



Universidad Autónoma del Estado de Morelos

Centro de Investigación en Biotecnología

Maestría en Biotecnología



Estudio *in silico* de la interacción de la esterasa HSL *BaEstB* de *Bjerkandera adusta* con sustratos esterificados y evaluación de su actividad *in vitro*

DANIEL HERNÁNDEZ FUENTES

DIRECTOR

DRA. MARÍA DEL RAYO SÁNCHEZ CARBENTE

Octubre del 2019

Centro de Investigación en Biotecnología. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca 62209, Morelos, México

El presente trabajo de investigación se desarrolló bajo la dirección de la Dra. María del Rayo Sánchez Carbente en el Laboratorio de Biología Molecular de Hongos del Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB) de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM).

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	12
1.1	Hongos como degradadores de materia vegetal	12
1.2	Esterasas y lipasas	13
1.3	Mecanismo de acción de las esterasas	15
1.4	Mecanismo de acción de las lipasas.....	17
1.5	Activación interfacial.....	17
1.6	Súperfamilia α/β hidrolasa.....	18
1.7	Clasificación de las lipasas.....	19
1.7.1	De acuerdo a su especificidad	19
1.7.2	De acuerdo a la reacción que catalizan.....	20
1.8	Clasificación esterasas.....	22
1.9	Clasificación de lipasas por Arpigny y Jaeger	23
1.10	<i>P. pastoris</i> como sistema de expresión.....	28
1.10.1	Péptido señal α -MF	29
1.10.2	Fenotipos de utilización de metanol	30
2	ANTECEDENTES	31
3	JUSTIFICACIÓN.....	36
4	HIPÓTESIS	37
5	OBJETIVOS	37
5.1	Objetivo general:.....	37
5.2	Objetivos específicos:.....	37
6	METODOLOGÍA.....	38
6.1	Construcción de árboles filogenéticos y estructuras 3D.....	38
6.2	Acoplamiento molecular (Molecular Docking)	40
6.2.1	Preparación del sistema para el acoplamiento molecular	40
6.2.2	Acoplamiento molecular	43
6.3	Diseño de las mutaciones puntuales in silico.....	43
6.4	Expresión de <i>BaEstB</i> en <i>Pichia pastoris</i> X-33	44
6.5	Purificación de <i>BaEstB</i>	45
6.6	SDS-PAGE.....	46
6.7	Zimograma	46

6.8	Actividad esterasa y determinación de la especificidad de sustratos sintéticos	46
6.9	Cuantificación de proteína por el método de Bradford	48
6.10	Curva de calibración	48
6.11	Actividad esterasa utilizando esteroides esterificados	48
6.12	HPLC	49
6.13	Mutaciones puntuales “PCR-All around”	50
7	RESULTADOS	51
7.1	Análisis filogenético.....	51
7.2	Modelaje tridimensional de BaEstB mediante I-TASSER.....	53
7.3	Superposición estructural por homología de BaEstB con otras esterasas.....	56
7.4	Acoplamiento molecular “Docking”	58
7.5	Mutaciones puntuales <i>in silico</i>	66
7.6	Inducción de la expresión de BaEstB.....	80
7.7	Cuantificación de la actividad esterasa	82
7.8	SDS-PAGE y Zimograma.....	84
7.9	HPLC y ensayo de actividad esterasa	84
8	DISCUSIÓN.....	91
9	CONCLUSIONES	100
10	PERSPECTIVAS	101
11	BIBLIOGRAFÍA.....	102
12	ANEXOS	107

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Aplicaciones industriales de esterases y lipasas	14
Tabla 2. Actividad específica de la esterasa HSL <i>BaEstB</i> con diferentes sustratos	32
Tabla 3. Contenido de ergosterol libre y esterificado en las diferentes partes de hongos agárlicos	35
Tabla 4. Lista de los PDB con los mejores puntajes para el modelado de <i>BaEstB</i>	53
Tabla 5. Identificación de los 10 mejores análogos estructurales de <i>BaEstB</i>	54
Tabla 6. RMSD global de las conformaciones en PELE de la HSL <i>BaEstB</i>	59
Tabla 7. Porcentaje de poses cercanas al sitio activo para cada uno de los sustratos	65
Tabla 8. Identificación de residuos de aminoácidos que interaccionan con los diferentes sustratos en una esfera de 6 Å de radio alrededor del sustrato utilizando las poses de mejor energía de afinidad.	67
Tabla 9. Mutaciones puntuales in silico, se muestran las mejores energías de afinidad de unión para cada uno de los sustratos analizados por acoplamiento molecular.	79
Tabla 10. Resultados de la purificación de <i>BaEstB</i> del sistema de expresión heterólogo <i>P.</i> <i>pastoris</i>	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo del plegamiento canónico α/β hidrolasa de una lipasa de <i>Candida</i> antártica, generada a partir de la estructura cristalográfica de la lipasa B de <i>Candida antártica</i> . A) Vista frontal. B) α -hélices que rodean al núcleo de β -plegadas. C) Núcleo estructural de hojas β . Tomada y modificada de (Torres, 2009).	15
Figura 2. Mecanismo de acción de las esterasas, basado en la triada catalítica compuesta por una serina nucleofílica (Ser105), una histidina (His224) y un ácido aspártico (Asp187). El intermediario tetraédrico (A2) es estabilizado mediante puentes de hidrógeno. Esta estructura se conoce como cavidad de oxianión integrado por una treonina (Thr40) y una glutamina (Gln106). El complejo acil-enzima (A3) se rompe cuando un segundo sustrato lleva a cabo un ataque nucleofílico al carbonilo de este complejo. A partir de entonces se genera un nuevo intermediario tetraédrico (A2) para terminar con la liberación del segundo producto y regenerar el sitio activo (A1) (Li <i>et al.</i> , 2014).	16
Figura 3. Estructura de una lipasa de <i>Candida rugosa</i> . En color rojo, se muestra la región que forma el “Lid” o tapa de la enzima, a la izquierda se observa la conformación abierta en la cual el sitio activo (en color verde) queda expuesto permitiendo la interacción enzima-sustrato, a la derecha la conformación cerrada (Rehm, Trodler, & Pleiss, 2010).	18
Figura 4. Reacciones de hidrólisis catalizadas por diferentes tipos de esterasas	23
Figura 5. Lipasas sensibles a hormonas pertenecientes a la familia IV. <i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> <i>Archaeoglobus fulgidus</i> , <i>Alcaligenes eutrophus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Moraxella sp.</i>	25
Figura 6. Organización estructural de la HSL humana y varias HSL bacterianas: BFAE, Est25, EST2 y AFEST. La HSL humana está compuesta por un dominio N-terminal y un dominio catalítico C-terminal. El dominio C-terminal de ambos tipos de HSL, alberga la triada catalítica (Ser-Asp-His) y los motivos conservados (GX SXG, DPXXD y HGX) (Modificado de Doohun-Kim, 2017).	28
Figura 7. Modelo tridimensional propuesto para <i>BaEstB</i> . El cap y los dominios catalíticos se representan en magenta y verde, respectivamente; mientras que el N-terminal (M1) y el C-terminal (E322) se muestran en cian. (b) Tríada catalítica de <i>BaEstB</i> . S163, D252, y H285 se representan en verde. (c) y (d) Residuos ubicados en el centro del bolsillo de unión de sustrato. (c) Y81 y E225 se representan en verde en <i>BaEstB</i> , y (d) W92 y F222 se representan en rojo en PDB 4WY8 de <i>RmEstB</i>	34
Figura 8. Modelo tridimensional de la <i>RmEstA</i> . Se muestran los aminoácidos de la triada catalítica de <i>RmEstA</i> , los átomos de oxígeno están en rojo, los átomos de nitrógeno en azul y los átomos de carbono en verde. El canal de unión al sustrato de <i>RmEstB</i> está cerrado por los residuos aromáticos Trp92 y Phe222	34
Figura 9. Alineamiento parcial de secuencias de aminoácidos de esterasas seleccionadas. Etiquetado con códigos PDB: 4KRY, una acetil esterasa de <i>E. coli</i> ; 4C87, una esterasa de <i>L. plantarum</i> ; 4J7A, una esterasa obtenida de una librería metagenómica; 3AIO, esterasa de <i>S. tokodaii</i> ; 2C7B, una esterasa obtenida de una librería metagenómica; 2YH2, una esterasa de <i>P. calidifontis</i> ; y 1QZ3, una esterasa de <i>A. acidocaldarius</i> . El residuo clave Phe222 de <i>RmEstB</i> está marcado con un punto rojo en la alineación de la secuencia de aminoácidos. Se enumeran los sustratos óptimos de estas esterasas, tomados de estudios anteriores.	35
Figura 10. Estrategia computacional para la construcción de árboles filogenéticos y estructuras 3D.	40
Figura 11. Estrategia computacional para el análisis de la interacción de <i>BaEstB</i> con diferentes ésteres.	41

Figura 12. Características del vector de expresión pPICZαA. Contiene un marcador de resistencia a zeocina, el sitio de clonación múltiple dentro del cual se encuentra el péptido señal factor α y el epítipo c-mic, 6xHis y el promotor AOX1.....	45
Figura 13. Árbol filogenético de 47 secuencias de aminoácidos. Algoritmo de agrupamiento máxima verosimilitud, bajo 1000 réplicas bootstrap. Con una matriz de reemplazamiento WAG. Se observa la formación de clados que presentan a las secuencias consenso GTSAG y GDSAG. El análisis indica la el ortólogo más cercano de <i>BaEstB</i> es la feruloil esterasa 4zrsA y que estas se encuentran estrechamente relacionadas con una HSL de <i>Trichoderma atroviride</i>	52
Figura 14. Estructura tridimensional de <i>BaEstB</i> . Se muestra los residuos amino terminal M1 y carboxilo terminal E322, al centro de la enzima en rojo se observan los dominios de láminas β rodeadas de hélices α en azul, en verde se muestran las dos α hélice conectadas por un <i>loop</i> que conforman al domino Cap.....	55
Figura 15. Modelo de “sticks” que muestra los elementos que participan en la catálisis enzimática de <i>BaEstB</i> en un acercamiento. En verde la triada catalítica SDH, en amarillo la cavidad oxianiónica y en naranja los aminoácidos implicados en la unión del sustrato.....	56
Figura 16. Superposición estructural de <i>BaEstB</i> con las HSL de distintos microorganismos. A) PDB 4ZRS (Feruloil esterasa de metagenoma de suelo. B) PDB 4WY8, <i>Rhizomucor miehei</i> . C) I-TASSER, <i>Aspergillus sidowii</i> . D) I-TASSER <i>B. adusta</i> . En la parte inferior de cada figura se muestra el porcentaje de identidad.....	57
Figura 17. E) Superposición estructural de <i>BaEstB</i> con la HSL de <i>Mus musculus</i> y F) La HSL de <i>Necator americanus</i> . En ambos casos se observa el plegamiento α/β hidrolasa típico de esterasas así como la conservación de las secuencias consenso GDSAG en azul, HGGG en magenta y amarillo y finalmente el ácido aspártico e histidina de la triada catalítica en rojo. En la parte inferior de cada figura muestra el porcentaje de identidad.....	58
Figura 18. Interacción de <i>BaEstB</i> con el ergosteril acetato. Se muestra la distancia que hay entre el grupo carbonilo del enlace éster del ergosteril acetato y el átomo de oxígeno del grupo hidroxilo de la cadena lateral de la Ser163. A) La distancia que hay entre estos átomos es menor y la energía de afinidad de unión es más negativa con respecto a la interacción de B). Por consiguiente, energéticamente más favorable.....	60
Figura 19. Dispersión de poses distancia-energía para el acoplamiento molecular de <i>BaEstB</i> con el 2-naftil acetato por medio del método de Monte Carlo.....	60
Figura 20. Distribución de frecuencias de poses para el acoplamiento molecular de <i>BaEstB</i> con el 2-naftil acetato por medio del método de Monte Carlo.....	60
Figura 21. Dispersión de poses distancia-energía para el acoplamiento molecular de <i>BaEstB</i> con el ergosteril acetato por medio del método de Monte Carlo.....	61
Figura 22. Distribución de frecuencias de poses para el acoplamiento molecular de <i>BaEstB</i> con el ergosteril acetato por medio del método de Monte Carlo.....	61
Figura 23. Dispersión de poses distancia-energía para el acoplamiento molecular de <i>BaEstB</i> con el ergosteril acetato y 2-naftil acetato por medio del método de Monte Carlo.....	62
Figura 24. Dispersión de poses distancia-energía para el acoplamiento molecular de <i>BaEstB</i> con el ergosteril acetato y 2-naftil acetato por medio del método de Modos normales de vibración.....	62
Figura 25. Distribución de frecuencias de poses para el acoplamiento molecular de <i>BaEstB</i> con el ergosteril acetato y 2-naftil acetato por medio del método de Monte Carlo.....	62
Figura 26. Distribución de frecuencias de poses para el acoplamiento molecular de <i>BaEstB</i> con el ergosteril acetato y 2-naftil acetato por medio del método de modos normales de vibración.....	63

Figura 27. Dispersión de poses distancia-energía del acoplamiento molecular de <i>BaEstB</i> con distintos sustratos esterificados: 2-naftil acetato, 1-naftil acetato, 1-naftil butirato, ergosteril acetato, colesteril acetato, <i>p</i> -nitrofenil acetato, <i>p</i> -nitrofenil butirato, <i>p</i> -nitrofenil decanoato y feruloil arabinofuranosa (FAra) con el método de modos normales de vibración.....	64
Figura 28. Distribución de frecuencias de poses del acoplamiento molecular de <i>BaEstB</i> con distintos sustratos esterificados: el 2-naftil acetato, 1-naftil acetato, 1-naftil butirato, ergosteril acetato, colesteril acetato, <i>p</i> -nitrofenil acetato, <i>p</i> -nitrofenil butirato, <i>p</i> -nitrofenil decanoato y FAra con el método de modos normales de vibración.	64
Figura 29. Acoplamiento molecular de <i>BaEstB</i> con los nueve sustratos analizados. A) Modelos de superficie rellena para la enzima y en modelo de esferas para los sustratos. Se muestran las distancias y las energías de afinidad de unión. B) En la parte inferior, un modelo de <i>sticks</i> del ergosteril acetato y todos los elementos que participan en la catálisis: triada catalítica (Ser163, His285 y Asp252); cavidad oxianiónica (Gly78, Gly79); Residuos implicados en la unión con el sustrato (Tyr81 y Leu211).	66
Figura 30. Dispersión de poses distancia-energía para el acoplamiento molecular de las mutantes de Y81 de <i>BaEstB</i> con el <i>p</i> -nitrofenil acetato, por medio del método de modos normales de vibración. Cada color representa una mutante y la enzima parental.	71
Figura 31. Distribución de frecuencias de poses para el acoplamiento molecular de las mutantes de Y81 de <i>BaEstB</i> con el <i>p</i> -nitrofenil acetato, por medio del método de modos normales de vibración. Cada color representa una mutante y la enzima parental.	71
Figura 32. Dispersión de poses distancia-energía para el acoplamiento molecular de las mutantes de Y81 de <i>BaEstB</i> con el <i>p</i> -nitrofenil butirato, por medio del método de modos normales de vibración. Cada color representa una mutante y la enzima parental.	72
Figura 33. Distribución de frecuencias de poses para el acoplamiento molecular de las mutantes de Y81 de <i>BaEstB</i> con el <i>p</i> -nitrofenil butirato, por medio del método de modos normales de vibración. Cada color representa una mutante y la enzima parental.	72
Figura 34. Dispersión de poses distancia-energía para el acoplamiento molecular de las mutantes de Y81 de <i>BaEstB</i> con el <i>p</i> -nitrofenil decanoato, por medio del método de modos normales de vibración. Cada color representa una mutante y la enzima parental.	72
Figura 35. Distribución de frecuencias de poses para el acoplamiento molecular de las mutantes de Y81 de <i>BaEstB</i> con el <i>p</i> -nitrofenil decanoato, por medio del método de modos normales de vibración. Cada color representa una mutante y la enzima parental.	73
Figura 36. Dispersión de poses distancia-energía para el acoplamiento molecular de las mutantes de Y81 de <i>BaEstB</i> con el 1-naftil acetato, por medio del método de modos normales de vibración. Cada color representa una mutante y la enzima parental.	73
Figura 37. Distribución de frecuencias de poses para el acoplamiento molecular de las mutantes de Y81 de <i>BaEstB</i> con el 1-naftil acetato, por medio del método de modos normales de vibración. Cada color representa una mutante y la enzima parental.	73
Figura 38. Dispersión de poses distancia-energía para el acoplamiento molecular de las mutantes de Y81 de <i>BaEstB</i> con el 1-naftil butirato, por medio del método de modos normales de vibración. Cada color representa una mutante y la enzima parental.	74
Figura 39. Distribución de frecuencias de poses para el acoplamiento molecular de las mutantes de Y81 de <i>BaEstB</i> con el 1-naftil butirato, por medio del método de modos normales de vibración. Cada color representa una mutante y la enzima parental.	74

Figura 40. Dispersión de poses distancia-energía para el acoplamiento molecular de las mutantes de Y81 de <i>BaEstB</i> con el ergosteril acetato, por medio del método de modos normales de vibración. Cada color representa una mutante y la enzima parental.	74
Figura 41. Distribución de frecuencias de poses para el acoplamiento molecular de las mutantes de Y81 de <i>BaEstB</i> con el ergosteril acetato, por medio del método de modos normales de vibración. Cada color representa una mutante y la enzima parental.	75
Figura 42. Dispersión de poses distancia-energía para el acoplamiento molecular de las mutantes de L211 de <i>BaEstB</i> con el <i>p</i> -nitrofenil acetato, por medio del método de modos normales de vibración. Cada color representa una mutante y la enzima parental.	75
Figura 43. Distribución de frecuencias de poses para el acoplamiento molecular de las mutantes de L211 de <i>BaEstB</i> con el <i>p</i> -nitrofenil acetato, por medio del método de modos normales de vibración. Cada color representa una mutante y la enzima parental.	75
Figura 44. Dispersión de poses distancia-energía para el acoplamiento molecular de las mutantes de L211 de <i>BaEstB</i> con el <i>p</i> -nitrofenil butirato, por medio del método de modos normales de vibración. Cada color representa una mutante y la enzima parental.	76
Figura 45. Distribución de frecuencias de poses para el acoplamiento molecular de las mutantes de L211 de <i>BaEstB</i> con el <i>p</i> -nitrofenil butirato, por medio del método de modos normales de vibración. Cada color representa una mutante y la enzima parental.	76
Figura 46. Dispersión de poses distancia-energía para el acoplamiento molecular de las mutantes de L211 de <i>BaEstB</i> con el <i>p</i> -nitrofenil decanoato, por medio del método de modos normales de vibración. Cada color representa una mutante y la enzima parental.	76
Figura 47. Distribución de frecuencias de poses para el acoplamiento molecular de las mutantes de L211 de <i>BaEstB</i> con el <i>p</i> -nitrofenil decanoato, por medio del método de modos normales de vibración. Cada color representa una mutante y la enzima parental.	77
Figura 48. Dispersión de poses distancia-energía para el acoplamiento molecular de las mutantes de L211 de <i>BaEstB</i> con el 1-naftil acetato, por medio del método de modos normales de vibración. Cada color representa una mutante y la enzima parental.	77
Figura 49. Distribución de frecuencias de poses para el acoplamiento molecular de las mutantes de L211 de <i>BaEstB</i> con el 1-naftil acetato, por medio del método de modos normales de vibración. Cada color representa una mutante y la enzima parental.	77
Figura 50. Dispersión de poses distancia-energía para el acoplamiento molecular de las mutantes de L211 de <i>BaEstB</i> con el 1-naftil butirato, por medio del método de modos normales de vibración. Cada color representa una mutante y la enzima parental.	78
Figura 51. Distribución de frecuencias de poses para el acoplamiento molecular de las mutantes de L211 de <i>BaEstB</i> con el 1-naftil butirato, por medio del método de modos normales de vibración. Cada color representa una mutante y la enzima parental.	78
Figura 52. Dispersión de poses distancia-energía para el acoplamiento molecular de las mutantes de L211 de <i>BaEstB</i> con el ergosteril acetato, por medio del método de modos normales de vibración. Cada color representa una mutante y la enzima parental.	78
Figura 53. Distribución de frecuencias de poses para el acoplamiento molecular de las mutantes de L211 de <i>BaEstB</i> con el ergosteril acetato, por medio del método de modos normales de vibración. Cada color representa una mutante y la enzima parental.	79
Figura 54. Representación del túnel de entrada en el acoplamiento molecular de <i>BaEstB</i> y su unión con sustratos. A) Túnel de la enzima parental con el sustrato <i>p</i> -NA. B) Túnel de la mutante Y81S con el sustrato <i>p</i> -NA, se observa que el túnel de entrada se alarga	

permitiendo al sustrato introducirse más, en comparación con la enzima parental en donde el sustrato queda muy cerca de la superficie. En azul y magenta se muestra la serina y el ácido aspártico de la triada catalítica, el verde corresponde a la mutante Y81S. C) y D) Representación en superficie rellena de la enzima parental y la mutante L211W con el ergosteril acetato, en representación de *sticks*, en la mutante se observa un cambio conformacional del túnel a una especie de hendidura en la que el ergosteril acetato se empaqueta a lo largo de esta. En azul y verde se muestra la serina y la histidina de la triada catalítica y en amarillo las glicinas 78-79 que forman la cavidad oxianiónica. 80

Figura 55. Determinación de fenotipos Mut+ y Muts de las transformantes positivas *P. pastoris* X-33 (pPICZαA/BaEstB). Se observa un mejor crecimiento en medio mínimo metanol. 81

Figura 56. PCR en colonia. Se observan los pesos moleculares esperados para el gen que codifica para *BaEstB* (1500 Pb, carril 2). En el carril 3 se muestra la digestión de la construcción con las enzimas de restricción *SacI* y *XbaI*, las cuales cortan al inicio del promotor de la *AOX1* y el final del gen respectivamente. Carril 4 cepa transformada con el vector pPICZαA. El carril 6 corresponde a la cepa silvestre. 82

Figura 57. Ensayo cualitativo para la determinación de actividad esterasa en placa. Los pocillos 1-3 corresponden a los sobrenadantes obtenidos a partir del tercer día de inducción con metanol. Pocillo 1: cepa silvestre. Pocillo 2: cepa transformada con el vector pPICZαA. Pocillo 3: transformante con la construcción pPICZαA/*BaEstB*. Pocillo 4: *BaEstB* purificada. Pocillo 5: Blanco (medio BMGY + sustrato). 83

Figura 58. Absorbancia obtenida de los ensayos de actividad respecto al tiempo, utilizando como sustrato al 2-naftil acetato y al 1-naftil acetato, se utilizó como controles negativos los sobrenadantes de la cepa *P. pastoris* X-33 silvestre (cuadros naranjas y rojos) y la cepa *P. pastoris* X-33/pPICZαA (rombos grises y negros). Los círculos azules y negros corresponden a la enzima purificada. 83

Figura 59. A) SDS PAGE al 12%. Sobrenadantes del tercer día de inducción con metanol (carriles 1,2 y 3). Carril 1: *P. pastoris* X33 silvestre; Carril 2: pPICZαA; Carril 3: pPICZαA/*BaEstB*. Carril 4: *BaEstB* purificada. B) Zimograma utilizando como sustrato 2-Naftil acetato, los carriles 1-4 corresponden a las mismas muestras. En ambos geles se observa la presencia de bandas que corresponden al peso molecular esperado para *BaEstB*. 84

Figura 60. Cromatograma del ergosterol libre y acetilado, pico 1 y 2, respectivamente. Fase móvil: (Acetonitrilo/metanol, 85:15, v/v). 85

Figura 61. Cromatograma del ergosterol libre (pico1). Fase móvil: (Acetonitrilo/metanol, 85:15, v/v). 85

Figura 62. Cromatograma del ergosterol acetilado (pico 1). Con la mezcla de extracción metanol, cloroformo, hexano Fase móvil: (Acetonitrilo/metanol, 85:15, v/v). 86

Figura 63. Cromatograma del ergosterol acetilado (pico 1). Utilizando hexano puro para la extracción. Fase móvil: (Acetonitrilo/metanol, 85:15, v/v). 86

Figura 64. A) Curvas de calibración del Ergosterol libre y acetilado. B) Concentraciones correspondientes a cada área bajo la curva. 87

Figura 65. Curva estándar con albumina de suero bovino. [*BaEstB*] = 0.00173 mg/mL. 122

Figura 66. A) Absorbancia obtenida de los ensayos de actividad respecto al tiempo, utilizando como sustrato al 2-naftil acetato y como controles negativos los sobrenadantes de la cepa *P. pastoris* X-33 silvestre y la cepa *P. pastoris* X-33/pPICZαA, rombos rojos y negros, respectivamente. Los círculos negros, grises y vacíos corresponden a la enzima purificada preservada en glicerol al 20%, al 10% y en buffer Tris HCl 50 Mm + Triton X-100 al 0.1%, pH 7, respectivamente. B) Actividades volumétricas y específicas de *BaEstB* preservada en diferentes soluciones. 123

Figura 67. Absorbancia obtenida de los ensayos de actividad respecto al tiempo, utilizando como sustrato al 2-naftil acetato y como controles negativos los sobrenadantes de la cepa *P. pastoris* X-33 silvestre y la cepa *P. pastoris* X-33/pPICZαA, ciclos grises y vacíos respectivamente. Los círculos negros, corresponden a la enzima purificada. En este ensayo se utilizó como buffer de reacción: Tris HCl 10 mM + Triton X-100 al 0.1%, pH 7. Actividad volumétrica y específica de *BaEstB* (0.0077 U/mL y 4.45 U/mg respectivamente)..... 124

1 INTRODUCCIÓN

Los procesos catalizados por enzimas en la industria son cada vez más numerosos, ya que presentan ventajas frente a los catalizadores químicos convencionales. Por ejemplo, su velocidad de reacción (pueden aumentar las velocidades de reacción hasta 10^{12} veces con respecto a procesos realizados en ausencia de enzimas) y su alta especificidad, aunque existen algunos casos en los que las enzimas son activas frente a una variedad de sustratos. Actualmente se conocen casi 4000 enzimas, de las cuales solo unas 200 son utilizadas comercialmente; tan solo para el 2004 el mercado mundial de enzimas industriales se estimó en 2000 millones de dólares y al menos el 75% de todas las enzimas industriales son de acción hidrolítica entre las que se incluyen las esterasas (Sharma, Sharma, & Shukla, 2011).

Comprender la acción de las esterasas tiene múltiples implicaciones biotecnológicas. Particularmente, dentro de esterasas, las HSL han sido ampliamente estudiadas en mamíferos, pero poco se ha hecho en hongos y aún se desconocen qué sustratos naturales tiene en esos organismos.

1.1 Hongos como degradadores de materia vegetal

Los hongos pertenecientes al grupo de los *Basidiomycetes* son los organismos más eficientes para la degradación de lignina y otros componentes de la biomasa vegetal, debido a que secretan una gran variedad de enzimas lignocelulolíticas como las lacasas, peroxidasas, celulasas, hemicelulasas y enzimas lipolíticas que son de gran interés en la refinería y procesos de biorremediación, así como en la degradación de xenobióticos. Dentro de estos hongos también conocidos como de pudrición blanca se encuentra *Bjerkandera adusta*, uno de los más conocidos por su actividad ligninolítica elevada. Dentro de las aplicaciones biotecnológicas que se le ha dado, destaca la degradación de compuestos húmicos (Belcarz, Ginalska, & Kornilowicz-Kowalska, 2005) y la degradación de insecticidas (Quintero, 2011;

Rüttimann-Johnson & Lamar, 1997). *Bjerkandera adusta* tiene además enzimas pertenecientes al grupo de las esterasas y lipasas ampliamente utilizadas en la industria y con alto potencial de uso biotecnológico.

1.2 Esterasas y lipasas

Las esterasas (carboxil éster hidrolasas, EC 3.1.1) son un grupo diverso de hidrolasas que catalizan la escisión y formación de enlaces éster. Muchas de estas enzimas muestran una amplia gama de sustratos, lo que lleva a la suposición de que evolucionaron para permitir el acceso a diferentes fuentes de carbono o para participar en distintas vías catabólicas.

Las esterasas catalizan principalmente la hidrólisis de enlaces éster de los triglicéridos de cadena corta (<10 átomos de carbono), mientras que las lipasas (EC 3.1.1.3) son principalmente activas contra sustratos insolubles en agua como triglicéridos con ácidos grasos de cadena larga (>10 átomos de carbono) (Liu et al., 2013). Ambos tipos de enzimas pueden catalizar reacciones de esterificación, transesterificación y reacciones enantioselectivas de hidrolisis (Pandey *et al.*, 1999) Una diferencia significativa entre estas enzimas es que las lipasas muestran activación interfacial, es decir, son activas en la interfaz entre el sustrato lipídico hidrofóbico y el medio hidrofílico, mientras que en las esterasas no ocurre este fenómeno (Fojan, Jonson, Petersen, & Petersen, 2000). Además, pueden distinguirse por el espectro de sustratos sintéticos que utilizan, las lipasas hidrolizan palmitato de *p*-nitrofenilo y las esterasas butirato de *p*-nitrofenilo. Debido a sus propiedades únicas como la amplia especificidad de sustrato, alta regioespecificidad, alta estabilidad en solventes orgánicos, (aunque esta propiedad es más notable en las lipasas) y de que generalmente no requieren de cofactores, estas enzimas son empleadas en múltiples procesos industriales como aditivos para el procesamiento de grasa y aceite, producción de fármacos, detergentes, papel, cosméticos, perfumes, biodiesel así como la producción de ésteres aromáticos en la industria alimentaria (Tabla 1) (Bornscheuer, 2002).

Las esterasas y lipasas se han aislado de diferentes bacterias, hongos, plantas, animales y de metagenomas (Fojan et al., 2000; Gopinath, Anbu, Lakshmi priya, & Hilda, 2013), de las cuáles algunas han sido producidas en diferentes sistemas de expresión heterólogos, debido a su relevancia biotecnológica.

Los análisis comparativos de estructuras tridimensionales de esterasas y lipasas muestran que estas se pliegan en una estructura típica hidrolasa α/β , que consiste en una hoja β central rodeada por un número variable de hélices α , y una triada catalítica compuesta por Ser-His y Asp/Glu (Figura 2) (David et al., 1992). Además la mayoría de ellas presentan la secuencia consenso GX SXG.

Tabla 1. Aplicaciones industriales de esterasas y lipasas

Industria	Reacción	Producto o aplicación
Detergentes	Hidrolisis de grasas	Eliminación de manchas de aceite en las telas
Farmacéutica	Transesterificación, hidrolisis	Lípidos especiales que ayudan a la digestión
Químicos	Enantioselectividad, síntesis	Compuestos quirales y químicos
Cosméticos	Síntesis	Hemulsificantes, cremas humectantes
Cuero	Hidrolisis	Productos de cuero
Papel	Hidrolisis	Papel de mayor calidad
Limpieza	Hidrolisis	Remoción de grasas
Bebidas	Mejorar el aroma	Bebidas
Aderezos	Mejorar el aroma	Mayonesa, aderezos
Carne y pescado	Mejorar el sabor	Productos cárnicos y pescado, remoción de grasas
Grasas y aceites	Transesterificación, hidrolisis	Manteca de cacao, margarina, ácidos grasos, glicerol, mono y diacilglicerol.
Lácteos	Hidrolisis de grasa de la leche, maduración de quesos, modificación de grasas de mantequilla	Mejoramiento de sabor

Tomada y modificada de Sharma *et al.*, 2011.

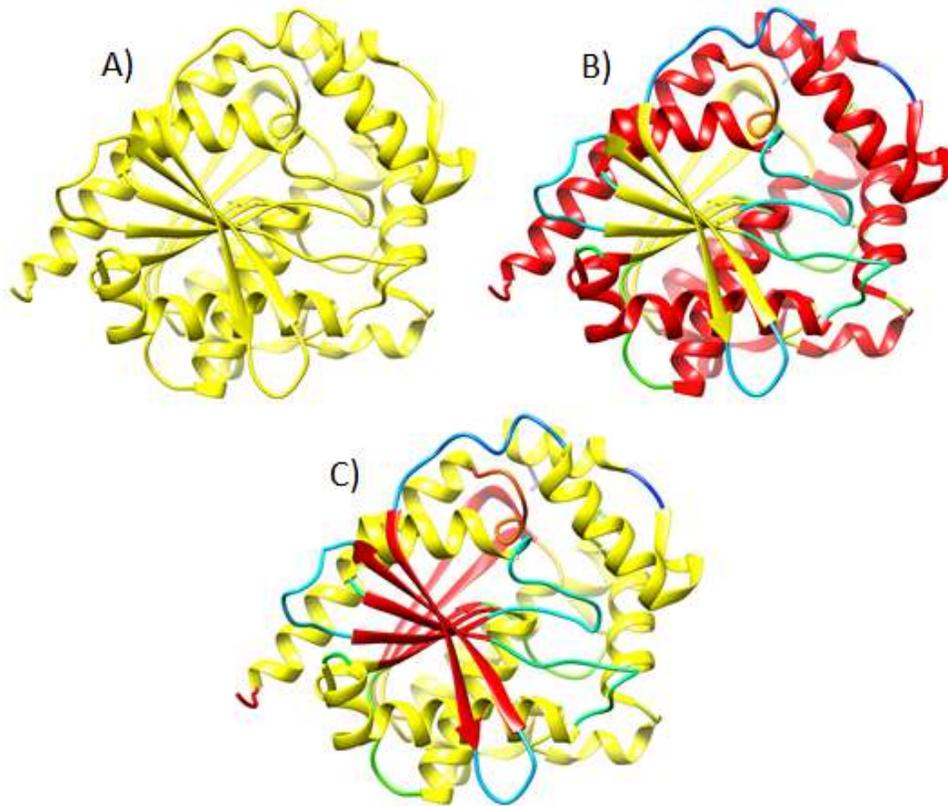


Figura 1. Modelo del plegamiento canónico α/β hidrolasa de una lipasa de *Candida antártica*, generada a partir de la estructura cristalográfica de la lipasa B de *Candida antártica*. A) Vista frontal. B) α -hélices que rodean al núcleo de β -plegadas. C) Núcleo estructural de hojas β . Tomada y modificada de (Torres, 2009).

1.3 Mecanismo de acción de las esterasas

La acción que ejerce la triada catalítica (Ser-His-Asp/Glu) de las esterasas inicia cuando el átomo de oxígeno del grupo hidroxilo de la serina se activa como nucleófilo por los residuos His-Asp/Glu mediante una transferencia de protones, es decir, el aumento de la nucleofilicidad del hidroxilo de la serina se da por la transferencia de su protón al grupo imidazol de la histidina, a su vez se da una estabilización de cargas con el residuo Asp/Glu. Cuando la serina actúa como nucleófilo durante el ataque al grupo carbonilo del sustrato (S1) se forma un intermediario tetraédrico y deja una carga negativa en el átomo de oxígeno del grupo carbonilo. Este intermediario es estabilizado por la α -hélice 3 de la enzima y por los puentes de hidrógeno generados entre los dos grupos amino y el grupo hidroxilo ubicado en el sitio conocido como cavidad de oxianión, posteriormente se

obtiene el primer producto (P1). El primer producto de la reacción se genera cuando la histidina dona el protón cedido por la serina, al oxígeno del alcohol liberado en la ruptura del enlace éster que se separa del intermediario tetraédrico. El acilo del sustrato termina por formar un enlace éster con la serina, creando el complejo acil-enzima. La disociación de la enzima de este complejo inicia cuando el segundo sustrato nucleófilo (S2) entra al sitio activo y realiza un nuevo ataque nucleofílico sobre el carbonilo ahora esterificado con la serina catalítica regenerando un intermediario tetraédrico el cual se estabiliza mediante interacciones con la cavidad oxianiónica. Finalmente la histidina dona el protón al átomo de oxígeno de la serina catalítica, haciendo que se libere el componente acilado como segundo producto (P2), regenerando la enzima a su estado original (Figura 2) (Li *et al.*, 2014).

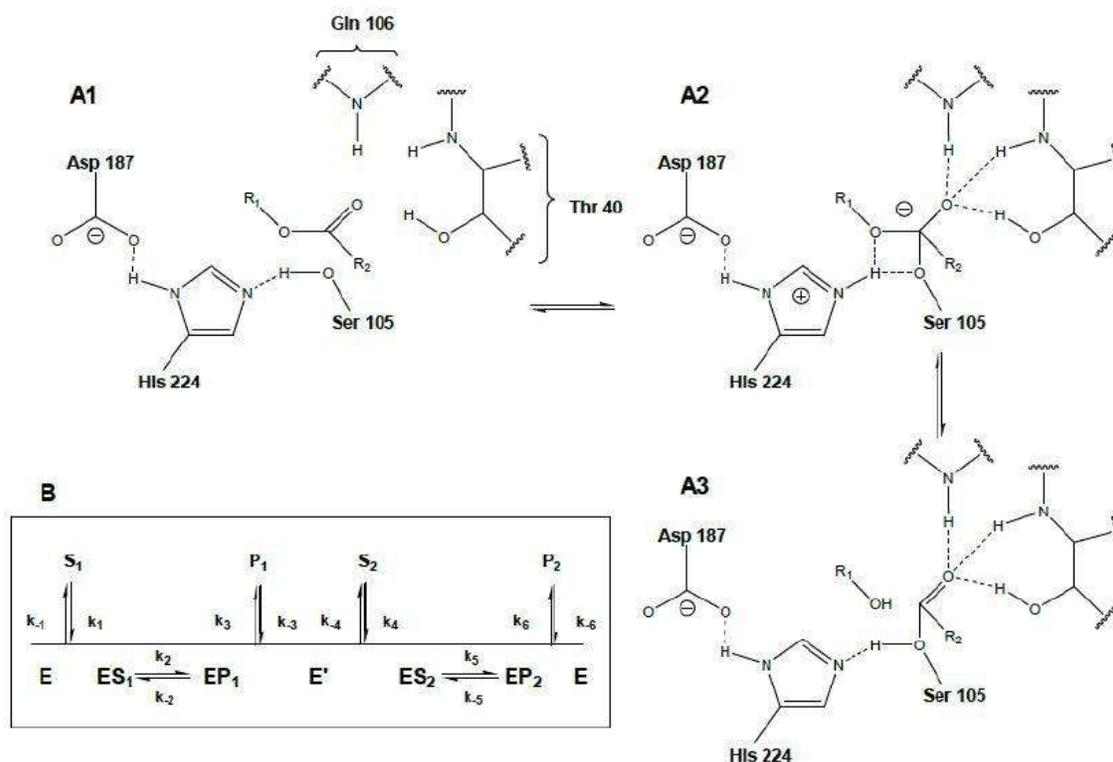


Figura 2. Mecanismo de acción de las esterases, basado en la triada catalítica compuesta por una serina nucleofílica (Ser105), una histidina (His224) y un ácido aspártico (Asp187). El intermediario tetraédrico (A2) es estabilizado mediante puentes de hidrógeno. Esta estructura se conoce como cavidad de oxianión integrado por una treonina (Thr40) y una

glutamina (Gln106). El complejo acil-enzima (A3) se rompe cuando un segundo sustrato lleva a cabo un ataque nucleofílico al carbonilo de este complejo. A partir de entonces se genera un nuevo intermediario tetraédrico (A2) para terminar con la liberación del segundo producto y regenerar el sitio activo (A1) (Li *et al.*, 2014).

1.4 Mecanismo de acción de las lipasas

El mecanismo de acción de las lipasas consiste en la hidrólisis de un ácido graso en presencia de un alcohol, obteniendo un éster y liberando agua. Así mismo el mecanismo catalítico se basa en un intercambio de cargas que consta de 5 etapas. La cadena lateral del aspartato se une por puentes de hidrogeno a la histidina convirtiéndola en un mejor aceptor de protones. A su vez la histidina polariza el átomo de hidrógeno de la serina haciéndola nucleofílica. Tras la unión del sustrato, se produce el ataque nucleofílico por parte del grupo hidroxilo de la serina catalítica sobre el enlace éster del lípido, lo que conlleva a la ruptura del enlace y a la formación de un intermediario entre el ácido graso y la serina nucleofílica. Posteriormente se libera el alcohol y se produce un segundo ataque nucleofílico por parte de una molécula de agua que ataca el enlace éster del intermediario transitorio, lo que produce la liberación del ácido graso y la regeneración del centro catalítico (Bornscheuer, 2002) Así mismo pueden llevar a cabo reacciones de: esterificación, interesterificación y transesterificación (Houde *et al.*, 2004)

1.5 Activación interfacial

En la conformación cerrada e inactiva de la enzima, tanto en el centro activo como la zona contigua, involucrada en la unión del sustrato, se hallan cubiertas por un bucle anfipático ("*tapa*"). La tapa en presencia de una interfase lípido/agua, es capaz de desplazarse de su posición original, dejando expuesto al centro activo y permitiendo la interacción enzima-sustrato (Kim, Song, Shin, Hwang, & Sun, 1997; Nardini, Lang, Liebeton, Jaeger, & Dijkstra, 2000). El movimiento de la tapa no sólo permite el acceso al centro activo de la enzima, sino que también expone una gran superficie hidrofóbica, al tiempo que parte de la superficie hidrofílica queda

cubierta (Figura 3). Este cambio de conformación se da por la “actividad interfacial” esto consiste en que durante el contacto con la interface lípido/agua, el bucle sigue un reordenamiento conformacional, descubriendo el sitio activo.

