversas aplicaciones biotecnológicas incluyendo la biodegradación y biorremediación, la producción de lípidos y péptidos, la ingeniería de enzimas y la producción de biosurfactantes y biopolímeros. Debido a estas características y a su procedencia oleosa, el objetivo de este estudio fue clonar la EstB codificada por el gen X8895, caracterizarla cinéticamente y predecir su estructura tridimensional.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos, plásmidos y cepas bacterianas

Acinetobacter calcoaceticus sp DSM587 (BD413 ivl-10) fue comprada a la colección alemana de microorganismos DSMZ (German collection of microorganisms and cell cultures, Germany).

Los kits de Biología Molecular utilizados se compraron a Quiagen (Hilden, Alemania). La T4 DNA ligasa y los oligodesoxirribonucleótidos diseñados específicamente para el gen fueron comprados a Isogen Life Science (IJsselstein, Holanda). El vector de expresión, pET-28a+, se compró a Novagen (Darmstadt, Alemania). La cepa bacteriana de *Escherichia coli* usada para la clonación y expresión (Rosetta (D3)) y las enzimas de restricción se adquirieron de Invitrogen (Frederick, EEUU) y Novagen (Darmstadt, Alemania).

Los sustratos usados para medir la actividad esterasa y lipasa fueron 2-nitrofenilmiristato, 4-nitrofenillaureato, 4-nitrofenilcaprilato, 4-nitrofenilbutirato, 4-nitrofenilacetato, α -naftil acetato, β -naftil acetato, α -naftil butirato y β -naftil butirato. Los sustratos utilizados para medir la actividad tioesterasa (S-metiltiobutanoato), los inhibidores específicos de aminoácidos (paraoxon, eserina, pestatina A, fenilglicosamonohidradato (PGO), dimetilpirocarbonato (DEPC), fenilmetilsulfonil fluoruro (PMFS)), los iones en forma de sales (Mn^{2+} , Mg^{2+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Na^{2+}), EDTA, el isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG), la kanamicina, cloranfenicol, marcadores de peso molecular, inhibidor de proteasas, ácido bicinconínico, albúmina de suero bovino (BSA), DTNB (ácido 5-5'-bisditio nitrobenzoico) y bromuro de etidio se compraron a Sigma (Madrid, España).

Las sales y tampones inorgánicos se compraron a Fluka (Buchs, Suiza). Los reactivos para electroforesis de proteínas fueron obtenidos de Bio-Rad (Hércules, EEUU). El agua utilizada se purificó a través de un sistema Milli-Q de Millipore (Bedford, EEUU). Los medios de cultivo fueron comprados de Laboratorios Conda (Madrid, España).

Clonación y expresión de la proteína

Las técnicas de clonación y transformación empleadas fueron descritas por Sambrook et al., 1989. Para la clonación del gen X8895 se utilizaron los oligonucleótidos o cebadores complementarios a los extremos 5' y 3' del gen.

X-up (5'CCGAATTCATGAATAGCGCTTTGCAATT3') derivado del extremo 5' de la secuencia del gen. X-down (5'GGAAGCTTTTATGATCTAAAGTGATGAG3') derivado del extremo 3' de la secuencia del gen.

A los cebadores se les incluyó la secuencia de reconocimiento para las enzimas de restricción EcoRI para X-up y HindIII para X-down.

Los genes amplificados se obtuvieron mediante PCR (Minicycler Research MJ, EEUU) usando como molde el genómico obtenido de *A. calcoaceticus* sp DSM587. Los productos amplificados obtenidos de la PCR se digirieron con las enzimas de restricción nombradas y se purificaron mediante su aislamiento en gel de agarosa, e insertaron en un vector de expresión (pET-28a+), el cual fue anteriormente digerido con las mismas enzimas de restricción. La reacción de ligación entre el vector y el inserto se hizo manteniendo una relación 2:1 (inserto:vector) a 16°C durante 16 horas. Los plásmidos obtenidos fueron utilizados para transformar en células electrocompetentes de *E. coli* Rosetta, las cuales se sembraron en placas de LB (Luria Broth) agar con 50 μ g/mL kanamicina y 34 μ g/mL cloranfenicol y se incubaron 12 horas a 37°C.

La identificación de los clones positivos se realizó mediante una PCR de colonias. Algunos clones de los que dieron positivos se pusieron a crecer en LB con los antibióticos a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0.9. En este momento se añadió el IPTG a 0.5 mM, para inducir y expresar la proteína a 30°C durante 12 horas.

La preparación del extracto enzimático inicial se realizó poniendo 0.25 g de masa bacteriana en 25 mL de tampón fosfato potásico 50 mM pH 7. El tubo que contenía esta suspensión se introdujo en hielo y la suspensión fue sonicada durante un minuto unos cuatro ciclos, a la máxima potencia, utilizando un sonicador Cole-Palmer serie 4710. El lisado celular se centrifugó a 11000 g 20 minutos a 4 °C y se colectó el sobrenadante, para medir la actividad esterasa.

El clon seleccionado fue almacenado a -80°C en un ultracongelador (UltraLow MDFU3086, Sanyo Electric, Lapon) en forma de glicerol stock (40% glicerol). A ese clon se le extrajo el ADN plasmídico para secuenciarlo y certificar que la secuencia del gen clonado era la misma que la depositada en la base de datos NCBI.

Cultivos de alta densidad

Para obtener una mayor cantidad de proteína se realizaron cultivos bacterianos de alta densidad en 1 L de medio TB (Terrific Broth) con kanamicina y cloranfenicol en un matraz aforado de 5 L, bajo las condiciones óptimas de expresión.

Para lisar las células bacterianas se empleó un homogenizador de bolas de vidrio (Mini Zetall, Netzsch) y obtener el extracto enzimático.

Determinación y análisis de proteínas

La cuantificación de proteína se realizó por el método del ácido bicinconínico (Smith et al., 1985).

