



## IMPORTANCIA DE LA REGION AMINO TERMINAL EN LA ACTIVIDAD ENZIMATICA, ESTABILIDAD Y ESPECIFICIDAD EN UNA ESTERASA DE *Aspergillus nidulans* INVOLUCRADA EN LA BIOSINTESIS DE UN PRECURSOR DE AFLATOXINAS.

Carolina Peña Montes y Amelia Farrés González Saravia.

Facultad de Química. Depto. Alimentos y Biotecnología. Conjunto "E". Laboratorio 312. 04510, Ciudad Universitaria. UNAM. México, D.F. Tel: 56 22 53 05. Fax.: 56 22 53 09. E-mail: [farres@servidor.unam.mx](mailto:farres@servidor.unam.mx).

*Palabras clave:* esterasa, *Aspergillus nidulans*, esterigmatocistina.

**Introducción.** La esterasa StcI forma parte de la vía de biosíntesis de esterigmatocistina en *A. nidulans*, el cual es un precursor de aflatoxinas. Empleando la secuencia reportada en la literatura, se diseñaron cebadores y a partir de una genoteca disponible se había realizado previamente la clonación y expresión de esta enzima en *Pichia pastoris* (1,2,3). Un estudio de la secuencia permitió identificar que 29 aminoácidos (a.a) adicionales en la región N-terminal de la esterasa que también forman parte de la proteína. Por lo tanto, también se realizó la clonación y expresión de esta variante en el mismo hospedero. Las dos variantes de la proteína StcI presentaron actividad de esterasa.

En otras esterases que pertenecen a la familia HSL se ha reportado la importancia de la región amino terminal para su especificidad y termoestabilidad y también en las propiedades catalíticas de una lipasa de *Rhizopus oryzae* (5). Este trabajo se centra en el estudio del papel que juegan esos 29 a.a adicionales en la región amino-terminal para las propiedades de la enzima. Se obtuvieron modelos estructurales para las dos variantes y se estudiaron las propiedades bioquímicas de las mismas.

**Metodología. Modelos estructurales.** Se utilizó el programa "EsyPred3D" de Lambert *et. al.* en la Universidad de Bélgica (6).

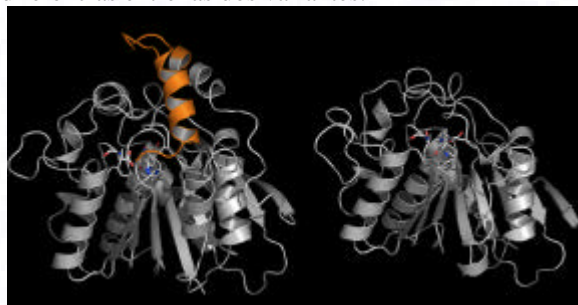
**Purificación de la enzima.** Las enzimas se purificaron con una columna de sephadex y cromatografía de afinidad por níquel (IMAC).

**Caracterización bioquímica.** La estabilidad a la temperatura y pH, así como la temperatura y pH óptimo del ensayo se determinaron por pH-stat con etil acetato (7) y espectrofotométricamente con p-nitrofenil acetato (8). La hidrólisis de p-nitrofenil ésteres con largo de cadena de 2-18 carbonos se midió espectrofotométricamente a pH 7.5, 40°C. También se evaluó la hidrólisis de triglicéridos y etil ésteres con diferente largo de cadena (2-18) con pH stat en las condiciones óptimas del ensayo.

### Resultados y discusión.

Los dos modelos obtenidos se basaron en la proteína 1QZ3 que es una mutante de la esterasa termófila de *Allycyclobacillus acidocaldarius*. En la figura 1 se observan los dos modelos obtenidos, a la izquierda el que corresponde a la nStcI (con 29 a.a) y a la derecha el que corresponde a la StcI. Básicamente las diferencias entre ambos son las dos hélices al centro que no aparecen en el modelo de la StcI y que en el modelo de la nStcI se encuentran por encima del sitio activo. Las propiedades bioquímicas observadas para

ambas enzimas mostraron diferencias en cuanto a la actividad y estabilidad de la enzima, sin embargo la hidrólisis del perfil de sustratos probados no mostró grandes diferencias entre las dos variantes.



**Figura 1-** Modelos estructurales para la proteína nstcl y stcl.

**Conclusiones.** La secuencia adicional en la región N-terminal que corresponde a la hélice por encima del sitio activo en la proteína nStcI, esta involucrada en la actividad y estabilidad de la esterasa. La forma más estable de la enzima es la nStcI que difiere de la que corresponde a la secuencia del gen reportado (2). La proteína StcI que corresponde a ésta última es inestable y presenta poca actividad. Sería importante realizar estudios estructurales de ambas enzimas y así como evaluar la hidrólisis de otros sustratos y realizar ensayos de regio y enantioselectividad.

### Bibliografía.

1. Peña M. C. y Farrés A. (2005). Clonación y estudio de la expresión de una esterasa de *aspergillus nidulans* involucrada en la biosíntesis de esterigmatocistina. *XI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.* SMBB. Merida, septiembre 2005.
2. Brown DW. *et. al.* (1996). Twenty-five coregulated transcripts define a sterigmatocystin gene cluster in *Aspergillus nidulans*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 20; 93(4):1418-22.
3. Aramayo, R. y Metzberg, R.L. (1996) Meiotic transvection in fungi. *Cell.* 86: 103-113.
4. 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.
5. Lambert C, Leonard N, De Bolle X, Depiereux E. (2002). *Bioinformatics.* 18(9):1250-1256.
6. Hockeborn, M. y Rick W. (1982). Determination of the catalytic activity of lipase by the continuous titration method. *J Clin Chem Clin Biochem.* 20(11):773-8.
7. Isobe, K., Akiba, T. and Yamaguchi, S. (1988) Crystallization and Characterization of Esterase from *Penicillium cyclopium*. *Agric. Biol. Chem.* 52, 41-47.