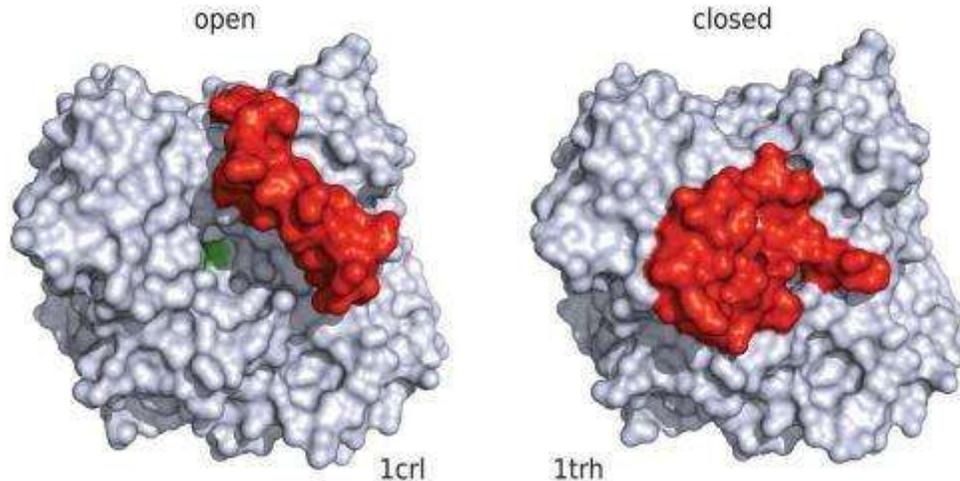


Figura 3. Estructura de una lipasa de *Candida rugosa*. En color rojo, se muestra la región que forma el “Lid” o tapa de la enzima, a la izquierda se observa la conformación abierta en la cual el sitio activo (en color verde) queda expuesto permitiendo la interacción enzima-sustrato, a la derecha la conformación cerrada (Rehm, Trodler, & Pleiss, 2010).

Las lipasas poseen tapas anfipáticas que, en la conformación cerrada su lado hidrofílico queda expuesto hacia el solvente, mientras que la parte hidrofóbica se dirige hacia el túnel de entrada donde se encuentra la triada catalítica (Brocca *et al.*, 2009) Conforme la enzima se desplaza hacia la conformación abierta, la parte hidrofóbica queda expuesta y contribuye a la región de unión al sustrato (Yang y Lowe, 2000). Por lo tanto, no solo la naturaleza anfipática de la tapa es importante para la actividad y especificidad de las lipasas, sino que también contribuye su secuencia específica de aminoácidos (Holmquist *et al.*, 1995)

1.6 Súperfamilia α/β hidrolasa

Existen múltiples clasificaciones de proteínas tipo hidrolasas. Estas clasificaciones se basan en caracterizaciones bioquímicas de acuerdo a los sustratos frente a los

que son activas, a la reacción específica que catalizan, con base en caracterizaciones estructurales y de los dominios que presentan. La base de datos *ESTHER* (<http://bioweb.ensam.inra.fr/esther>), está dedicada a la recopilación y análisis de proteínas y dominios pertenecientes a la superfamilia α/β hidrolasa. Esta base de datos ofrece una enorme y valiosa información, por ejemplo, el número de genes que hay en cada una de las subfamilias, las estructuras cristalográficas disponibles, inhibidores y sustratos que utilizan, mutaciones realizadas en diferentes organismos, enfermedades relacionadas con estas proteínas. Además, de vincularse con las bases de datos InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) y Pfam (<https://pfam.xfam.org/>).

El servidor clasifica a la súperfamilia α/β hidrolasa en cuatro grandes bloques: C, H, L y X, que albergan 98 familias y 116 subfamilias, apuntando a la enorme variabilidad que existe dentro de esta súperfamilia. Encontramos por ejemplo a carboxilesterasas de bacterias, hongos, plantas, vertebrados e invertebrados; lipasas bacterianas y de mamíferos; acetilcolinesterasas, cutinasas, epóxido-hidrolasas, peptidasas, entre muchas otras (Anexos de figuras). El bloque mayormente representado es el bloque X, mientras que el bloque H es el más pequeño, en este último encontramos a las lipasas sensibles a hormonas, clasificadas por Arpigny y Jeager en 1999 como lipasas bacterianas de la familia IV.

1.7 Clasificación de las lipasas

1.7.1 De acuerdo a su especificidad

Lipasas no específicas

Estas catalizan la hidrólisis del grupo éster, cualquiera que sea su posición en el esqueleto del glicerol o la naturaleza del ácido graso liberado. Catalizan la hidrólisis completa de triglicéridos en ácidos grasos, pero también conduce a la producción de productos intermedios como los diglicéridos.

Lipasas que hidrolizan específicamente los ácidos grasos en posición 1 y 3 sobre el glicerol

Dan lugar a los productos de hidrólisis como 1,2-diglicérido, 2,3- diglicérido y 2-monoglicérido. Éstos son muy inestables químicamente y sufren migración del grupo acilo.

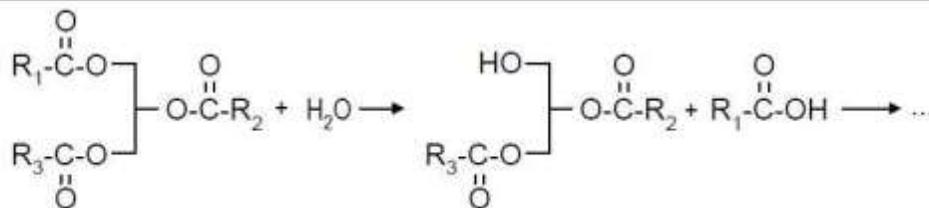
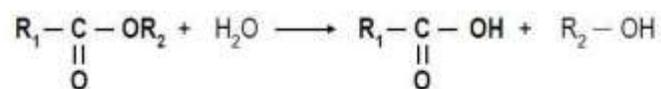
Lipasas que muestran especificidad ligada a la naturaleza del ácido graso y la longitud de cadena

Para una misma longitud de cadena, la velocidad de hidrólisis aumenta con el número de insaturaciones y el efecto es mayor cuanto mayor es la temperatura (Macrae, 1983).

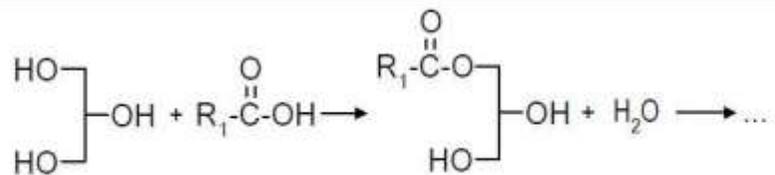
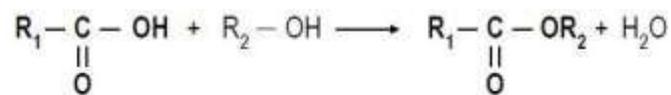
1.7.2 De acuerdo a la reacción que catalizan

Las lipasas también pueden clasificarse de acuerdo a la reacción específica que catalizan (En los esquemas de las reacciones, los puntos suspensivos indican que la reacción puede proseguir con el resto de los grupos del glicerol) (Páez, 2000).

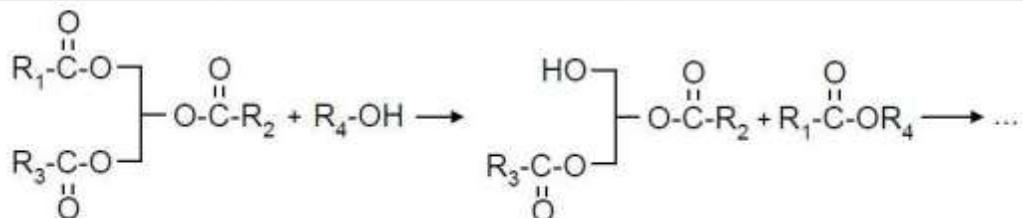
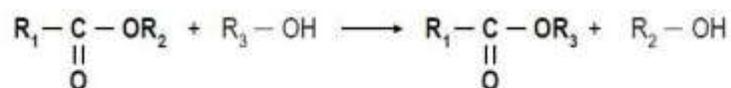
Hidrolisis: descomposición de un éster en su ácido y su alcohol constituyente en presencia de agua



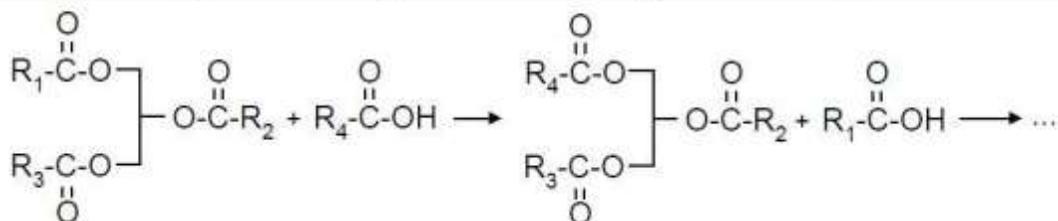
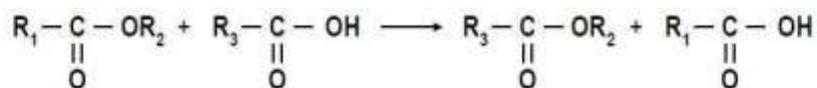
Esterificación: es la reacción entre un ácido carboxílico y un alcohol para dar un éster



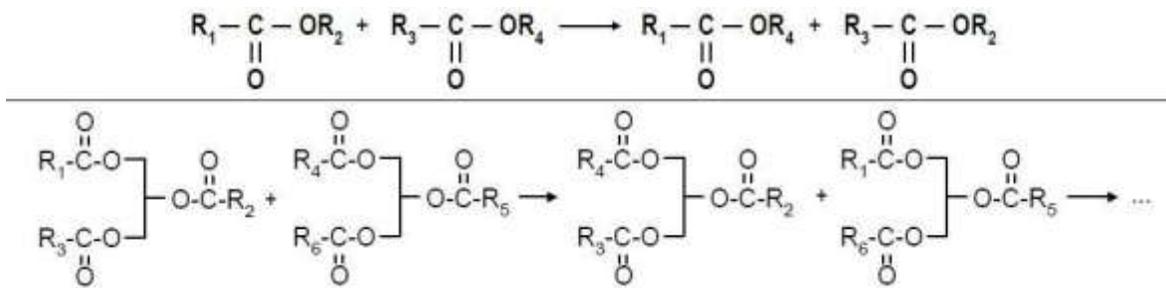
Alcoholisis: es la reacción entre un éster y un alcohol produciéndose la sustitución de un grupo alquilo de un éster por otro



Acidólisis: es la reacción entre un éster y un ácido carboxílico, que transcurre con el reemplazo del grupo acilo del éster por el del ácido libre

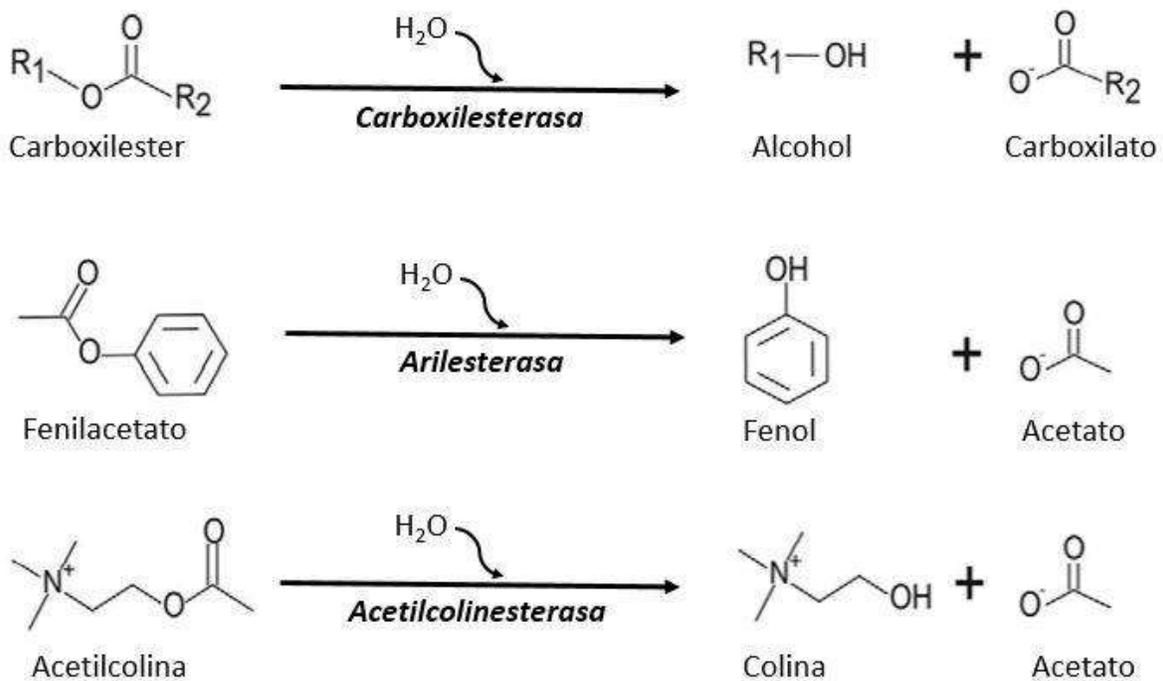


Interesterificación: es la reacción entre dos ésteres que intercambian sus grupos acilo



1.8 Clasificación esterasas

Las reacciones de hidrolisis son catalizadas por diferentes tipos de esterasas las cuales son clasificadas por la NC-IUBMB (por sus siglas en inglés Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology) de acuerdo al sustrato específico que es reconocido por la enzima (Figura 4).



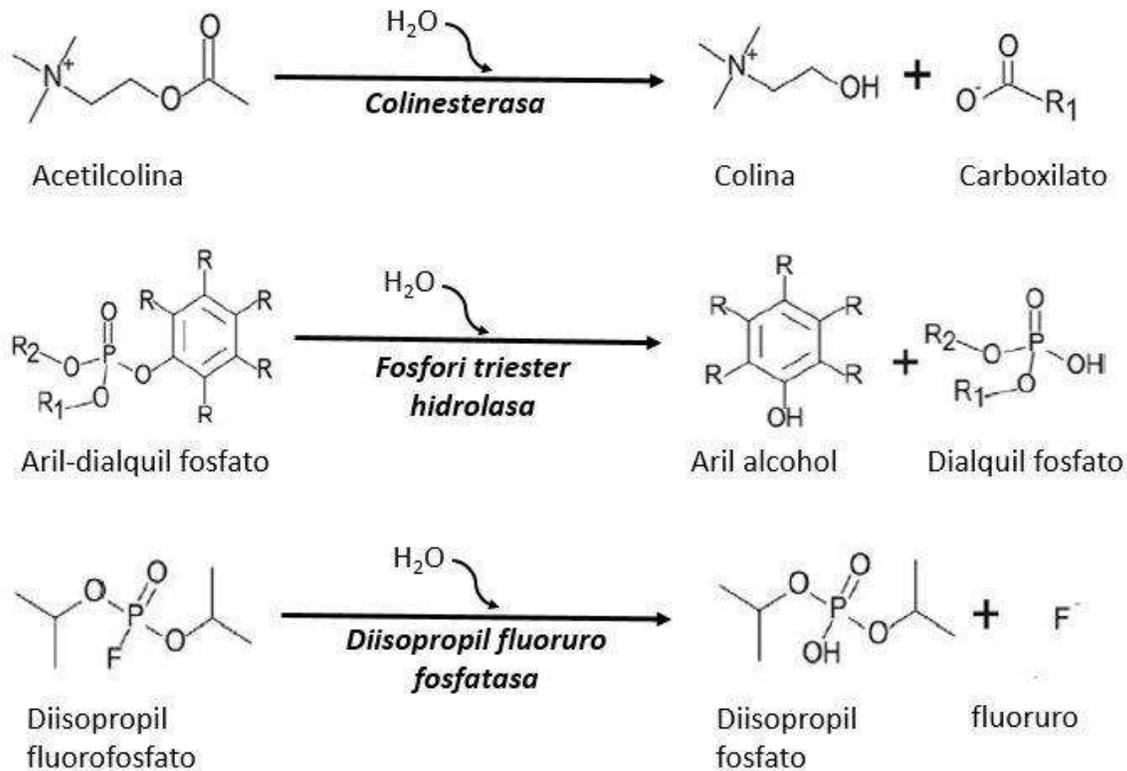


Figura 4. Reacciones de hidrolisis catalizadas por diferentes tipos de esterases

1.9 Clasificación de lipasas por Arpigny y Jaeger

En 1999, Arpigny y Jaeger compararon 53 secuencias de lipasas y esterases bacterianas y las clasificaron de acuerdo al porcentaje de conservación en las secuencias de aminoácidos y algunas propiedades biológicas. De acuerdo a los resultados propusieron una clasificación de ocho familias (Arpigny & Jaeger, 1999).

Familia I: Lipasas verdaderas o lipasas de *Pseudomonas*

Destaca la presencia de dos residuos de ácido aspártico implicados en la unión a Ca^{2+} cuyas posiciones son homologas en todas las secuencias, además de dos residuos de Cys que forman un puente disulfuro. Los residuos de Asp y Cys se

localizan en la vecindad de los residuos catalíticos His y Asp, los cuales probablemente participan en la estabilización del centro activo (Kim *et al.*, 1997).

Familia II: GDSL

Esta familia no presenta la secuencia consenso GX SXG, particularmente en *Streptococcus scabies* se presenta una diada catalítica en lugar de la triada catalítica canónica. Otra característica importante de las esterasas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* y *Photobacterium luminescens* es un dominio adicional en la región C-terminal que abarca aproximadamente un tercio de su secuencia completa y es similar a la de una familia de autotransportadores que funcionan como factores de virulencia. En estas proteínas, el dominio C-terminal se pliega presumiblemente en aproximadamente 12 láminas β anfipáticas que forman un poro acuoso en la membrana externa (Henderson, Navarro-garcia, & Nataro, 1998; Loveless & Saier, 1997).

Familia III

Esta familia fue identificada primeramente por Cruz y colaboradores. En 1998, Wei y colaboradores obtuvieron la primera estructura terciaria de la lipasa producida por *Streptomyces exfoliatus*, la cual muestra el pliegue canónico α/β hidrolasa y la triada catalítica típica. También muestra aproximadamente el 20% de identidad de secuencia de aminoácidos con las isoformas intracelulares y de plasma humano PAF-AH (Cruz, Pérez, Wellington, Castro, & Servín-González, 1994; Hard, T., Barnes, H., Larsson, C., Gustafsson., Lund, 1995).

Familia IV: Lipasas Sensibles a Hormonas

Varias enzimas bacterianas muestran una elevada similitud en la secuencia de aminoácidos con las HSL de mamíferos. La figura 5 muestra el alineamiento múltiple de 6 secuencias de aminoácidos de HSL procarióticas filogenéticamente alejadas con la de humano (Hemilä, Koivula, & Palva, 1994). Las HSL de mamíferos parecen derivar de un dominio catalítico, homólogo con las enzimas bacterianas, fusionado con un dominio adicional en la región N-terminal y un módulo regulador insertado en la parte central de la secuencia.

hHSL	348	HF	HGGGF	422	GDSAGGNLCF	884	PVHI	VACALDPML	DDSVMLARR	RNLGQPV	TLRLVEDL	PHGFL
<i>A.acido</i>	79	YY	HGGGW	153	GDSAGGNLAA	244	PAYL	ATAQYDPL	RDVGKLYAEA	LNKAGV	KVEIENFEDL	HGFA
<i>Pse.sp</i>	79	FF	HGGGF	153	GDSAGGNLAL	242	PTTLI	TAEFDPLR	DEGEAFALR	LQQAGV	SVRVQRCEGMI	HGFI
<i>A.fulg</i>	74	YY	HGGGF	158	GDSAGGNLAA	247	PALIT	TAEYDPLR	DEGEVFGQML	RRAGVEAS	IVRYRGVLR	HGFI
<i>A.eutro</i>	126	YF	HGGGF	202	GDSAGGTLAA	294	PAW	AVAGYDPL	HDEGVAYAEK	LRAAGVAA	TLADYPGMI	HDFP
<i>E.coli</i>	89	YL	HGGGF	183	GDSAGANLAL	254	PCF	AGAEFDPLL	DDSRLLYQT	LAHQQPCE	EFKLYPGTL	HAFI
<i>M.sp.L2</i>	163	FF	HGGGF	227	GDSAGGCLAA	353	PSY	VVAELDTLR	DEGLAYAEEL	LQKEGV	QVQTYTVL	GAPHFI

Figura 5. Lipasas sensibles a hormonas pertenecientes a la familia IV. *Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Pseudomonas sp.* *Archaeoglobus fulgidus*, *Alcaligenes eutrophus*, *Escherichia coli*, *Moraxella sp.*

Familia V

Presentan el plegamiento α/β hidrolasa, así como la secuencia consenso GX SXG, también presentan un motivo conservado formado por los aminoácidos PTL, se han reportado esterasas en las cuales se sustituye por PTQ y por PAL (Will *et al.*, 2010) y se han descrito a partir de organismos mesófilos, termófilos y psicrófilos. También se ha descrito que presentan similitud con otras enzimas no lipolíticas (epóxido hidrolasas, deshalogenasas y haloperoxidasas) que también poseen el típico pliegue α/β hidrolasa y una tríada catalítica SHD.

Familia VI

Con una masa molecular en el rango de 23-26 kDa, las enzimas de esta familia se encuentran entre las esterasas más pequeñas conocidas. La forma activa de esta enzima es un dímero con el pliegue α/β hidrolasa y una triada catalítica SHD clásica. Esta carboxilesterasa hidroliza sustratos pequeños con una amplia especificidad y no muestra actividad hacia triacilglicéridos de cadena larga. Muestran aproximadamente el 40% de identidad con la secuencia de lisofosfolipasa eucariotas (Fosfolipasas A_2 independientes de Ca^{2+}) (Arpigny & Jaeger, 1999; Hong, Jang, Choi, & Yoo, 1991).

Familia VII

En esta familia, diversas esterasas de 55 kDa aproximadamente comparten una identidad de secuencia de aminoácidos significativa con esterasas de mamíferos (30 y 40% con la acetilcolinesterasa de intestino y la carboxilesterasa de hígado respectivamente). La esterasa de *Arthrobacter oxydans* es particularmente activa

contra los herbicidas de fermilcarbamato al hidrolizar su enlace de carbamato central y está codificada en un plásmido (Pohlenz, Boidol, Schuttke, & Streber, 1992).

Familia VIII

La familia está compuesta por tres enzimas que tienen 380 residuos de aminoácidos aproximadamente, y muestran una alta similitud con algunas clases de β -lactamasas de clase C. Una región de 150 aminoácidos (posición 50-200) tiene una identidad del 45% con una β -lactamasa de *Enterobacter cloacae* (Galleni et al., 1988). Además poseen una secuencia consenso SXXL en la región N-terminal

Con base en los alineamientos de secuencias de sus aminoácidos y la conservación de los motivos particulares que contienen, las esterasas también se han clasificado en los bloques C, H, X y L (Arpigny & Jaeger, 1999).

Lipasas sensibles a hormonas (HSL por sus siglas en inglés)

Las lipasas sensibles a hormonas (E.C. 3.1.1.79, HSL) son enzimas intracelulares que pueden ser estimuladas por varias hormonas, como la catecolamina, la adrenocorticotropina (ACTH) y el glucagón (Lass, Zimmermann, Oberer, & Zechner, 2011). La actividad de las HSL de vertebrados está regulada por fosforilación reversible dependiente AMPc (Arner & Langin, 2007). En tejido adiposo, las HSL catalizan la hidrólisis de triacilglicerol y diacilglicerol, que promueve la liberación de ácidos grasos libres que son transportados a otros órganos como una fuente importante de energía. Además, se ha demostrado que las HSL hidrolizan o sintetizan una amplia gama de sustratos que contienen enlaces éster, que incluyen ésteres de colesterilo, ésteres de hormonas esteroides, ésteres de retinilo y otros sustratos relacionados con lípidos (Lafontan y Langin, 2009; Yeaman, 2004). Debido a su amplia especificidad de sustratos las HSL resultan altamente atractivos para aplicaciones industriales.

Las HSL mejor caracterizadas son las de mamíferos, estas se expresan en múltiples tejidos como músculo esquelético, corazón, macrófagos, células β del páncreas, glándulas mamarias y testículos. En mamíferos se conocen tres isoformas, con pesos moleculares que van de 84 a 130 kDa (Lass *et al.*, 2011).

Las HSL de humanos están compuestas por un polipéptido de 786 aminoácidos sin una región de extensión a membrana. Estas enzimas podrían formar agregados funcionales a altas concentraciones, así como unirse a vesículas de fosfolípidos para llevar a cabo su función (Lass *et al.*, 2011). Están compuestas por dos dominios: un dominio de unión N-terminal y un dominio catalítico C-terminal idéntico (Smith, Garton, Aitken, & Yeaman, 1996; Osterlund, 2001) El dominio N-terminal está implicado en la mediación de las interacciones proteína-proteína, mientras que el dominio C-terminal alberga la tríada catalítica canónica compuesta por Ser-Asp-His con varios sitios de fosforilación. Específicamente, el dominio N-terminal podría interactuar con la proteína de unión a los lípidos de adipocitos. En el dominio C-terminal se encuentra el pliegue α/β -hidrolasa, con un residuo Ser altamente conservado en la secuencia consenso Gly-X-Ser-X-Gly (A. J. Smith, Sanders, Juhlmann, Hertzell, & Bernlohr, 2008) Además, en el dominio C-terminal alberga un módulo regulador de ~150 aminoácidos, que es la región diana principal de la proteína quinasa A (Figura 6) (Watt & Steinberg, 2008).

Según la clasificación Arpigny y Jeager que incluye lipasas de los bloques C, H, X y L, dentro del bloque H se encuentran las lipasas sensibles a hormonas (HSL), las cuales están ampliamente distribuidas en microorganismos, plantas y animales. A su vez las HSL de microorganismos se clasifican en dos subfamilias: la subfamilia **GTSAG** y la subfamilia **GDSAG** (en las que los residuos de aminoácidos en negritas pueden sustituirse (Jeon *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2014).

A pesar de estar descritas en algunas bacterias, muy pocas han sido descritas y caracterizadas en hongos, tal es el caso de las HSL *RmEstA* y *RmEstB* de *Rhizomucor miehei* (Yang, Qin, Duan, Yan, & Jiang, 2015).

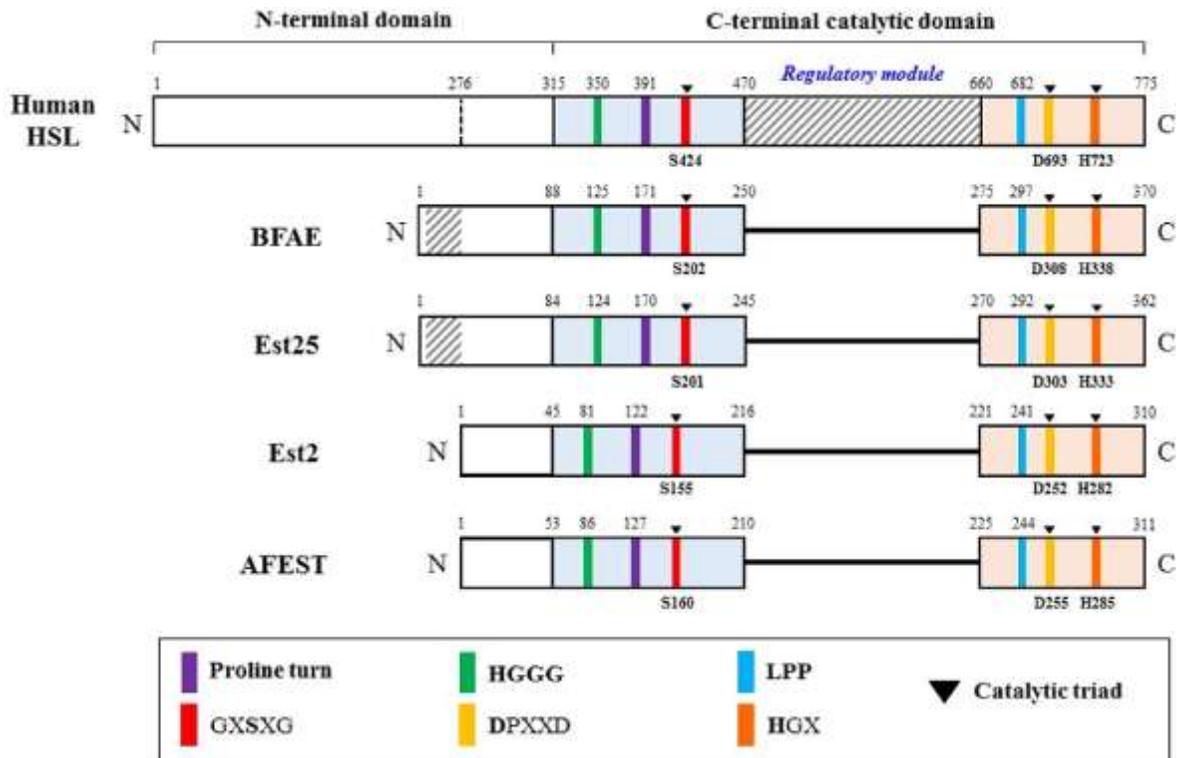


Figura 6. Organización estructural de la HSL humana y varias HSL bacterianas: BFAE, Est25, EST2 y AFEST. La HSL humana está compuesta por un dominio N-terminal y un dominio catalítico C-terminal. El dominio C-terminal de ambos tipos de HSL, alberga la tríada catalítica (Ser-Asp-His) y los motivos conservados (GX SXG, DPXXD y HGX) (Modificado de Doohun-Kim, 2017).

1.10 *P. pastoris* como sistema de expresión

En la última década, la levadura metilotrófica facultativa, *P. pastoris* se ha utilizado para producir cientos de proteínas recombinantes importantes para fines industriales, farmacéuticos y de investigación básica. Presenta varias ventajas como sistema de expresión heteróloga, como su fácil manipulación a nivel genético, puede agregar diversas modificaciones postraduccionales eucariotas y se han descrito varios promotores fuertes para conducir la expresión heteróloga (Cereghino & Cregg, 2000; Macauley-Patrick, Fazenda, McNeil, & Harvey, 2005). Las proteínas heterólogas pueden producirse intracelularmente o secretarse extracelularmente. Debido a que *P. pastoris* secreta cantidades pequeñas de proteínas extracelulares, la proteína recombinante secretada constituye la gran

mayoría de la proteína total en el medio. Por lo tanto, producir una proteína heteróloga dirigida al sobrenadante del cultivo puede ser un primer paso importante en la purificación (Cereghino *et al.*, 2007).

Se ha descrito que en *P. pastoris*, el promotor de la alcohol oxidasa P_{AOX1} es un promotor fuerte e inducible por metanol. La alcohol oxidasa (AOX) cataliza la primer reacción para la oxidación del metanol a formaldehído y a peróxido de hidrógeno, la enzima es “secuestrada” dentro del peroxisoma junto con las catalasas descomponen el peróxido de hidrogeno en oxígeno y agua, una parte del formaldehído que produce AOX sale del peroxisoma y es oxidado a formato y dióxido de carbono por dos deshidrogenasas citoplasmáticas, de este modo las células obtienen la energía para el crecimiento utilizando metanol (Cereghino & Cregg, 2000).

P. pastoris tiene dos genes que codifican para la síntesis de la enzima: el gen de la alcohol oxidasa 1 (AOX1) y el 2 (AOX2). El gen AOX1 contribuye con el 90% de la síntesis de la alcohol oxidasa que se genera en la célula, mientras que AOX2 codifica para el 10% restante de la enzima.

1.10.1 Péptido señal α -MF

El péptido señal más comúnmente usado en *P. pastoris*, proviene del factor α de apareamiento (α -MF: α mating factor por sus siglas en inglés) una pre-pro secuencia. Esta secuencia comprende a 19 aminoácidos del péptido señal (pre-secuencia), seguido por una pro-región de 60 aminoácidos. La secuencia señal presenta un sitio de corte en la pro-región que es reconocida por la proteasa Kex2 de la levadura, el resultado es la liberación de la proteína totalmente procesada (Parodi, 1999)

En cuanto a las modificaciones postraduccionales generadas por *P. pastoris*, estas son semejantes a las de los organismos eucariotas superiores, dentro de las que podemos encontrar el plegamiento correcto de las enzimas, la formación de

puentes disulfuro, la adición de N-glicosilaciones (en su mayoría la glicosilación es constante y no alterada en Man₈₋₉GlcNAc₂ en la cadena lateral de un residuo de Asn), el cual se encuentra en la secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr y O-glicosilaciones en las que se adicionan O-oligosacáridos en los grupos hidroxilos de los aminoácidos Ser y Thr presentes en las proteínas secretadas, estas glicosilaciones están compuestas sólo de residuos de manosas. Además *P. pastoris* no hiperglicosila como en el caso de *Saccharomyces cerevisiae* (Cereghino & Cregg, 2000). Además, existen distintos tipos de vectores disponibles para obtener la expresión óptima de la proteína. Las características que presenta el sistema de expresión son las siguientes:

1.10.2 Fenotipos de utilización de metanol

La cepa de *P. pastoris* de acuerdo al uso de metanol pueden clasificarse en tres fenotipos: a) Mut⁺ las cuales tienen un buen crecimiento en metanol, b) Mut^s o fenotipo de utilización baja de metanol, debido a que estas cepas utilizan el gen AOX2 (solo codifica para el 10% de la alcohol oxidasa) por lo que se observa un lento crecimiento en metanol, c) Mut⁻ o fenotipo de utilización nula de metanol, estas cepas no son viables para crecer en metanol debido a que tienen deletados ambos genes AOX, por lo que pueden ser utilizadas como control negativo para el crecimiento en medio con metanol.

2 ANTECEDENTES

Se ha caracterizado una gran variedad de enzimas lipolíticas de levaduras como *Candida antarctica* y *C. rugosa*, así como de hongos filamentosos como *Aspergillus niger*, *Rhizopus orizae*, *Penicillium camembertii*, entre otros. No obstante, hasta la fecha sólo se han caracterizado dos enzimas lipolíticas pertenecientes a la familia de esterasas HSL a partir del hongo termófilo mucoral *Rhizomucor miehei* y otra del hipertermofilo *Thermotoga marítima*. Sin embargo, el papel que desempeñan en la fisiología de los hongos y quiénes son los sustratos naturales de estas enzimas aún son desconocidos.

HSL *BaEstB* de *B. adusta*

En el laboratorio de Biología Molecular de Hongos del CEIB se caracterizó bioquímicamente a la esterasa HSL *BaEstB*, obtenida a partir de una librería de cDNA de una cepa *B. adusta* crecida sobre petróleo crudo. Se determinó que el tamaño del gen de *BaEstB* es de 1133 nucleótidos (incluidos dos intrones de 57 y uno de 50 nucleótidos), mientras que el mRNA es de 969 nucleótidos. La caracterización bioquímica de la enzima mostró su preferencia por sustratos con cadenas de acilo cortas, tal como el 2-naftil Acetato. La preferencia de sustratos de cadena corta es una característica de las esterasas y no de las lipasas. En contraste, la enzima no mostró actividad frente a acilos con cadenas de 10 y 16 carbonos, (*p*-NP decanoato y *p*-NP palmitato, respectivamente). En cuanto a los *p*-NPs de cadena corta se observó una marcada disminución de la actividad de hidrólisis de hasta 20 veces para el *p*-NP acetato mientras que para el *p*-NP butirato disminuye 32 veces respecto al 2-naftil-acetato (Tabla 2) (Sánchez-Carbente *et al.*, 2017).

Tabla 2. Actividad específica de la esterasa HSL *BaEstB* con diferentes sustratos

Sustrato	Actividad Específica ($\mu\text{mol}/\text{mg}$)
2-Naftil Acetato	31.58 \pm 0.1
<i>p</i> -NP Acetato	1.78 \pm 0.329
<i>p</i> -NP Butirato	0.98 \pm 0.115
<i>p</i> -NP Decanoato	0
<i>p</i> -NP Palmitato	0

El modelado tridimensional y la construcción del árbol filogenético a partir de la comparación estructural de sus análogos más cercanos, apuntan a que *BaEstB* es un ortólogo de la HSL-*RmEstB* de *Rhizomucor miehei*, el cual se encuentra filogenéticamente alejado de *B. adusta*. Además, los resultados del análisis por BLAST mostraron una gran similitud con la familia IV de las esterasas, la cual incluye a las HSL. También se localizó la triada catalítica común de las HSL a partir de alineamientos múltiples de aminoácidos. La figura 3 muestra un modelo propuesto para la estructura tridimensional de la HSL *BaEstB*. El análisis bioquímico mostró que la actividad máxima se alcanza a 45°C, mientras que a 30°C y 50°C todavía conserva el 69% y el 99% de la actividad, respectivamente. La enzima presenta una actividad óptima a pH de 7.0 y la actividad disminuyó sólo 9% a pH 10, mientras que a pH 11 mantiene hasta 53% de la actividad, en pH's ácidos (pH 4.0) la enzima presenta hasta 45% de actividad.

Hasta el momento, aún se desconoce cuáles son los sustratos naturales de esta enzima y si al mutar los residuos que se encuentran en la entrada del sitio catalítico podría cambiar la especificidad del largo de la cadena del sustrato como ha sido demostrado en el ortólogo *RmEstB* de *R. miehei*.

En 2014, se describieron dos HSL del hongo termófilo *Rhizomucor miehei*, *RmEstA* y *RmEstB*, las comparaciones estructurales muestran que hay una alta similitud con las esterasas de *Pyrobaculum calidifontis*, *Archaeoglobus fulgidus*, *Salmonella typhimurum* *Alicyclobacillus acidocaldarius*. La

caracterización bioquímica de *RmEstA* y *RmEstB* muestra que poseen diferentes especificidades de sustrato. Por un lado *RmEstA* hidroliza ésteres de cadena larga (hasta C16) presentando la actividad más alta para aquellos con seis carbonos, mientras que *RmEstB* favorece la hidrólisis de ésteres de cadena corta, con la actividad más alta observada para C2. Se ubicaron dos aminoácidos aromáticos (Phe222 y Trp92), en el centro del “bolsillo” de unión al sustrato de *RmEstB* y los autores proponen que esto conlleva al bloqueo del sitio de unión al sustrato (figura 8 y 9), sin embargo, no proponen cuáles podrían ser los sustratos naturales (Yang *et al.*, 2015) Las HSL de mamíferos utilizan al colesterol esterificado como sustrato, que puede servir como precursor para la síntesis de hormonas, sin embargo en los hongos no existe este tipo de moléculas, en cambio contienen ergosterol. Estas moléculas pueden estar esterificadas cuando el hongo las almacena y se ha reportado que la cantidad de ergosterol esterificado es diferente en distintas estructuras de hongos basidiomicetos. En 2008, Yuan y colaboradores determinaron el contenido de ergocalciferol, ergosterol y ésteres de ergosterilo en diferentes estructuras de los hongos agáricos: *Agrocybe aegerita*, *Termitomyces albuminosus* y *Lentinus edodes* (píleo, branquias y estípite), los resultados mostraron que el contenido de ergosterol libre y esterificado variaba, pero no se detectó ergocalciferol. Las abundancias relativas entre los ergosteroles libres y los esterificados mostraron que en las tres especies el ergosterol esterificado fue mucho más alto en las branquias que en el píleo y el estípite (el contenido de ergosterol esterificado constituye 37-58% del ergosterol total en las branquias y menos del 15% en el píleo y el estípite (Tabla 3) (Yuan, Kuang, Wang, & Liu, 2008). No se tiene información respecto al contenido de este tipo de ergosteroles en *B. adusta* y tampoco de las enzimas involucradas en la movilización del ergosterol esterificado a ergosterol libre.