La electroforesis bajo condiciones desnaturalizantes se hizo siguiendo el método Laemmli, 1970.

Para calcular el porcentaje de proteína recombinante expresada y el peso molecular del monómero, el gel de electroforesis se sometió a un análisis de imagen en el equipo Image Quant TL software (Versión del 2005) (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia).

Purificación y determinación del peso molecular de la proteína

La proteína fue purificada parcialmente con sulfato de amonio, realizándose diferentes ensayos para determinar el porcentaje de saturación de sulfato de amonio más adecuado, probándose un rango entre 20% y 80% de saturación.

El cálculo del peso molecular se realizó por filtración en gel, empleándose una columna Tricorn Superdex 200 10/300 GL (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) equilibrada con tampón fosfato potásico 50 mM conteniendo NaCl 0.15 M. Los ensayos se efectuaron en un equipo ÄKTA Purifier (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min. Los cálculos se hicieron utilizando una recta de calibrado realizada con los marcadores de peso molecular contenidos en un Kit de Sigma (Sigma, St. Louis, EEUU). Los marcadores utilizados fueron aldolasa, 158 KDa; albúmina de suero bovina, 66 KDa; anhidrasa carbónica 29 KDa; y citocromo C, 12 KDa. Para calcular el volumen muerto de la columna se utilizó el azul dextrano.

Medidas de actividad enzimática

Para la determinación de la actividad enzimática se midió la liberación de *p*-nitrofenol a 405nm (4-nitrofenilmiristato, 4-nitrofenillaureato, 4-nitrofenilcaprilato (PNPC), 4-nitrofenilbutirato (PNPB), 4-nitrofenilacetato (PNPA)). La reacción estándar (1 mL) contenía 20 µl de *p*-nitrofenilacetato (a una concentración final de 0.1 mM), 100 µl de extracto enzimático y 880 µl de tampón Tris-HCL 100 mM a pH 8. Se define una unidad esterasa como la cantidad de enzima que es capaz de liberar un µmol por minuto, de *p*-nitrofenol a 25°C bajo las condiciones de ensayo especificadas.

Al mismo pH, también se emplearon otros sustratos como los naftilos (β -naftil acetato, α -naftil acetato, β -naftil butirato y el α -naftil butirato) siguiendo el método descrito por Martínez-Martínez et al., 2008.

La actividad tioesterasa fue medida empleando el S-metiltiobutanoato y DTNB según Lozada-Ramírez et al., 2006.

Características cinéticas

El pH óptimo de actuación de la enzima y la especificidad de sustrato se hicieron a 348 nm, con los *p*-nitrofenoles, a 30°C, con un coeficiente molar de 5300M⁻¹ cm⁻¹. (Mandrich et al., 2005). Los tampones empleados a 100 mM tenían un pH comprendido entre 3 y 5.5 para el tampón citrato, entre 6 y 7.5 para el fosfato potásico, pH 8 para el Tris-clorhídrico y de 8.5 a 11 para el glicina-NaOH.

El efecto de la temperatura sobre la actividad catalítica de la enzima se hizo en un espectrofotómetro UV/ Vis Uvikon con baño de agua recirculante. El rango de temperaturas ensayadas fue de 20°C hasta 60°C.

La termoestabilidad enzimática se probó colocando la enzima a diferentes temperaturas (55°C, 50°C, 45°C, 40°C, 42°C) y sacando alícuotas cada cinco minutos para medir la actividad.

La estabilidad de la enzima en presencia de detergentes (SDS, Tween 20 y Triton X-100 al 5% y al 10%) y solventes orgánicos (metanol, etanol, acetona, 2-propanol, DMSO y acetonitrilo al 5% y al 10%), la acción de los cationes en forma de sales (NaCl, CaCl₂, MgCl₂, AlCl₃, LiCl, NiCl, MnCl₂, KCl, HgCl₂ a 5mM), el EDTA (10mM), los agentes inhibidores de aminoácidos específicos implicados en la catálisis (PLP, PMFS, DEPC, PGO, pestatina-A) y el paraoxon y la eserina se utilizaron siguiendo el proceso descrito por Navarro-González, 2012.

Todos los experimentos tuvieron un control, donde la actividad cinética de la enzima se midió bajo las mismas condiciones pero en ausencia de cada compuesto.

Herramientas Bioinformáticas

Las secuencias de nucleótidos del gen fueron obtenidas de la base de datos del National Center For Biotechnology Information (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). El análisis de homología de la secuencia se realizó usando el programa Clustal W (<http://npsa-pbil.ibcp.fr>) y puntualmente se utilizó la base de datos Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb>). Los alineamientos múltiples se realizaron con el programa ESPript (<http://esript.ibcp.fr/ESPrpt>). La secuencia de aminoácidos de las distintas enzimas se enviaron al Expert Protein Analysis System Proteomic Server (<http://www.expasy.ch/swissmod/SWISS-MODEL.html>) para la construcción de los modelos tridimensionales. Las figuras se realizaron usando los programas DSViewer (Accelrys, Cambridge, Inglaterra) y Swiss-pdbViewer (GlaxoSmithkline y SwissInstitute of Bioinformatics, Basel, Suiza). Los diagramas topológicos se construyeron a través del programa TOPS (<http://www.tops.leeds.ac.uk/>).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Clonación y expresión.

Para sobre expresar la proteína un clon se inoculó en el medio de cultivo LB con los antibióticos mencionados a 37°C durante 12 horas. Cuando el cultivo bacteriano alcanzó una D.O de 0.9 se añadió el IPTG para inducir la proteína durante 12 horas a 30°C.

