



CONVERSIÓN DE UNA ESTERASA OBTENIDA DE UNA GENOTECA METAGENÓMICA EN UNA LIPASA ALTAMENTE SELECTIVA

Dolores Reyes-Duarte^{1*}, Julio Polaina², Nieves López-Cortés¹, Miguel Alcalde¹, Francisco J. Plou¹, Kieran Elborough³, Kenneth N. Timmis⁴, Peter N. Golyshin⁴, Antonio Ballesteros¹, Manuel Ferrer¹. ¹CSIC, Instituto de Catálisis, España; ²CSIC, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, España; ³ViaLactia Biosciences Limited, Nueva Zelanda; ⁴GBF-German Research Center for Biotechnology, Alemania; *Dirección actual y de correspondencia: Depto. Procesos y Tecnología. UAM-Cuajimalpa. México, D.F. Pedro Antonio de los Santos #84 esq. Gobernador Tornel. Col. San Miguel Chapultepec. Del. Miguel Hidalgo. C.P. 11850. Fax: 55156000. e-mail: dreyes@correo.cua.uam.mx

Palabras clave: genoteca metagenómica, lipasa, mutagénesis aleatoria.

Introducción. Las lipasas y las carboxilesterasas o esterases son enzimas ampliamente utilizadas a nivel industrial. Son muy similares en secuencia y estructura, y ambas hidrolizan ésteres de ácidos grasos. Las esterases tienen preferencia por ésteres solubles en agua y triglicéridos de cadena corta mientras que las lipasas prefieren ésteres insolubles en agua y triglicéridos de cadena larga⁽¹⁾.

La necesidad de mejorar los bioprocesos y ampliar su campo de acción, ha llevado a utilizar nuevas estrategias para la obtención de novedosos y mejores biocatalizadores. Entre ellas están: la búsqueda de nuevas actividades enzimáticas en genotecas metagenómicas de ambientes extremos⁽²⁾, la modificación de las enzimas por técnicas moleculares como la evolución dirigida o el diseño racional, entre otras.

En este trabajo, se presenta la modificación de la especificidad por la longitud de cadena de sustratos grasos de una nueva esterasa obtenida de microorganismos no cultivables (R.34), a través de PCR mutagénica.

Metodología. La carboxilesterasa R.34 utilizada como enzima nativa, se obtuvo de una genoteca metagenómica de rumen de vaca realizada en fagos lambda⁽²⁾. La actividad carboxilesterasa se identificó utilizando acetato de α -naftilo (α -NA) y el colorante azo, Fast Blue RR (FBRR), produciendo un precipitado café⁽³⁾. **Transformación esterasa-lipasa.** Se realizó una librería de mutantes por PCR en condiciones mutagénicas. Las mutantes se identificaron con laurato de α -naftilo (α -NL) y FBRR. **Caracterización enzimática.** Se utilizaron como sustratos ésteres de *p*-nitrofenilo (*p*-NP) y triglicéridos. **Regioselectividad.** Se determinó con el lípido estructurado 1,3-dipalmitoil-2-oleoil glicerol (POP) y etanol en 2-metil-2-butanol. **Identificación de la posible causa del cambio de actividad.** Diseño de un modelo tridimensional de R.34 basado en similitud de secuencias con la esterasa de *Alicyclobacillus acidocaldarius*⁽³⁾ y posteriormente utilizando mutagénesis dirigida sobre el aminoácido mutado.

Resultados y discusión. La esterasa nativa R.34 presenta una alta preferencia por ésteres de *p*-NP y triglicéridos de cadena corta (C₂-C₆). Por medio de mutagénesis aleatoria se obtuvo una mutante (de entre 8200 clones) con potente actividad lipasa (EL1) que presenta un cambio de

especificidad hacia sustratos de cadena larga (C₈-C₁₈), además de un aumento en la actividad específica cercano a un orden de magnitud (Fig. 1). La lipasa EL1 también presenta una alta preferencia por la posición *sn*-2 de triglicéridos. Por dicroísmo circular se observó que aún sin cambios en la estructura secundaria, la *Tm* varía de 63.7 °C (para R.34) a 51.3 °C (para EL1), lo que indica una menor estabilidad para la enzima mutante, coincidente con la baja estabilidad frente a solventes y surfactantes.

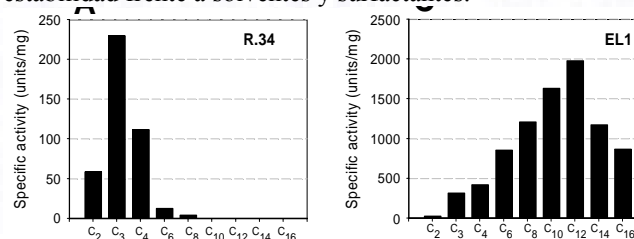


Fig. 1. Actividades específicas de la esterasa nativa R.34 y la esterasa-lipasa EL1 frente a ésteres de *p*-NP.

Conclusiones. Estudios estructurales acoplados con mutagénesis dirigida revelaron que una sola mutación (N33D) es causante de una distorsión en la estructura de la proteína posiblemente provocada por la formación de un puente salino, haciendo al sitio catalítico más accesible a sustratos de cadena larga pero también más lábil. La especificidad *sn*-2 convierte a EL1 en una enzima con gran potencial en la síntesis de una nueva generación de lípidos estructurados. La transformación de R.34 a EL1 demuestra como las técnicas metagenómicas acopladas con mutagénesis aleatoria pueden ser el punto de partida de nuevas y mejores actividades enzimáticas.

Agradecimiento. Al Ministerio Español de Ciencia y Tecnología por el financiamiento recibido.

Bibliografía. 1. Bornscheuer, U.T. (2002) Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis *Fems Microbiol. Rev.* 26(1): 73-81.
2. Ferrer, M., et al. (2005). Novel hydrolase diversity retrieved from a metagenome library of bovine rumen microflora. *Environ. Microbiol.*, 7(12): 1996-2010.
3. Reyes-Duarte, D., et al. (2005). Conversion of a Carboxylesterase into a Triacylglycerol Lipase by a Random Mutation. *Angew. Chem Int Ed.* 44: 7553-7557.