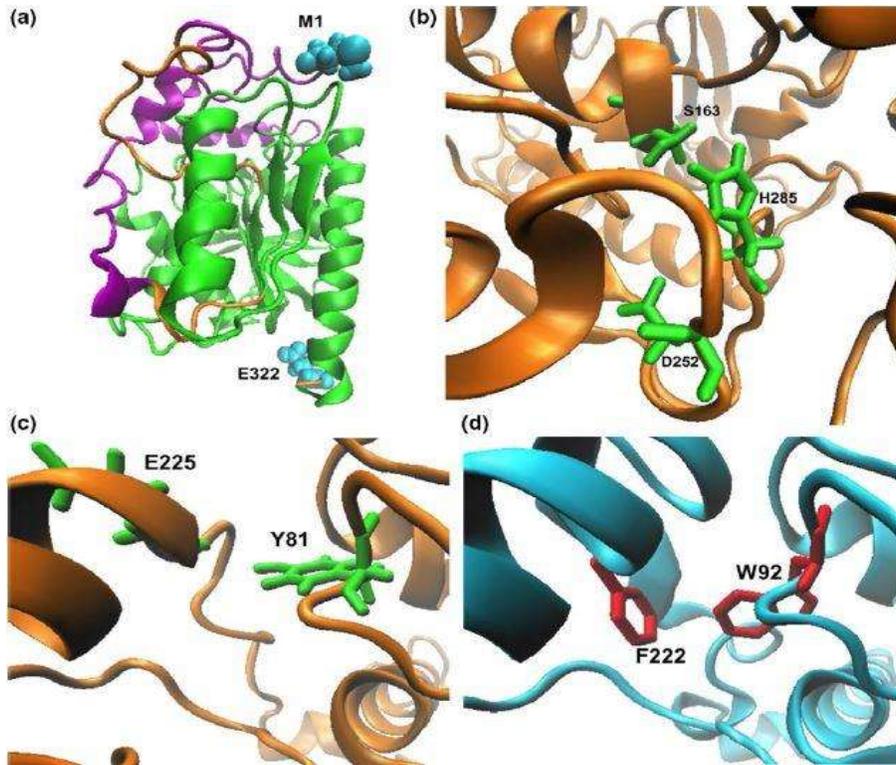


Figura 7. Modelo tridimensional propuesto para *BaEstB*. El cap y los dominios catalíticos se representan en magenta y verde, respectivamente; mientras que el N-terminal (M1) y el C-terminal (E322) se muestran en cian. (b) Tríada catalítica de *BaEstB*. S163, D252, y H285 se representan en verde. (c) y (d) Residuos ubicados en el centro del bolsillo de unión de sustrato. (c) Y81 y E225 se representan en verde en *BaEstB*, y (d) W92 y F222 se representan en rojo en PDB 4WY8 de *RmEstB*.

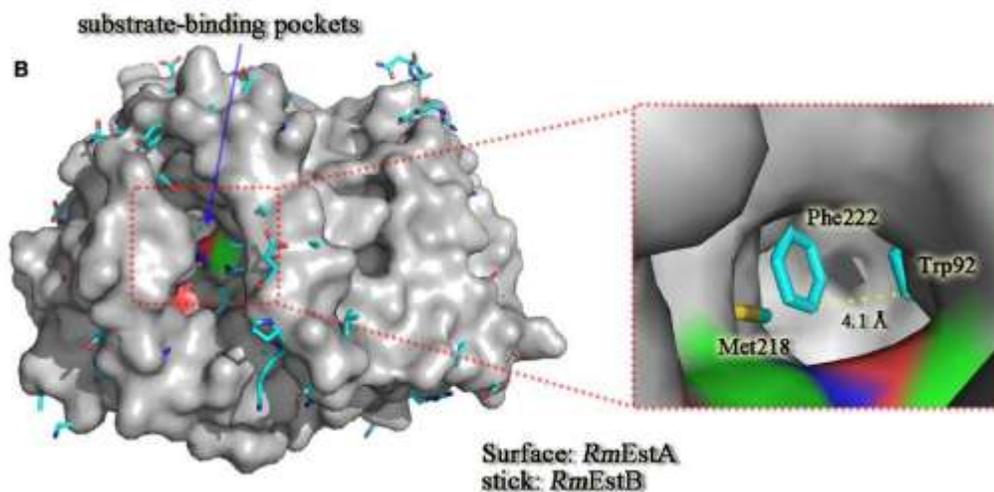


Figura 8. Modelo tridimensional de la *RmEstA*. Se muestran los aminoácidos de la tríada catalítica de *RmEstA*, los átomos de oxígeno están en rojo, los átomos de nitrógeno en azul y los átomos de carbono en verde. El canal de unión al sustrato de *RmEstB* está cerrado por los residuos aromáticos Trp92 y Phe222

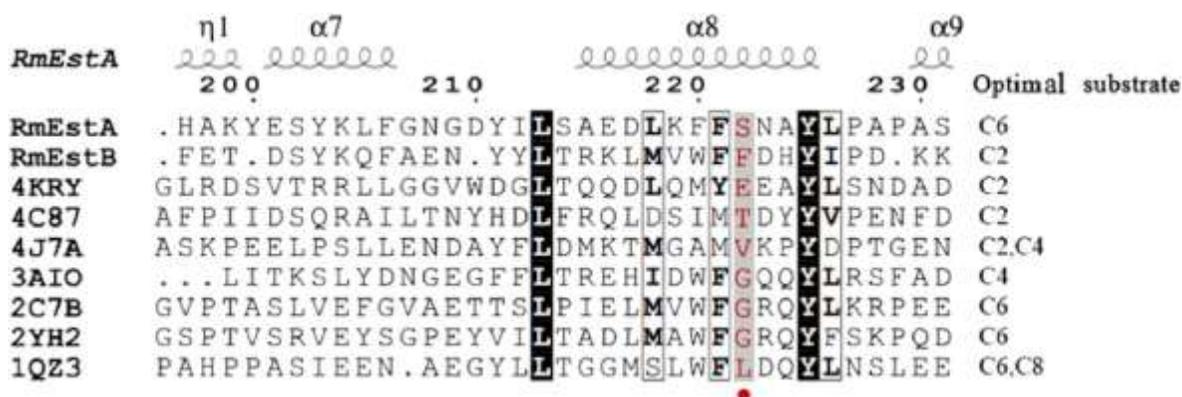


Figura 9. Alineamiento parcial de secuencias de aminoácidos de esterasas seleccionadas. Etiquetado con códigos PDB: 4KRY, una acetil esterasa de *E. coli*; 4C87, una esterasa de *L. plantarum*; 4J7A, una esterasa obtenida de una librería metagenómica; 3AIO, esterasa de *S. tokodaii*; 2C7B, una esterasa obtenida de una librería metagenómica; 2YH2, una esterasa de *P. calidifontis*; y 1QZ3, una esterasa de *A. acidocaldarius*. El residuo clave Phe222 de RmEstB está marcado con un punto rojo en la alineación de la secuencia de aminoácidos. Se enumeran los sustratos óptimos de estas esterasas, tomados de estudios anteriores.

Tabla 3. Contenido de ergosterol libre y esterificado en las diferentes partes de hongos agárlicos

Sample	Tissue	Free ergosterol (mg/g dm)	Ergosteryl esters ^a (mg/g dm)	Total ergosterol (mg/g dm)	Esterified ergosterol (%)
<i>A. aegerita</i>	Pileus	3.51±0.06	0.43±0.02	3.94	10.9
	Gills	1.44±0.04	1.98±0.05	3.42	57.9
	Stipe	2.40±0.05	0.07±0.01	2.47	2.8
<i>T. albuminosus</i>	Pileus	2.15±0.04	0.37±0.02	2.52	14.7
	Gills	1.70±0.03	1.00±0.04	2.70	37.0
	Stipe	4.02±0.08	0.61±0.03	4.63	13.2
<i>L. edodes</i>	Pileus	1.11±0.03	0.17±0.01	1.28	13.3
	Gills	3.69±0.07	0.34±0.02	4.03	8.4
	Stipe	1.25±0.03	0.13±0.01	1.38	9.4

3 JUSTIFICACIÓN

Comprender la acción de las esterasas tiene implicaciones biotecnológicas, por ejemplo en la bioremediación, degradación de insecticidas y ácidos húmicos, o bien en procesos industriales como la producción de fármacos, detergentes, papel, cosméticos, perfumes, biodiesel así como la producción de ésteres aromáticos en la industria alimentaria.

Aunque se han caracterizado una gran variedad de enzimas lipolíticas de levaduras como *Candida antarctica* y *C. rugosa* y de hongos filamentosos como *Aspergillus niger*, solo dos HSL esterasas de *Rhizomucor miehei* han sido cristalizadas y caracterizadas bioquímicamente, mientras que en mamíferos han sido ampliamente estudiadas. Estas muestran actividad sobre sustrato con distintos largos de cadena como los *p*-nitrofeniles, sin embargo, no se ha explorado cuáles podrían ser los sustratos naturales de estas enzimas en hongos, ni de su importancia celular. De manera interesante, la esterasa HSL de *Bjerkandera adusta* BaEstB mostró preferencia sobre sustratos de cadena corta con un extremo voluminoso como el 2-Naftil-acetato. No obstante aún se requiere una caracterización más profunda de la enzima. Por otro lado, se sabe que en hongos hay una acumulación de ergosterol esterificado en distintas partes del cuerpo fructífero de hongos basidiomicetos, sin embargo, aún se desconoce quién es la enzima responsable de su desesterificación. Por lo tanto, es posible que las HSL de *B. adusta* estén desesterificando el ergosterol esterificado.

4 HIPÓTESIS

La HSL *BaEstB* de *Bjerkandera adusta* desesterificará esteroides acilados

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general:

Analizar la actividad esterasa de *BaEstB* frente a sustratos acilados

5.2 Objetivos específicos:

Analizar las relaciones filogenéticas de *BaEstB* con respecto a otras HSL de diferentes organismos y obtener las estructuras 3D de los homólogos más cercanos

Analizar la interacción enzima-sustrato y especificidad de *BaEstB* para diferentes sustratos por medio de *Docking* (Ergosteril acetato, colesteril acetato y diferentes *p*-nitrofenoles)

Generar mutantes *in silico* de *BaEstB* de los aminoácidos del sitio de unión al sustrato y analizar los efectos por medio de *docking*

Expresar y purificar la enzima por medio de cromatografía de afinidad de níquel

Determinar la desesterificación por *BaEstB* de sustratos acilados por medio de HPLC

6 METODOLOGÍA

6.1 Construcción de árboles filogenéticos y estructuras 3D

Con el fin de determinar las relaciones filogenéticas de *BaEstB*, y la generación de estructuras 3D, se planteó la siguiente estrategia computacional (Figura 10). Partimos de la búsqueda de secuencias de la familia HSL en el genoma de diferentes hongos basidiomicetos, primeramente de *B. adusta*, esto con el fin de averiguar si en su genoma, se encuentran secuencias homologas de HSL. Posteriormente se realizó la búsqueda de secuencias ortólogas de HSL de algunos hongos ascomicetos, particularmente de *Aspergillus nidulans* y *Trichoderma reesei*, los cuales poseen características de manipulación genética mucho menos compleja en comparación con *B. adusta*. Además, *Aspergillus nidulans* y *Trichoderma reesei* son hongos de interés biotecnológico para nuestro laboratorio. También se buscaron HSL de otros basidiomicetos como *Panoporus cinnabarinus* y *Panoporus coccineus*. (<https://genome.jgi.doe.gov/mycocosm/home>) de mamíferos y de bacterias en la base de datos del NCBI.

Posteriormente se hizo un alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos en Clustal Omega y seleccionamos las secuencias más parecidas a *BaEstB* a partir de una matriz de porcentaje de identidad. Se generó el modelo estructural de la secuencia de *BaEstB* en el servidor I-TASSER por sus siglas en inglés: Iterative Threading ASSEmblly Refinement, este servidor utiliza un enfoque de subprocesos y múltiples programas, en el que cada programa puede generar decenas de miles de alineamientos de plantados, de modo que sólo utiliza los plantados de mayor importancia, lo cual se mide con el parámetro Z-score. Después de la simulación de ensamblaje de estructuras, I-TASSER usa el programa de alineación estructural TM-align para hacer coincidir el primer modelo de I-TASSER con todas las estructuras de la base de datos PDB.

Los PDB plantados que el programa utilizó para generar el modelo se incluyeron en la lista de secuencias. Para confirmar que todas las secuencias pertenecieran a

la familia de HSL, estas se cargaron en la base de datos ESTHER (<http://bioweb.ensam.inra.fr/esther>) y se utilizó la herramienta de Modelos Ocultos de Markov. Esta herramienta consiste en una colección de programas diseñados para detectar homólogos lejanos con la mayor sensibilidad posible. Posteriormente se realizó un segundo alineamiento múltiple de las secuencias en Clustal Omega. Se utilizó el programa Smart Model Selection Tool (<http://www.atgc-montpellier.fr/sms/>) para obtener el modelo de sustitución de aminoácidos más adecuado para nuestras secuencias. La edición de secuencias y construcción de árboles filogenéticos se realizó con el programa SeaView versión 4. Posteriormente, de acuerdo al árbol filogenético obtenido se seleccionaron algunas secuencias para modelar en el I-TASSER.

Finalmente se llevó a cabo la superposición estructural por homología de *BaEstB* con diferentes HSL y se calculó el porcentaje de identidad utilizando el software UCSF Chimera 1.13.

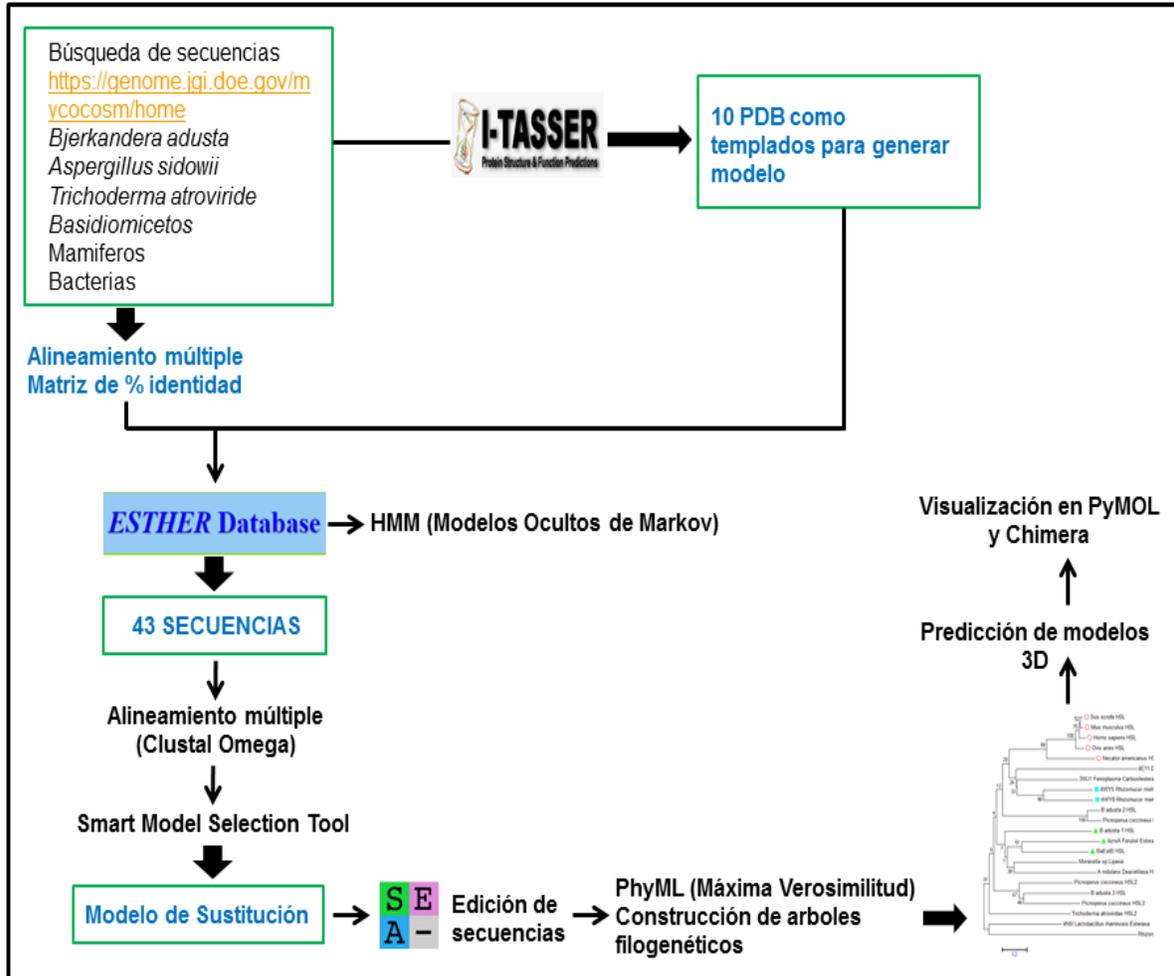


Figura 10. Estrategia computacional para la construcción de árboles filogenéticos y estructuras 3D.

6.2 Acoplamiento molecular (Molecular Docking)

6.2.1 Preparación del sistema para el acoplamiento molecular

Con el fin de evaluar la preferencia de *BaEstB* sobre diferentes sustratos tipo éster, entre ellos el 2-naftil acetato, 1-naftil acetato, 1-naftil butirato, ergosteril acetato, colesteril acetato, 5-O-(*trans*-feruloil)-arabinofuranosa (FAra) y diferentes *p*-nitrofenil ésteres sustituidos (acetato, butirato y decanoato), se planteó la siguiente estrategia de trabajo *in silico* (Figura 11).

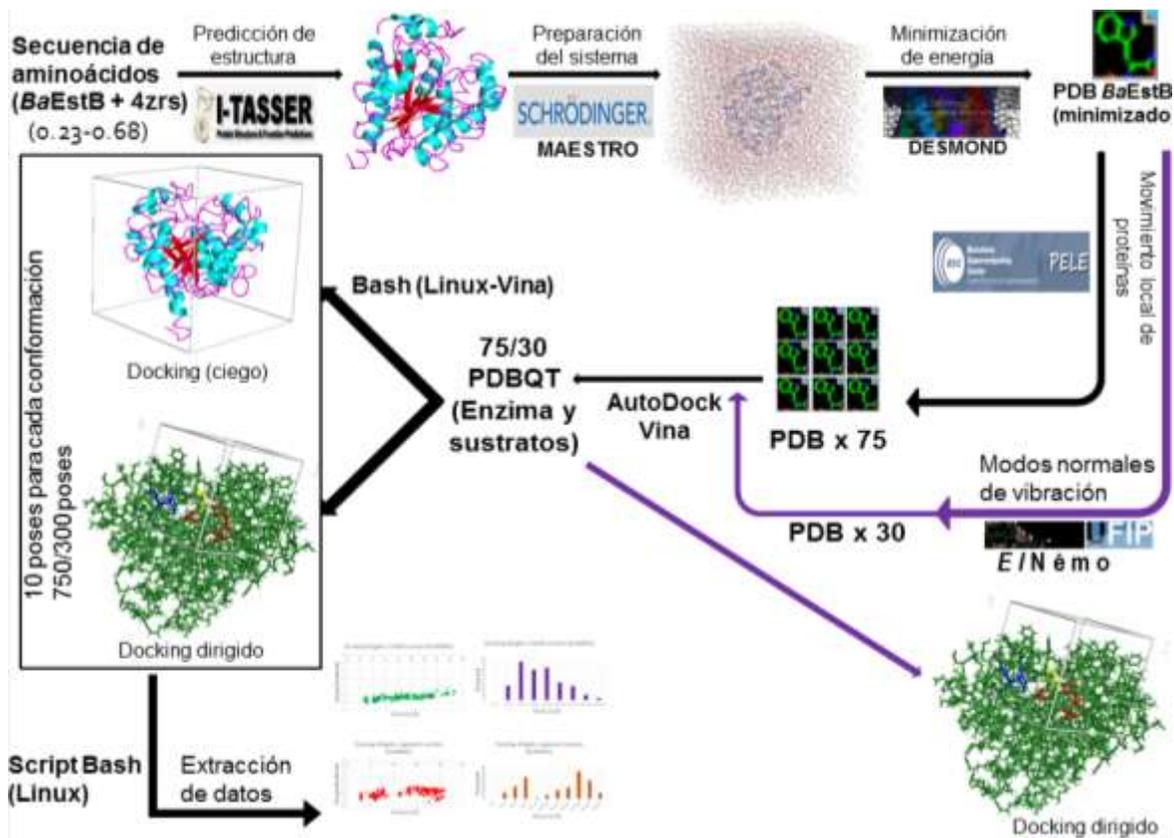


Figura 11. Estrategia computacional para el análisis de la interacción de *BaEstB* con diferentes ésteres.

A partir de la secuencia de aminoácidos (Anexo secuencias) de *BaEstB* se obtuvo el modelo de la estructura tridimensional generado en I-TASSER utilizando como templado el modelo de una feruloil esterasa (PDB: 4ZRS) el ortólogo más cercano de *BaEstB*. Posteriormente, en el programa de Schrödinger Maestro 9.8 (versión 2014-2) se preparó el sistema para realizar una minimización, con lo cual se asignaron las siguientes características al modelo: órdenes de enlace, protonación de aminoácidos a pH 7.0; de acuerdo con los pKa predichos por PropKa: todos los ácidos glutámicos y aspárticos desprotonados, la His285 se protonó en el nitrógeno épsilon y el resto de las His en el nitrógeno delta. Con el programa DESMOND (<https://www.schrodinger.com/desmond>) se generó una caja cúbica de agua (modelo SPC) de 10 Å por lado desde la superficie de la proteína. El sistema se neutralizó con 7 iones Na⁺. El sistema preparado consistió en 38,960 átomos.

La minimización de la energía se realizó con el programa DESMOND (v38017) por el método de *Steepest Descent* con un criterio de convergencia de 0.1 kcal/mol/Å. Las interacciones coulómbicas se calcularon con un radio de corte de 12 Å.

Posteriormente, se realizó una búsqueda conformacional del modelo de la enzima BaEstB minimizada por el método Monte Carlo utilizando el servidor de Protein Energy Landscape Exploration (<https://pele.bsc.es/pele.wt>) (PELE, por sus siglas en inglés) mediante la opción de movimiento local de proteínas. Los modelos obtenidos se convirtieron en formato PDBQT con la herramienta `prepare_receptor4.py` de AutoDockTools (<http://autodock.scripps.edu/resources/adt>).

Se probó una segunda estrategia para la búsqueda conformacional de la enzima. Se obtuvieron los modos normales de vibración con el servidor Elastic Network Model (<http://www.sciences.univ-nantes.fr/elnemo/>) (EINemo). Se obtuvieron los primeros 5 modos normales no triviales de menor frecuencia utilizando los siguientes parámetros: DQMIN: -100 yo -50; DQMAX: 100 yo 50; y DQSTEP: 20. Los modelos obtenidos se convirtieron en formato PDBQT con la herramienta `prepare_receptor4.py` de AutoDockTools.

Los modelos de la estructura tridimensional de los sustratos 2-naftil acetato, 1-naftil acetato, 1-naftil butirato, ergosteril acetato, colesteril acetato, 5-O-(*trans*-feruloil)-arabinofuranosa (FAra) *p*-nitrofenil acetato, *p*-nitrofenil butirato y *p*-nitrofenil decanoato se construyeron con la herramienta *Build Fragments* del paquete Schrödinger Maestro y se minimizaron con el programa DESMOND por el método de “*Steepest Descent*” con un criterio de convergencia de 0.1 kcal/mol/Å. Las interacciones coulómbicas se calcularon con un radio de corte de 12 Å.

Las estructuras minimizadas se guardaron en formato PDB y se transformaron en formato PDBQT con la herramienta `prepare_receptor4.py` de AutoDockTools.

6.2.2 Acoplamiento molecular

Se realizó un primer docking “ciego”, es decir, buscando en toda la proteína las posibles interacciones proteína-ligando (dimensiones de la caja de búsqueda: 29 x 29 x 29 Å). Primeramente, se utilizaron sólo los sustratos 2-naftil acetato y ergosteril acetato. Posteriormente, se realizó un docking dirigido; esta vez se definieron los límites de búsqueda trazando una caja (dimensiones: 22.5 x 29.62 x 26.25 Å, centrado en las coordenadas 10.0, -17.0, 5.0) en la que se consideraron todos los residuos de aminoácido de la enzima que participan en la catálisis: triada catalítica (Ser163, His285, Asp252), residuos de aminoácidos de unión con el sustrato (Tyr81 y Leu211) y cavidad oxianiónica (Gly78 y Gly79). (Li *et al.*, 2014). Se calcularon 10 poses de interacción proteína-sustrato para cada conformación de la proteína y se hizo la extracción de los datos de energía de interacción y de distancia entre el carbonilo del enlace éster del sustrato y el átomo de oxígeno del grupo hidroxilo de la cadena lateral de la Ser163 con el *script datoscoord.sh* (ver anexo). Se construyó una distribución de frecuencias de poses y una dispersión de datos de distancia-energía en la aplicación de Microsoft Excel y se generó una plantilla de cálculo llamada **calculo_distancias_docking.xls**.

6.3 Diseño de las mutaciones puntuales in silico

La elección de las mutaciones puntuales se hizo con base en los siguientes criterios: primero, se identificaron todos los residuos de aminoácidos que estuvieran interaccionando con los diferentes sustratos en una esfera de 6 Å de radio alrededor del sustrato en las poses con la mejor energía de afinidad. El segundo criterio fue la revisión bibliográfica de trabajos en los que se hubieran caracterizado HSL de diferentes microorganismos (De Simone *et al.*, 2004; Ngo *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2015). Utilizando los mismos sustratos con los que se caracterizó previamente a BaEstB, particularmente *p*-nitrofeniles sustituidos con ésteres de cadenas alifáticas de tamaño C2 a C16. Además, se buscó que estuvieran reportadas mutaciones puntuales comprobadas experimentalmente de

los aminoácidos implicados con la unión al sustrato y que coincidieran con nuestra lista. Las mutaciones (Y81W, Y81F, Y81S, L211A, L211F, L211S y L211W) se generaron *in silico* en el programa Schrödinger Maestro y se minimizó la estructura con el programa DESMOND mediante el método de Steepest Descent. Posteriormente, se realizó el acoplamiento molecular dirigido con los sustratos *p*-nitrofenil acetato, *p*-nitrofenil butirato, *p*-nitrofenil decanoato, 1-naftil acetato, 1-naftil butirato y ergosteril acetato.

6.4 Expresión de *BaEstB* en *Pichia pastoris* X-33

La construcción pPICZ α A/*BaEstB* (Sánchez-Carbente *et al.*, 2017) (Anexo 1) se transformó en *E. coli* DH5 α . Para verificar que el plásmido es el correcto, se verificó la inserción de *BaEstB* en pPICZ α A por un análisis de restricción, posteriormente la construcción se linearizó con la enzima de restricción ScaI para ser transformada en células de *P. pastoris* X-33 mediante electroporación. Estas, se sembraron placas con medio levadura-peptona-dextrosa (YPD) y zeocina a una concentración de 100 μ g/ml. Se utilizó como control negativo a *P. pastoris* X-33 transformada con el vector vacío pPICZ α A.

La integración del gen de *BaEstB* en el genoma de *P. pastoris* X-33 se confirmó mediante análisis de PCR en colonia utilizando los oligonucleótidos de AOX 5' y 3' del kit de expresión Easy Select *Pichia* (Life Technologies Invitrogen). Para inducir la expresión de *BaEstB*, las colonias positivas se resembraron en placas de medio mínimo dextrosa (MD) y metanol mínimo (MM) (Anexo 3) por separado a 28°C por 48 horas y se seleccionarán los fenotipos Mut⁺ y Mut^s. Se seleccionaron 5 colonias fenotipo Mut⁺, *P. pastoris* X-33 silvestre y *P. pastoris* X-33 transformadas con el vector vacío, estas se inocularon en 15 ml de medio complejo suplementado con glicerol (BMGY) (Anexo 3) en matraces de 50 ml a 28°C en agitación (200-250 rpm) hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 2-6 (16 a 18 horas). Las células se centrifugaron a 1500 g por 5 minutos y se resuspendieron nuevamente en 50 ml de medio complejo suplementado con medio metanol (BMMY) (Anexo 3) en matraces de 250 ml a 28°C, 200-250 rpm. Se indujo la expresión de *BaEstB*

añadiendo metanol a una concentración final de 0,5% a intervalos de 24 horas durante 5 días.

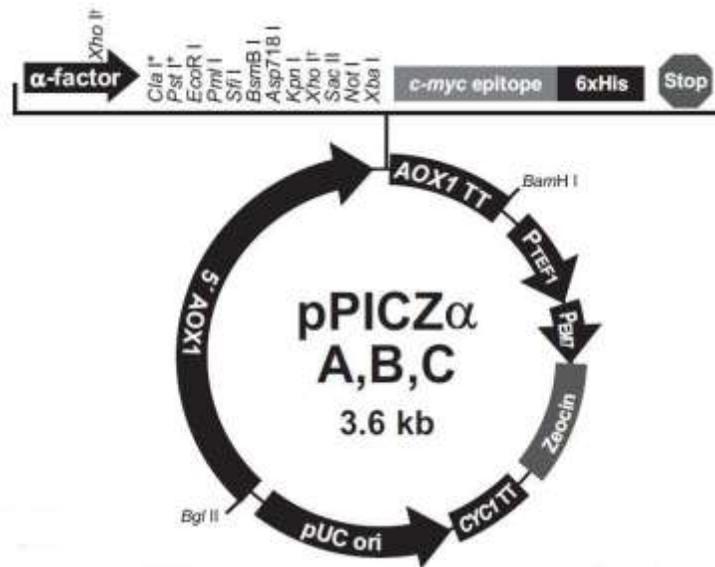


Figura 12. Características del vector de expresión pPICZ α A. Contiene un marcador de resistencia a zeocina, el sitio de clonación múltiple dentro del cual se encuentra el péptido señal factor α y el epítopo c-mic, 6xHis y el promotor AOX1.

6.5 Purificación de BaEstB

La purificación se realizó a partir de un sobrenadante de cultivo de 96 horas por medio de cromatografía de afinidad de níquel. Se partió de un cultivo de 50 mL y se recolectó el sobrenadante por centrifugación a 1500 x g durante 15 minutos en tubos de ultrafiltración de 15 mL Amicon Ultra de 10 kDa MILLIPORE con una membrana de celulosa donde se concentró el extracto enzimático desde 20ml hasta 1-1.5 mL. El extracto se llevó hasta un volumen de 15 mL con Buffer Tris-HCl (10 mM, pH 7, 0.2% Tritón) y se aplicó en una columna de afinidad a histidinas HisTrap Chelating HP, GE Healthcare de 1mL previamente equilibrada con 15 ml de sulfato de níquel 0.2 M, se recirculó durante 1 hora utilizando una bomba peristáltica y posteriormente se eluyó la proteína con buffer Tris-HCl (10 mM, pH 7.5, 0.3 M Imidazol). Finalmente se eliminó el imidazol utilizando un

amicon de corte de 5 kDa por centrifugación a 5500 rpm hasta obtener aproximadamente 0.75 - 0.5 mL y se almacenó a 4°C.

6.6 SDS-PAGE

Para verificar la purificación de la enzima, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) de acuerdo al método de Laemmli (1970) utilizando los extractos crudos de diferentes etapas de purificación. El gel se tiñó con azul de Coomassie brillante R-250 para la detección de las proteínas. La banda correspondiente a la enzima purificada es de un peso molecular de 38.3 kDa aproximadamente.

6.7 Zimograma

Para detectar la actividad esterasa de *BaEstB* se realizarán zimogramas con gel de poliacrilamida al 12% (PAGE). La tinción de la actividad esterasa se realizó como describen Karpushova, y colaboradores (2005). Los geles se incubaron durante 5 minutos a 25°C en una solución de revelado con 3 mmol/L de 2- Naftilo acetato, 1mmol/L de Fast Garnet TR (Sigma) y 100 mmol/L buffer fosfato de sodio (pH 7.5). La actividad se observa cuando aparecen bandas de color naranja.

6.8 Actividad esterasa y determinación de la especificidad de sustratos sintéticos

Los sustratos que se utilizan para la determinación de actividad esterasa son el 1 y 2-naftil acetato, para lo cual se prepararon las siguientes soluciones:

Solución 1: 2-naftil acetato (54 mmol / L) en acetona.

Solución 2: para la preparación de sustrato: se disuelven 10 mg de sal de sulfato GBC de Garnet en 100 µl de tampón de fosfato de potasio 50 mmol /L (pH 7) y Triton X-100 al 0,1%.

Se preparó una mezcla de 10: 0.01: 0.05 (v / v / v) Tampón fosfato de potasio (pH 7.01) 0.1% Triton X-100 / Solución 2 / Solución 1.

Se agregan 100 µl de esterasa pura diluida (1/100) a la solución de sustrato (200 µl) más 100 µl de tampón Tris-HCl 10 mmol/L pH 7.0. El 1-naftil acetato se preparó de la misma manera.

En la reacción, el enlace éster del 1 y 2-naftil acetato se hidroliza para producir acetato y naftol. El 1 y 2-naftol liberado se cuantificó midiendo la absorbancia a 538 nm durante 30 y 40 minutos en un espectrofotómetro para microplacas EPOCH™ BioTek. Para la determinación de la actividad volumétrica (AV) de BaEstB se utilizó la siguiente ecuación:

Ec 1:

$$AV = \frac{(m * Vt)}{(\epsilon * b * Ve)}$$

En donde:

m = pendiente (Δ Abs/min)

Vt = Volumen total de la reacción

ϵ = Coeficiente de extinción molar del 1 y 2-naftil acetato = 23.593 L mmol⁻¹ cm⁻¹

b = Longitud de la celda = 1 cm

Ve = Volumen de la enzima

Una unidad de actividad esterasa se define como la cantidad de enzima que libera 1 µmol de 2-naftol por minuto. A partir de la actividad volumétrica y la determinación de la concentración de proteína por el método de Bradford se determinó la actividad específica (AE, expresada en U/mg de proteína), utilizando la siguiente ecuación:

Ec 2:

$$AE = \frac{AV}{[proteína]}$$

Para determinar la especificidad de *BaEstB* para la longitud de cadena de acilo se analizará utilizando los siguientes sustratos: *p*-nitrofenil acetato (C2), *p*-nitrofenil butirato (C4), *p*-nitrofenil decanoato (C10) y *p*-nitrofenil palmitato (C16) como se describe anteriormente. Una unidad de actividad esterasa se define como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de *p*-nitrofenol (pNP) por minuto.

6.9 Cuantificación de proteína por el método de Bradford

En una placa de 96 pozos se aplica en cada pocillo 150 μ L de reactivo de Bradford (Bradford: H₂O, 1:4, v/v). Se utilizó como blanco 100 μ L de agua y 200 μ L de Bradford.

6.10 Curva de calibración

A partir de una solución de referencia de albúmina de suero bovino (BSA, 0.1 mg/mL) se preparó una curva de calibración de 0 a 1.6 μ g/mL. Se realizaron diluciones seriadas 1:2 en una placa de 96 pocillos, por triplicado y se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro para microplacas EPOCH™ BioTek.

6.11 Actividad esterasa utilizando esteroides esterificados

Con el objetivo de verificar si la *BaEstB* presentaba la capacidad de desesterificar al ergosterol acetilado (sintetizado en el CEIB por el Dr. A. Cardoso Taketa) y al colesterol palmitato (compañía Sigma-Aldrich), se diseñó la siguiente estrategia experimental:

Se estableció el sistema de extracción de los sustratos para el ensayo de actividad esterasa, se probaron las siguientes mezclas de solventes: 1. Metanol, cloroformo, hexano (10:9:7, v/v/v) y 2. Hexano. Ambos sustratos se resuspendieron a una concentración de 0.5 mg/mL en metanol y se analizaron por HPLC.

Para el ensayo de la actividad esterasa con el ergosterol acetilado se realizó como describe Eichmann y colaboradores en 2016 con algunas modificaciones. Para la preparación del sustrato, se disolvió a una concentración de 0.5 mg/mL en buffer Tris HCl 10 mM + Triton-X 100 1% pH 7.0, seguido de sonicación durante 15 min. La incubación de la enzima con el sustrato se realizó a 28°C durante 1 hora en agitación. Después de la incubación, se agregó hexano a la mezcla (hexano/mezcla, 1:1, v/v) y se resuspendió vigorosamente con ayuda del vortex. La separación de fases se aceleró mediante centrifugación a 5000 X g a 4°C durante 10 minutos. La fase orgánica superior se recogió y se dejó secar en una campana de flujo laminar durante 24 horas. Se realizó una segunda extracción con hexano bajo las mismas condiciones. Se siguió el mismo protocolo para el control sin la enzima. Las muestras se resuspendieron en metanol a una concentración final de 0.5 mg/mL y se analizaron por HPLC.

Finalmente, para la cuantificación de ambos sustratos se realizaron curvas de calibración utilizando concentraciones de 0.25, 0.1, 0.05 y 0.005 mg/mL por triplicado.

6.12 HPLC

Los sustratos ergosterol acetilado y ergosterol libre se analizaron por medio de HPLC. Se utilizó un equipo HPLC Ultimate 3000 RS Diode Array Detector. La fase estacionaria consistió en una columna C18 de 150 mm de diámetro y 4.6 mm de tamaño de poro. La fase móvil consistió en una solución (Acetonitrilo/metanol, 85:15, v/v). Ambos sustratos se disolvieron a una concentración de 0.5 mg/mL en metanol.

6.13 Mutaciones puntuales “PCR-All around”

De acuerdo a los resultados obtenidos por Docking se llevará a cabo la mutagénesis sitio dirigida “PCR-All around” utilizando el kit comercial QuikChange Lightning Multi Site-Directed (Agilent Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se diseñarán oligonucleótidos (5' y 3') para cambiar los aminoácidos implicados en el sitio de unión al sustrato de la *BaEstB* (E225 y Y81).

Se utilizará como DNA templado para PCR el plásmido pPICZ α A/*BaEstB* el cual se encuentra metilado, posteriormente se realizará la digestión del DNA parental (pPICZ α A/*BaEstB*) con la enzima de restricción Dnpl que es dependiente de DNA metilado y el DNA producido en la reacción de PCR se transforma en una cepa de *E. coli* que no digiere DNA sin metilar (revisar las indicaciones del fabricante) Se seleccionarán las colonias por PCR y posteriormente se extraerá el DNA plasmídico con el kit (ThermoScientific) y se secuenciará en la Unidad de Secuenciación del IBT-UNAM. Una vez confirmada la presencia de las mutaciones deseadas, se transformará por electroporación en células de *E. coli* DH5 α para posteriormente transformar e inducir la expresión de las mutantes de la *BaEstB* en células de *P. pastoris* X-33.

Se purificarán las proteínas mutantes, se evaluará la actividad esterasa y se determinará la especificidad de sustratos sintéticos con 2-Naftilo Acetato, *p*-NP Acetato, *p*-NP Butirato, *p*-NP Decanoato y *p*-NP Palmitato como se describió anteriormente para ver si existe una modificación en la preferencia de sustratos con cadenas de carbono de mayor o menor tamaño en las mutantes con respecto a la *BaEstB*.

7 RESULTADOS

7.1 Análisis filogenético

Se realizó un análisis filogenético con las secuencias de algunas HSL de hongos basidiomicetos como *B. adusta*, *Picnoporus cinnabarinus*, *Picnoporus coccineus* y de los hongos ascomicetos *A. nidulans*, *A. sydowii* y *T. atroviride*, así como de algunas HSL caracterizadas de bacterias y de mamíferos. La figura 13 muestra el árbol filogenético construido con el algoritmo de agrupación de máxima verosimilitud, se observa la formación de grupos coherentes, primeramente, todas las secuencias pertenecen a la familia IV de las HSL, se distinguen dos grandes grupos parafiléticos que contienen la secuencia consenso GTSAG y GDSAG, a su vez, dentro de estos encontramos varios grupos monofiléticos de mamíferos, bacterias y hongos. Es importante señalar que las secuencias de las HSL de mamíferos no se encuentran completamente separadas de las HSL de bacterias y hongos a pesar de estar tan separadas evolutivamente.

De acuerdo con los diferentes análisis filogenéticos (Anexo 5), podemos sugerir que la feruloil esterasa 4zrsA es el ortólogo más cercano de *BaEstB* y se encuentra estrechamente relacionada con una HSL de *Trichoderma atroviride*.