En un gel de electroforesis SDS-PAGE se observó que la enzima se expresaba formando cuerpos de inclusión, por tanto, se intentó solubilizar la mayor cantidad de proteína haciendo diferentes pruebas de inducción. Para ello, se pusieron distintos cultivos a distintas densidades ópticas (0.7 y 0.2), para inducirlos a diferentes temperaturas (18°C, 20°C y 25°C) y con distintas concentraciones de IPTG (0.2 mM, 0.5 mM, 1 mM y 2 mM), optimizándose así la expresión de la proteína en forma soluble. Finalmente, las condiciones óptimas de expresión de la proteína en forma soluble fueron a 20°C con 0.5 mM de IPTG añadido cuando la densidad óptica era de 0.7. En esas condiciones se preparó otro cultivo para medirle actividad cada hora y optimizar así el tiempo de inducción, que fue de 12 horas.

Al extracto enzimático se le midió actividad esterasa con *p*-nitrofenilacetato y a la proteína se le llamó EstB (como fue nombrada por los que la secuenciaron) (Geißdörfer et al., 1999).

Una vez conocidas las condiciones óptimas de expresión de la proteína se continuó con los cultivos de alta densidad en medio TB bajo las mismas condiciones de expresión que en medio LB (12 horas, 20°C y 0.5mM IPTG); excepto la densidad óptica que debía ser entre 7 y 8 en medio TB antes de añadir el IPTG.

Purificación y obtención del peso molecular de la esterasa EstB.

La EstB se purificó parcialmente con sulfato amónico. Para determinar la concentración de sulfato amónico que produce la precipitación de la EstB, se preparó una batería de tubos con distintas concentraciones de sulfato amónico, desde el 20% hasta el 80%.

La mejor purificación se obtuvo al precipitar la proteína al 30% del sulfato amónico, sin la necesidad de realizar otro corte (Fig. 1). La actividad específica fue de 1094 UE/mg de proteína y una recuperación del 22% de actividad.

Se intentó purificar la proteína por cromatografía de afinidad (IMAC), no pudiendo ser purificada por esta técnica.

El peso molecular del monómero, calculado por electroforesis desnaturante en SDS-PAGE, fue de 36 kDa (Fig. 1) y el de la proteína nativa, estimado por cromatografía de filtración en gel, fue de 68.9 kDa. De estos resultados se deduce que la enzima es un dímero en su forma nativa.

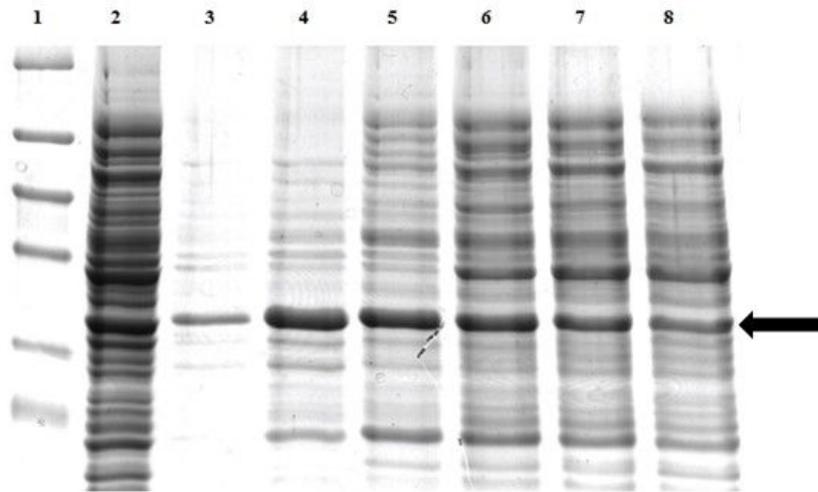


Fig. 1. Gel de proteína, la calle 1 es el marcador de proteínas (175 kDa la β -galactosidasa, 83kDa la miosina, 62kDa el glutámico deshidrogenasa, 47,5 kDa la aldolasa, 32,5 kDa la triosa fosfato isomerasa y 25 kDa de la β -lactoglobulina); la calle 2 es la fracción soluble; la calle 3 es la enzima parcialmente purificada con un 20% de sulfato amónico; la calle 4 es la enzima parcialmente purificada con sulfato al 30%; la calle 5 es la enzima parcialmente purificada con sulfato al 40%; la calle 6 es la enzima parcialmente purificada con sulfato al 50%; la calle 7 es la enzima parcialmente purificada con sulfato al 60% y la calle 8 es la enzima parcialmente purificada con sulfato al 70%.

Características cinéticas.

Los ensayos de actividad a diferentes pHs y con distintos sustratos, se realizaron como se explica en el apartado de materiales y métodos.

La figura 2A representa el porcentaje relativo de actividad obtenido sobre el p-nitrofenilacetato, el p-nitrofenilbutirato y el p-nitrofenilcaprilato (sobre el p-nitrofenilmiristato y p-nitro-fenillaureato no presentó actividad). Como puede observarse, con todos los sustratos utilizados la enzima presentó su máxima actividad a pH 8, mostrando actividad esterasa solamente.

Los resultados representados en la figura 2B manifiestan que aunque la temperatura a la cual la enzima presenta una mayor actividad catalítica es a 35°C, a 40°C sólo tiene un 2% menos de actividad y a 45°C un 10%. Y sin embargo, a 30°C la enzima presenta un 25% menos de actividad que a 35°C.

Los estudios de termoestabilidad mostraron que cuando la EstB se incubó a 60°C, 55°C y 50°C de temperatura, se inactiva en menos de cinco minutos. Al incubarla a 45°C la enzima perdió el 100% de su actividad a los 15 minutos, a 40°C la perdió a los 30 minutos y a los 35°C tardó cinco horas en perderla. A 30°C la pérdida del 50% de su actividad se produce a las nueve horas de incubación (Fig. 2C). Así que se puede afirmar que la enzima es termo-sensible bajo las condiciones de trabajo ensayadas.

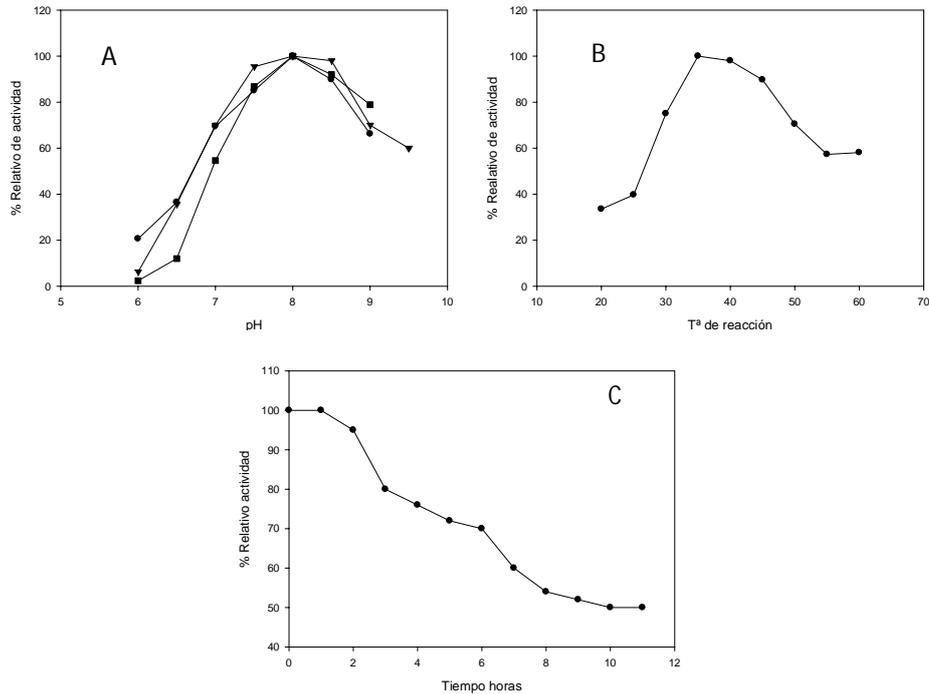


Fig. 2. (A) Efecto del pH sobre la actividad de la EstB con distintos sustratos: (■) p-nitrofenilacetato; (●) p-nitrofenilbutirato y (▼) p-nitrofenilcaprilato. (B) Efecto de la temperatura sobre la actividad de la EstB. (C) Estabilidad de la EstB incubada a 30°C y diferentes tiempos.

Las esterasas son ampliamente empleadas a nivel industrial para la síntesis de antibióticos y para la resolución de compuestos puros (Guisan et al., 2002; Ji-Youn et al., 2003; Sánchez-Ferrer et al., 2007), para la síntesis de aditivos (Chevil et al., 2006; Silvert et al., 2007; Villeneuve, 2007), para la síntesis de lípidos estructurados (Sharma et al., 2001), etc. Estos procesos se llevan a cabo en presencia de disolventes o detergentes, por tanto, para poder emplear la proteína en algún proceso industrial es necesario que esta resista la presencia de alguno de estos compuestos. Por este motivo, se estudió el efecto de los detergentes y solventes orgánicos sobre la enzima.

En la tabla 1 se puede observar el efecto de los detergentes empleados sobre la actividad enzimática. Estos resultados muestran claramente que la enzima se ve afectada fuertemente por la presencia de detergentes.

Del estudio llevado a cabo con los disolventes orgánicos se observa que en presencia de metanol, la enzima es más estable que con los otros disolventes orgánicos. Con un 5% de metanol, la enzima retiene el 95% de su actividad, seguido del DMSO, que retiene el 67% y del etanol que retiene el 64%. Con el propanol, las pérdidas se elevan al 48%, con el acetonitrilo al 55% y con la acetona se pierde el 72%. Cuando la concentración de los disolventes orgánicos se eleva al 10% las pérdidas son altamente significativas, incluso con el etanol, el metanol y el DMSO, aunque siguen siendo los disolventes estudiados que menos efectos negativos producen sobre la enzima, ya que la acetona, el acetonitrilo y el propanol la dejan casi inactiva.

Tabla 1. Efecto de los detergentes y solventes orgánicos sobre la actividad de la EstB.

	Actividad (%)	
Detergente	5%	10%
SDS	0	0
Triton X-100	6.9	6
Tween 20	0	0
Solvente	5%	10%
Etanol	64	30
Metanol	95	45
Acetonitrilo	45	4
Acetona	28	3
DMSO	67	50
Propanol	52	16

En resumen, se puede afirmar que la actividad de la EstB se ve afectada negativamente en presencia de los detergentes y de los solventes orgánicos empleados.

De los resultados obtenidos de estudiar el efecto de los cationes sobre la actividad enzimática (datos no mostrados) se observó que el mercurio inhibe completamente la enzima, lo que podría indicar que alguna cisteína está involucrada en la actividad enzimática ya que es un inhibidor de grupos tioles (Kim y Lee, 2004), el manganeso, litio, calcio, sodio y aluminio no tienen efecto sobre la actividad de la enzima. El magnesio provoca pérdidas del 67% y el potasio del 23%, actividad que no se recupera tras añadir EDTA; con el níquel la pérdida es del 100% y al añadir EDTA no la recupera. La completa inhibición de la esterasa en presencia de níquel, podría explicar la imposibilidad de purificar la enzima por IMAC, ya que la resina de la columna está cargada con níquel, lo que podría inhibir de forma irreversible a la enzima.

Los datos obtenidos indican que la enzima no requiere la ayuda de ningún catión para activarla, al igual que la EstR5 (Wang et al., 2011), pero difiere de otras esterases como la Est53 de *Thermotoga marítima* que se activa con la presencia de calcio y magnesio (Kakugawa et al., 2007).

Aminoácidos esenciales para la catálisis de la esterasa EstB

Para deducir los posibles aminoácidos que están implicados en la catálisis enzimática, se incubó la enzima a dos concentraciones distintas con los inhibidores específicos de aminoácidos durante 30 minutos a 30°C.