El objetivo de este análisis era proponer al gen ortólogo de la *BaEstB* en un hongo que sea de fácil manipulación genética y biotecnológicamente relevante para poder posteriormente estudiar el rol de los ortólogos de la *BaEstB* en la fisiología de distintos hongos, además de seguir con su caracterización bioquímica por sus posibles aplicaciones biotecnológicas. De acuerdo a estos criterios podemos ver que el ortólogo de la *BaEstB* en *T. atroviride* es la HSL2 por lo cual podríamos realizar manipulaciones genéticas para deletar a estos genes y determinar su función en los hongos.

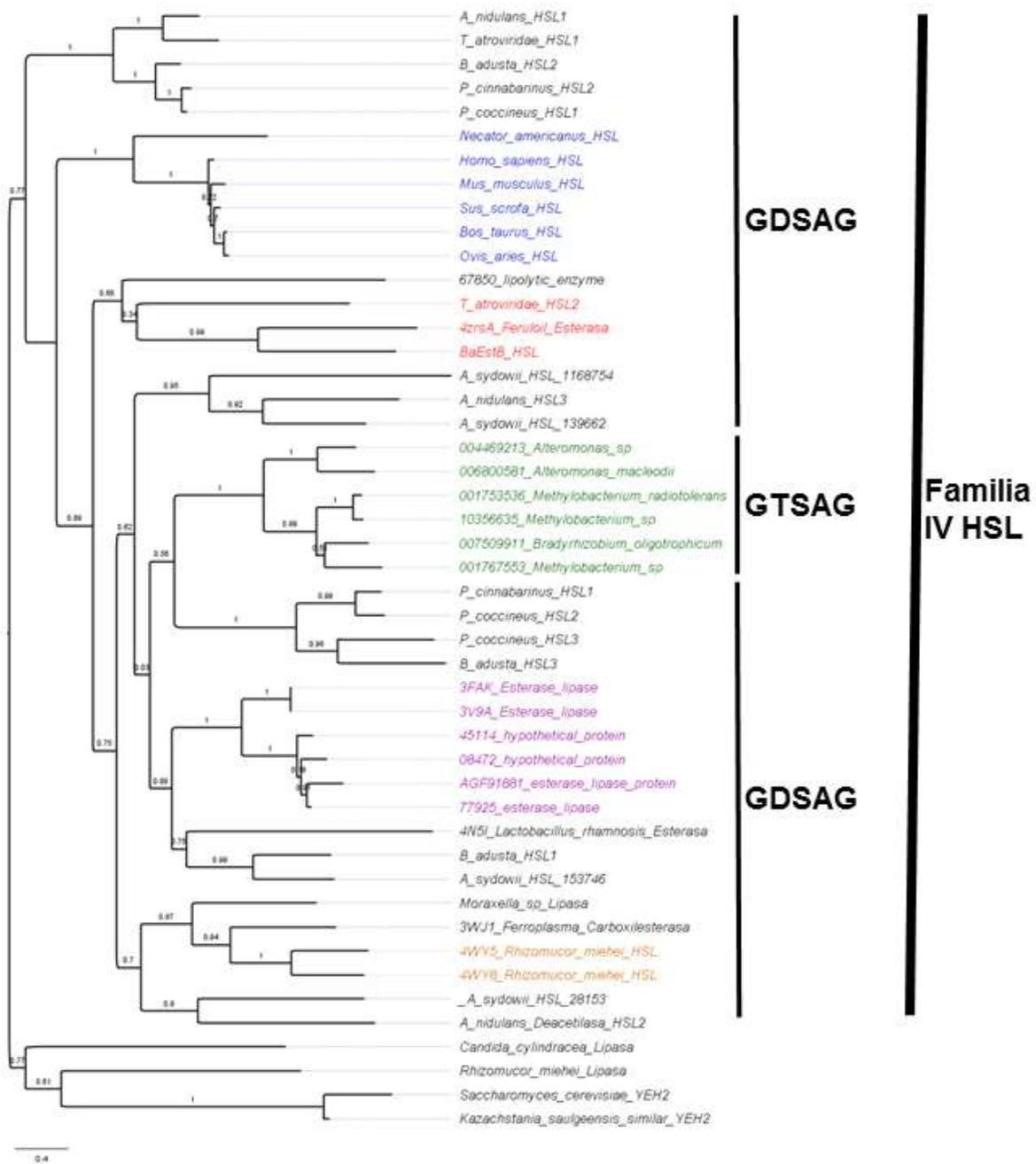


Figura 13. Árbol filogenético de 47 secuencias de aminoácidos. Algoritmo de agrupamiento máxima verosimilitud, bajo 1000 réplicas bootstrap. Con una matriz de reemplazamiento WAG. Se observa la formación de clados que presentan a las secuencias consenso GTSAG y GDSAG. El análisis indica la el ortólogo más cercano de *BaEstB* es la feruloil esterasa *4zrsA* y que estas se encuentran estrechamente relacionadas con una HSL de *Trichoderma atroviride*.

7.2 Modelaje tridimensional de BaEstB mediante I-TASSER

El modelo tridimensional de la *BaEstB* se obtuvo a partir del archivo PDB (Protein Data Bank) generado en el servidor I-TASSER, este arroja diferentes puntajes de confianza como el TM-score que mide la similitud entre dos estructuras de proteínas y va de 0.1 a 1, donde el 1 indica la coincidencia perfecta entre dos estructuras, puntajes por debajo de 0.17 corresponden a proteínas no relacionadas elegidas al azar, mientras que las estructuras con puntaje mayor a 0.5 indica un modelo de topología correcta. El C-score estima la calidad de los modelos predichos y se encuentra típicamente en el rango (-5 a 2) donde un puntaje de mayor valor significa un modelo con una alta confianza y viceversa. Finalmente, la raíz de la desviación cuadrática media (RMSD), es la medida promedio entre pares de átomos del esqueleto de las proteínas superpuestas.

Los puntajes de confianza para estimar la calidad del modelo fueron los siguientes:

C-score = 0.68, **TM-score** = 0.81 ± 0.09 y **RMSD** = 4.9 ± 3.2 Å.

La tabla 4 muestra los PDB hits que I-TASSER utilizó como plantados para generar el modelo.

Tabla 4. Lista de los PDB con los mejores puntajes para el modelado de *BaEstB*

PDB	% Cobertura	Z-score	Especie	Descripción
4zrsA	0.89	2.25	Metagenoma de suelo	Cristalografía de una feruloil esterasa (librería metagenómica de suelo)
4zrsA'	0.89	3.01	Metagenoma de suelo	Cristalografía de una feruloil esterasa (librería metagenómica de suelo)
4wy8	0.93	2.50	<i>Rhizomucor miehei</i>	Lipasa sensible a hormonas (HSL)
4zrs	0.89	0.83		Cristalografía de una feruloil esterasa
4n51	0.91	1.01	<i>Lactobacillus rhamnosis</i>	esterasa

4wy5	0.92	2.53	<i>Rhizomucor miehei</i>	Lipasa sensible a hormonas (HSL)
4n51'	0.79	1.26	<i>Lactobacillus rhamnosis</i>	esterasa
3WJ1	0.90	4.13	Ferroplasma	Cristalografía de una carboxilesterasa
4E11	0.89	2.08	<i>Drosophila melanogaster</i>	Cristalografía de una kinurenina formamidasa
4E11'	0.89	3.44	<i>Drosophila melanogaster</i>	Cristalografía de una kinurenina formamidasa

En esta sección aparecen las 10 proteínas con mayor similitud estructural, es decir, la puntuación más alta de TM según el modelo I-TASSER predicho (Tabla 5).

Tabla 5. Identificación de los 10 mejores análogos estructurales de *BaEstB*

PDB	TM-score	RMSD	% Identidad	Cobertura
4zrsA	0.836	1.93	0.233	0.894
4zrsA'	0.800	3.16	0.181	0.922
4wy8	0.799	2.83	0.192	0.904
4zrs	0.799	2.83	0.151	0.904
4n51	0.794	2.68	0.173	0.888
4wy5	0.783	3.01	0.170	0.894
4n51'	0.780	3.27	0.184	0.907
3WJ1	0.777	3.05	0.180	0.894
4E11	0.775	2.97	0.174	0.885
4E11'	0.771	3.09	0.207	0.894

Posteriormente, se utilizó el PDB generado por I-TASSER para el análisis de la estructura tridimensional y la obtención de imágenes mediante los programas

PyMOL Molecular Graphics System 2.1 y UCSF Chimera 1.13. La figura 14 muestra el modelo obtenido por Chimera de *BaEstB*, se observan los residuos amino y carboxilo terminal, así como el plegamiento α/β hidrolasa, típico de esterasas y lipasas, en este caso compuesto por 8 estructuras de tipo β plegadas rodeadas por 10 α Hélice. También se identificaron todos los elementos que participan en la catálisis enzimática, es decir, los residuos de aminoácidos de la triada catalítica: Ser163, His285 y Asp252, los implicados en la unión con el sustrato: Tir81, Leu211 y de la cavidad oxianiónica: Gli 78-79 la cual estabiliza el intermediario tetraédrico, tal y como se describe anteriormente en el mecanismo de acción (Figura 14).

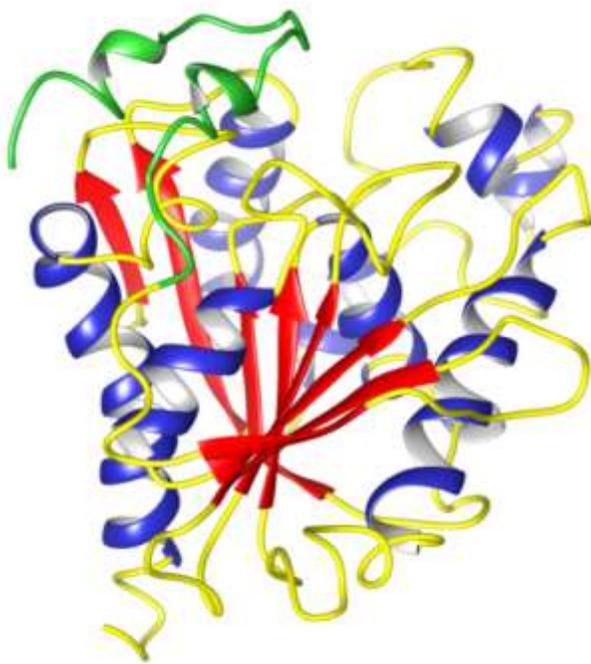


Figura 14. Estructura tridimensional de *BaEstB*. Se muestra los residuos amino terminal M1 y carboxilo terminal E322, al centro de la enzima en rojo se observan los dominios de láminas β rodeadas de hélices α en azul, en verde se muestran las dos α hélice conectadas por un *loop* que conforman al domino Cap.

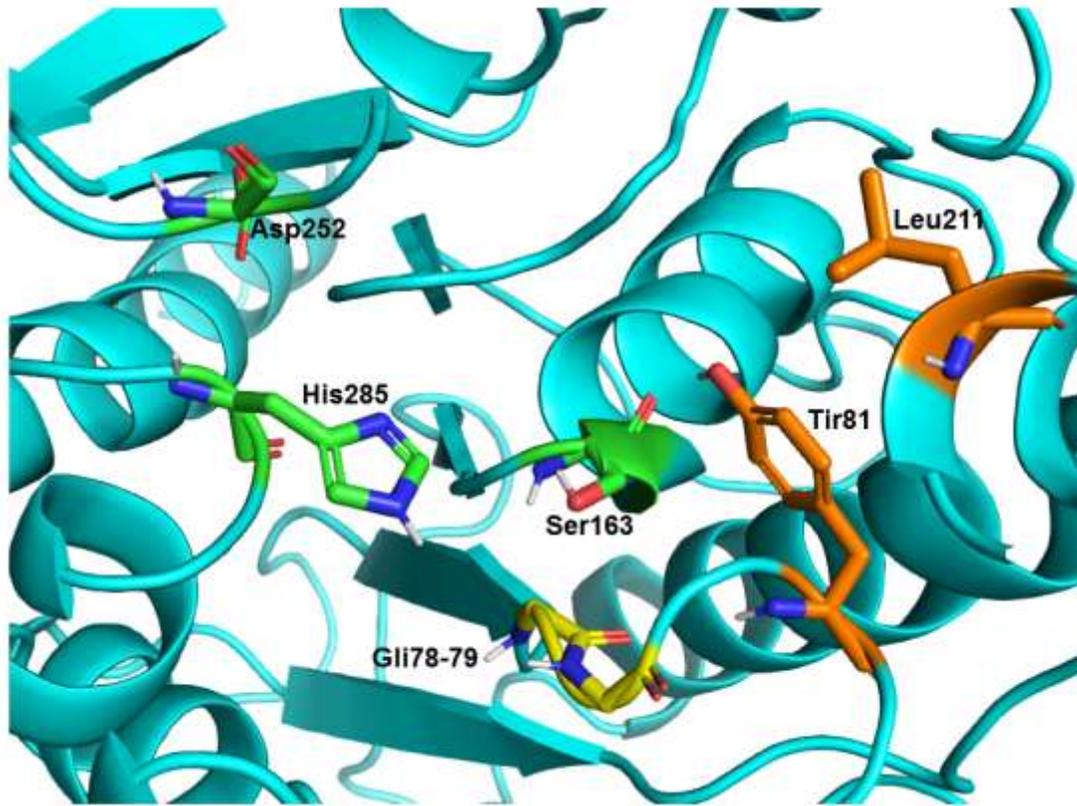


Figura 15. Modelo de “sticks” que muestra los elementos que participan en la catálisis enzimática de *BaEstB* en un acercamiento. En verde la triada catalítica SDH, en amarillo la cavidad oxianiónica y en naranja los aminoácidos implicados en la unión del sustrato.

7.3 Superposición estructural por homología de *BaEstB* con otras esterasas

De acuerdo a los resultados obtenidos por I-TASSER, dos de los 10 templados presentaron los mejores valores de Z-score: el PDB 4ZRSA y el 4WY8. Hasta el momento, el modelo generado con *BaEstB/4zrsA* es el que mayor porcentaje de identidad presenta (22.2%), seguido de un 13.4% de identidad presente entre *BaEstB/HSL Aspergillus sidowii*. El modelo generado con *BaEstB/RmEstB-PDB 4wy8* presentó un 12.7% de identidad (Figura 16). En general podemos observar modelos de empalmes estructurales con porcentajes de homología por debajo del 23%. Sin embargo, es evidente la conservación del plegamiento α/β hidrolasa, el cual como se describió anteriormente está compuesto por una hoja β central rodeada por un número variable de α -hélices y una triada catalítica compuesta por

Ser-His-Asp. Este se presentó en todos los empalmes estructurales, incluso con las estructuras de las HSL de *Mus musculus* y de *Necator americanus*, las cuales, en el estudio son las más alejadas filogenéticamente respecto a la *BaEstB*, dichas superposiciones estructurales presentaron porcentajes de identidad del 12.6 y 10.3% respectivamente, al modelarse con *BaEstB* (Figura 17).

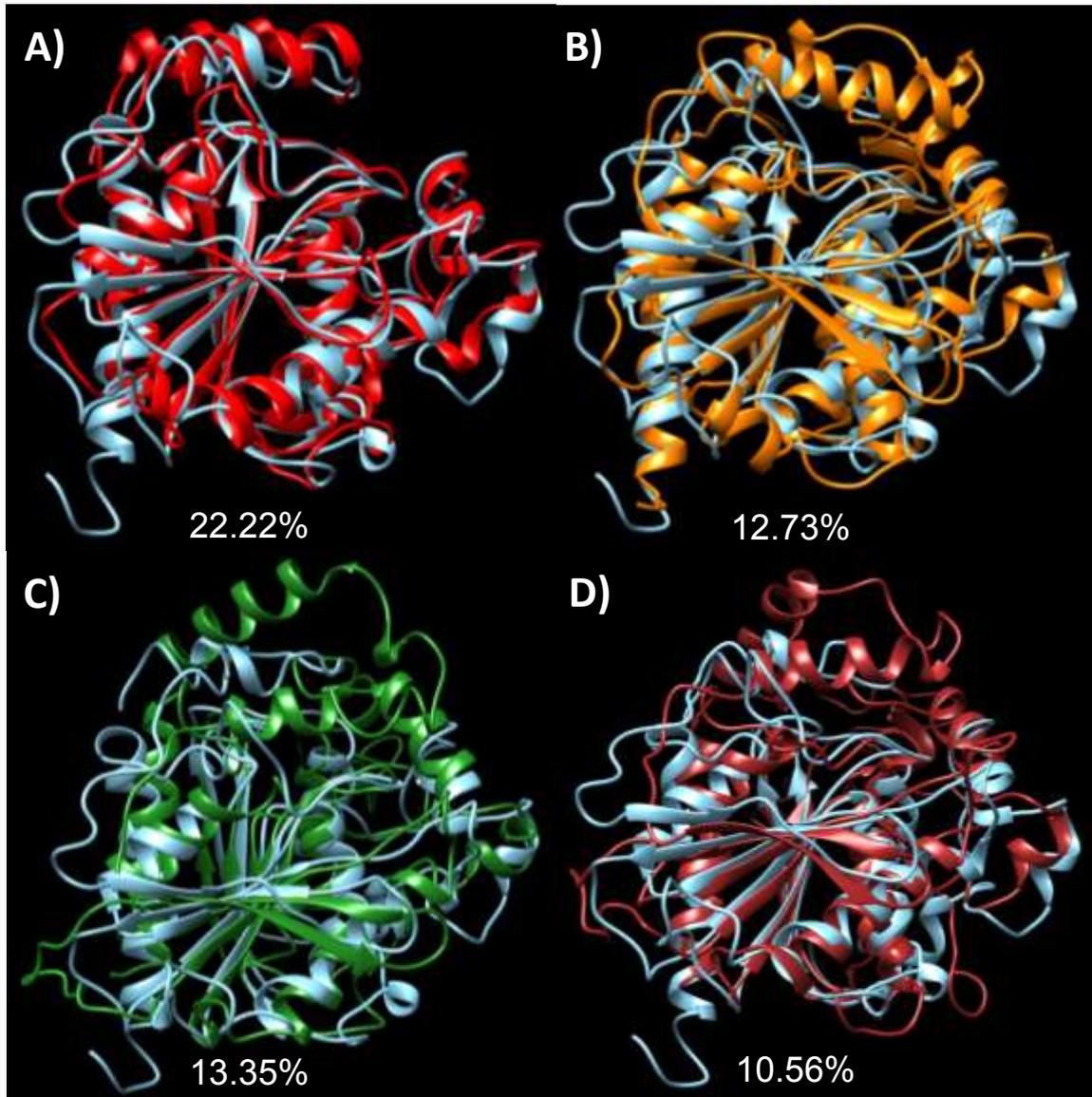


Figura 16. Superposición estructural de *BaEstB* con las HSL de distintos microorganismos. A) PDB 4ZRS (Feruloil esterasa de metagenoma de suelo. B) PDB 4WY8, *Rhizomucor miehei*. C) I-TASSER, *Aspergillus sidowii*. D) I-TASSER *B. adusta*. En la parte inferior de cada figura se muestra el porcentaje de identidad.

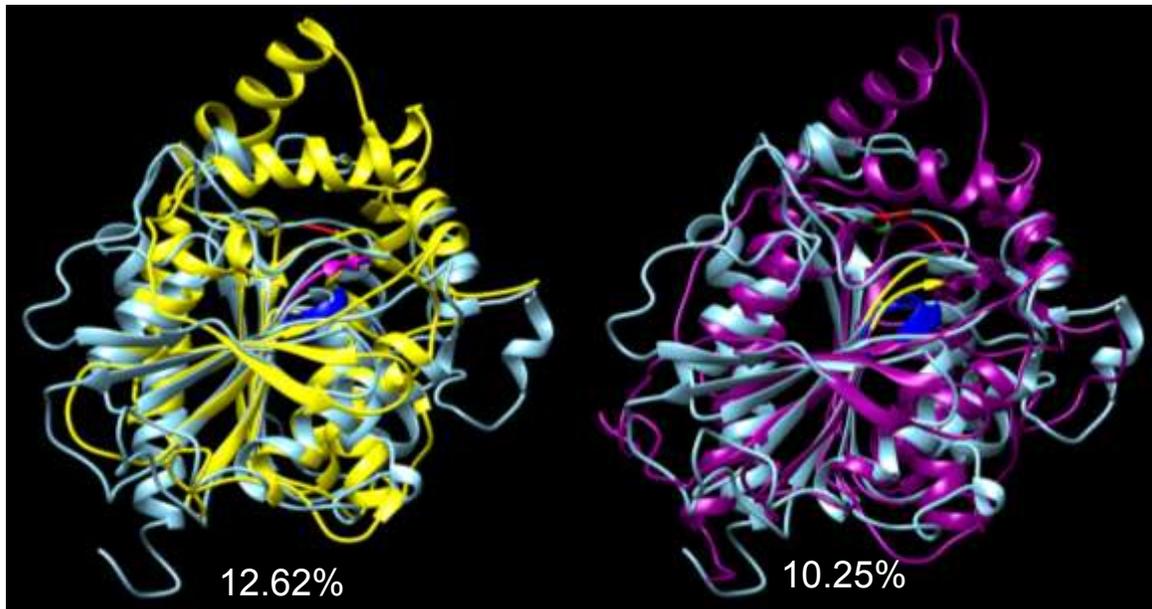


Figura 17. E) Superposición estructural de *BaEstB* con la HSL de *Mus musculus* y F) La HSL de *Necator americanus*. En ambos casos se observa el plegamiento α/β hidrolasa típico de esterasas así como la conservación de las secuencias consenso GDSAG en azul, HGGG en magenta y amarillo y finalmente el ácido aspártico e histidina de la triada catalítica en rojo. En la parte inferior de cada figura muestra el porcentaje de identidad.

7.4 Acoplamiento molecular “Docking”

Con el fin de estudiar el modo de interacción de la enzima *BaEstB* con diferentes sustratos y de proponer mutaciones puntuales que podrían modular su actividad, se realizó un estudio *in silico* de acoplamiento molecular. Se modeló la estructura tridimensional de *BaEstB* usando como estructura de plantilla al ortólogo más cercano de este análisis, la feruloil esterasa PDB: 4ZRS. El modelo obtenido por este método es comparable con el que se generó en un trabajo previo (Sánchez-Carbente *et al.*, 2017). Con este nuevo modelo, se obtuvieron 75 conformaciones en formato PDB por el método de Monte Carlo, los cuales se utilizaron para calcular la desviación de la raíz cuadrática media (RMSD) global en el programa VMD (por sus siglas en inglés: Visual Molecular Dynamics) (Tabla 6). Como se observa en la tabla 6, los RMSD son menores a 0.5 Å, por lo que las diferentes conformaciones obtenidas tienen una baja movilidad. Esto tuvo repercusiones al

momento de realizar las simulaciones de acoplamiento molecular, ya que, como se observa en las figuras 19 y 20 el 2-naftil acetato no logró acomodarse cerca del sitio activo, incluso cuando se realizó un acoplamiento dirigido o restringido a la región del sitio activo. La mayoría de las poses muestran que el sustrato está a más de 10 Å de la serina catalítica (Ser163). Lo mismo ocurre cuando se realiza el acoplamiento molecular con el ergosteril acetato (Figuras 21 y 22). Con los resultados obtenidos por este método no es posible extraer información relevante sobre la interacción de los sustratos con la enzima, por lo que se buscó otra estrategia para generar otras conformaciones enzimáticas. La figura 18 muestra un ejemplo del acoplamiento molecular de *BaEstB* con el ergosteril acetato, se muestra la distancia que hay entre el grupo carbonilo del enlace éster del ergosteril acetato y el átomo de oxígeno del grupo hidroxilo de la cadena lateral de la Ser163, la energía de afinidad de unión que tiene una interacción favorable y otra menos favorable. Es importante destacar la importancia de la frecuencia de poses cercanas al sitio activo de la enzima, una mayor frecuencia nos estaría indicando un mayor número de eventos de interacción enzima-sustrato y podría sugerirnos una mayor probabilidad de que se lleve a cabo esa interacción.

Tabla 6. RMSD global de las conformaciones en PELE de la HSL *BaEstB*

	RMSD (Å). Estructuras completas	RMSD (Å). Triada catalítica, cavidad oxianiónica, aminoácidos de unión al sustrato
Promedio	0.192	0.25
Desviación estándar	0.207	0.24
Valor mínimo	0.374	0.13
Valor máximo	2.084	2.2

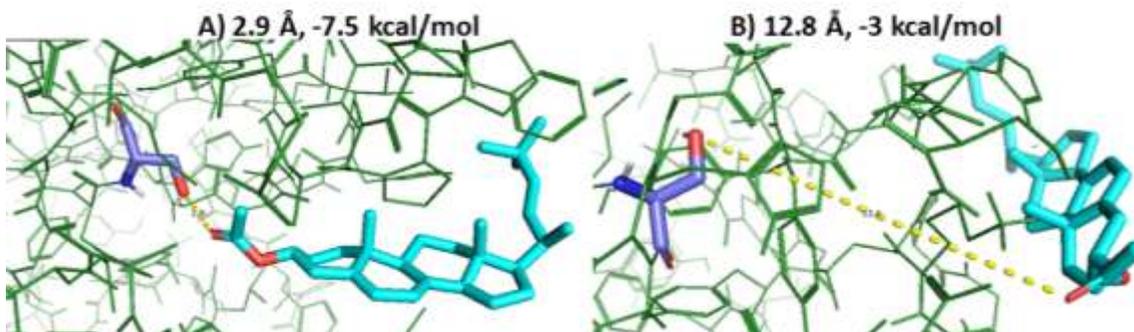


Figura 18. Interacción de *BaEstB* con el ergosteril acetato. Se muestra la distancia que hay entre el grupo carbonilo del enlace éster del ergosteril acetato y el átomo de oxígeno del grupo hidroxilo de la cadena lateral de la Ser163. A) La distancia que hay entre estos átomos es menor y la energía de afinidad de unión es más negativa con respecto a la interacción de B). Por consiguiente, energéticamente más favorable.

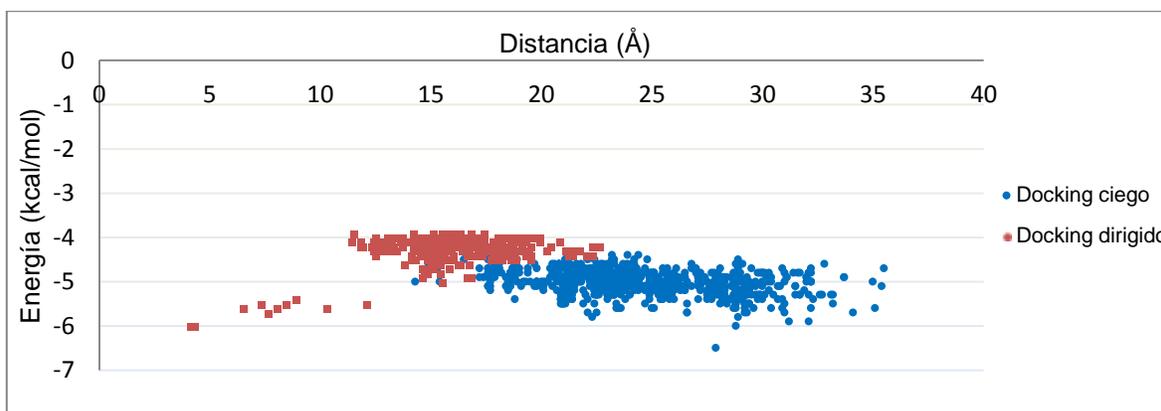


Figura 19. Dispersión de poses distancia-energía para el acoplamiento molecular de *BaEstB* con el 2-naftil acetato por medio del método de Monte Carlo.

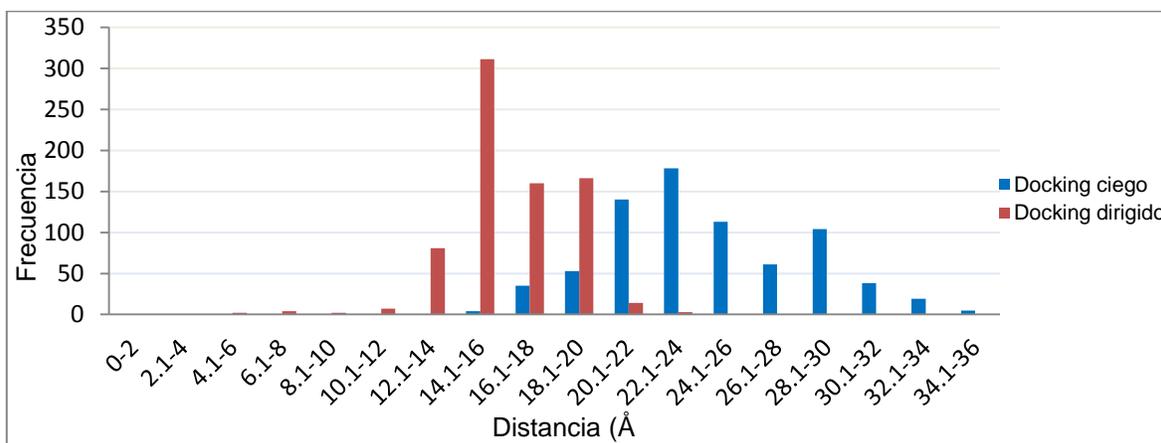


Figura 20. Distribución de frecuencias de poses para el acoplamiento molecular de *BaEstB* con el 2-naftil acetato por medio del método de Monte Carlo.

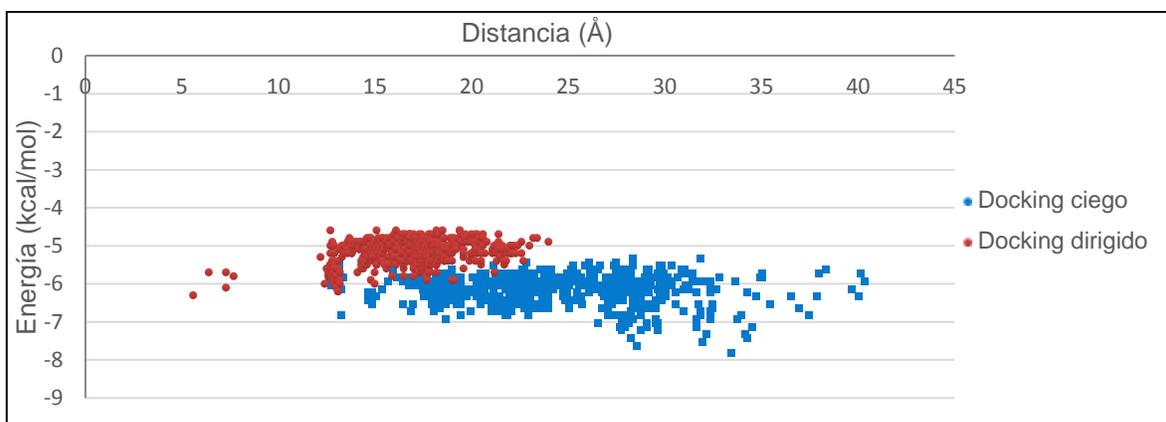


Figura 21. Dispersión de poses distancia-energía para el acoplamiento molecular de BaEstB con el ergosteril acetato por medio del método de Monte Carlo.

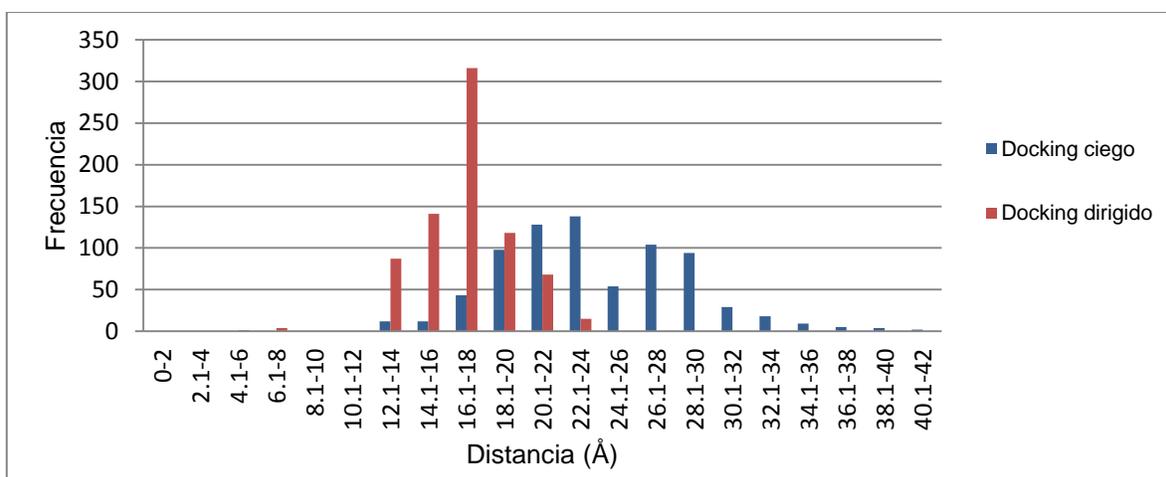


Figura 22. Distribución de frecuencias de poses para el acoplamiento molecular de BaEstB con el ergosteril acetato por medio del método de Monte Carlo.

Se decidió utilizar el método de Modos Normales de Vibración, el cual permite obtener una descripción de los movimientos de la proteína al combinar dos o más modos de vibración (<http://www.sciences.univ-nantes.fr/elnemo/>). Al comparar los resultados obtenidos con las estructuras generadas por este método respecto al de Monte Carlo, podemos observar que las energías de afinidad de unión mejoran considerablemente, por ejemplo, la mejor energía para el ergosteril acetato con el método de Monte Carlo fue de -6.3 kcal/mol mientras que con el método de Modos normales de vibración fue de -7.3 kcal/mol (Figuras 23 y 24). El número de poses cercanas al sitio activo también incrementa considerablemente hasta un 16 y un 34.3% para el 2-naftil acetato y el ergosteril acetato respectivamente (Figuras 25 y 26). Por esta razón, los cálculos de acoplamiento subsecuentes se realizaron con las estructuras generadas por el método de Modos Normales de Vibración.

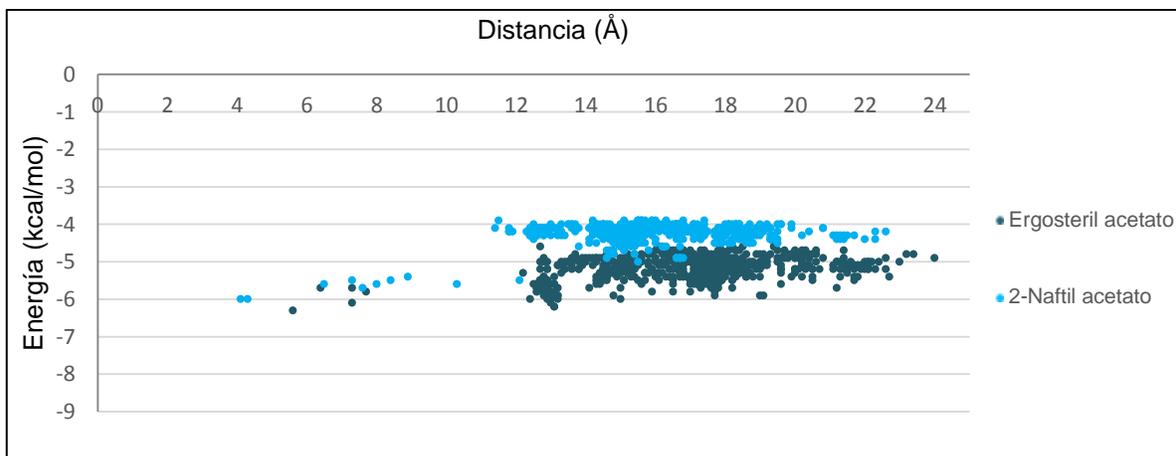


Figura 23. Dispersión de poses distancia-energía para el acoplamiento molecular de BaEstB con el ergosteril acetato y 2-naftil acetato por medio del método de Monte Carlo.

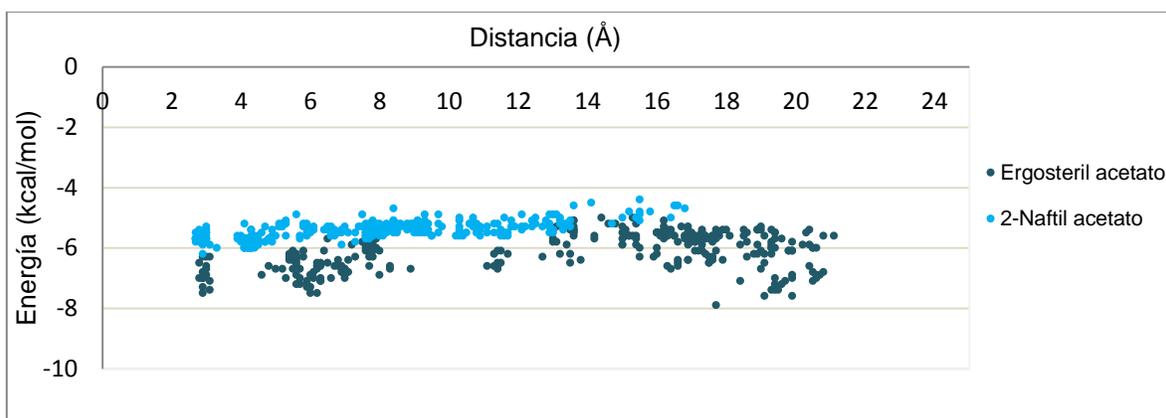


Figura 24. Dispersión de poses distancia-energía para el acoplamiento molecular de BaEstB con el ergosteril acetato y 2-naftil acetato por medio del método de Modos normales de vibración.

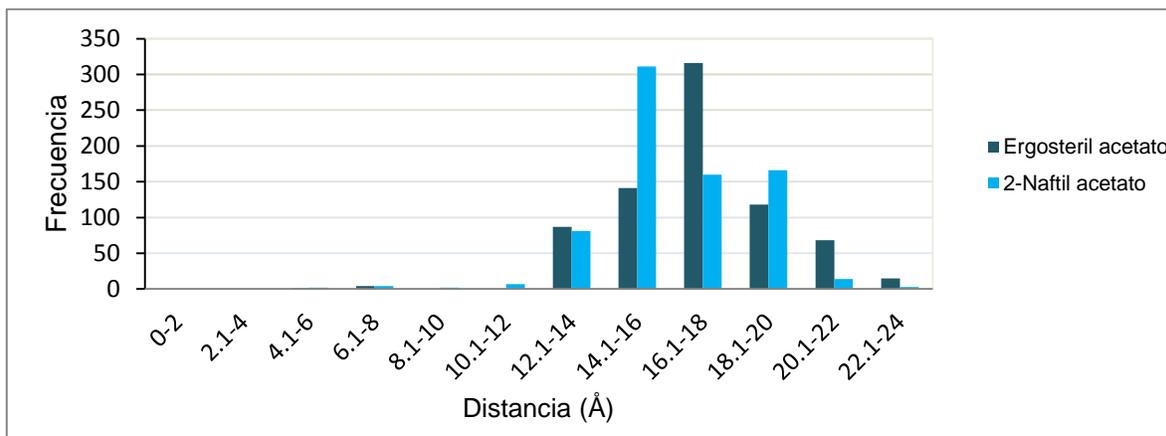


Figura 25. Distribución de frecuencias de poses para el acoplamiento molecular de BaEstB con el ergosteril acetato y 2-naftil acetato por medio del método de Monte Carlo.

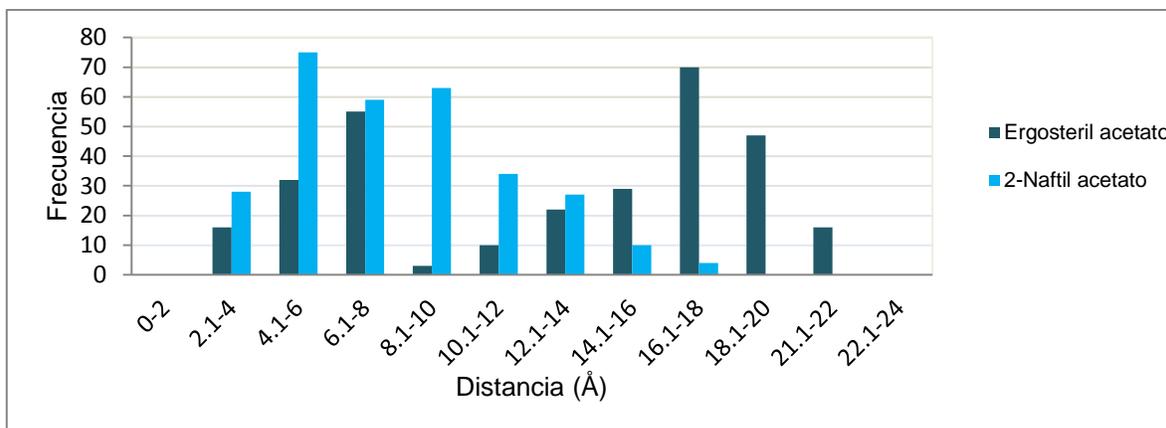


Figura 26. Distribución de frecuencias de poses para el acoplamiento molecular de BaEstB con el ergosteril acetato y 2-naftil acetato por medio del método de modos normales de vibración.