El DEPC, que es el inhibidor específico de histidinas, inhibe a la enzima en un 84% a una concentración de 0.5 mM y en un 100% a la concentración de 5 mM, el PMFS, que es el inhibidor específico de serinas, la inhibe completamente a la menor concentración utilizada, de igual forma que ocurre con la pestatina A, que es el inhibidor específico de aspártico, el PGO, inhibidor específico de arginina, no provocan pérdidas al 0.5 mM y al 5 mM la EstB retiene el 35% de su actividad inicial y el piridoxal, inhibidor específico de lisinas, provoca pérdidas del 30% a 0.5 mM (Tabla 2). Estos datos sugieren que el centro activo está constituido por una histidina, un aspártico y una serina.

Tabla 2. Efecto de los diferentes moduladores sobre la actividad de la EstB.

Inhibidores específicos de aminoácidos	% relativo de actividad	
	0.5 mM	5 mM
DEPC	16%	0%
PGO	100%	35%
Pestatina A	0%	0%
PMFS	0%	0%
Piridoxal	70%	70%
Paraoxón	0%	0%
Eserina	74%	0%

El paraoxon y la eserina son inhibidores de acetilcolinesterasas, por tanto la proteína podría ser una colinesterasa según Park et al., 2006; por este motivo se midió la actividad colinesterasa y butirilesterasa, no presentando actividad sobre ninguno de los dos sustratos.

Parámetros cinéticos de la esterasa EstB

La concentración final de enzima utilizada en cada medida fue de 2.2 UE (p-nitrofenilacetato) en un mililitro de reacción a su pH óptimo (8), para todas las medidas y con todos los sustratos.

Los datos obtenidos de la Km indican que la EstB presenta una mayor afinidad sobre el PNPB, pero si nos basamos en la eficacia (V_{max}/K_m), la enzima se decanta hacia el PNPA. Las Km para PNPA y PNPC son parecidas, si bien la afinidad es mayor para el PNPC. La velocidad máxima disminuye conforme disminuye el número de carbonos; lo que podría interpretarse que conforme aumenta el número de carbonos en la cadena lateral, es más complicado que el sustrato pueda acceder a los aminoácidos del centro activo.

La presencia de actividad tioesterasa se ha puesto de manifiesto en algunas esterasas como la EST2 de *Alicyclobacillus acidocaldarius* (Mandrich et al., 2006) o la Est2528 de *Corynebacterium glutamicum* (Navarro-González, 2012). La EstB presenta esta actividad cuando se mide con el S-metiltiobutanoato, con una Km de 3.3 mM y una V_{max} 107 $\mu\text{M}/\text{min}$, como se puede ver en la tabla 3.

Tabla 3. Parámetros cinéticos de la EstB.

	PNPA	PNPB	PNPC	S-metiltiobutanoato
Km (mM)	4.4	0.95	3.2	3.3
V_{max} ($\mu\text{M}/\text{min}$)	2289	272.2	4.2	107

Modelado estructural de la esterasa EstB

De la comparación por homología de la EstB (YP_045774) con otras esterasas en la base de datos NCBI, se dedujo que la EstB presenta una identidad del 84% con la acetiltransferasa de la superfamilia α/β de *A. baumannii* ACICU (YP_001845613) y con la hipotética hidrolasa de *A. baumannii* (YP_005513551), un 83% con una hipotética esterasa de *A. baumannii* (WP_001083349), un 46% con la α/β hidrolasa de *A. baumannii* (WP_001986227) y un 32% con otra hipotética proteína de *A. baumannii* (WP_005129334).

A pesar de no ofrecer ningún parecido con ninguna esterasa estudiada y/o cristalizada, según los resultados del blast, se procedió a la creación del modelo tridimensional teórico de la esterasa. Para modelarla, el programa informático usó como molde la

aclacinomicinametilesterasa (1QoR) (YP_492194) de *Streptomyces purpurascens*, con la que muestra un 22% de identidad.

En la figura 3 se puede observar el alineamiento de aminoácidos de ambas proteínas y la predicha estructura secundaria, formada por nueve láminas β y nueve hélices α más grandes y cinco más pequeñas. Los aminoácidos que son iguales en ambas aparecen sombreados de rojo y los que son de la misma familia aparecen escritos con rojo.

Los aminoácidos del centro activo de la EstB aparecen señalados con un triángulo rojo, y son la serina 138, el aspártico 264 y la histidina 292. Estos datos concuerdan con los obtenidos con los inhibidores específicos de aminoácidos. La serina del centro activo se encuentra en el pentapéptido característico de las esterases, siendo GASMG en la EstB. Y la histidina catalítica se encuentra situada en un tetrapéptido que es conservado en las dos proteínas (GMGH).

Otro bloque de aminoácidos que se encuentra conservado en ambas proteínas es el que forma la lámina β 8 (PTLVI).

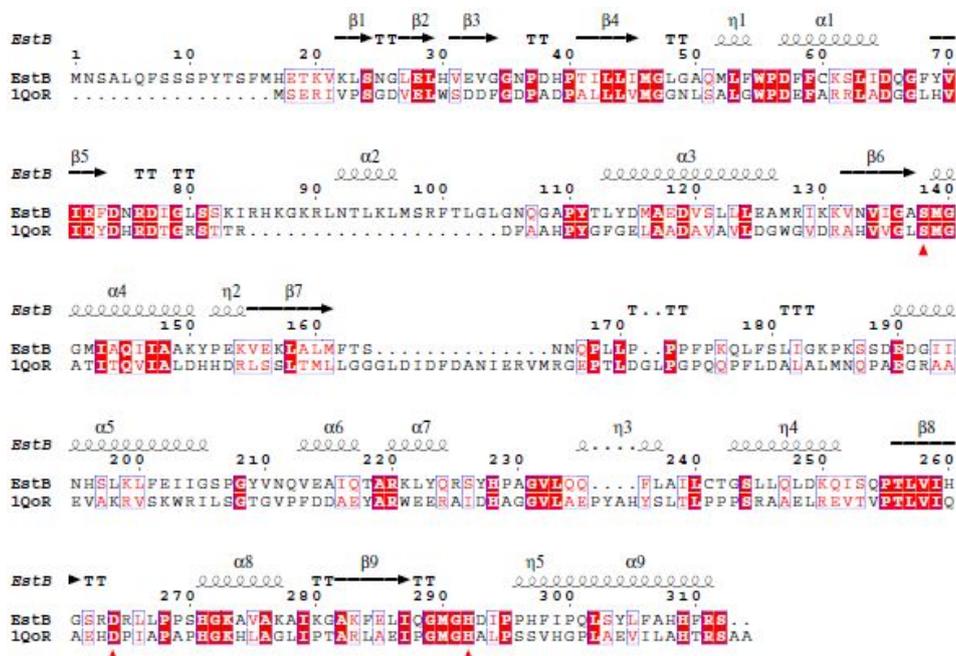


Fig. 3. Alineamiento de los amino ácidos de la esterasa de *Acinetobacter calcoaceticus* (EstB) y la aclacinomicinametilesterasa de *Streptomyces purpurascens* (1QoR).

Los autores que cristalizaron la 1QoR (Jansson et al., 2003), observaron que la proteína presentaba, estructuralmente, poco parecido con las enzimas lipolíticas, mostrando un mayor parecido con las haloperoxidasas (que también son consideradas α/β -hidrolasas). Siguiendo esta metodología, también se realizó un blast para estudiar la homología de estas con haloperoxidasas.

Los resultados obtenidos mostraron que la EstB tiene un 27% de similitud con la 1QoR, un 24% con la bromoperoxidasa de *Bacillus anthracis* (3FOB) (GI:219689315) y un 22% con la cloroperoxidasa de *Streptomyces aureofaciens* (1BRO) (GI:1943027), entre otras. Como la 3FOB y la 1BRO son dos haloperoxidasas, se realizó un alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las cuatro proteínas (EstB, 1QoR, 3FOB, 1BOR) (Fig. 4).

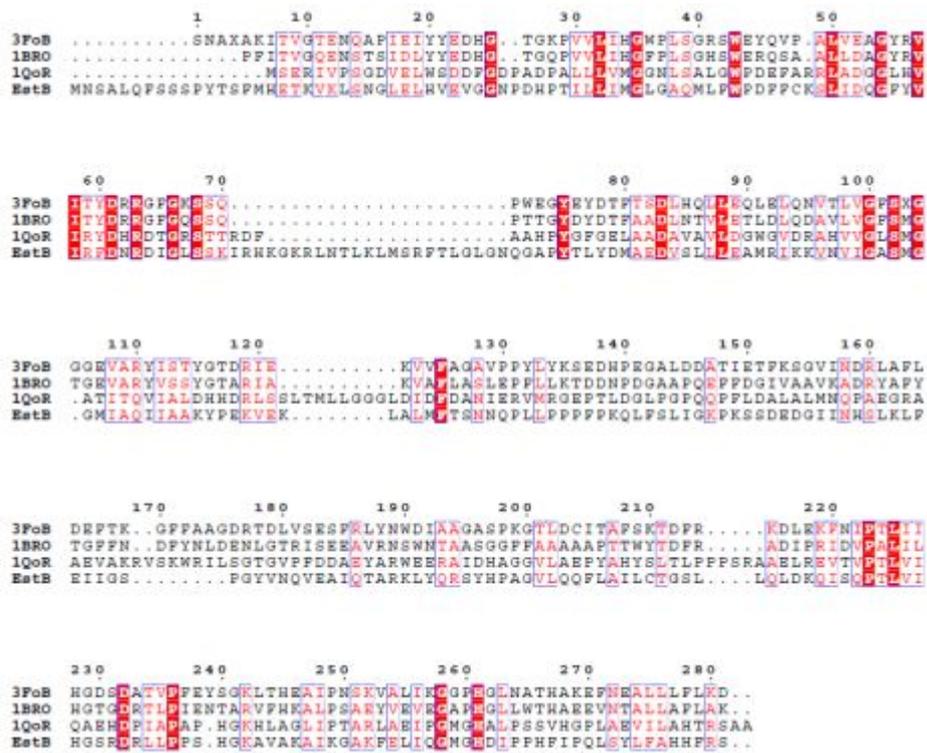


Fig. 4. Alineamiento de los aminoácidos de la bromoperoxidasa (3FoB) de *B. anthracis*; cloroperoxidasa (1BR0) de *S. aureofaciens*; la aclacinomicinametilsterasa (1QoR) de *S. purpurascens* y la esterasa (EstB) de *A. calcoaceticus*.

De este alineamiento se deduce que ni la EstB ni la 1QoR pueden ser consideradas haloperoxidasa, ya que no presentan bloques de aminoácidos conservados entre ellas y aparentemente presentan poca similitud.

En el modelado tridimensional de la EstB con la proteína cristalizada (Fig. 5A y 5B), se observa que la EstB presenta la estructura típica de las α/β -hidrolasas, formando una estructura central que tiene hojas β (8 hojas β) interconectadas con hélices α (12 hélices α). La EstB, al igual que la 1QoR, se pliega formando dos dominios bien caracterizados, uno más grande formado por seis hélices α y ocho láminas β (señalado con un círculo azul) y otro más pequeño formado por hélices α solamente (señalado con un círculo rojo).

Las hélices α del dominio grande, se encuentran formando un barril, y en el interior del barril quedan encerradas las láminas β ; el dominio pequeño, que parece una tapa, se cree que está involucrada en la unión del sustrato al bolsillo catalítico (Jansson et al., 2003).