Las figuras 27 y 28 que muestran la dispersión de poses y la distribución de frecuencias respectivamente, muestran los resultados de los acoplamientos moleculares con el método de modos normales de vibración utilizando tres *p*-nitrofeniles con diferentes tamaños de cadenas alifáticas *p*-NA (C2), *p*-NB (C4), *p*-ND (C10), 2-naftil acetato (C2), 1-naftil acetato (C2), 1-naftil butirato (C4), colesteril acetato (C2), ergosteril acetato (C2) y feruloil arabinofuranosa. Para el caso de los *p*-nitrofeniles se observa una clara tendencia de agrupación de poses ubicadas entre 3 y 17 Å de distancia y con energías de unión entre -4.3 a -6.1 kcal/mol. En esta región también se ubicó el 2-naftil acetato, 1-naftil acetato y 1-naftil butirato, este último presentó las mejores energías de unión (-5.5 a -6.4 kcal/mol) con poses ubicadas entre los (2.7 a 3.2 Å de distancia). Seguido del 2-naftil acetato con energías de unión de -5.3 a -6.2 kcal/mol, mientras que con el 1-naftil acetato se obtuvieron energías de unión de -5.2 a -6.1 kcal/mol, sin embargo, la interacción fue ligeramente más cercana con el cambio en la posición del radical (2.5 Å de distancia).

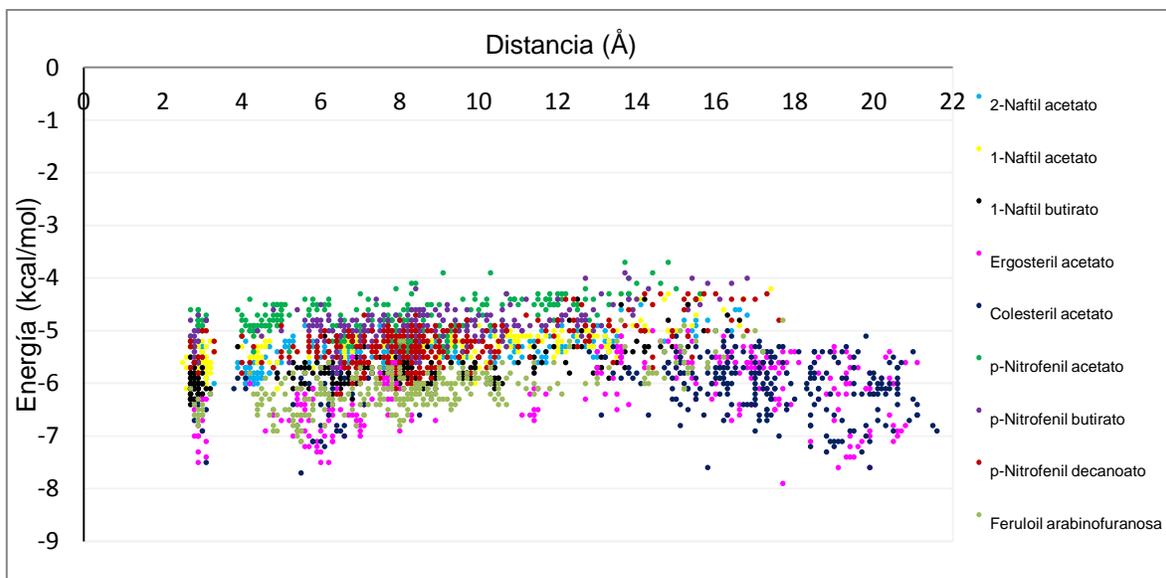


Figura 27. Dispersión de poses distancia-energía del acoplamiento molecular de *BaEstB* con distintos sustratos esterificados: 2-naftil acetato, 1-naftil acetato, 1-naftil butirato, ergosteril acetato, colesteril acetato, *p*-nitrofenil acetato, *p*-nitrofenil butirato, *p*-nitrofenil decanoato y feruloil arabinofuranosa (FAra) con el método de modos normales de vibración.

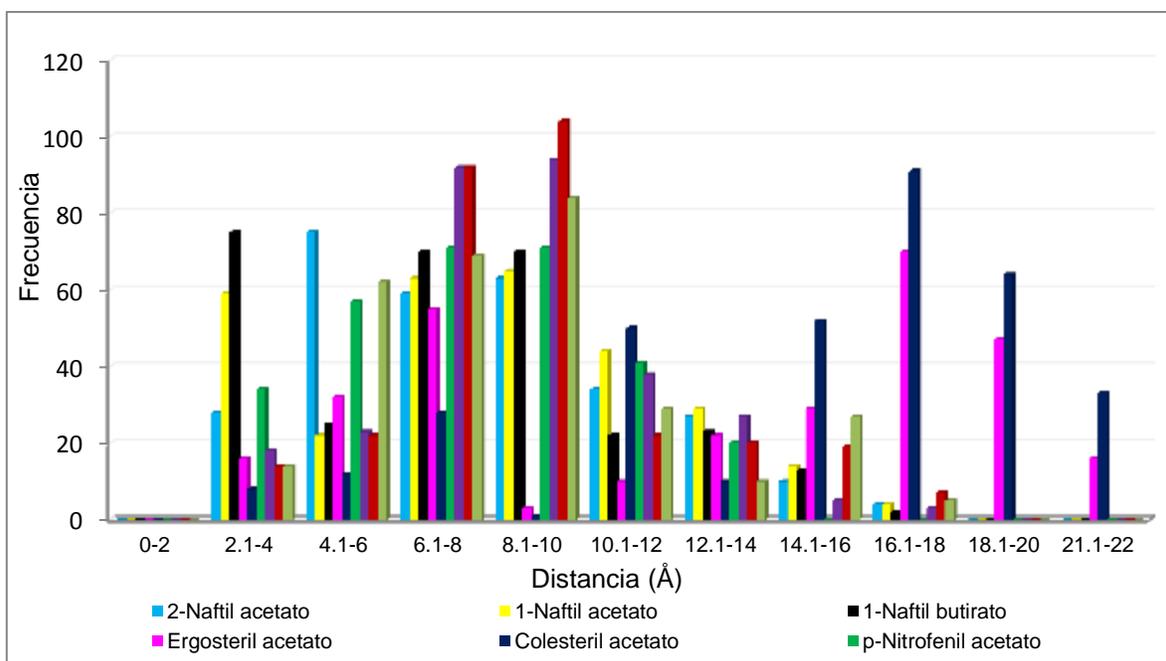


Figura 28. Distribución de frecuencias de poses del acoplamiento molecular de *BaEstB* con distintos sustratos esterificados: el 2-naftil acetato, 1-naftil acetato, 1-naftil butirato, ergosteril acetato, colesteril acetato, *p*-nitrofenil acetato, *p*-nitrofenil butirato, *p*-nitrofenil decanoato y FAra con el método de modos normales de vibración.

Resulta interesante observar que conforme aumenta el tamaño de los *p*-NP esteres sustituidos, disminuye el porcentaje de poses cercanas al sitio activo de la enzima (<3.5 Å, <=5.6 Å) por ejemplo, con el *p*-NP acetato se obtuvo un 27.9% de poses contra un 7.9% para el *p*-NP decanoato.

Si bien, el mayor porcentaje de poses en dicho rango de distancias se obtuvo con el 2-naftil acetato (31.3%), seguido del 1-naftil butirato y 1-naftil acetato con 30 y 26.3% respectivamente, en la región menor a los 3.5 Å de distancia, el mayor porcentaje de poses se obtuvo con el 1-naftil butirato y 1-naftil acetato con 24.6 y 19% respectivamente, mientras que con el 2-naftil acetato solo se presentó un 8% (tabla 7).

De los nueve sustratos analizados por acoplamiento molecular, las mejores energías de unión se obtuvieron con el ergosteril acetato, colesteril acetato y feruloil arabinofuranosa, con un promedio de -7.5 kcal/mol para los esteroides acetilados y -6.8 kcal/mol para la feruloil arabinofuranosa. Es importante destacar que, de los 9 sustratos analizados, estos tres son los más voluminosos. La figura 28 muestra las estructuras en superficie rellena y esferas para los nueve sustratos analizados, las energías de afinidad de unión, así como un modelo de *sticks* del ergosteril acetato y todos los elementos que participan en la catálisis.

Tabla 7. Porcentaje de poses cercanas al sitio activo para cada uno de los sustratos

	Tamaño de la cadena alifática	< 3.5Å (%)	<3.5 Å, <=5.6 Å (%)
2-Naftil acetato	C2	8	31.3
1-Naftil acetato	C2	19	26.3
1-Naftil butirato	C4	24.6	30
Ergosteril acetato	C2	5.3	12.3
Colesteril acetato	C2	2	4.6
<i>p</i> -Nitrofenil acetato	C2	9.6	27.9
<i>p</i> -Nitrofenil butirato	C4	6	8.3
<i>p</i> -Nitrofenil decanoato	C10	3.6	7.9
FAra		4.6	20.3

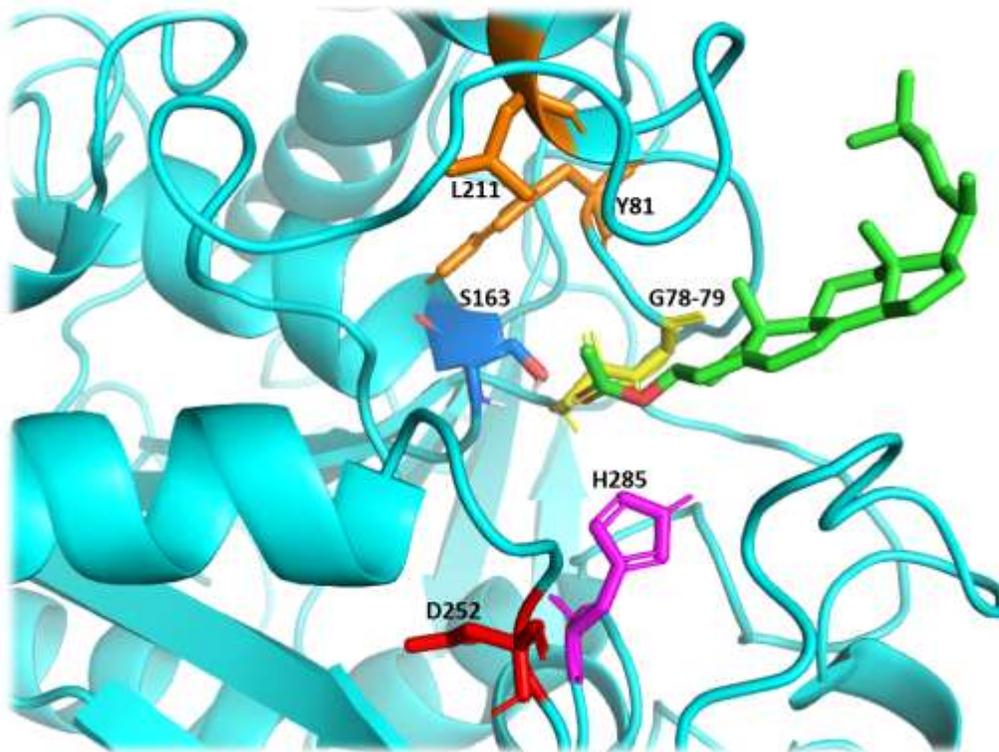


Figura 29. Acoplamiento molecular de *BaEstB* con los nueve sustratos analizados. A) Modelos de superficie rellena para la enzima y en modelo de esferas para los sustratos. Se muestran las distancias y las energías de afinidad de unión. B) En la parte inferior, un modelo de *sticks* del ergosteril acetato y todos los elementos que participan en la catálisis: triada catalítica (Ser163, His285 y Asp252); cavidad oxianiónica (Gly78, Gly79); Residuos implicados en la unión con el sustrato (Tyr81 y Leu211).

7.5 Mutaciones puntuales *in silico*

Se realizaron los acoplamientos moleculares de la enzima parental con diferentes sustratos (Figura 29), se identificaron los residuos que podrían participar, por su cercanía, en la interacción con los sustratos: ergosterol acetato, 2-naftil acetato (2NA), *p*-nitrofenil acetato (*p*-NA), *p*-nitrofenil butirato (*p*-NB) y *p*-nitrofenil decanoato (*p*-ND), 1-naftil acetato y 1-naftil butirato (Tabla 8). Con base en lo que se ha reportado en la literatura para otras enzimas de esta familia, se realizaron las siguientes mutaciones puntuales *in silico* y se analizaron por acoplamiento molecular: **Y81W**, **Y81S**, **Y81F**, **L211A**, **L211F**, **L211S** y **L211W** (Yang *et al.*, 2015; De Simone *et al.*, 2003; Duc Ngo *et al.*, 2013). Se utilizó como control la

enzima parental. Las figuras 30-53 muestran los resultados obtenidos en el análisis.

Tabla 8. Identificación de residuos de aminoácidos que interaccionan con los diferentes sustratos en una esfera de 6 Å de radio alrededor del sustrato utilizando las poses de mejor energía de afinidad.

Ergosteril acetato		2-NA		p-NA		p-NB		p-ND	
11	G	13	I	13	I	13	I	13	I
12	T	15	N	14	S	14	S	14	S
13	I	16	D	15	N	15	N	15	N
14	S	17	I	16	D	16	D	16	D
15	N	20	Q	17	I	17	I	17	I
16	D	21	V	20	Q	20	Q	20	Q
17	I	77	H	21	V	21	V	21	V
78	G	78	G	77	H	77	H	77	H
79	G	79	G	78	G	78	G	78	G
80	A	80	A	79	G	79	G	79	G
81	Y	81	Y	80	A	80	A	80	A
82	V	82	V	81	Y	81	Y	81	Y
83	H	83	H	82	V	82	V	82	V
118	L	84	G	83	H	83	H	83	H
119	P	85	S	84	G	84	G	84	G
120	H	88	H	88	H	85	S	85	S
162	H	94	L	93	D	88	H	88	H
163	S	96	Y	94	L	93	D	94	L
194	G	162	H	96	Y	94	L	96	Y
196	M	163	S	162	H	96	Y	162	H
203	E	194	G	163	S	162	H	163	S
205	P	195	G	194	G	163	S	194	G
206	I	196	M	195	G	194	G	195	G
207	P	206	I	196	M	195	G	196	M
208	P	207	P	206	I	196	M	206	I
209	F	209	F	207	P	206	I	207	P
210	V	210	V	210	V	207	P	208	P
252	D	211	L	211	L	209	F	209	F
253	V	253	V	253	V	210	V	210	V
254	A	256	M	256	M	211	L	211	L
255	A	285	H	285	H	253	V	253	V
256	M	286	I	286	I	256	M	255	A
257	R	289	H	289	H	285	H	256	M
285	H	290	Y	290	Y	286	I	285	H
						289	H	286	I
						290	Y	290	Y

Identificación de residuos de aminoácidos que interaccionan con los diferentes sustratos en una esfera de 6 Å de radio alrededor del sustrato utilizando las poses de mejor energía de afinidad. Se muestran en gris los residuos de aminoácidos que forman la cavidad oxianiónica, en azul y verde la serina e histidina catalíticas (Ser163, His285) y en naranja los aminoácidos implicados en la unión con el sustrato (Tyr81, Leu211), de estos últimos se seleccionó Y81 para realizar las mutaciones.

La figura 30 de dispersión de datos con el *p*-NA muestra en general, un ligero desplazamiento hacia zonas de mejor energía de afinidad de unión para las tres mutantes. La mejor energía de unión se presentó con la mutante Y81S (-6 kcal/mol), si bien no representa un cambio drástico en la energía afinidad de unión, en la región cercana a la serina catalítica, que está entre los 2 a 4 Å, podemos observar una cambio más notorio en la frecuencia de poses al aumentar un 9.3% es decir, casi el doble de poses con respecto a la enzima parental (figura 31). Un comportamiento similar se presentó con el *p*-NB: la mejor energía se presentó con la mutante Y81S (-6.1 kcal/mol), seguido de la mutante Y81W (-5.9 kcal/mol), (Figura 32). La figura 33 arroja datos interesantes; pareciera que la frecuencia de poses de la mutante Y81W no muestra mejora alguna, sin embargo, la energía de unión es mejor con respecto a la enzima parental (-5.9 y -5.8 kcal/mol respectivamente).

El acoplamiento molecular de la mutante Y81S en general mostró mejores resultados para ambos sustratos. El tamaño de las cadenas laterales y los grupos funcionales de estos aminoácidos parecen determinar estos cambios. La serina, al ser un aminoácido mucho más pequeño que el triptófano, tirosina o fenilalanina, podría estar permitiendo un mejor arreglo conformacional del túnel de entrada. Asimismo, el grupo hidroxilo de la serina puede formar fuertes puentes de hidrógeno, en comparación con el grupo amino del anillo pirrol presente en el triptófano que forma puentes de hidrógeno más débiles, por el contrario, en el benceno de la fenilalanina no hay hidroxilo lo que podría explicar que no haya mejoras en energía de unión para el *p*-NB con la mutante Y81F y que inclusive disminuye.

Para el caso del *p*-ND, con la mutante Y81W se obtuvo la mejor energía de unión, al menos de los tres *p*-NP esteres sustituidos analizados, la cual fue de -6.6 kcal/mol a una distancia de 2.8 Å (Figura 34). Sin embargo, la mayor frecuencia de interacciones cercanas al sitio activo fue con la mutante Y81S, aumentando de 14 a 25 interacciones con respecto a la enzima parental (Figura 35).

Al analizar el acomplamiento molecular de las mutantes Y81W, Y81S y Y81F con el 1-naftil acetato, la mejor energía de unión se presentó con Y81S (-6.5 kcal/mol contra -6.1 kcal/mol de la enzima parental), sin embargo, la frecuencia de poses cercanas al sitio activo disminuyó de 59 a 53. Con el 1-naftil butirato no hubo mejoras, de hecho, la energía de unión de la enzima parental fue mejor que la de las tres mutantes. Para ambos sustratos la frecuencia de poses cercanas al sitio activo no representó cambios significativos (Figuras 36-39).

Cuando se utilizó el ergosteril acetato como sustrato para las mismas mutantes, una vez más, la mutante Y81S fue la única que presentó una mejora en la energía de unión (de -7.5 a -7.7 kcal/mol). Sin embargo, en este caso fue más notable el aumento en la frecuencia de poses cercanas al sitio activo aumentando de 16 a 46 poses para las mutantes Y81S y Y81F y de 16 a 48 poses para Y81W (Figuras 40 y 41).

Las siguientes mutaciones puntuales *in silico* que se analizaron por acoplamiento molecular fueron L211A, L211F, L211S y L211W. Las figuras 41-46 muestran los resultados obtenidos con los *p*NP, es claro que de las cuatro mutantes, L211W muestra en general distribuciones de poses que se desplazan hacia las zonas de mejor energía de afinidad de unión (Figuras 42, 44 y 46). Para el caso del *p*NA las mutantes L211A, L211F, L211S no muestran mejora alguna en la energía de unión con respecto a la enzima parental. Con el *p*NB las mutantes L211A, L211S y L211W presentan una energía de unión de -6 kcal/mol, no obstante, el sustrato se encuentra más cerca del sitio activo con la mutante L211W (2.7 Å), mientras que en las mutantes L211S y L211A las distancias son de 2.8 y 2.9 Å respectivamente. La tabla 9 muestra los cambios de energías de unión para las 4 mutantes. Resulta interesante ver como a medida que aumenta el tamaño de las cadenas alifáticas

de los *p*-NP ésteres sustituidos, las energías de afinidad de unión mejoran, este mismo efecto se presenta con los *p*-NP en las mutantes Y81W, Y81S y Y81F. La tabla 9 muestra los cambios de energías de unión para las 4 mutantes.

En contraste con lo anterior, el efecto es el mismo con respecto al aumento en la frecuencia de poses cercanas al sitio activo y es mucho más claro que el efecto visto con las mutantes Y81W, Y81S y Y81F. Por ejemplo, la mutante L211W con el *p*-NA (C2) hay un aumento del 20.7% con respecto a la enzima parental, mientras que con el *p*-ND (C10) aumenta un 51%, esto representa casi un aumento de 12 veces más el número de poses que la enzima parental (Figuras 43, 45 y 47).

Los análisis de acoplamiento molecular con el 2-naftil acetato muestran que la mejor energía de unión se presentó con la mutante L211W (-6.6 kcal/mol contra -6.1 kcal/mol de la enzima parental). También presentó la mayor frecuencia de poses cercanas al sitio activo, a saber, 42% en comparación con la enzima parental de un 19.6% (Figuras 48 y 49). Ahora bien, con el 1-naftil butirato, la mejor energía de unión se obtuvo con la mutante L211F (-7 kcal/mol contra -6.4 kcal/mol de la enzima parental). Sin embargo la mayor frecuencia de poses cercanas al sitio activo fue con la mutante L211A (51%) mientras que L211F presentó un 42.3% (Figuras 50 y 51).

Finalmente se evaluó el ergosteril acetato, una vez más la mutante L211W, presentó la mayor energía de afinidad de unión, la cual fue de -8.1 kcal/mol. De hecho, la mejor energía de unión entre todas las mutantes y todos los sustratos analizados. Además, la mutante L211W presentó la mayor frecuencia de poses cercanas al sitio activo (26%) mientras que las mutantes L211A, L211F y L211S presentaron 14.3, 15 y 13.3% respectivamente (Figuras 52 y 53). Un resumen de las 7 mutaciones puntuales *in silico* que se analizaron por acoplamiento molecular con los 6 sustratos se presenta en la tabla 9.

En la figura 54 podemos observar el acoplamiento molecular de la *BaEstB* con el *p*-NA de la enzima parental y de la mutante Y81S, se observa que en la mutante el túnel se alarga y permite que el sustrato se introduzca mucho más, mientras que

en la enzima silvestre el sustrato queda muy cerca de la superficie. Un efecto más drástico ocurre en la mutante L211W con el ergosteril acetato, se observa que la conformación espacial del túnel de la mutante cambia a una especie de *hendidura* en la que el sustrato se empaqueta a lo largo de esta.

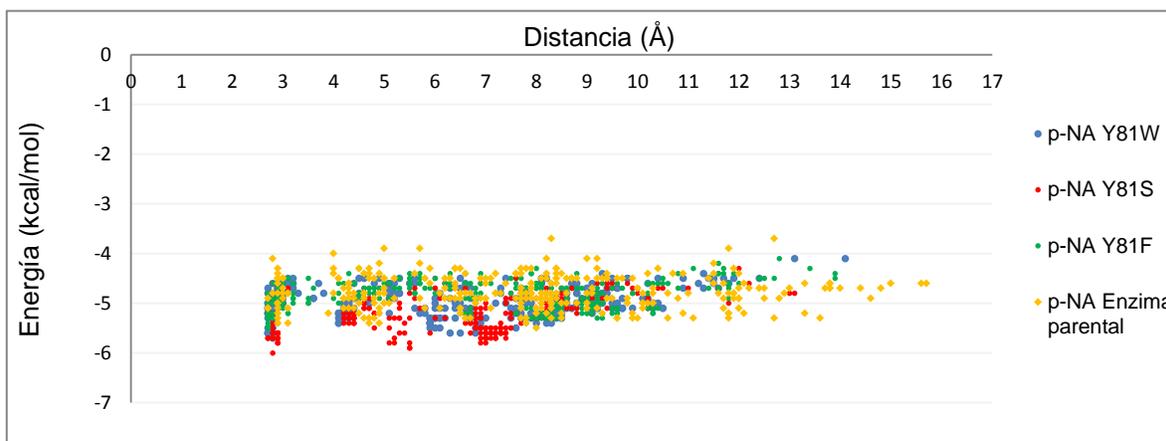


Figura 30. Dispersión de poses distancia-energía para el acoplamiento molecular de las mutantes de Y81 de *BaEstB* con el *p*-nitrofenil acetato, por medio del método de modos normales de vibración. Cada color representa una mutante y la enzima parental.

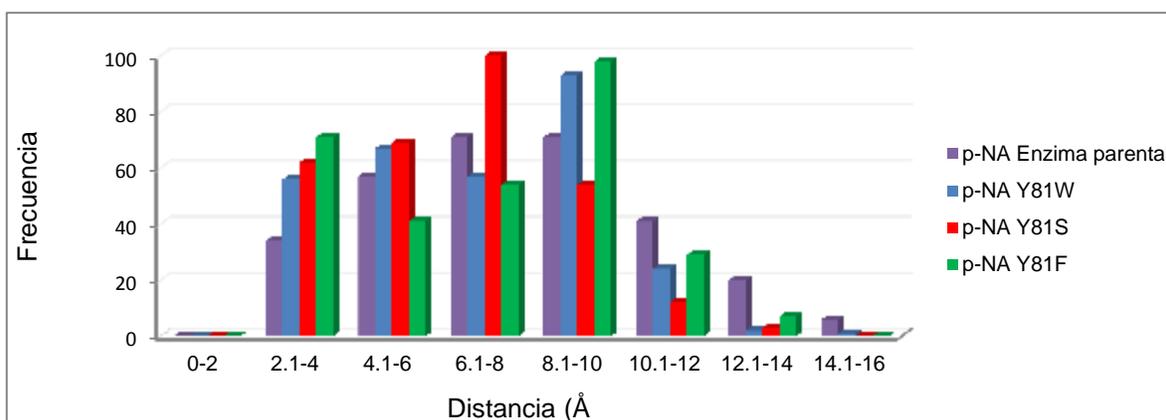


Figura 31. Distribución de frecuencias de poses para el acoplamiento molecular de las mutantes de Y81 de *BaEstB* con el *p*-nitrofenil acetato, por medio del método de modos normales de vibración. Cada color representa una mutante y la enzima parental.

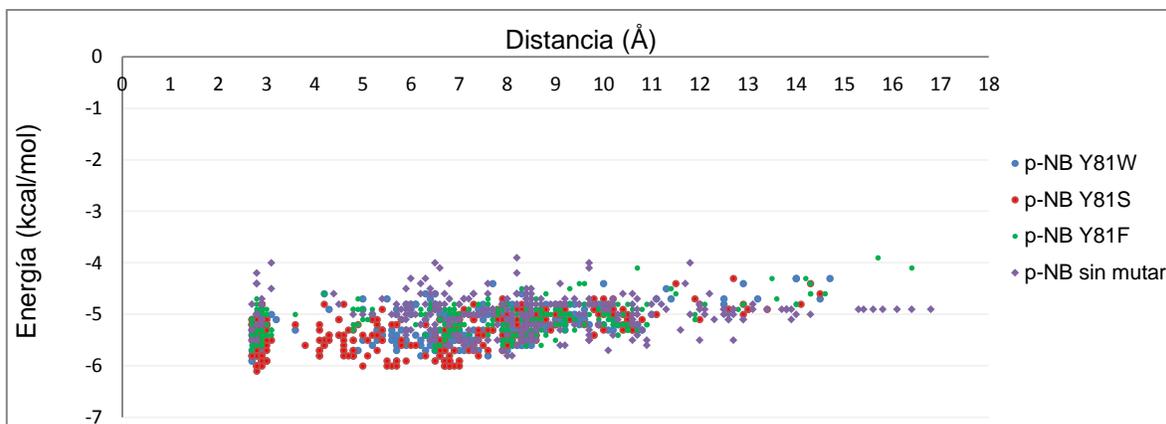


Figura 32. Dispersión de poses distancia-energía para el acoplamiento molecular de las mutantes de Y81 de *BaEstB* con el *p*-nitrofenil butirato, por medio del método de modos normales de vibración. Cada color representa una mutante y la enzima parental.

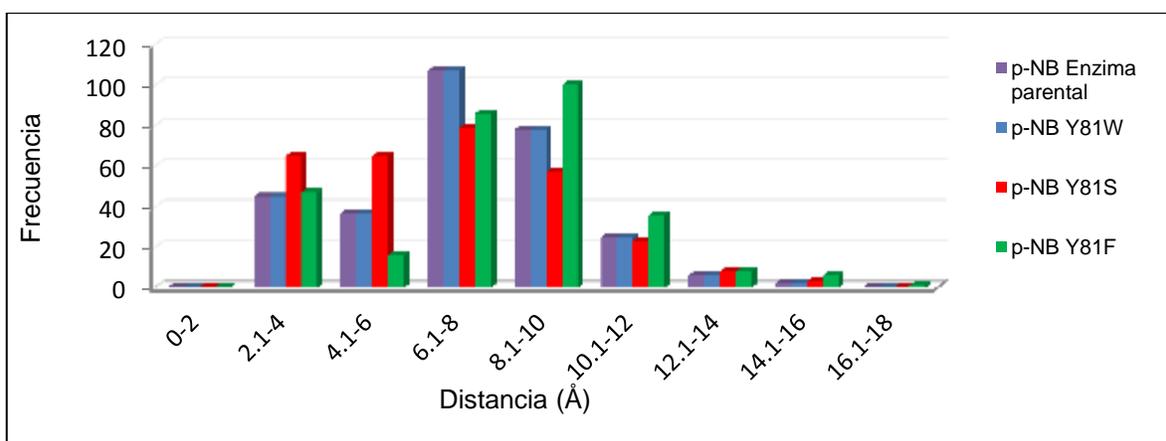


Figura 33. Distribución de frecuencias de poses para el acoplamiento molecular de las mutantes de Y81 de *BaEstB* con el *p*-nitrofenil butirato, por medio del método de modos normales de vibración. Cada color representa una mutante y la enzima parental.

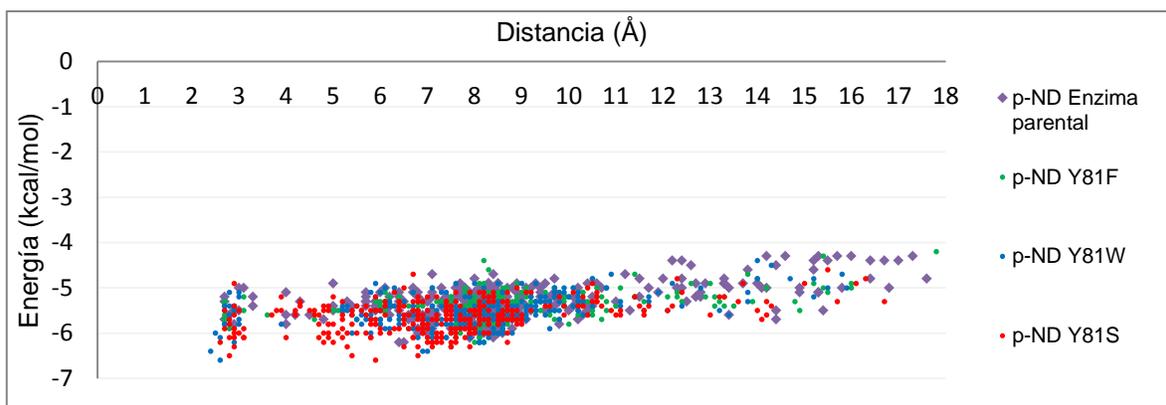


Figura 34. Dispersión de poses distancia-energía para el acoplamiento molecular de las mutantes de Y81 de *BaEstB* con el *p*-nitrofenil decanoato, por medio del método de modos normales de vibración. Cada color representa una mutante y la enzima parental.

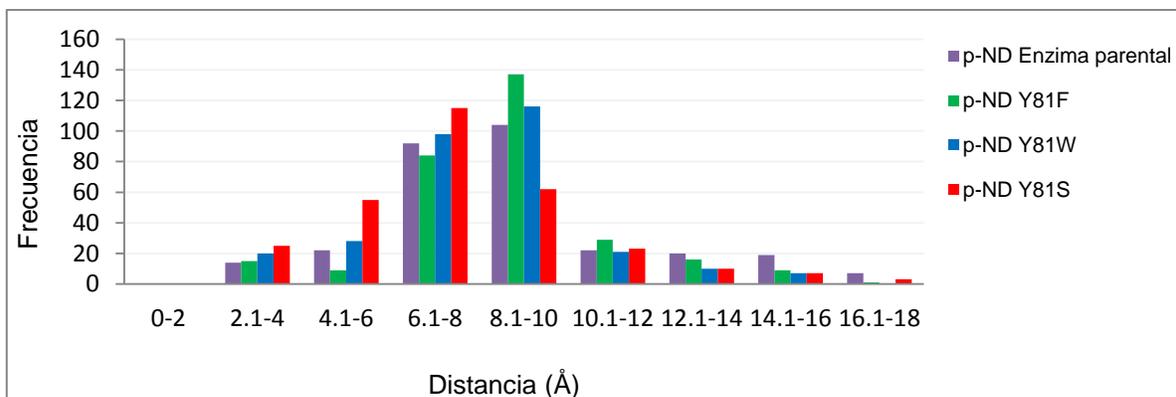


Figura 35. Distribución de frecuencias de poses para el acoplamiento molecular de las mutantes de Y81 de *BaEstB* con el *p*-nitrofenil decanoato, por medio del método de modos normales de vibración. Cada color representa una mutante y la enzima parental.

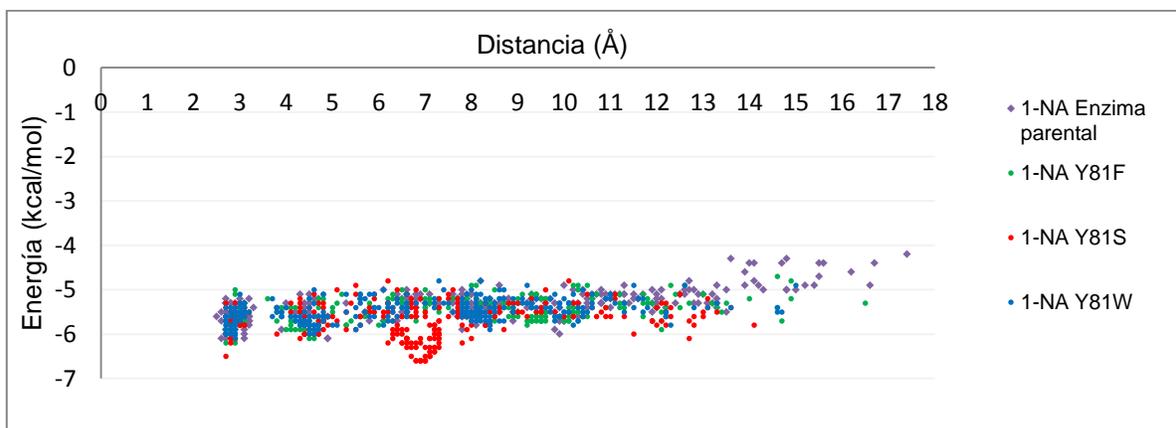


Figura 36. Dispersión de poses distancia-energía para el acoplamiento molecular de las mutantes de Y81 de *BaEstB* con el 1-naftil acetato, por medio del método de modos normales de vibración. Cada color representa una mutante y la enzima parental.

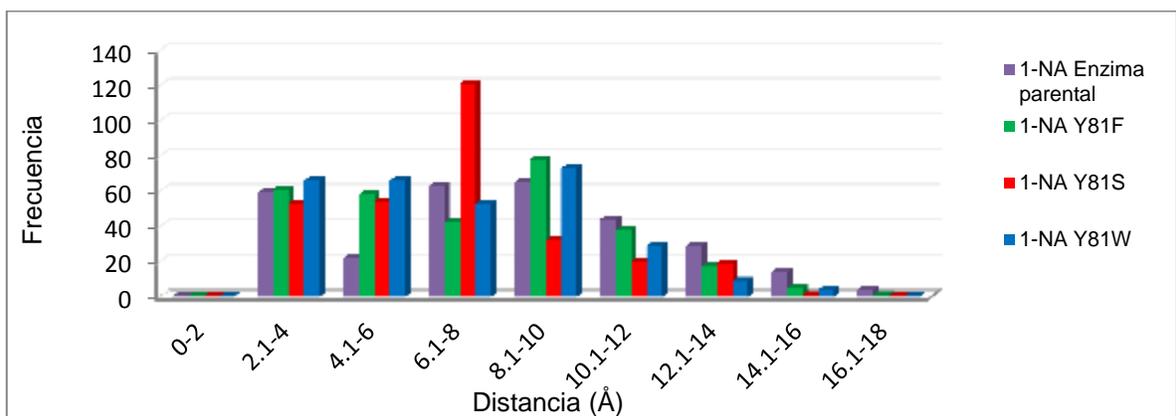


Figura 37. Distribución de frecuencias de poses para el acoplamiento molecular de las mutantes de Y81 de *BaEstB* con el 1-naftil acetato, por medio del método de modos normales de vibración. Cada color representa una mutante y la enzima parental.

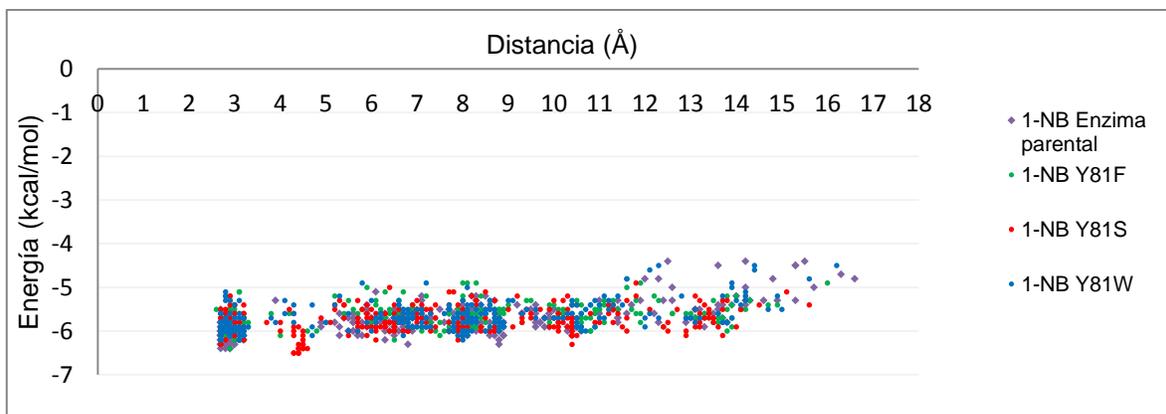


Figura 38. Dispersión de poses distancia-energía para el acoplamiento molecular de las mutantes de Y81 de *BaEstB* con el 1-naftil butirato, por medio del método de modos normales de vibración. Cada color representa una mutante y la enzima parental.

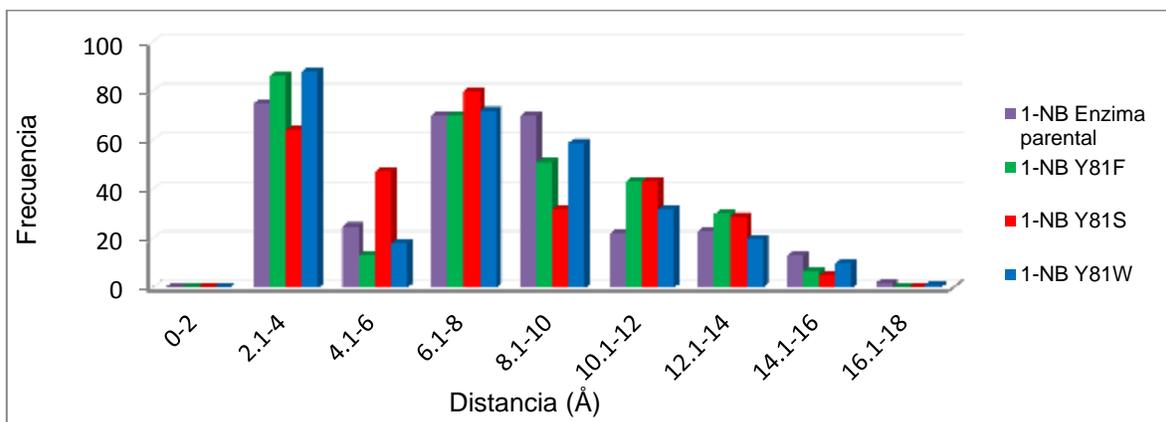


Figura 39. Distribución de frecuencias de poses para el acoplamiento molecular de las mutantes de Y81 de *BaEstB* con el 1-naftil butirato, por medio del método de modos normales de vibración. Cada color representa una mutante y la enzima parental.