El centro activo de ambas proteínas se ha señalado de azul la serina, de verde el aspártico y de amarillo la histidina. Y en la EstB se observa que los tres aminoácidos se encuentran situados en el fondo del bolsillo catalítico y entre los dos dominios.

El diagrama topológico de ambas esterases (Fig. 5B), da una visión más simplificada de la estructura tridimensional. Así, se observa la estructura típica de las α/β -hidrolasas, formada por una estructura central de hojas β (triángulos azules) interconectadas con hélices α (círculos rojos y blancos). Concretamente, la EstB tiene siete hojas β grandes paralelas entre ellas excepto la β_2 que es antiparalela y la hoja β_1 se encuentra dividida en dos pequeñas antiparalelas entre

sí, siete hélices α principales y seis secundarias. La 1QoR tiene ocho hojas β ($\beta 2$ antiparalela al resto), 10 hélices α principales y tres hélices α secundarias.

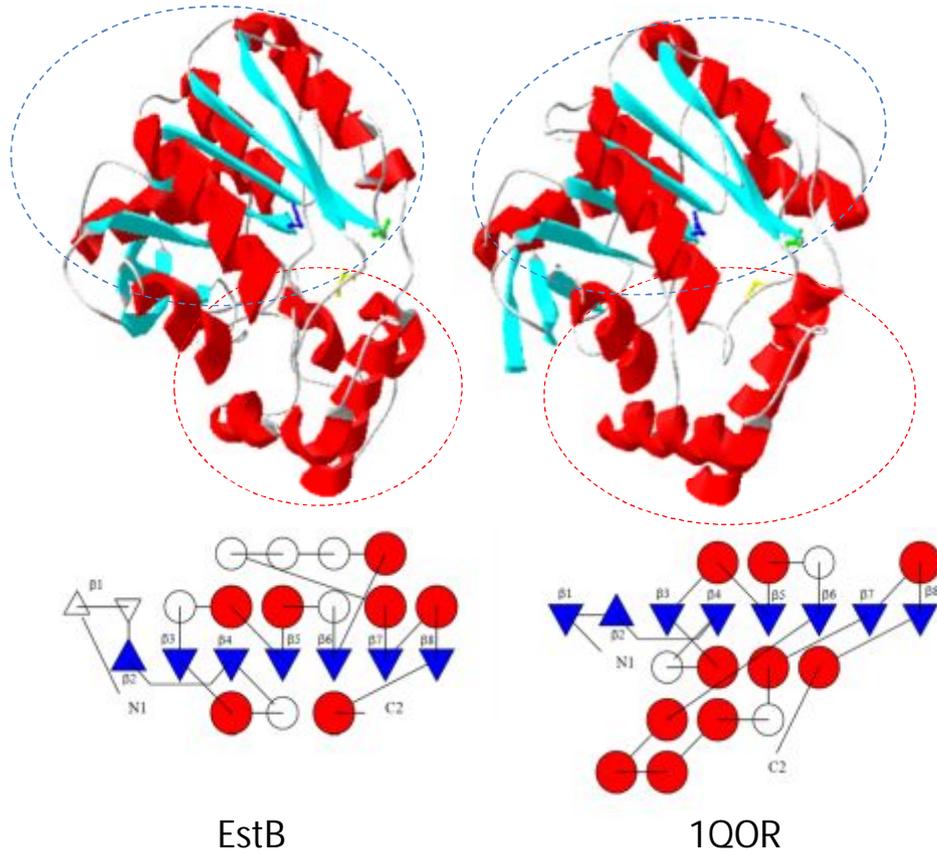


Fig. 5. (A) Modelado de la esterasa de *A. calcoaceticus* (EstB) y la aclacinomicinametilesterasa de *S. purpurascens* (1QoR). (B) Diagrama topológico de la esterasa de *A. calcoaceticus* (EstB) y la aclacinomicinametilesterasa de *S. purpurascens* (1QoR).

La diferencia que se aprecia en el número de hélices α grandes y pequeñas entre la figura 3 y la figura 5, se debe a que cada programa bioinformático tiene diferentes criterios para adjudicar las hélices α grandes o pequeñas.

En conclusión, la EstB presenta actividad esterasa, es decir, tiene actividad sobre los ácidos grasos de cadena corta, presenta el plegamiento de las α/β -hidrolasas, conserva el pentapéptido donde se encuentra la serina catalítica y tiene la triada catalítica de las esterases (serina, histidina y glutámico o aspártico) y además, presenta una similitud del 20%-25% con enzimas bacterianas no lipolíticas como son las haloperoxidasas. Por todos estos motivos se va a considerar a la EstB como una esterasa de la familia V de la clasificación de Arpigny y Jaeger, (1999).

CONCLUSION

La EstB de *Acinetobacter calcoaceticus* sp. codificada por el gen X8895, ha sido clonada y sobre expresada con éxito en un vector pET-28a+. La proteína fue parcialmente purificada y caracterizada cinéticamente. Las condiciones de pH y temperatura a las cuales la enzima es más activa son 8 y 35°C, respectivamente. La enzima queda fuertemente inhibida en presencia de solventes orgánicos, de detergentes y a elevadas temperaturas; lo que dificulta su aplicación industrial en aquellos procesos que se lleven a cabo bajo estas condiciones. La ventaja que presenta es que no requiere la ayuda de ningún cofactor para su actividad. La EstB es una esterasa de la familia V con actividad tioesterasa. Los posibles aminoácidos implicados en la catálisis enzimática han sido identificados (la serina 138, el aspártico 264 y la histidina 292), con programas informáticos y por el empleo de inhibidores específicos.

REFERENCIAS

1. Arpigny, J.L., y K.E. Jaeger, 1999. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *The Biochemical Journal*, 343: 177-183.
2. Chevil, L., C. Humeau, A. Falcimaigne, J.M. Engasser, y M. Ghoul, 2006. Enzymatic acylation of flavonoids. *Process Biochemistry*, 41: 2237-2251.
3. Clustal W (<http://npsa-pbil.ibcp.fr>).
4. ESPript (<http://esript.ibcp.fr/ESPript>)
5. Expert Protein Analysis System Proteomic Server (<http://www.expasy.ch/swissmod/SWISS-MODEL.html>)
6. GeißDörfer, W., Kok, R., Ratajczak, A., Hellingwerf, K., y Hillen, W., 1999. The genes *rubA* and *rubB* for Alkane Degradation in *Acinetobacter* Sp. Strain ADP1 Are in an Operon with *estB*, Encoding an Esterase, and *oxyR*. *Journal of Bacteriology*, 181: 4292-4298.
7. Guisan, J.M., Fernández, G., Fernández, R., Mateo, C., Ceínos, C., y Ramón, E., 2002. Procedimiento de hidrólisis enzimática de ésteres del ácido (3SR,4RS)-4-(4-Fluorofenil)-6-Oxopiperidin-3-carboxílico con biocatalizadores de lipasas o esterasas inmovilizadas. WO/09802556.
8. Jansson, A., Niemi, J., Mäntsälä, P., y Schneider, G., 2003. Crystal structure of Aclacinomycin methylesterase with bound product analogues. *The Journal of Biological Chemistry*, 278: 39006-39013.
9. Ji-youn, K., Gi-sub, C., In-Su, J., Yeon-Eoo, R., y Geun-Joong, K., 2003. A systematic approach for yielding a potential pool of enzymes: practical case for chiral resolution of (R,S)-Ketoprofen ethyl ester. *Protein Engineering*, 16: 357-364.
10. Kakugawa, S., Fushinobu, S., Wakagi, T., y Shoun, H., 2007. Characterization of a thermostable carboxylesterase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotogamaritima*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74: 585-591.
11. Kaplan, N., Rosenberg, E., Jann, B., y Jann, K., 1985. Structural studies of the capsular polysaccharide of *Acinetobacter calcoaceticus* BD14. *European Journal of Biochemistry*, 152: 453-458.

12. Kim, S., y Lee, S., 2004. Thermostable esterase from a thermoacidophilic archaeon: purification and characterization for enzymatic resolution of a chiral compound. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 68: 2289-2298.
13. Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
14. Ledermann, D., 2007. *Acinetobacter lwoffii* and *anitratu*s. *Revista Chilena de Infectología*, 24: 76-80
15. Lozada-Ramírez, J.D., Martínez-Martínez, I., Sánchez-Ferrer, A., y García-Carmona, F., 2006. A colorimetric assay for S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 67: 131-140.
16. Mandrich, L., Manco, G., Rossi, M., Floris, E., Bosch, T., Smit, G., y Wouters, J., 2006. *Alicyclobacillus acidocaldarius* thermophilic esterase EST2's activity in milk and cheese models. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 3191-3197.7
17. Mandrich, L., Merone, L., Pezzullo, M., Cipolla, L., Nicotra, F., Rossi, M., y Manco, G., 2005. Role of the N terminus in enzyme activity, stability and specificity in thermophilic esterases belonging to the HSL family. *Journal of Molecular Biology*, 345: 501-512.
18. Martínez-Martínez, I., Navarro-Fernández, J., Lozada-Ramírez, J.D., García-Carmona, F., y Sánchez-Ferrer A., 2008. YesT: A new rhamnogalacturonan acetyl esterase from *Bacillus subtilis*. *Proteins*, 71: 379-388.
19. National center for Biotechnology Information (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)
20. Navarro-González, I., 2012. Clonación, expresión, caracterización y modelado de esterasas putativas de *Corynebacterium glutamicum* ATTC 13032. *Anales de Biología* 34: 75-87, (DOI:<http://dx.doi.org/10.6018/analesbio.0.34.12>).
21. Park, Y., Choi, S.Y., y Lee, H.B., 2006. A carboxylesterase from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* P1; purification, characterization, and expression. *Biochimica et Biophysica acta*, 1760: 820-828.
22. Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb>)
23. Sambrook, J., Fritsch, E.F., y Maniatis T., 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
24. Sánchez-Ferrer, A., Martínez-Martínez, I., García-Pizarro, E., y García-Carmona, F., 2007. Producción de formas quiméricas de cefalosporina C acetilasa. ES2272115.
25. Sharma, R., Chisti, Y., y Banerjee, U., 2001. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, 19: 627-662.
26. Silva, J.A., Avello, C.C., Matamoro, F.R., Villagra, L.M., Rojas, V.S., y Sandoval, L.L., 1999. Resistencia a antimicrobianos en diferentes biotipos de *Acinetobacter baumannii* aislados en el norte de Chile. *Revista Médica de Chile*, (<http://dx.doi.org/10.4067/S0034-98871999000800006>)
27. Silver, R.S., Brown, P.H., Boyd, M., y Woolfschoon-pombo, A.F., 2007. Producto fuertemente aromatizado para el uso en la fabricación de queso y procedimiento para producirlo. Número de solicitud 2276508.

28. Smith, P.K., Kroha, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., y Klenk, D.C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150: 76-85.
29. Taylor, W.H., y Juni, E., 1961. Pathways for biosynthesis of a bacterial capsular polysaccharide II. Carbohydrate metabolism and terminal oxidation mechanisms of a capsule. Producing coccus. *Journal of Bacteriology*, 81: 694-703.
30. TOPS (<http://www.tops.leeds.ac.uk/>)
31. Villeneuve, P., 2007. Lipases in lipophilization reactions. *Biotechnology Advances*, 25: 515-536.
32. Wan, G., Meng, K., Luo, H., Wang, Y., Huang, H., Shi, P., Pan, X., Yang, P y Yao, B., 2011. Molecular cloning and characterization of a novel SGNH arylesterase from the goat rumen contents. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91: 1561-1570.