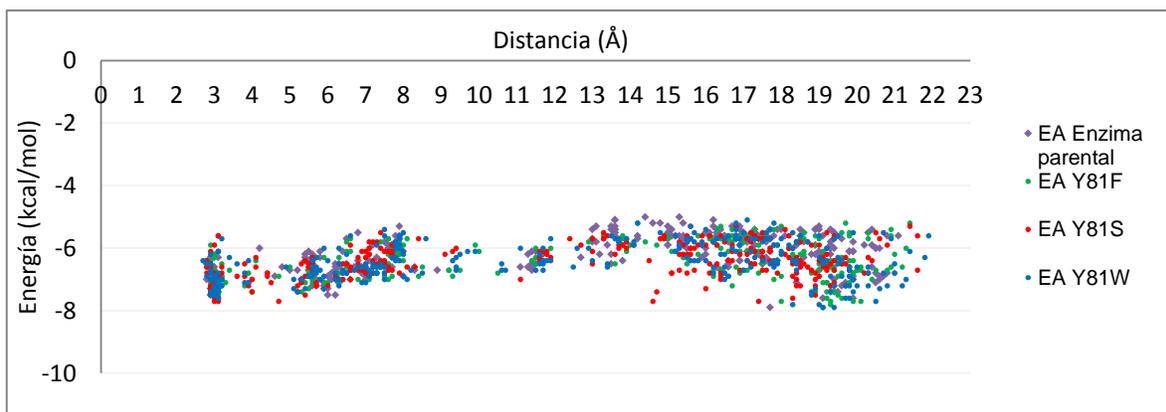


Figura 40. Dispersión de poses distancia-energía para el acoplamiento molecular de las mutantes de Y81 de *BaEstB* con el ergosteril acetato, por medio del método de modos normales de vibración. Cada color representa una mutante y la enzima parental.

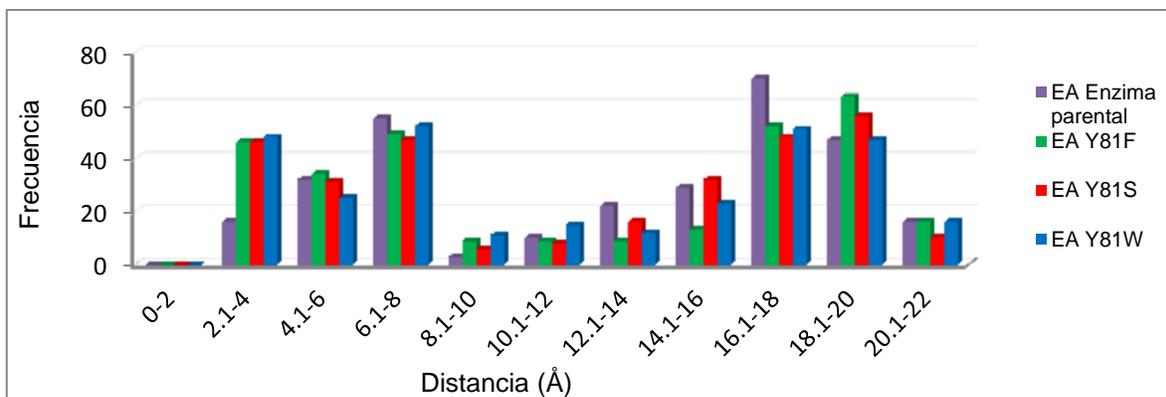


Figura 41. Distribución de frecuencias de poses para el acoplamiento molecular de las mutantes de Y81 de *BaEstB* con el ergosteril acetato, por medio del método de modos normales de vibración. Cada color representa una mutante y la enzima parental.

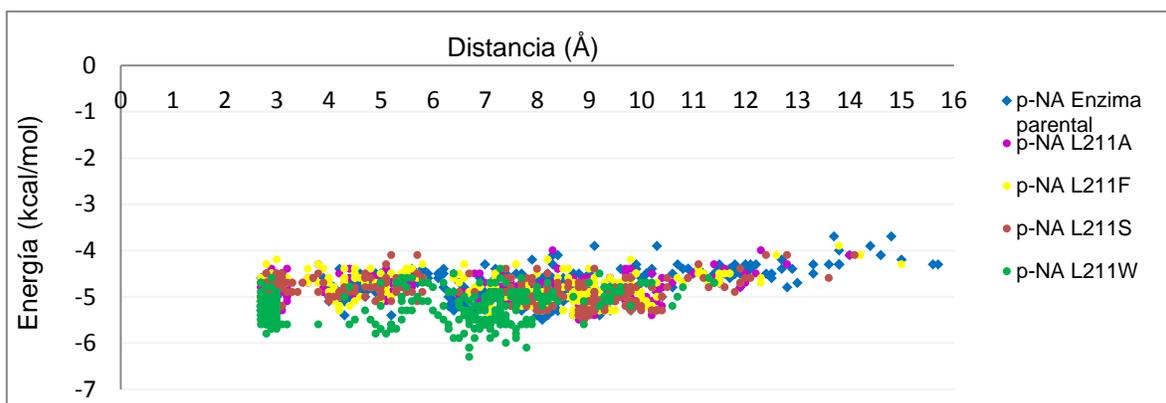


Figura 42. Dispersión de poses distancia-energía para el acoplamiento molecular de las mutantes de L211 de *BaEstB* con el *p*-nitrofenil acetato, por medio del método de modos normales de vibración. Cada color representa una mutante y la enzima parental.

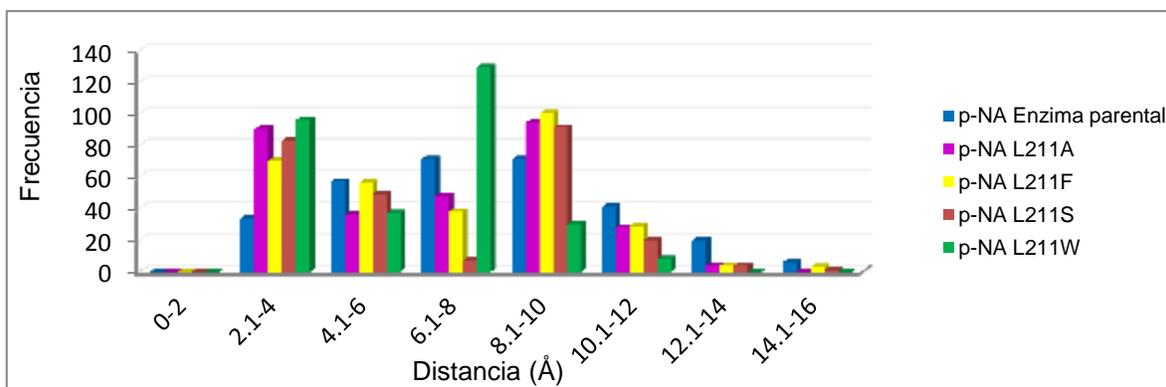


Figura 43. Distribución de frecuencias de poses para el acoplamiento molecular de las mutantes de L211 de *BaEstB* con el *p*-nitrofenil acetato, por medio del método de modos normales de vibración. Cada color representa una mutante y la enzima parental.

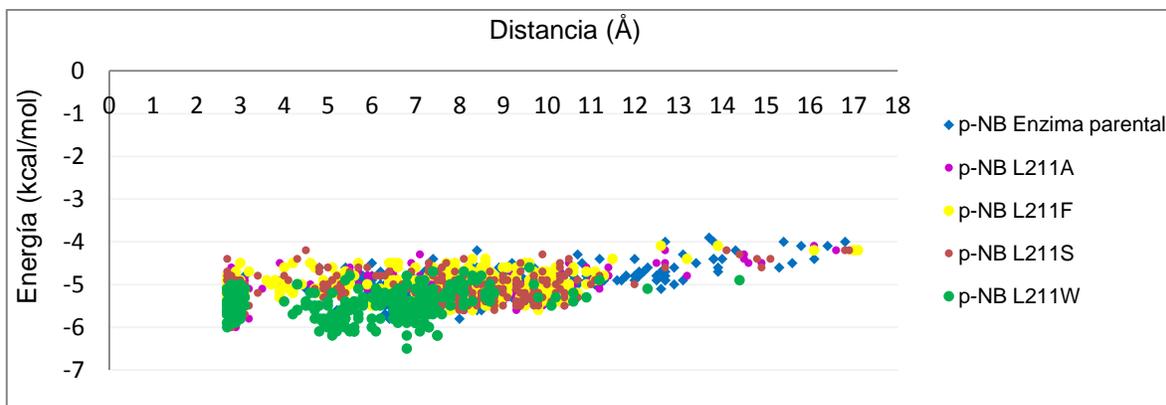


Figura 44. Dispersión de poses distancia-energía para el acoplamiento molecular de las mutantes de L211 de *BaEstB* con el *p*-nitrofenil butirato, por medio del método de modos normales de vibración. Cada color representa una mutante y la enzima parental.

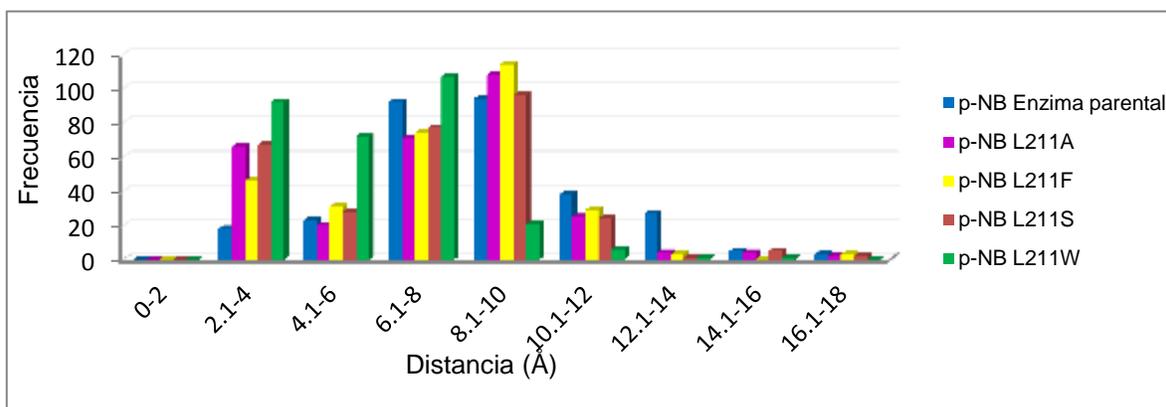


Figura 45. Distribución de frecuencias de poses para el acoplamiento molecular de las mutantes de L211 de *BaEstB* con el *p*-nitrofenil butirato, por medio del método de modos normales de vibración. Cada color representa una mutante y la enzima parental.

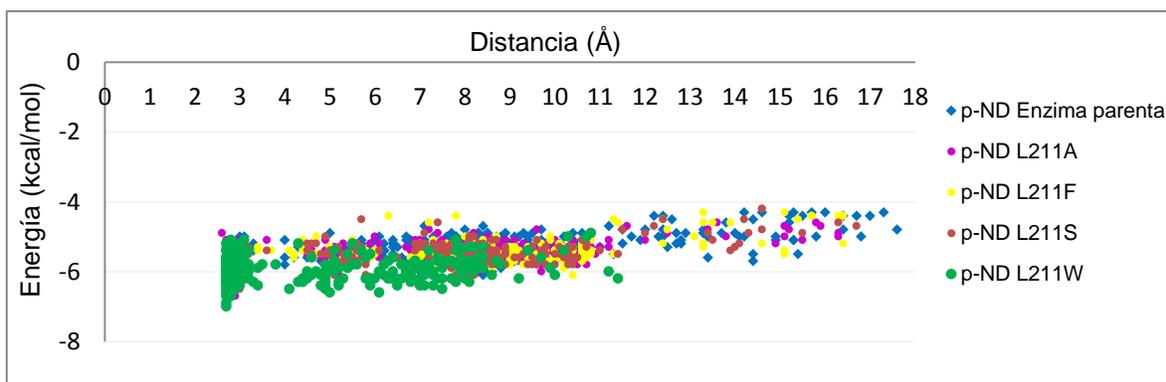


Figura 46. Dispersión de poses distancia-energía para el acoplamiento molecular de las mutantes de L211 de *BaEstB* con el *p*-nitrofenil decanoato, por medio del método de modos normales de vibración. Cada color representa una mutante y la enzima parental.

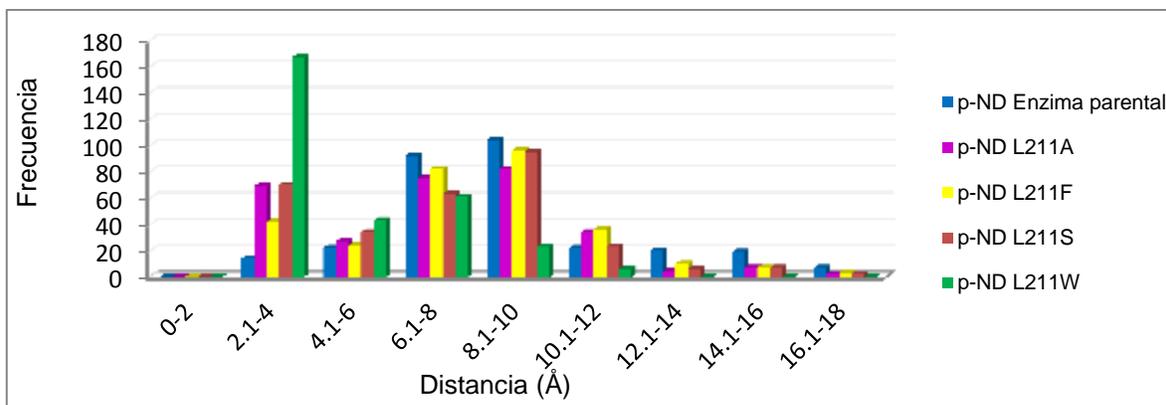


Figura 47. Distribución de frecuencias de poses para el acoplamiento molecular de las mutantes de L211 de *BaEstB* con el *p*-nitrofenil decanoato, por medio del método de modos normales de vibración. Cada color representa una mutante y la enzima parental.

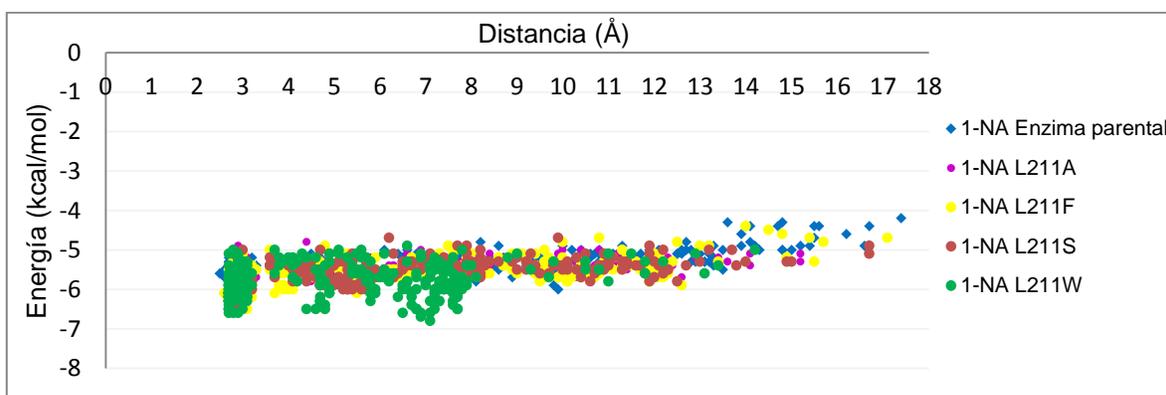


Figura 48. Dispersión de poses distancia-energía para el acoplamiento molecular de las mutantes de L211 de *BaEstB* con el 1-naftil acetato, por medio del método de modos normales de vibración. Cada color representa una mutante y la enzima parental.

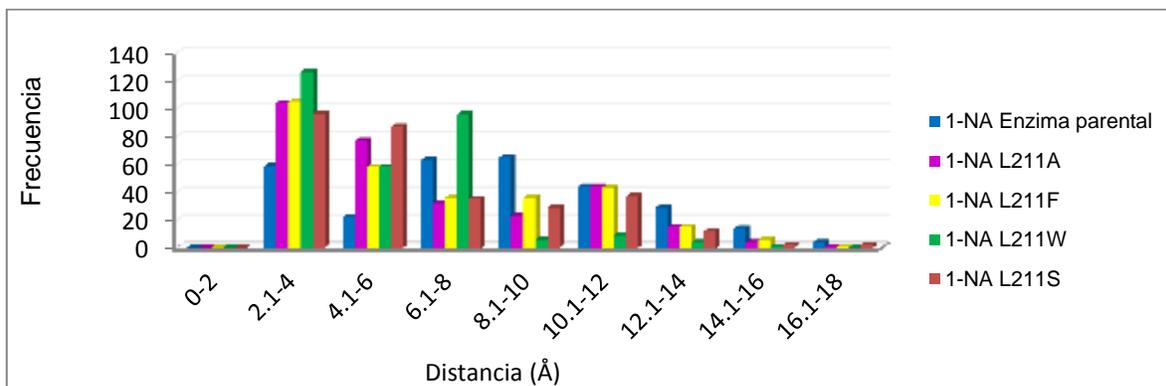


Figura 49. Distribución de frecuencias de poses para el acoplamiento molecular de las mutantes de L211 de *BaEstB* con el 1-naftil acetato, por medio del método de modos normales de vibración. Cada color representa una mutante y la enzima parental.

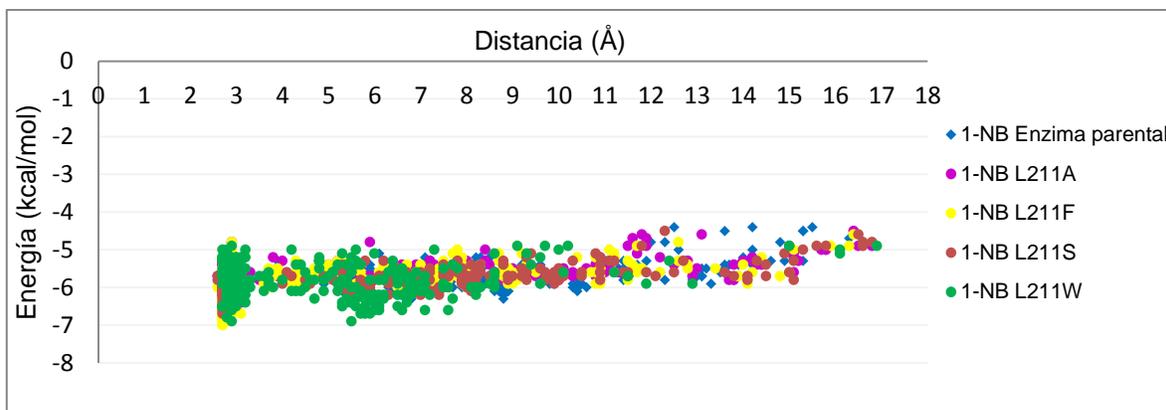


Figura 50. Dispersión de poses distancia-energía para el acoplamiento molecular de las mutantes de L211 de *BaEstB* con el 1-naftil butirato, por medio del método de modos normales de vibración. Cada color representa una mutante y la enzima parental.

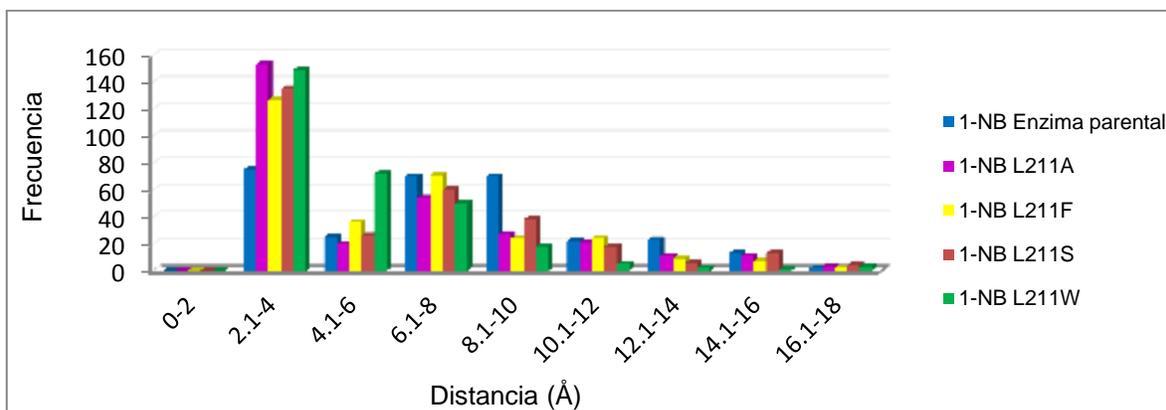


Figura 51. Distribución de frecuencias de poses para el acoplamiento molecular de las mutantes de L211 de *BaEstB* con el 1-naftil butirato, por medio del método de modos normales de vibración. Cada color representa una mutante y la enzima parental.

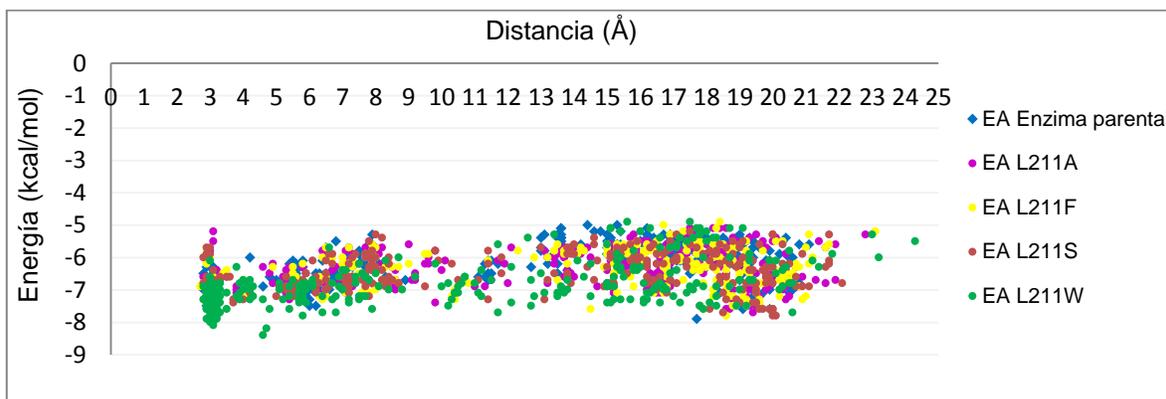


Figura 52. Dispersión de poses distancia-energía para el acoplamiento molecular de las mutantes de L211 de *BaEstB* con el ergosteril acetato, por medio del método de modos normales de vibración. Cada color representa una mutante y la enzima parental.

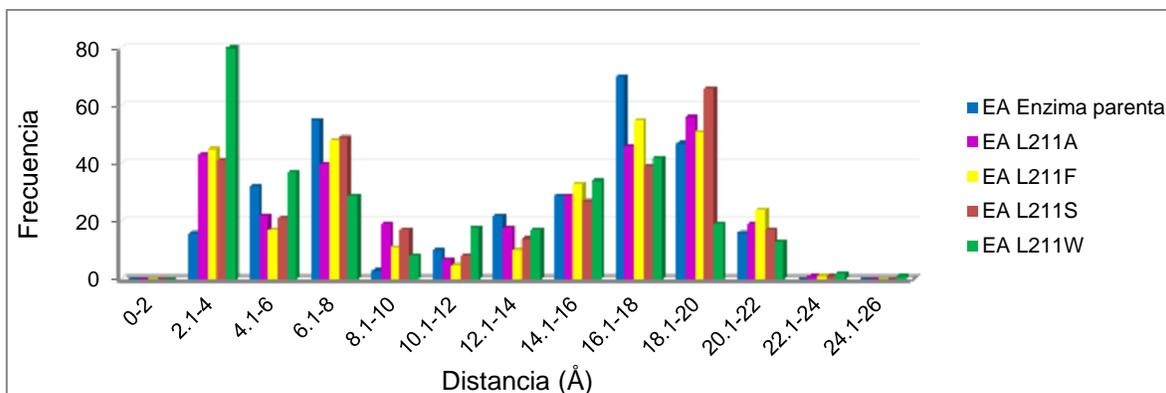


Figura 53. Distribución de frecuencias de poses para el acoplamiento molecular de las mutantes de L211 de *BaEstB* con el ergosteril acetato, por medio del método de modos normales de vibración. Cada color representa una mutante y la enzima parental.

Tabla 9. Mutaciones puntuales in silico, se muestran las mejores energías de afinidad de unión para cada uno de los sustratos analizados por acoplamiento molecular.

Sustratos		Enzima Parental		Mutantes						
		Y81	L211	Y81F	Y81W	Y81S	L211A	L211F	L211S	L211W
<i>p</i> -NPA	Energías (kcal/mol)	-5.5	-5.5	-5.5	-5.7	-6	-5.5	-5.5	-5.5	-5.5
<i>p</i> -NPB		-5.8	-5.8	-5.7	-5.9	-6.1	-6	-5.7	-6	-6
<i>p</i> -NPD		-6.2	-6.2	-6.2	-6.6	-6.5	-6.7	-6.3	-6.5	-7
1-NA		-6.1	6.1	-6.2	-6	-6.5	-6.5	-6.4	-6.4	-6.6
1-NB		-6.4	-6.4	-6.3	-6.2	-6.3	-6.5	-7	-6.7	-6.9
EA		-7.5	-7.5	-7.5	-7.5	-7.7	-7.3	-7.5	-7.5	-8.1

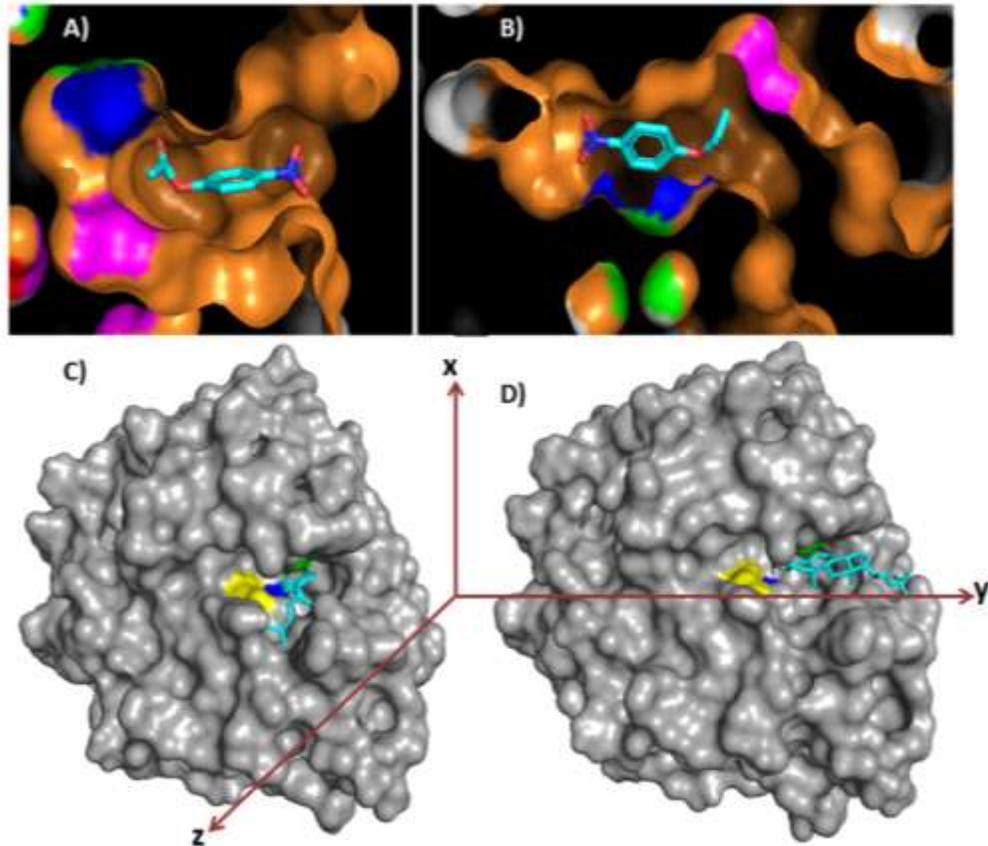


Figura 54. Representación del túnel de entrada en el acoplamiento molecular de BaEstB y su unión con sustratos. A) Túnel de la enzima parental con el sustrato *p*-NA. B) Túnel de la mutante Y81S con el sustrato *p*-NA, se observa que el túnel de entrada se alarga permitiendo al sustrato introducirse más, en comparación con la enzima parental en donde el sustrato queda muy cerca de la superficie. En azul y magenta se muestra la serina y el ácido aspártico de la triada catalítica, el verde corresponde a la mutante Y81S. C) y D) Representación en superficie rellena de la enzima parental y la mutante L211W con el ergosteril acetato, en representación de *sticks*, en la mutante se observa un cambio conformacional del túnel a una especie de hendidura en la que el ergosteril acetato se empaqueta a lo largo de esta. En azul y verde se muestra la serina y la histidina de la triada catalítica y en amarillo las glicinas 78-79 que forman la cavidad oxianiónica.

7.6 Inducción de la expresión de BaEstB

Para llevar a cabo la inducción de la expresión de la *BaEstB*, las cepas *P. pastoris* X-33/pPICZαA/*BaEstB* y X-33/pPICZαA se recuperaron a partir de un glicerol al 20% y se sembraron en una placa de Petri con medio levadura-peptona-dextrosa (YPD) y zeocina a una concentración de 100 µg/ml. Se dejaron incubar a 30°C

durante 48 horas, al igual que la cepa silvestre *P. pastoris* X-33. Posteriormente, se seleccionaron 10 colonias a partir de las placas con medio YPD con zeocina y se resembraron en placas de Petri con medio mínimo metanol (MM) y medio mínimo dextrosa (MD) por separado a 28°C por 48 horas con el fin de determinar los fenotipos Mut⁺ y Mut^s, la figura 55 muestra el crecimiento de *P. pastoris* X-33 (pPICZαA/BaEstB) en ambos medios.



Figura 55. Determinación de fenotipos Mut⁺ y Mut^s de las transformantes positivas *P. pastoris* X-33 (pPICZαA/BaEstB). Se observa un mejor crecimiento en medio mínimo metanol.

Para confirmar la integración del gen de *BaEstB* en el genoma de *P. pastoris* X-33, se realizó un PCR en colonia utilizando los oligonucleótidos de AOX 5' y 3', los resultados se muestran en la figura 56.

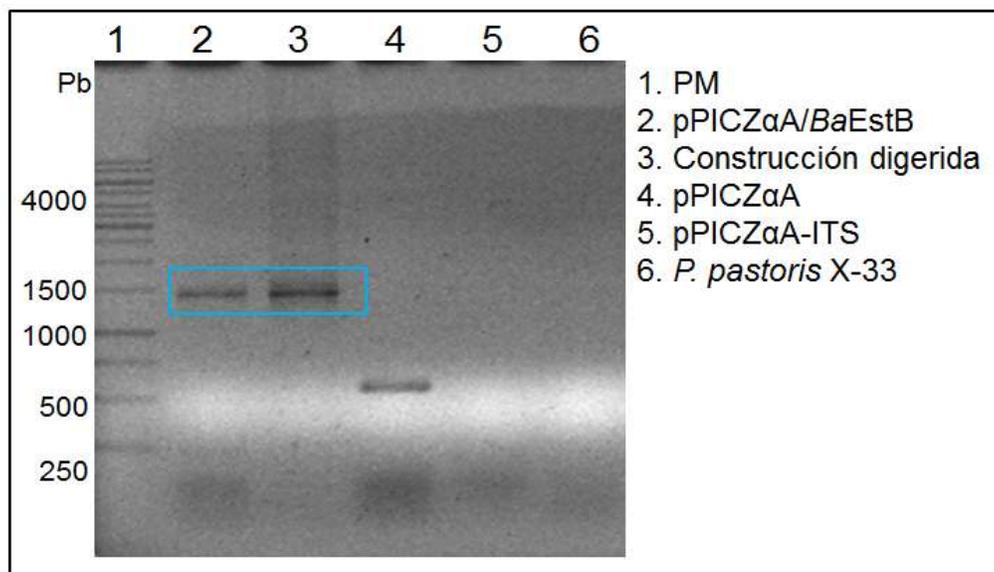


Figura 56. PCR en colonia. Se observan los pesos moleculares esperados para el gen que codifica para *BaEstB* (1500 Pb, carril 2). En el carril 3 se muestra la digestión de la construcción con las enzimas de restricción *SacI* y *XbaI*, las cuales cortan al inicio del promotor de la *AOX1* y el final del gen respectivamente. Carril 4 cepa transformada con el vector pPICZαA. El carril 6 corresponde a la cepa silvestre.

7.7 Cuantificación de la actividad esterasa

Para determinar si el sobrenadante obtenido a partir del tercer día de inducción con metanol y la enzima purificada presentaba actividad esterasa, se realizó un ensayo directo de actividad en placa de 96 pozos y se midió la absorbancia obtenida de la desesterificación del 2-naftil-acetato a naftol a una longitud de onda de 538 nm como se describe en la sección 6.8 de métodos. La aparición de color rojo en la reacción confirmó que, tanto el sobrenadante como la enzima purificada presentaron actividad esterasa (Figura 57). A partir de la absorbancia obtenida respecto al tiempo se calculó la actividad volumétrica de *BaEstB* utilizando como sustratos al 1 y 2 naftil acetato. Con base en la concentración de proteína (Anexo 7) y las actividades volumétricas se calcularon las actividades específicas. Se presentó una mayor actividad específica con el 2-naftil acetato (45.08 y 1.96 U/mg para el 2 y 1 naftil acetato, respectivamente), es decir, 23 veces más actividad específica con el 2-naftil acetato (Figura 58). Los resultados de la purificación de *BaEstB* se muestran en la tabla 9.

Con el fin de evaluar en qué medio se preservaba mejor la enzima purificada, se utilizaron 3 soluciones: Glicerol al 10 y 20% y Buffer Tris-HCl 10 Mm + Triton X-100 0.1% pH 7.0. Se calcularon las actividades volumétricas y específicas, con base en esto, la solución con glicerol al 20% mostró mejores resultados (Anexo 8).

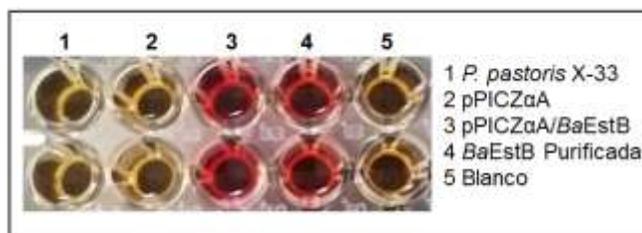


Figura 57. Ensayo cualitativo para la determinación de actividad esterasa en placa. Los pocillos 1-3 corresponden a los sobrenadantes obtenidos a partir del tercer día de inducción con metanol. Pocillo 1: cepa silvestre. Pocillo 2: cepa transformada con el vector pPICZαA. Pocillo 3: transformante con la construcción pPICZαA/BaEstB. Pocillo 4: BaEstB purificada. Pocillo 5: Blanco (medio BMGY + sustrato).

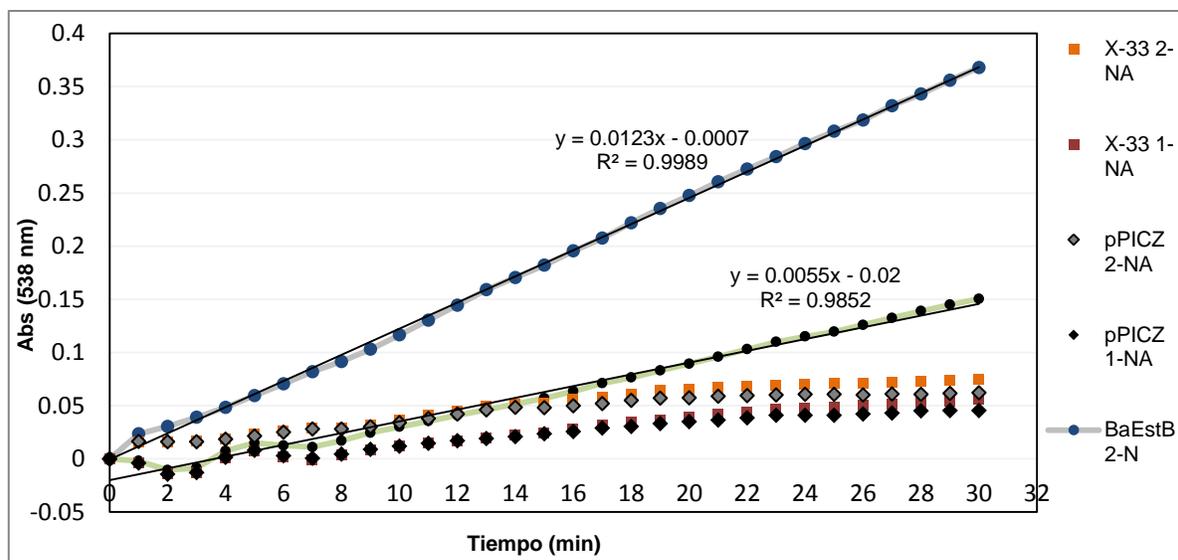


Figura 58. Absorbancia obtenida de los ensayos de actividad respecto al tiempo, utilizando como sustrato al 2-naftil acetato y al 1-naftil acetato, se utilizó como controles negativos los sobrenadantes de la cepa *P. pastoris* X-33 silvestre (cuadros naranjas y rojos) y la cepa *P. pastoris* X-33/pPICZαA (rombos grises y negros). Los círculos azules y negros corresponden a la enzima purificada.

Tabla 10. Resultados de la purificación de BaEstB del sistema de expresión heterólogo *P. pastoris*

Sustrato	Actividad volumétrica (U/mL)	Volumen (mL)	Actividad específica (U/mg)	Proteína total (mg/mL)
2-NA	0.078	1.2	45.08	0.00173
1-NA	0.0034		1.96	

7.8 SDS-PAGE y Zimograma

Se realizó un SDS-PAGE al 12% como se describe en la sección 6.3 con el objetivo de verificar la inducción e integridad de la *BaEstB*, la cual tiene un peso molecular de aproximadamente 36.9 kDa. Para comprobar la presencia de actividad esterasa se realizó un zimograma como se describe en la sección 6.4. Se observa una banda de color naranja correspondiente al peso molecular esperado para *BaEstB* (Figura 59). Estos ensayos junto con los de aumento de absorbancia respecto al tiempo confirman la presencia de actividad esterasa de la purificación por cromatografía de afinidad de níquel de la *BaEstB*.

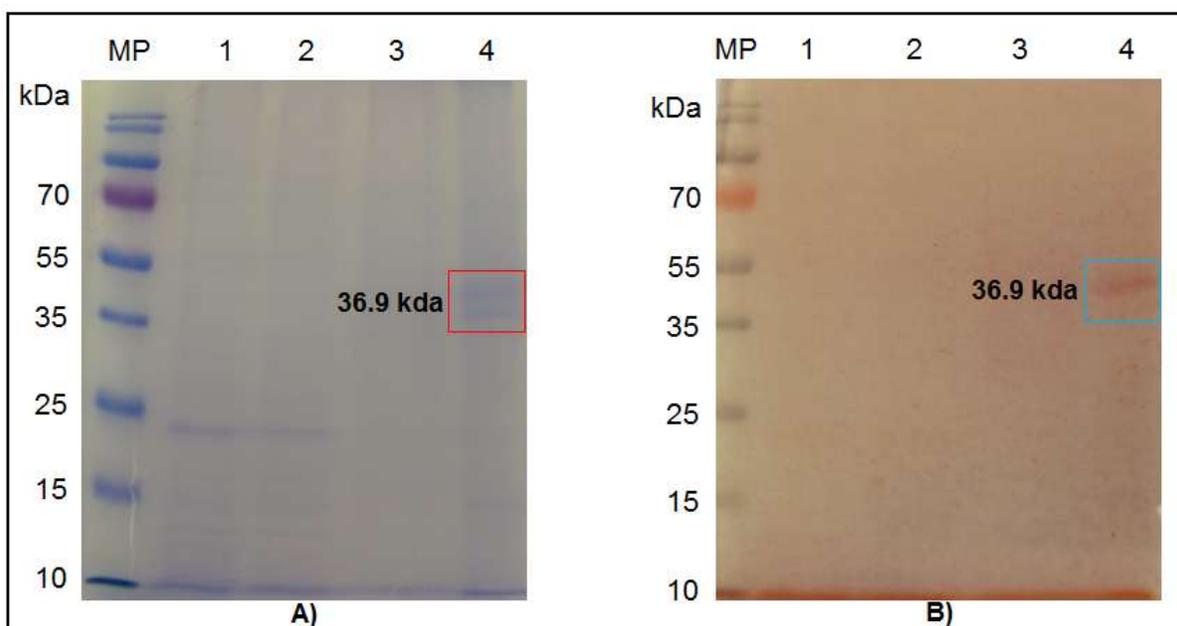


Figura 59. A) SDS PAGE al 12%. Sobrenadantes del tercer día de inducción con metanol (carriles 1,2 y 3). Carril 1: *P. pastoris* X33 silvestre; Carril 2: pPICZ α A; Carril 3: pPICZ α A/*BaEstB*. Carril 4: *BaEstB* purificada. B) Zimograma utilizando como sustrato 2-Naftil acetato, los carriles 1-4 corresponden a las mismas muestras. En ambos geles se observa la presencia de bandas que corresponden al peso molecular esperado para *BaEstB*.

7.9 HPLC y ensayo de actividad esterasa

Con el objetivo de obtener los perfiles cromatográficos del ergosterol acetilado y libre, ambos sustratos se analizaron por medio de HPLC como se describe en la

sección 7.3 de métodos. De acuerdo al cromatograma obtenido del ergosterol acetilado, el tiempo de retención fue de 20.3 minutos, se observa un pico más pequeño con un tiempo de retención de 14.05 minutos, el cual, asumimos se trataba del ergosterol libre (Figura 60). La figura 61 confirma lo anterior al mostrar un pico con un tiempo de retención de 14.13 minutos.

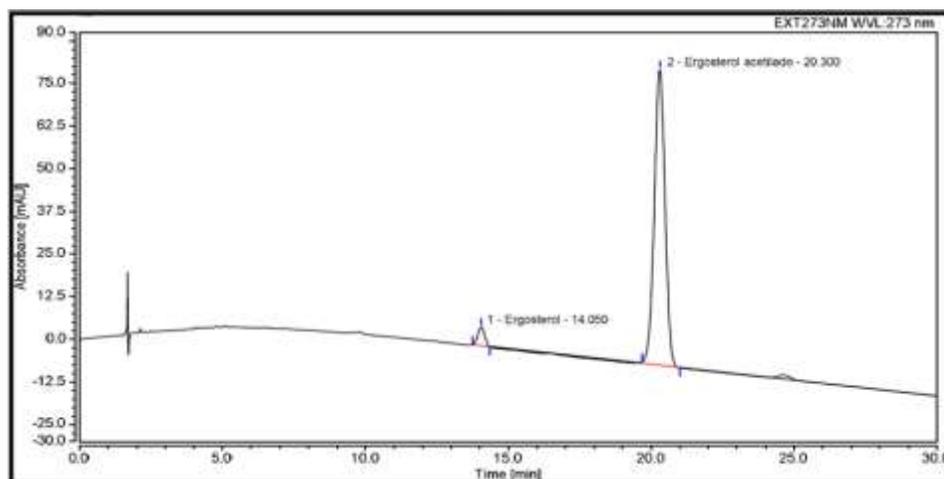


Figura 60. Cromatograma del ergosterol libre y acetilado, pico 1 y 2, respectivamente. Fase móvil: (Acetonitrilo/metanol, 85:15, v/v).

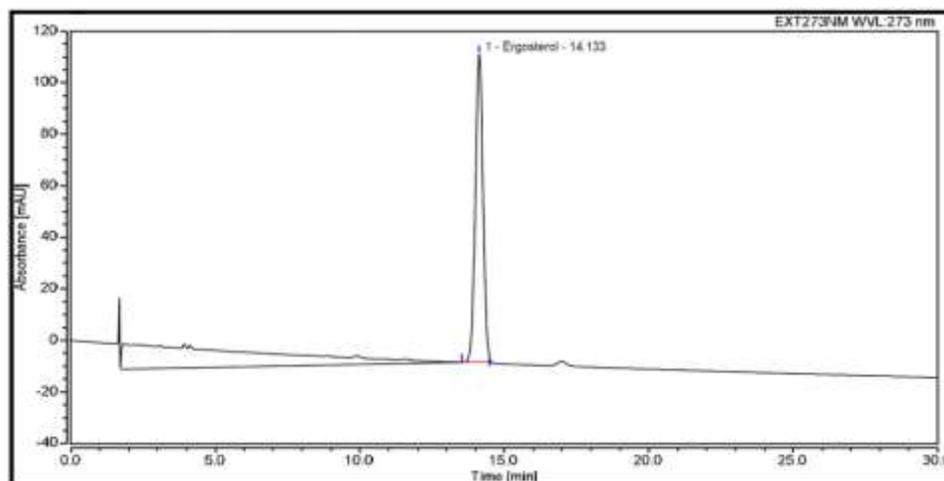


Figura 61. Cromatograma del ergosterol libre (pico1). Fase móvil: (Acetonitrilo/metanol, 85:15, v/v).

Posteriormente, se estableció el sistema de extracción de los sustratos para el ensayo de actividad esterasa, se probaron dos mezclas de solventes: 1) Metanol, cloroformo, hexano (10:9:7, v/v/v) y 2) Hexano. Las figuras 62 y 63 muestran los

cromatogramas del ergosterol acetilado, observamos que los tiempos de retención para ambos sustratos fueron muy similares (20.493 y 20.513 minutos) con la mezcla 1 y 2, respectivamente.

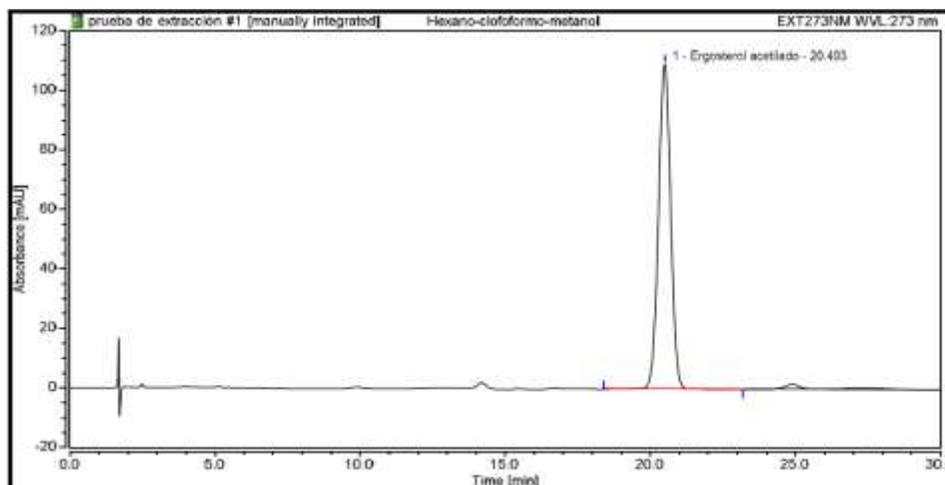


Figura 62. Cromatograma del ergosterol acetilado (pico 1). Con la mezcla de extracción metanol, cloroformo, hexano Fase móvil: (Acetonitrilo/metanol, 85:15, v/v).

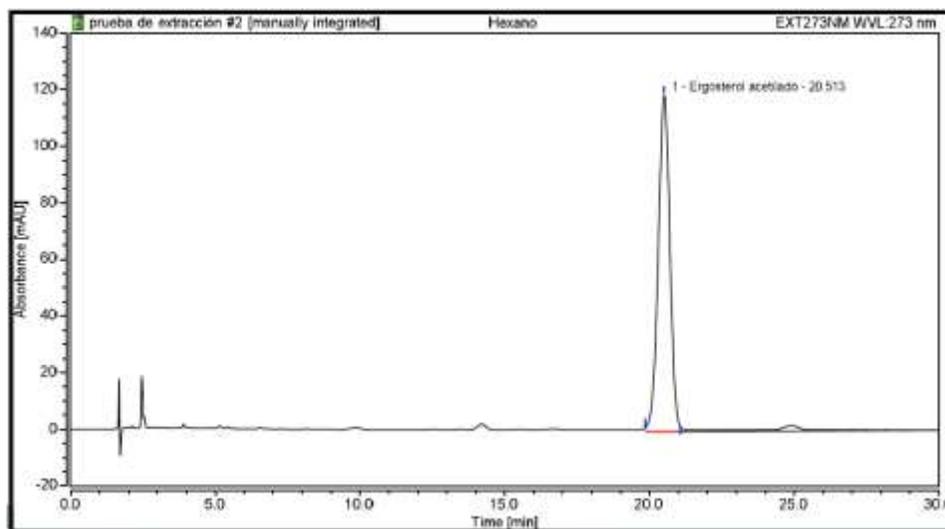
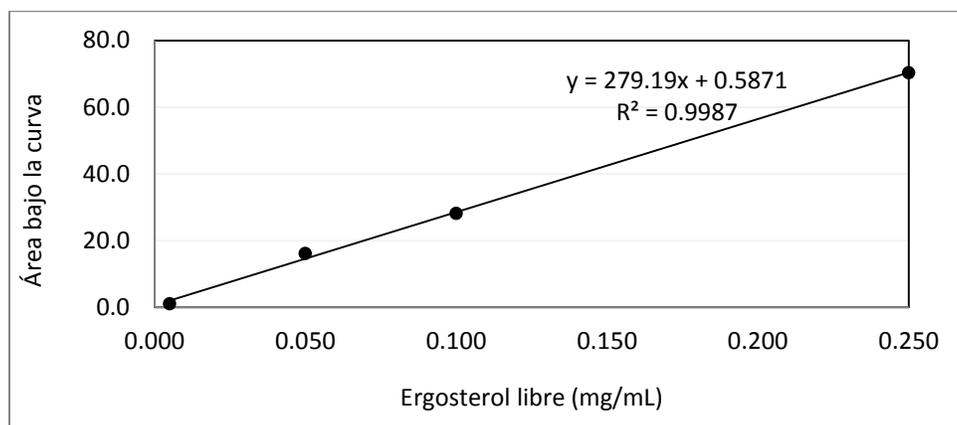
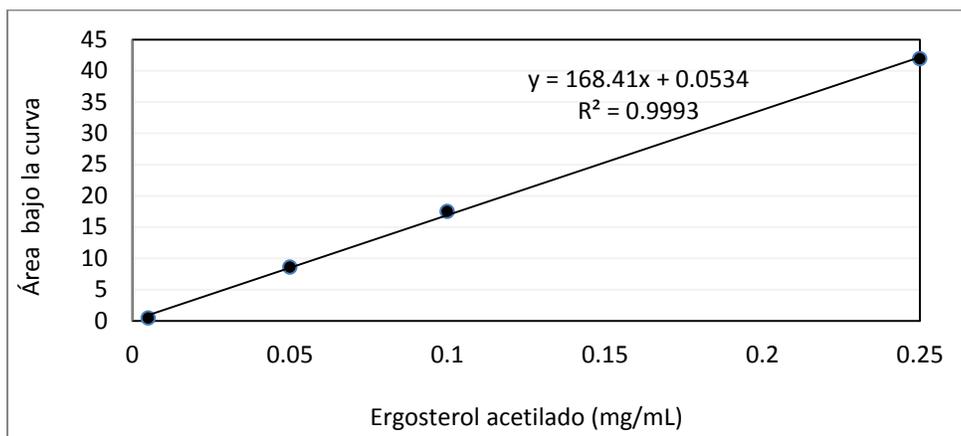


Figura 63. Cromatograma del ergosterol acetilado (pico 1). Utilizando hexano puro para la extracción. Fase móvil: (Acetonitrilo/metanol, 85:15, v/v).

Para determinar las concentraciones relacionadas a cada área bajo la curva, se realizaron curvas de calibración con diferentes concentraciones del ergosterol libre y acetilado por triplicado (0.25, 0.1, 0.05 y 0.005 mg/mL) (Figura 64).

A)



B)

Ergosterol acetilado (mg/ml)	Área bajo la curva	(mg/mL)
0.25	41.9	0.248
0.1	17.5	0.104
0.05	8.59	0.051
0.005	0.43	0.002
Ergosterol libre (mg/ml)		
0.25	70.27	0.2496
0.1	28.07	0.0984
0.05	16.09	0.0555
0.005	0.99	0.0014

Figura 64. A) Curvas de calibración del Ergosterol libre y acetilado. B) Concentraciones correspondientes a cada área bajo la curva.

Con el objetivo de verificar si *BaEstB* presentaba la capacidad de desesterificar al ergosterol acetilado, se realizaron ensayos de actividad esterasa como se describe en la sección 6.11 de métodos. La figura 65 muestra el cromatograma del control utilizado en el experimento, en el cual se utilizó únicamente al ergosterol acetilado. Las figuras 66 y 67 muestran los cromatogramas del ensayo de actividad esterasa con el ergosterol acetilado y con 100 y 200 ng de la enzima purificada, respectivamente. Asumimos que una disminución en el área bajo la curva correspondiente al ergosterol acetilado nos estaría indicando que la enzima está hidrolizando el sustrato. Al cuantificar la concentración correspondiente a cada área bajo la curva de los tratamientos y el control, se observa una disminución en la concentración del sustrato. En el tratamiento 1 con 100 ng de *BaEstB* purificada se obtuvo una concentración de 0.298 mg/mL mientras que en el tratamiento 2 con 200 ng de enzima, una concentración de 0.166 mg/mL lo cual corresponde aproximadamente a una disminución del doble en la concentración de sustrato respecto al tratamiento. Estos resultados indican que hubo una disminución en la concentración del sustrato del 29.2 y 60.5% con respecto al control (Tabla 10).

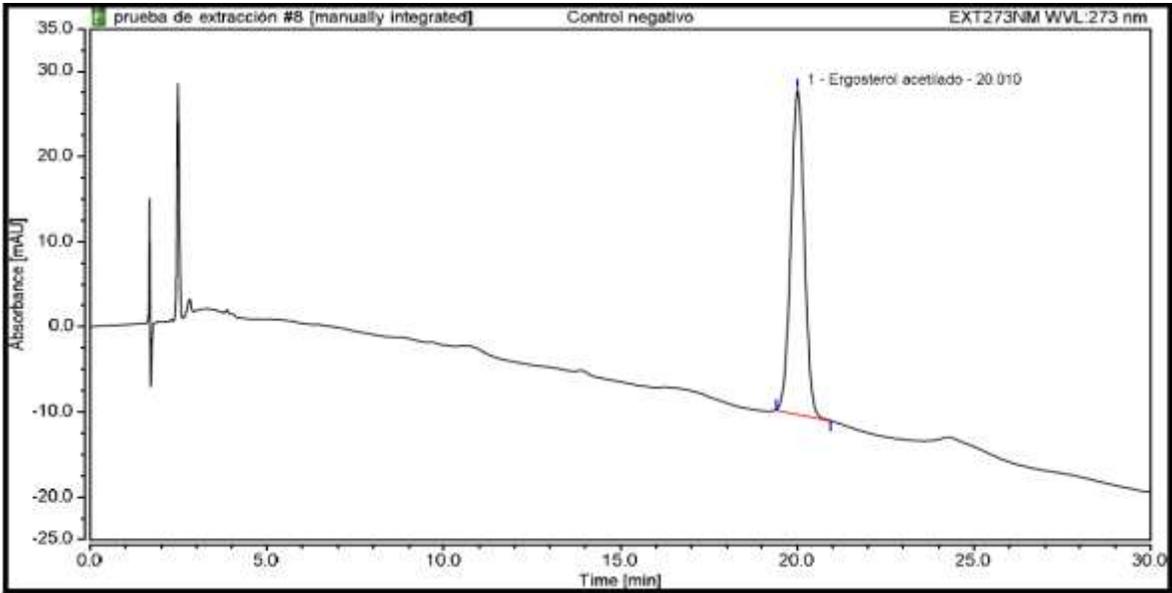


Figura 65. Cromatograma del ergosterol acetilado sin enzima (control-). Fase móvil: (Acetonitrilo/metanol, 85:15, v/v).

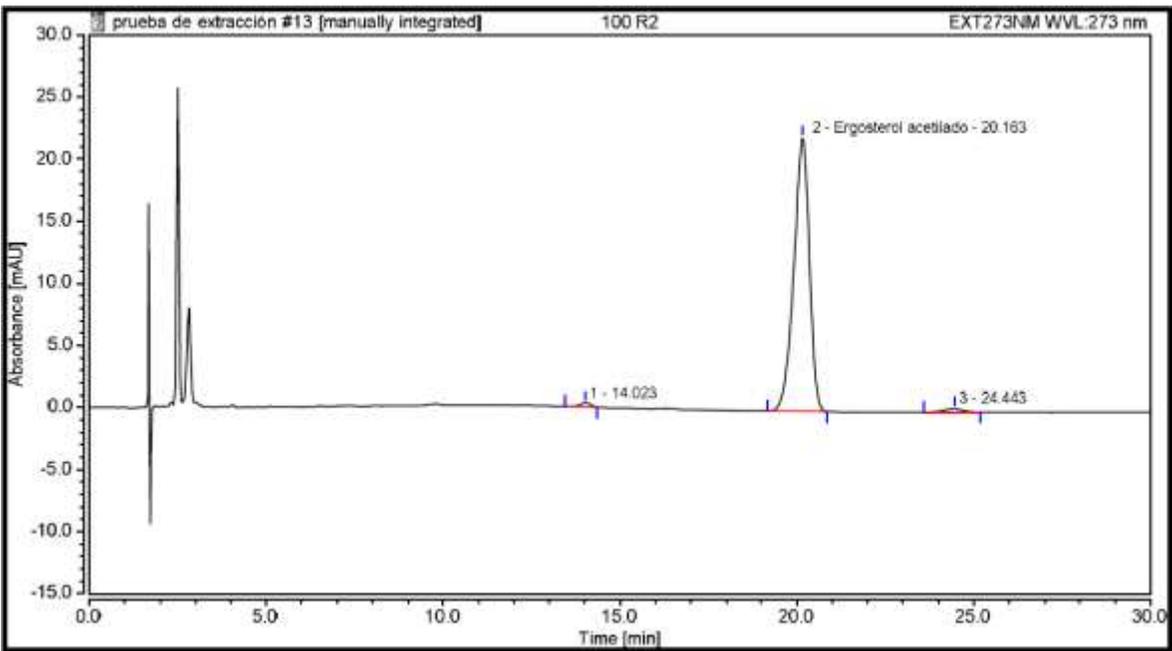


Figura 66. Cromatograma del tratamiento 1 con *BaEstB* purificada (100 ng) + ergosteril acetato. Fase móvil: (Acetonitrilo/metanol, 85:15, v/v).

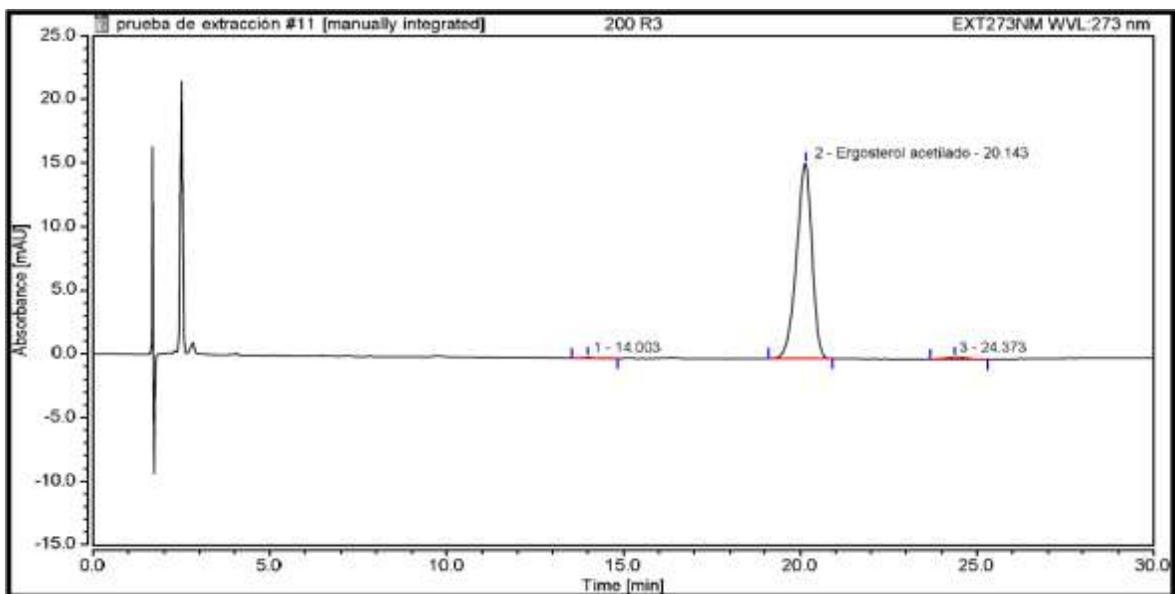


Figura 67. Cromatograma del tratamiento 2 con *BaEstB* purificada (200 ng) + ergosteril acetato. Fase móvil: (Acetonitrilo/metanol, 85:15, v/v).

Tabla 11. Resultados del ensayo de actividad esterasa con *BaEstB* purificada y ergosterol acetilado (Los resultados se representan como media \pm desviación estándar)

Tratamientos	Área bajo la curva	Concentración de sustrato (mg/mL)	Concentración de sustrato (%)
Control	40.684 \pm 2.385	0.421 \pm 0.02	100
<i>BaEstB</i> (100 ng) + S	26.684 \pm 6.519	0.298 \pm 0.01	29.2
<i>BaEstB</i> (200 ng) + S	13.966 \pm 2.0	0.166 \pm 0.06	60.5

8 DISCUSIÓN

Construcción de árboles filogenéticos y estructuras 3D

Con el fin de tener información respecto a la existencia de otras HSL tanto en *B. adusta*, en otros basidiomicetos y otros hongos filamentosos que sean fáciles de manipular genéticamente, se realizaron análisis filogenéticos. Con la suma de estos resultados y la superposición estructural por homología podemos sugerir que la feruloil esterasa PDB 4zrsA es un ortólogo de *BaEstB*, hasta el momento, el modelo generado con *BaEstB/4zrsA* es el que mayor porcentaje de identidad presenta (22.2%), seguido de un 13.4% de identidad presente entre *BaEstB/HSL Aspergillus sidowii*. El modelo generado con *BaEstB/RmEstB-PDB 4wy8* presentó un 12.73% de identidad. En 2017, Sánchez-Carbente y colaboradores ya habían reportado a *RmEstB* como un ortólogo de *BaEstB* con un 16.9% de identidad, este cambio no es raro ya que con el paso del tiempo las bases de datos como UniProt y Protein Data Bank se actualizan constantemente. Es interesante ver como secuencias de aminoácidos tan divergentes conservan plegamientos muy conservados y característicos, tal es el caso de las HSL de *Mus musculus* (ratón común) y de *Necator americanus* (un nematodo parásito de varios mamíferos incluido el hombre) las cuales presentan el plegamiento α/β hidrolasa canónico de esterasas al igual que la triada catalítica Ser-His-Asp, las dos glicinas centrales del tetrapéptido HGGG y la secuencia consenso GDSAG. Como se observa en la figura 16 las HSL de *Mus musculus* y de *Necator americanus* presentan una identidad de 12.6% y 10.3% respectivamente, al modelarse con *BaEstB*. Es evidente que la región menos conservada es el dominio Cap, en donde el *loop* que conecta a las α hélice se ve interrumpido por una pequeña región α hélice, lo mismo ocurre en el dominio Cap de *RmEstB*. Estos resultados no son inusuales, de acuerdo a los alineamientos múltiples de aminoácidos, estas regiones tienen los menores porcentajes de identidad (Yang *et al.*, 2015).

En cuanto a la construcción de los árboles filogenéticos, se utilizó, en un primer momento con el algoritmo de agrupamiento basado en distancias Neighbor Joining y posteriormente con el algoritmo de máxima verosimilitud utilizando diferentes

modelos de sustitución de aminoácidos (Ver anexos y figura 13). Estos mostraron topologías y agrupaciones similares, por ejemplo, en todos los casos *BaEstB* se agrupó con la feruloil esterasa con soportes bootstrap de 0.99 y 1. Podemos observar que la filogenia forma grupos coherentes: en primer lugar todas las secuencias pertenecen a la Familia IV HSL, vemos también la formación de subclados que presentan la secuencia consenso GTSAG y GDSAG en donde encontramos por ejemplo secuencias de HSL de mamíferos y bacterias, respectivamente. Dicho pentapéptido puede estar sustituido por diferentes residuos de aminoácidos en la segunda y cuarta posición, en este caso, dos especies del género *Aspergillus* presentan la secuencia GFSAG, mientras que *BaEstB* y HSL2 de *T. atroviride* presentan las secuencias GHSAG y GSSAG respectivamente. En dos de las filogenias construidas con máxima verosimilitud se muestra que una HSL de *Trichoderma atroviridae* se encuentra estrechamente relacionada con *BaEstB* y la feruloil esterasa 4zrsA. Estos resultados son alentadores ya que *Trichoderma atroviridae* resulta ser un buen modelo de manipulación genética y de interés biotecnológico para nuestro laboratorio, además, podríamos utilizarlo como modelo para realizar las mutantes Y81S y L211W y llevar a cabo una caracterización fisiológica de la función de la enzima.

Estos resultados son consistentes con un estudio anterior en algunos aspectos, a saber, las HSL de *R. miehei* (*RmEstA* y *RmEstB*) se agrupaban con la HSL-carboxilestera de *Sulfolobus tokodaii* (una arquea termofílica, acidófila) y una HSL-lipasa de *Moraxella* sp. (Sánchez-Carbente *et al.*, 2017). En el presente estudio *RmEstA* y *RmEstB* se agrupan con una HSL-carboxilestera de *Ferroplasma acidophilum*, esta especie también pertenece al dominio Archaea y se trata de un mesófilo, acidófilo. Asimismo se agrupan con la HSL-lipasa de *Moraxella* sp.

Finalmente, se observa la formación de varios grupos monofiléticos, como el del grupo de los mamíferos. Es interesante notar que no se separan completamente de los demás clados a pesar de tratarse de secuencias tan alejadas evolutivamente, sin embargo, se sabe que las HSL de mamíferos se encuentran

más relacionadas filogenéticamente con HSL procarióticas que con algunas lipasas de mamíferos, como la lipasa pancreática. Esta noción está soportada por las diferencias estructurales que tienen ambos grupos de HSL (Anexo y figura 6). Las HSL de mamíferos presentan un dominio N-terminal considerablemente más grande, (aproximadamente 270 residuos de aminoácidos), además de un módulo regulador en la región C-terminal, que es exclusivo de estas, dicha región contiene cuatro residuos de serina conocidos por ser fosforilados por la proteína kinasa A (PKA). El dominio catalítico muestra una alta similitud con las esterasas/lipasas de la familia IV de procariotas, lo que indica que las HSL de mamíferos probablemente evolucionaron a partir de enzimas de la familia IV de procariotas.

Acoplamiento molecular

Los resultados de acoplamiento molecular son consistentes con los resultados experimentales obtenidos por Sánchez-Carbente y colaboradores en 2017, quienes observaron por pruebas bioquímicas que la mayor actividad específica de la *BaEstB* fue con el 2-naftil acetato, seguido de *p*-NP acetato y *p*-NP butirato, con el *p*-NP decanoato y *p*-NP palmitato no se presentó actividad. Ambos resultados sugieren que *BaEstB* tiene preferencia por sustratos con ésteres de cadenas cortas.

Un comportamiento similar se reportó con *RmEstB* su ortólogo en *Rhizomucor miehei* la cual mostró mayor actividad de hidrólisis frente al *p*-NP acetato. Además, los análisis de docking apuntan a que la especificidad de la *BaEstB* se relaciona con la voluminosidad de los sustratos, ya que de los nueve sustratos analizados el ergosteril acetato, colesteril acetato y feruloil arabinofuranosa, los más voluminosos y de mayor peso molecular, presentaron las mejores energías de afinidad de unión donde la mejor interacción se determinó con el ergosteril acetato. Ahora bien, es importante destacar que el tamaño de las cadenas alifáticas de los *p*NP ésteres sustituidos analizados en el estudio, también desempeñan un papel importante, como se describió en la sección de resultados. Finalmente, la regioselectividad de *BaEstB* mostró igualmente ser crucial en la especificidad por algunos sustratos, particularmente del 2-naftil acetato y 1-naftil

acetato, esta noción fue respaldada con los ensayos de actividad esterasa, en los que la mayor actividad fue con el 2-naftil acetato.

Si bien, el mecanismo de acción es prácticamente idéntico en todas las α/β hidrolasas, la especificidad por los sustratos es muy diferente y no se han aclarado las razones de este fenómeno a nivel estructural. Se ha propuesto que la preferencia por estos sustratos voluminosos está dada por la arquitectura del sitio de unión al sustrato, por ejemplo, algunas acetil xilano esterasas muestran una baja actividad frente sustratos pequeños como el *p*-NP acetato, pero una alta actividad frente al xilano, estas enzimas reconocen, además del residuo de azúcar acetilado, varios residuos de azúcares cercanos a la cadena principal del polisacárido (Byeli, 2012). Además, se ha planteado que la arquitectura del túnel de entrada para el sustrato juega un papel importante. De acuerdo con el modelaje 3D del túnel de la HSL *RmEstA*, de *R. miehei*, se observó que el túnel atravesaba prácticamente toda la enzima y que esta tenía mayor especificidad por sustratos largos (Yang *et al.*, 2015). No obstante, los túneles de *BaEstB* y *RmEstB* con similitud estructural son cortos y ligeramente curvados (Figura 54).

El análisis de alineamientos múltiples de secuencias de aminoácidos relacionados con la unión de los sustratos, particularmente de aquellos que son clave en la especificidad del sustrato, sugiere que las cadenas laterales de estos aminoácidos voluminosos situados en el túnel de entrada crean impedimentos estéricos que disminuyen la actividad frente a sustratos de mayor tamaño. Por ejemplo, las esterasas de *Escherichia coli* PDB 4KRY, (Acido glutámico); *Lactobacillus plantarum*, 4C87, (Treonina); *R. miehei*, 4WY8, (Fenilalanina) presentan mayor especificidad para *p*-nitrofenil acetato (C2). Mientras que las esterasas de *Alicyclobacillus acidocaldarius* 1QZ3, (Leucina); *Pirobaculum calidifontis* 2YH2 (Glicina); *R. miehei* 4WY5, (Serina) presentan mayor especificidad para *p*-nitrofenil hexanoato (C6) y *p*-nitrofenil octanoato (C8) (Ver antecedentes). Aunado a esto, la comparación estructural del túnel de entrada y del análisis de mutagénesis dirigida apoyan esta noción (Yang *et al.*, 2015). Al igual que la HSL *RmEstB* de *R. miehei*, *BaEstB* tiene un aminoácido aromático en

la posición 81, en este caso una tirosina y hemos demostrado previamente que esta tiene preferencia por sustratos pequeños como el 2-naftil acetato (C2) y *p*-nitrofenil acetato (C2). En nuestro estudio, las mutaciones puntuales *in silico* indican que el papel clave de la especificidad de *BaEstB* por uno u otro sustrato está relacionado con los grupos funcionales presentes en estos aminoácidos, como es el caso de la mutante Y81S en donde el grupo hidroxilo de la serina podría estar formando puentes de hidrogeno más estables, en comparación con los puentes de hidrogeno que se forman con el grupo amino de la cadena lateral del triptófano, esta noción se respalda con la mutante Y81F, la fenilalanina carece del grupo hidroxilo y en general esta mutante presentó la peores energías de afinidad de unión (Tabla 9). El largo de las cadenas laterales y la voluminosidad de los aminoácidos también parecen determinar la especificidad, como se observó en las mutantes de L211, en donde de las 4 mutantes analizadas L211W presentó mejores energías de afinidad de unión que L211S, L211A y L211F.

Evaluamos siete mutaciones puntuales de los aminoácidos implicados con el sitio de unión al sustrato, primeramente para Y81, en donde las mejores energías de unión se encontraron con la mutante Y81S para todos los sustratos analizados a excepción del 1-naftil butirato. Posteriormente para L211, esta vez las mejores energías de unión se obtuvieron con la mutante L211W para todos los sustratos analizados. Desde los primeros análisis de acoplamiento molecular con la enzima parental se observó que las mejores energías de unión se presentaban con los sustratos más voluminosos, es decir, con el ergosteril acetato y colesteril acetato, con los posteriores análisis de mutaciones puntuales, se repitió el mismo comportamiento y de las mutaciones que se hicieron para Y81 y L211, en todos los casos las mejores energías de unión se presentaron con el ergosteril acetato, cabe destacar que la mutante L211W, presentó la mayor energía de afinidad de unión, la cual fue de -8.1 kcal/mol de hecho la mejor para todas las mutantes y todos los sustratos analizados. Por lo cual podemos proponer a las mutantes Y81S y L211W como candidatos experimentales.

Expresión de *BaEstB* en *P. pastoris* X-33 y purificación

Se llevó a cabo la expresión heteróloga de *BaEstB* en *P. pastoris* X-33 y su posterior purificación por medio de cromatografía de afinidad de níquel, los resultados son consistentes con lo reportado por Carbente y colaboradores en 2016, a saber, *BaEstB* presenta un peso molecular aproximado de 39 kDa de acuerdo a los SDS-PAGE de los extractos crudos de diferentes horas de inducción con metanol, de la purificación y de la aparición de una sola banda en el zimograma (Figura 59). En el SDS-PAGE correspondiente a la purificación de *BaEstB* se observa la presencia de una banda de mayor peso molecular al esperado, lo cual podría indicar la incorporación de modificaciones postraduccionales como glicosilaciones. Con base en la cuantificación de proteína por el método de Bradford determinamos la concentración de *BaEstB* purificada (Tabla 10) la cual se utilizó para los posteriores ensayos de actividad esterasa con 1-NA, 2-NA y con el ergosterol acetilado.

Ensayos de actividad esterasa con 1-NA, 2-NA y ergosterol acetilado

Para la detección de actividad enzimática tipo esterasa, el 1-naftil acetato y 2 naftil acetato han sido utilizados ampliamente como sustratos (citas). Estos son sustratos cromogénicos artificiales de fácil disponibilidad y ofrecen la ventaja de poder usarse en métodos espectrofotométricos rápidos, sin embargo, en general son poco específicos. En nuestro estudio determinamos la actividad esterasa de *BaEstB* en términos de actividad volumétrica y específica, se utilizó como controles negativos los sobrenadantes del tercer día de inducción con metanol de las cepas *P. pastoris* pPICZ α A y *P. pastoris* X-33. *BaEstB* mostró una mayor especificidad frente al 2-naftil acetato, cuando se incubó *BaEstB* con el 1-naftil acetato, la actividad decayó 23 veces aproximadamente (Figura 58 y Tabla 10). Estos resultados son congruentes con los análisis de acoplamiento molecular, en los que precisamente evaluamos la interacción de *BaEstB* con ambos sustratos. La mayor energía de afinidad de unión se presentó con el 2-naftil acetato al igual que la mayor frecuencia de interacciones enzima-sustrato cercanas al sitio activo.

Para determinar si *BaEstB* presentaba actividad esterasa frente al ergosterol acetilado, se realizaron ensayos de acuerdo al método de Eichmann y colaboradores (2016) con algunas modificaciones (ver sección de métodos). Los ensayos arrojaron resultados interesantes, primeramente y el más importante, indica que *BaEstB* tiene la capacidad de hidrolizar al ergosterol acetilado y que la actividad esterasa es dependiente de la concentración de enzima, es decir, se comparó la concentración del control con respecto a los tratamientos 1 y 2 con la enzima y se observó una disminución en la concentración del sustrato del 29.2 y 60.5% respectivamente (Figuras 65-67 y Tabla11).

Los resultados experimentales entran en sintonía con los resultados de acoplamiento molecular, ya que desde los primeros análisis con la enzima parental de los 9 sustratos evaluados, con el ergosteril acetato se presentó la mejor energía de afinidad de unión y el efecto mejoró considerablemente con las mutantes Y81S y L211W evaluadas posteriormente, estas fueron las primeras evidencias *in silico* de que la HSL *BaEstB* podría hidrolizar otros sustratos esterificados, particularmente, ergosterol y colesterol.

La Importancia de los esteroides en los hongos

En la naturaleza el ergosterol libre y esterificado es sintetizado por hongos ascomicetos y basidiomicetos y tiene diferentes funciones fisiológicas. El ergosterol libre se encuentra principalmente en la membrana plasmática, allí contribuye en la fluidez, la permeabilidad y la integridad de la membrana, mientras que el ergosterol esterificado se encuentra en partículas lipídicas citosólicas, donde puede servir como fuente de reserva de energía o bien, actuar como fuente de ergosterol libre una vez que se hidroliza para la biosíntesis de membrana (Shobayashi *et al.*, 2005). Se ha reportado que existen diferencias en la tasa de acumulación de uno u ergosterol en distintas partes del cuerpo fructífero de hongos agáricos (Yuan *et al.*, 2008). Estas diferencias están relacionadas con las necesidades metabólicas de las células, por ejemplo, ocurre una mayor acumulación de ergosterol total esterificado durante la fase estacionaria de

crecimiento y de esporulación (Taylor y Parques 1978) y el desarrollo del asca en *Saccharomyces cerevisiae* (Illingworth *et al.*, 1973).

Si bien el esteroles predominante en la mayoría de hongos basidiomicetos y ascomicetos es el ergosterol, en algunos hongos el esteroles mayoritario es el colesterol, como es el caso de varias especies de los phylum Blastocladiomycota y Chytridiomycota (Weete, Abril, & Blackwell, 2010). Durante el proceso evolutivo cada reino ha seleccionado sus propios esteroides, es interesante destacar que el ergosterol no se encuentra en los primeros linajes de hongos y al parecer el colesterol no se produce en hongos divergentes posteriores (Ver anexos). No se conocen las presiones de selección que impulsaron el cambio de colesterol a ergosterol, de hecho se requiere más energía para la síntesis del ergosterol y se ha demostrado en sistemas de membrana artificial que el colesterol es funcionalmente más competente (Weete *et al.*, 2010).

En cuanto a las partículas lipídicas, gotas lipídicas o *droplets* de todas las especies de células de mamíferos, plantas y levaduras, estas son partículas formadas por una monocapa de fosfolípidos que almacenan lípidos de diferente composición, por ejemplo, las partículas lipídicas de adipositos contienen principalmente triacilglicerol y esteroides de colesterol en células esteroideogénicas, mientras que en las levaduras los esteroides de ergosterol y triacilglicerol están presentes en cantidades aproximadamente iguales. Hasta el momento se desconoce el mecanismo de almacenamiento de estos lípidos, cómo se empaquetan y finalmente cómo se hidrolizan.

Lipasas sensibles a hormonas

En mamíferos el paso limitante de la velocidad de hidrólisis de triacilglicerol está dado por las HSL, las cuales hidrolizan principalmente el diacilglicerol para generar ATP, aunque también pueden catalizar la hidrólisis de monoacilglicerol. Además se ha sugerido que participan en el proceso de esteroideogénesis al proporcionar colesterol libre para la síntesis de esteroides (Yeaman, 1990; Cook & Yeaman, 1982). Por otra parte varias hormonas esteroides se almacenan en las células en forma de ésteres de ácidos grasos, y es probable que HSL sea la

esterasa que hidroliza estos ésteres esteroides (Lee, Adams, Garton, & Yeaman, 1988). Actualmente se encuentran depositadas varias estructuras cristalográficas de HSL de bacterias, hongos y obtenidas a partir de metagenomas. En mamíferos a pesar de ser ampliamente estudiadas y caracterizadas no se cuenta con ninguna cristalografía de rayos x.

Las HSL de bacterias y hongos han sido caracterizadas bioquímicamente utilizando básicamente sustratos sintéticos como los *p*-nitrofeniles de diferentes tamaños de cadenas alifáticas, los cuales han sido cruciales para determinar su especificidad, y su comportamiento cinético frente a diversas condiciones como pH, de salinidad, termoestabilidad, o bien el efecto que tienen diferentes solventes, iones y detergentes en su actividad. Otros estudios se han enfocado en llevar a cabo mutaciones puntuales de los aminoácidos implicados en la unión con el sustrato para mejorar su actividad, o bien, caracterizaciones estructurales por medio del modelado por homología u otros métodos. Sin embargo, hasta el momento, el papel fisiológico que tienen las HSL de hongos y bacterias es desconocido.

En nuestro estudio evaluamos la interacción de la HSL *BaEstB* de *B. adusta* con diferentes sustratos esterificados entre ellos el colesterol y ergosterol acetato por medio de acoplamiento molecular así como la actividad esterasa con el ergosterol acetilado. Los análisis *in silico* señalan que la HSL *BaEstB* podría hidrolizar el colesterol y ergosterol acetato, en la parte experimental, los ensayos de actividad esterasa apuntan a que la enzima puede utilizar como sustrato al ergosterol acetilado. Si bien las HSL no tienen la capacidad de hidrolizar fosfolípidos, de acuerdo a nuestros resultados podemos sugerir que estas podrían estar participando en el proceso de hidrolisis del ergosterol esterificado almacenado en las partículas lipídicas del citoplasma de hongos con ayuda de otras enzimas para facilitar el acceso a estos sustratos, tal y como se ha propuesto en el proceso de hidrolisis de triacilgliceridos o ésteres de colesterol en células de mamíferos.

9 CONCLUSIONES

- De acuerdo con los análisis filogenéticos y de superposición estructural por homología, podemos sugerir que la feruloil esterasa 4zrsA es un ortólogo de *BaEstB* y se encuentra estrechamente relacionada con una HSL de *Trichoderma atroviride*.
- Se obtuvieron 6 modelos de *BaEstB* superpuesta con diferentes HSL, las cuales muestran un plegamiento considerablemente parecido al de *BaEstB* y en general al plegamiento α/β hidrolasa.
- De acuerdo con los análisis de acoplamiento molecular, la mejor energía de unión fue con el ergosteril acetato, seguida del colesterol acetato, por lo cual podemos sugerir que la enzima podría hidrolizar al ergosteril acetato; sin embargo, es necesario validar esta información experimentalmente.
- De acuerdo con las comparaciones de los análisis de acoplamiento molecular con los diferentes ésteres de *p*-nitrofenilo, estos reflejan la tendencia de presentar una mayor frecuencia de poses a menor tamaño del sustituyente del grupo éster.
- Se generaron 7 mutaciones puntuales *in silico* y se analizaron por acoplamiento molecular, los resultados sugieren que las mutantes Y81S y L211W favorecería la interacción con *p*-nitrofenilos de cadena larga y con el ergosteril acetato, respectivamente, lo cual resultaría en una mayor actividad enzimática.
- Las actividades volumétricas y específicas reflejan la preferencia de la *BaEstB* frente al 2-naftil acetato.
- Se desarrolló un método de HPLC para la detección y evaluación de actividad esterasa, los resultados indican que la HSL *BaEstB* tiene la capacidad de hidrolizar el ergosterol acetilado y que la actividad es dependiente de la concentración de enzima.

10 PERSPECTIVAS

Purificar el ergosterol total esterificado obtenido del micelio de *B. adusta* u otros hongos y determinar si *BaEstB* muestra actividad esterasa frente a estos sustratos.

Evaluar la actividad esterasa con algún colesterol esterificado (Colesterol palmitato).

Llevar a cabo las mutaciones puntuales *in vitro* por medio de PCR-All around de los aminoácidos implicados con la unión del sustrato.

11 BIBLIOGRAFÍA

- Arner, P., & Langin, D. (2007). The role of neutral lipases in human adipose tissue lipolysis. *Current Opinion in Lipidology*, 18(3), 246–250. <https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e32811e16fb>
- Arpigny, J. L., & Jaeger, K. (1999). <Arpigny 1999.pdf>. 183, 177–183. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3430177>
- Belcarz, A., Ginalska, G., & Kornilowicz-Kowalska, T. (2005). Extracellular enzyme activities of *Bjerkandera adusta* R59 soil strain, capable of daunomycin and humic acids degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(5), 686–694. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-1918-1>
- Bornscheuer, U. T. (2002). 2689050368Es_Classification.Pdf. 26, 73–81.
- Brocca, S., Secundo, F., Ossola, M., Alberghina, L., Carrea, G., & Lotti, M. (2009). Sequence of the lid affects activity and specificity of *Candida rugosa* lipase isoenzymes. *Protein Science*, 12(10), 2312–2319. <https://doi.org/10.1110/ps.0304003>
- Cereghino, J. L., & Cregg, J. M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(1), 45–66. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(99\)00029-7](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(99)00029-7)
- COOK, K. G., YEAMAN, S. J., STRALFORS, P., FREDRIKSON, G., & BELFRAGE, P. (1982). Direct Evidence that Cholesterol Ester Hydrolase from Adrenal Cortex is the Same Enzyme as Hormone-Sensitive Lipase from Adipose Tissue. *European Journal of Biochemistry*, 125(1), 245–249. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1982.tb06675.x>
- Cruz, H., Pérez, C., Wellington, E., Castro, C., & Servín-González, L. (1994). Sequence of the *Streptomyces albus* G lipase-encoding gene reveals the presence of a prokaryotic lipase family. *Gene*, 144(1), 141–142. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(94\)90220-8](https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)90220-8)
- David, L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Sybille, M., ... Goldman, A. (1992). The α/β hydrolase fold. *Protein Engineering, Design and Selection*, 5(3), 197–211. <https://doi.org/10.1093/protein/5.3.197>

- De Simone, G., Mandrich, L., Menchise, V., Giordano, V., Febbraio, F., Rossi, M., ... Manco, G. (2004). A substrate-induced switch in the reaction mechanism of a thermophilic esterase: Kinetic evidences and structural basis. *Journal of Biological Chemistry*, 279(8), 6815–6823. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307738200>
- Fojan, P., Jonson, P. H., Petersen, M. T. N., & Petersen, S. B. (2000). *Esterase and lipase difference*. 82.
- Galleni, M., Lindberg, F., Normark, S., Cole, S., Honore, N., Joris, B., & Frere, J. M. (1988). Sequence and comparative analysis of three *Enterobacter cloacae* ampC beta-lactamase genes and their products. *The Biochemical Journal*, 250(3), 753–760. <https://doi.org/10.1042/bj2500753>
- Gopinath, S. C. B., Anbu, P., Lakshmi Priya, T., & Hilda, A. (2013). Strategies to characterize fungal lipases for applications in medicine and dairy industry. *BioMed Research International*, 2013, 31–34. <https://doi.org/10.1155/2013/154549>
- Hard, T., Barnes, H., Larsson, C., Gustafsson, J., & Lund, J. (1995). © 1995 Nature Publishing Group <http://www.nature.com/nsmb>. *Nature*, 2(11), 983–989.
- Hemilä, H., Koivula, T. T., & Palva, I. (1994). Hormone-sensitive lipase is closely related to several bacterial proteins, and distantly related to acetylcholinesterase and lipoprotein lipase: Identification of a superfamily of esterases and lipases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Lipids and Lipid Metabolism*, 1210(2), 249–253. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(94\)90129-5](https://doi.org/10.1016/0005-2760(94)90129-5)
- Henderson, I. R., Navarro-garcia, F., & Nataro, J. P. (1998). 3030327297_the Great Escape.Pdf. (1989), 1615–1621. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.95.245111>
- Hong, K. H., Jang, W. H., Choi, K. D., & Yoo, O. J. (1991). *Hong 1991*. 55(II), 2839–2845.
- Jeon, J. H., Lee, H. S., Kim, J. T., Kim, S. J., Choi, S. H., Kang, S. G., & Lee, J. H. (2012). Identification of a new subfamily of salt-tolerant esterases from a metagenomic library of tidal flat sediment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(2), 623–631. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3433-x>
- Kim, K. K., Song, H. K., Shin, D. H., Hwang, K. Y., & Sun, S. W. (1997). The crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Pseudomonas cepacia* reveals a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor. *Structure*, 5(2), 173–185. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(97\)00177-9](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(97)00177-9)
- Lass, A., Zimmermann, R., Oberer, M., & Zechner, R. (2011). Lipolysis - A highly regulated

multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores. *Progress in Lipid Research*, 50(1), 14–27. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2010.10.004>

Lee, F. T., Adams, J. B., Garton, A. J., & Yeaman, S. J. (1988). Hormone-sensitive lipase is involved in the hydrolysis of lipoidal derivatives of estrogens and other steroid hormones. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Lipids and Lipid Metabolism*, 963(2), 258–264. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(88\)90289-5](https://doi.org/10.1016/0005-2760(88)90289-5)

Li, P. Y., Ji, P., Li, C. Y., Zhang, Y., Wang, G. L., Zhang, X. Y., ... Zhang, Y. Z. (2014). Structural basis for dimerization and catalysis of a novel sterase from the GTSAG motif subfamily of the bacterial hormone-sensitive lipase family. *Journal of Biological Chemistry*, 289(27), 19031–19041. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.574913>

Liu, Y., Xu, H., Yan, Q., Yang, S., Duan, X., & Jiang, Z. (2013). Biochemical characterization of a first fungal esterase from *Rhizomucor miehei* showing high efficiency of ester synthesis. *PLoS One*, 8(10), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077856>

Loveless, B. J., & Saier, M. H. (1997). A novel family of channel-forming, autotransporting, bacterial virulence factors. *Molecular Membrane Biology*, 14(3), 113–123. <https://doi.org/10.3109/09687689709048171>

Macauley-Patrick, S., Fazenda, M. L., McNeil, B., & Harvey, L. M. (2005). Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, 22(4), 249–270. <https://doi.org/10.1002/yea.1208>

Nardini, M., Lang, D. A., Liebeton, K., Jaeger, K. E., & Dijkstra, B. W. (2000). Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* lipase in the open conformation. The prototype for family I.1 of bacterial lipases. *Journal of Biological Chemistry*, 275(40), 31219–31225. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003903200>

Ngo, T. D., Ryu, B. H., Ju, H., Jang, E., Park, K., Kim, K. K., & Kim, T. D. (2013). Structural and functional analyses of a bacterial homologue of hormone-sensitive lipase from a metagenomic library. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 69(9), 1726–1737. <https://doi.org/10.1107/S0907444913013425>

Pohlentz, H. D., Boidol, W., Schuttke, I., & Streber, W. R. (1992). Purification and properties of an *Arthrobacter oxydans* P52 carbamate hydrolase specific for the herbicide phenmedipham and nucleotide sequence of the corresponding gene. *Journal of Bacteriology*, 174(20), 6600–6607. <https://doi.org/10.1128/jb.174.20.6600-6607.1992>

Quintero, J. C. (2011). Revisión: Degradación De Plaguicidas Mediante Hongos De La

Pudrición Blanca De La Madera. *Facultad Nacional de Agronomía, UniAntioquia*, 64(1), 23.

- Rehm, S., Trodler, P., & Pleiss, J. (2010). Solvent-induced lid opening in lipases: A molecular dynamics study. *Protein Science*, 19(11), 2122–2130. <https://doi.org/10.1002/pro.493>
- Rüttimann-Johnson, C., & Lamar, R. T. (1997). Binding of pentachlorophenol to humic substances in soil by the action of white rot fungi. *Soil Biology and Biochemistry*, 29(7), 1143–1148. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(96\)00296-9](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(96)00296-9)
- Sánchez-Carbente, M. del R., Batista-García, R. A., Sánchez-Reyes, A., Escudero-García, A., Morales-Herrera, C., Cuervo-Soto, L. I., ... Folch-Mallol, J. L. (2017). The first description of a hormone-sensitive lipase from a basidiomycete: Structural insights and biochemical characterization revealed *Bjerkandera adusta* BaEstB as a novel esterase. *MicrobiologyOpen*, 6(4), 1–15. <https://doi.org/10.1002/mbo3.463>
- Sharma, D., Sharma, B., & Shukla, A. K. (2011). Biotechnological approach of microbial lipase: A review. *Biotechnology*, Vol. 10, pp. 23–40. <https://doi.org/10.3923/biotech.2011.23.40>
- Smith, A. J., Sanders, M. A., Juhlmann, B. E., Hertz, A. V., & Bernlohr, D. A. (2008). Mapping of the hormone-sensitive lipase binding site on the adipocyte fatty acid-binding protein (AFABP): Identification of the charge quartet on the AFABP/aP2 helix-turn-helix domain. *Journal of Biological Chemistry*, 283(48), 33536–33543. <https://doi.org/10.1074/jbc.M806732200>
- Smith, G. M., Garton, A. J., Aitken, A., & Yeaman, S. J. (1996). Evidence for a multi-domain structure for hormone-sensitive lipase. *FEBS Letters*, 396(1), 90–94. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)01076-9](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)01076-9)
- Watt, M. J., & Steinberg, G. R. (2008). Regulation and function of triacylglycerol lipases in cellular metabolism. *Biochemical Journal*, 414(3), 313–325. <https://doi.org/10.1042/BJ20080305>
- Weete, J. D., Abril, M., & Blackwell, M. (2010). Phylogenetic distribution of fungal sterols. *PLoS ONE*, 5(5), 3–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010899>
- Will, C., Thürmer, A., Wollherr, A., Nacke, H., Herold, N., Schrupf, M., ... Daniell, R. (2010). Horizon-specific bacterial community composition of german grassland soils, as revealed by pyrosequencing-based analysis of 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(20), 6751–6759. <https://doi.org/10.1128/AEM.01063-10>

- Yang, S., Qin, Z., Duan, X., Yan, Q., & Jiang, Z. (2015). Structural insights into the substrate specificity of two esterases from the thermophilic *Rhizomucor miehei*. *Journal of Lipid Research*, *56*(8), 1616–1624. <https://doi.org/10.1194/jlr.M060673>
- Yeaman, S. J. (1990). Hormone-sensitive lipase - A multipurpose enzyme in lipid metabolism. *BBA - Molecular Cell Research*, *1052*(1), 128–132. [https://doi.org/10.1016/0167-4889\(90\)90067-N](https://doi.org/10.1016/0167-4889(90)90067-N)
- Yuan, J. P., Kuang, H. C., Wang, J. H., & Liu, X. (2008). Evaluation of ergosterol and its esters in the pileus, gill, and stipe tissues of agaric fungi and their relative changes in the comminuted fungal tissues. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *80*(3), 459–465. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1589-9>

12 ANEXOS

Anexo 1. Tabla general de la superfamilia α/β hidrolasa

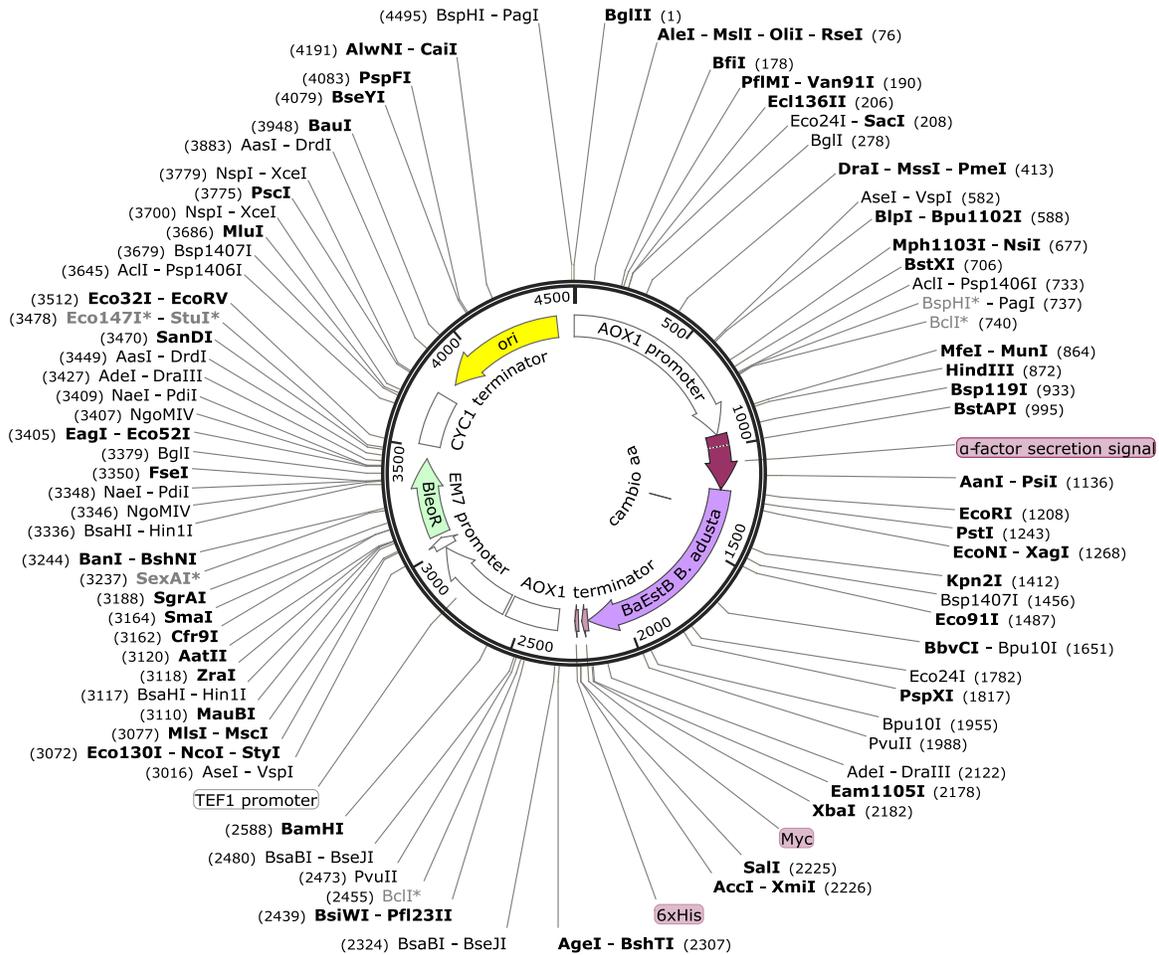
■ Block C	■ Carboxylesterase 12290 (Tc) (Su) (In) (EDB) (ODB)	■ Carb_B_Annelida 10 (Tc) (EDB)
		■ Carb_B_Arthropoda 1552 (Tc) (St) (M) (Su) (In) (EDB)
		■ Carb_B_Bacteria 4334 (Tc) (St) (M) (Su) (In) (EDB) (ODB)
		■ Carb_B_Brachiopoda 61 (Tc) (EDB)
		■ Carb_B_Chordata 548 (Tc) (St) (M) (Su) (In) (EDB)
		■ Carb_B_Mollusca 32 (Tc) (EDB)
		■ Carb_B_Nematoda 382 (Tc) (EDB)
		■ Carb_B_Root 147 (Tc) (EDB)
		■ Cholesterol_esterase 129 (Tc) (St) (M) (D) (Su) (In) (EDB) (ODB)
		■ Fungal_carboxylesterase_lipase 4971 (Tc) (St) (Su) (In) (EDB) (ODB)
		■ Juvenile_hormone_esterase 124 (Tc) (St) (Su) (In) (EDB)
		■ AChE 526 (Tc) (St) (M) (Su) (In) (EDB) (ODB)
		■ BCHE 90 (Tc) (St) (M) (Su) (In) (EDB) (ODB)
	■ Cholinesterase-like 551 (Tc) (M) (Su) (EDB)	
	■ Gliotactin 104 (Tc) (EDB)	
	■ Glutactin 49 (Tc) (EDB)	
	■ Neuroigin 552 (Tc) (St) (M) (D) (EDB) (ODB)	
	■ Neurotactin 58 (Tc) (EDB)	
	■ OtherNon-catalytic_C 155 (Tc) (EDB)	
	■ Thyroglobulin 68 (Tc) (M) (D) (EDB) (ODB)	
■ Block H	■ Arylacetamide_deacetylase 453 (Tc) (Su) (In) (EDB)	
	■ GTSAGmotif 112 (Tc) (St) (Su) (In) (EDB) (ODB)	
	■ Hormone-sensitive_lipase_like 2150 (Tc) (St) (M) (D) (Su) (In) (EDB) (ODB)	
	■ Kynurenine-formamidase 364 (Tc) (St) (Su) (In) (EDB)	
	■ Plant_carboxylesterase 261 (Tc) (St) (Su) (In) (EDB)	
	■ Steryl_acetyl_hydrolase 62 (Tc) (Su) (EDB)	
	■ Tannase_Bact 137 (Tc) (St) (Su) (In)	
■ Block L	■ Avian-virus_vltp 7 (Tc) (EDB)	
	■ Bacterial_lipase 118 (Tc) (EDB) (ODB)	■ Bacterial_lip_Faml.1 45 (Tc) (St) (Su) (In) (ODB)
		■ Bacterial_lip_Faml.2 17 (Tc) (St) (Su) (In) (ODB)
		■ Bacterial_lip_Faml.3 27 (Tc) (St) (Su) (In) (ODB)
		■ Bacterial_lip_Faml.5 17 (Tc) (St) (Su) (In) (ODB)
		■ Bacterial_lip_Faml.6 12 (Tc) (St) (Su) (ODB)
	■ Canar_LipB 88 (Tc) (St) (Su) (In) (ODB)	
	■ Chlorophyllase 1014 (Tc) (Su) (EDB)	
	■ Hepatic_Lipase 115 (Tc) (M) (D) (Su) (In) (EDB)	
	■ Insect_Phospholipase 12 (Tc) (St) (EDB)	
	■ Insect_lipase 82 (Tc) (EDB)	
	■ Lipase_3 395 (Tc) (St) (Su) (In) (EDB) (ODB)	
	■ Lipoprotein_Lipase 318 (Tc) (St) (M) (D) (Su) (In) (EDB)	
	■ PC-sterol_acyltransferase 96 (Tc) (St) (M) (D) (Su) (In) (EDB) (ODB)	
	■ Pancreatic_lipase 488 (Tc) (St) (M) (D) (Su) (In) (EDB)	
	■ Phospholipase 161 (Tc) (M) (D) (Su) (EDB)	
	■ Plant_lipase_EDS1-like 13 (Tc) (St) (EDB)	
■ Plant_phospholipase 33 (Tc) (St) (Su) (EDB)		
■ Yolk-Protein_dipter 22 (Tc) (EDB)		

■ ABHD16 142 (Tc) (In) (EDB)	
■ ABHD18 112 (Tc) (EDB)	
■ Abhydrolase_5 125 (Tc) (EDB)	
	■ 5_AlphaBeta_hydrolase 69 (Tc) (St) (Su) (In) (EDB)
	■ PolyAspartate-hydrolase 56 (Tc) (St) (Su) (In) (EDB)
	■ 6_AlphaBeta_hydrolase 3766 (Tc) (St) (Su) (In) (EDB)
	■ ABHD10 151 (Tc) (St) (Su) (In)
	■ ABHD11-Acetyl_transferase 290 (Tc) (St) (Su) (In)
	■ AHL-acylase 22 (Tc) (St) (Su) (In) (EDB)
	■ Abhydr_predicted 20 (Tc) (EDB)
	■ Acidic_Lipase 670 (Tc) (St) (M) (D) (Su) (In) (EDB)
	■ Aclacinomycin-methylesterase_RdmC 212 (Tc) (St) (Su) (EDB)
	■ BioH 217 (Tc) (St) (Su) (In) (EDB)
	■ Bodyguard 136 (Tc) (EDB)
	■ CGI-58_ABHD5_ABHD4 175 (Tc) (St) (M) (D) (In) (EDB) (ODB)
	■ CIB-CCG1-interacting-factor-B 93 (Tc) (St) (EDB)
	■ Carboxymethylbutenolide_lactonase 720 (Tc) (St) (Su) (In) (EDB) (ODB)
	■ Duf_1057 153 (Tc) (EDB)
	■ Duf_3141 83 (Tc) (EDB)
	■ HNLyase_Bact 198 (Tc) (St) (Su)
	■ HOD-cofactorfree-dioxygenase 37 (Tc) (St) (Su) (EDB)
	■ Haloperoxidase 422 (Tc) (St) (Su) (In) (EDB)
	■ Homoserine_transacetylase 404 (Tc) (St) (Su) (In) (EDB)
	■ Homoserine_transacetylase_like_est 14 (Tc) (St) (Su) (EDB)
	■ Hydrolase-1_PEP 58 (Tc) (EDB)
	■ Hydrolase-2_PEP 41 (Tc) (EDB)
	■ Hydroxynitrile_lyase 199 (Tc) (St) (Su) (In) (EDB) (ODB)
	■ LIDHydrolase 102 (Tc) (Su) (In) (EDB)
	■ Maspardin-ACP33-SPG21_like 150 (Tc) (M) (D) (EDB)
	■ MenH_SHCHC 293 (Tc) (St) (Su) (In) (EDB) (ODB)
	■ Mg-chelatase_BchO 119 (Tc) (St) (Su) (EDB)
	■ PHA_depolymerase_ arom 18 (Tc) (EDB)
	■ PHA_synth_I 86 (Tc) (St) (EDB)
	■ PHA_synth_II 35 (Tc) (Su) (EDB)
	■ PHA_synth_III_C 95 (Tc) (EDB)
	■ PHB_depolymerase_PhaZ 72 (Tc) (Su) (EDB)
	■ PPase_methylesterase_euk 151 (Tc) (St) (In) (EDB) (ODB)
	■ PhaC_cen_dom 35 (Tc) (EDB)
	■ Pheophytinase 27 (Tc) (Su) (EDB)
	■ PlaB 31 (Tc) (Su) (EDB)
	■ RsbQ-like 131 (Tc) (St) (Su) (In) (EDB)
	■ RsbQ-like 131 (Tc) (St) (Su) (In) (EDB)
	■ RutD 15 (Tc) (St) (Su) (EDB)
	■ SERHL 289 (Tc)
	■ UCP031088 149 (Tc) (EDB)
	■ UCP037442 170 (Tc) (EDB)
	■ Valacyclovir-hydrolase 119 (Tc) (St) (Su) (In) (EDB)
	■ YcjY-like 27 (Tc) (St)
	■ RsbQ-like 131 (Tc) (St) (Su) (In) (EDB)
	■ RutD 15 (Tc) (St) (Su) (EDB)
	■ SERHL 289 (Tc)
	■ UCP031088 149 (Tc) (EDB)
	■ UCP037442 170 (Tc) (EDB)
	■ Valacyclovir-hydrolase 119 (Tc) (St) (Su) (In) (EDB)
	■ YcjY-like 27 (Tc) (St)
■ Abhydrolase_7 371 (Tc) (St) (EDB)	
■ Abhydrolase_9 937 (Tc) (EDB)	
■ Acetyl-esterase_deacetylase 304 (Tc) (St) (Su) (In) (EDB) (ODB)	
■ Acyl-CoA_Thioesterase 55 (Tc) (St) (M) (D) (Su) (In) (EDB) (ODB)	
■ AlphaBeta_hydrolase 884 (Tc) (St) (Su) (In) (EDB)	

■ Block X	■ Antigen85c 1848 (Tc) (Su) (EDB) (ODB)	■ A85-Est-Putative 97 (Tc) (EDB) (ODB)
		■ A85-EsteraseD-FGH 577 (Tc) (St) (Su) (In) (EDB) (ODB)
		■ A85-Feruloyl-Esterase 286 (Tc) (St) (M) (Su) (EDB) (ODB)
		■ A85-IroE-IroD-Fes-Yiel 694 (Tc) (St) (Su) (In) (EDB) (ODB)
		■ A85-Mycoly-transferase 194 (Tc) (St) (Su) (In) (EDB) (ODB)
	■ Arb2 407 (Tc) (EDB)	■ Arb2_FAM172A 110 (Tc) (EDB)
		■ Arb2_domain 297 (Tc) (St) (EDB)
	■ Asp2 303 (Tc) (EDB)	
	■ Bacillus_lip 10 (Tc) (EDB)	
	■ Bact_LipEH166_FamXII 7 (Tc) (Su) (ODB)	
	■ Bacterial_Est97 61 (Tc) (St) (Su) (ODB)	
	■ Bacterial_EstLip_FamX 80 (Tc) (Su) (EDB) (ODB)	
	■ Bacterial_esterase 92 (Tc) (St) (Su) (In) (ODB)	
	■ Carboxypeptidase_S10 554 (Tc) (St) (M) (D) (In) (EDB) (ODB)	
	■ Cutinase_like 704 (Tc) (EDB)	■ Acetylxyylan_esterase 135 (Tc) (St) (Su) (EDB) (ODB)
		■ Cutinase 545 (Tc) (St) (Su) (In) (EDB) (ODB)
		■ Lysin_B_C_ter 24 (Tc) (St) (Su) (EDB)
	■ DLH-S 173 (Tc) (St) (EDB)	
	■ Dienelactone_hydrolase 431 (Tc) (St) (Su) (In) (EDB) (ODB)	
	■ Duf_1023 1413 (Tc) (EDB)	
	■ Duf_1350 364 (Tc) (EDB)	
	■ Duf_1749 104 (Tc) (St) (Su) (EDB)	
	■ Duf_2235 32 (Tc) (St) (Su) (EDB)	
	■ Duf_2920 14 (Tc) (EDB)	
	■ Duf_2974 129 (Tc) (Su) (EDB)	
	■ Duf_3089 218 (Tc) (Su) (EDB) (ODB)	
	■ Duf_3530 68 (Tc) (EDB)	
	■ Duf_452 340 (Tc) (St) (EDB)	
	■ Duf_676 114 (Tc) (Su) (EDB)	
	■ Duf_726 139 (Tc) (EDB)	
	■ Duf_818 11 (Tc) (EDB)	
	■ Duf_829 87 (Tc) (EDB)	
	■ Duf_900 271 (Tc) (EDB)	
	■ Duf_915 54 (Tc) (St) (EDB)	
	■ Epoxide-hydrolase_like 2278 (Tc) (EDB) (ODB)	■ ABHD6-Lip 156 (Tc) (St) (Su) (In) (ODB)
		■ ABHD8 135 (Tc) (EDB)
		■ AcoC_BiotinLipoyl-ABH 42 (Tc) (EDB)
		■ CFTR-inhibitory-factor_Cif 102 (Tc) (St) (Su) (In) (EDB)
		■ Carbon-carbon_bond_hydrolase 305 (Tc) (St) (Su) (In) (EDB)
		■ Epoxide_hydrolase 1142 (Tc) (St) (M) (D) (Su) (In) (EDB)
		■ Haloacetate_dehalogenase 171 (Tc) (St) (Su) (In) (EDB) (ODB)
		■ Haloalkane_dehalogenase-HLD1 124 (Tc) (St) (Su) (EDB) (ODB)
		■ Haloalkane_dehalogenase-HLD2 43 (Tc) (St) (Su) (In) (EDB) (ODB)
		■ MEST-like 58 (Tc) (EDB)
	■ Est-OsmC 569 (Tc) (St)	
	■ Est9X 170 (Tc) (Su)	
	■ Esterase_phb 75 (Tc) (St) (Su) (EDB)	
	■ Esterase_phb_PHAZ 7 (Tc) (St) (Su) (EDB)	
	■ FSH1 68 (Tc) (St) (In) (EDB)	
	■ Fungal-Bact_LIP 407 (Tc) (St) (Su) (In) (EDB) (ODB)	
	■ Glucuronoyl_esterase 243 (Tc) (St) (Su) (ODB)	

<ul style="list-style-type: none"> Hydrolase_4 4651 (Tc) (EDB) 	<ul style="list-style-type: none"> ABHD12-PHARC 196 (Tc) (M) (D) (Su) (In) (EDB) ABHD13-BEM46 69 (Tc) (In) ABHD17-depalmitoylase 62 (Tc) (In) (EDB) Atu1826-like 489 (Tc) (St) (EDB) Bacterial_lip_FamI.8 111 (Tc) (EDB) (ODB) CarbLipBact_1 263 (Tc) (St) (Su) (In) (EDB) (ODB) CarbLipBact_2 665 (Tc) (St) (Su) (In) (EDB) (ODB) Monoglyceridelipase_lyso-phospholip 1166 (Tc) (St) (Su) (In) (EDB) Plasmodium_subtelomeric_PST-A 54 (Tc) (EDB) Proline_aminopeptidase 1002 (Tc) (St) (Su) (In) (EDB) (ODB) abh_upf0017 574 (Tc) (Su) (In) (EDB)
<ul style="list-style-type: none"> Hydrolase_RBBP9_YdeN 101 (Tc) (St) (In) (EDB) LYsophospholipase_carboxylesterase 332 (Tc) (St) (Su) (In) (EDB) (ODB) Lipase_2 169 (Tc) (St) (Su) (In) (EDB) (ODB) Lipase_bact_N_lipase 9 (Tc) (Su) (EDB) NFM-deformylase 170 (Tc) (St) (Su) NLS3-TeX30 676 (Tc) (EDB) Ndr_family 258 (Tc) (St) (M) (D) (EDB) OHBut_olig_hydro_put 232 (Tc) (Su) (EDB) 	
<ul style="list-style-type: none"> PAF_acetylhydro-like 576 (Tc) (EDB) 	<ul style="list-style-type: none"> Duf_1400 112 (Tc) (EDB) PAF-Acetylhydrolase 146 (Tc) (St) (M) (D) (Su) (In) (EDB) (ODB) Polyesterase-lipase-cutinase 127 (Tc) (St) (Su) (In) (EDB) (ODB) UCP031982 191 (Tc) (EDB) (ODB)
<ul style="list-style-type: none"> PE-PPE 92 (Tc) (In) (EDB) PGAP1 173 (Tc) (St) (M) (D) (Su) (In) (EDB) PHAZ7_phb_depolymerase 34 (Tc) (St) (Su) (ODB) Palmitoyl-protein_thioesterase 59 (Tc) (St) (M) (D) (Su) (In) (EDB) (ODB) Pectinacylesterase-Notum 695 (Tc) (St) (Su) (In) (EDB) (ODB) 	
<ul style="list-style-type: none"> Peptidase_S15 511 (Tc) (Su) (In) (EDB) (ODB) 	<ul style="list-style-type: none"> Cocaine_esterase 137 (Tc) (St) (Su) (In) (EDB) (ODB) Lactobacillus_peptidase 37 (Tc) (St) (In) (EDB) (ODB) Xaa-Pro-like_dom 337 (Tc) (EDB) (ODB)
<ul style="list-style-type: none"> Peptidase_S37 59 (Tc) (In) (EDB) (ODB) 	
<ul style="list-style-type: none"> Peptidase_S9 1592 (Tc) (EDB) (ODB) 	<ul style="list-style-type: none"> ACPH_Peptidase_S9 133 (Tc) (St) (Su) (In) (EDB) (ODB) DPP4N_Peptidase_S9 829 (Tc) (St) (M) (D) (Su) (In) (EDB) (ODB) Glutamyl_Peptidase_S9 14 (Tc) (Su) (EDB) (ODB) PMH_Peptidase_S9 91 (Tc) (St) (Su) (EDB) (ODB) Prolyl_oligopeptidase_S9 187 (Tc) (St) (Su) (EDB) (ODB) S9N_PPCE_Peptidase_S9 134 (Tc) (St) (M) (Su) (In) (EDB) (ODB) S9N_PREPL_Peptidase_S9 204 (Tc) (St) (M) (D) (Su) (In) (EDB) (ODB)
<ul style="list-style-type: none"> PhoPQ_related 63 (Tc) (EDB) Prolylcarboxypeptidase 492 (Tc) (St) (Su) (In) (EDB) (ODB) TTHA1544-like 8 (Tc) (St) Tannase 83 (Tc) (St) (Su) (In) (EDB) Thioesterase 560 (Tc) (St) (Su) (In) (EDB) (ODB) Thioesterase_acyl-transferase 17 (Tc) (St) (Su) (EDB) (ODB) UCP033634 367 (Tc) (EDB) 	
<ul style="list-style-type: none"> UPF0255 145 (Tc) (EDB) 	<ul style="list-style-type: none"> Duf_1100-R 77 (Tc) (St) (EDB) Duf_1100-S 68 (Tc) (St) (Su) (EDB)
<ul style="list-style-type: none"> VirJ 780 (Tc) (EDB) abh_upf00227 846 (Tc) (St) (Su) (EDB) lpg2422 4 (Tc) (St) (EDB) 	

Anexo 2



Anexo 2. Mapa de la construcción pPICZαA/BaEstB (Sánchez-Carbente *et al.*, 2017)

Anexo 3. Programas utilizados para los análisis de acoplamiento molecular

Programa datoscoord.sh

```
#!/bin/bash
echo "!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!"
echo "!!!!!"
echo "!!!!!-------DatosDock-----!!!!!"
echo "!!!!!      By Joaquin Ramirez      !!!!"
echo "!!!!!"
echo "!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!"
#$1 debe ser el nombre del sustrato
#$2 debe ser el nombre del receptor
for i in {1..300}; do
    echo "$i" >> numeros
done
for j in {1..30}; do
grep "O2" $1\_$.docked.pdbqt > coord_sustrato_$j #Cambiar criterio. Para naftilacetato
es "HETATM 14 O1"; para ergosterilacetato "O2"; para pnitrofenilacetato "O4"; para el
pnitrofenildecanoato tambien es "O4"; para colesterilacetato "O2"
    sed -i '/HETATM/ s/^/dragon /' coord_sustrato_$j
    grep "1493 OG" receptor.$2\_$.pdbqt > coord_receptor_$j
    sed -i '/ATOM/ s/^/dragon /' coord_receptor_$j
    grep -E "\-[0-9]\.[0-9] | \-1[0-9]\.[0-9]" $1\_$.vina.log >> energias
    join coord_sustrato_$j coord_receptor_$j >> coord_dock
    rm coord_sustrato_$j coord_receptor_$j
done
paste numeros coord_dock > coord_dock_numerados
cut -d ' ' -f 1,7,8,9,20,21,22 coord_dock_numerados > coord_dock_intermedios
paste coord_dock_intermedios energias > coord_dock_finales
rm coord_dock_numerados coord_dock numeros coord_dock_intermedios energias
```

Anexo 4. Lista de secuencias de aminoácidos utilizadas en los análisis filogenéticos

>Homo_sapiens_HSL

MEPGSKSVSRSDWQPEPHQRPITPLEPGPEKTPIAQPESKTLQGSNTQQKPASNQRPLT
QQETPAQHDAESQKEPRAQQKSASQEEFLAPQKPAPQQSPYIQRVLLTQQEAASQQGP
GLGKESITQQEPALRQRHVAQPGPGPGEPPEAQQEAESTPAAQAKPGAKREPSAPTES
TSQETPEQSDKQTTTPVQGAQKQGSLELGLFGLTKLQELSIQRSALWKALSEWVTDES
ESDVGSSSDTDSPATMGGMVAQGVKLGFKGKSGYKVMMSGYSGTSPHEKTSARNHRHY
QDTASRLIHNMDLRTMTQSLVTLAEDNIAFFSSQGPGETAQRLSGVFAGVREQALGLEPA
LGRLLGVAHLFDLDPETPANGYRSLVHTARCCLAHLLHKSRYVASNRRSIFFRRTSHNLAEL
EAYLAALTQLRALVYYAQRLLVNRPVGLFFEGDEGLTADFLREYVTLHGKCFYGRCLGF
QFTPAIRPFLQTISIGLVSFGEHYKRNETGLSVAASSLFTSGRFAIDPELRGAEFERITQNL
DVHFWKAFWNITEMEVLSSLANMASATVRVSRLLSLPPEAFEMPLTADPTLTVTISPPLAH
TGPGPVLVRLISYDLREGQDSEELSSLIKSNQSRLELWPRPQQAPRSRSLIVHFHGGGF
VAQTSRSHEPYLKSQAQELGAPIISIDYSLAPEAPFPRALEECFFAYCWAIKHCALLGSTG
ERICLAGDSAGGNLCFTVALRAAAYGVRVPDGIMAAYPATMLQPAASPSRLLSLMDPLLP
LSVLSKCVSAYAGAKTEDHSNSDQKALGMMGLVRRDTALLRDFRLGASSWLNSFLELS
GRKSQKMSEPIAEPMRRSVSEAAALAPQGPLGTDSLKNLTLRDLRLRGNSETSSDTPM
SLSAETLSPSTPSDVNFLLPPEDAGEEAEAKNELSPMDRGLGVRAAFPEGFHPRRSSQG
ATQMPLYSSPIVKNPFMSPLLAPDSMLKSLPPVHIVACALDPMLDDSVMLARRLRNLGQP
VTLRVVEDLPHGFLTAAALCRETRQAAELCVERIRLVLTTPAGAGPSGETGAAGVDGGCG
GRH

>Sus_scrofa_HSL

MDLRTMTQSLVTLAEDNMAFFSGQGPGETARRLSGVFAGIREQALGLEPALGRLLSVAH
LFDLDAETPANGYRSLVHTARCCLAHLLHKSRYVASNRRSIFFRRTSHNLAELEAYLAALTQ
LRALAYYAQRLLAINRPGKLFEGDEGVTADFLREYVTLHGKCFYGRCLGFQFTPAIRPFL
QTISIGLVSFGEHYKRNETGLSVTASSLFTSGRFAIDPELRGAEFERIIQNLDVHFWKAFW
NITEIEVLSSLANMASATVRVSRLLSLPPKAFEMPLTADPKLTVTISPPLAHTGPGPVLVRLI
SYDLREGQDSEELSSLVRSEGPRGLELRPRPQQAPRSRSLVVIHGGGFVAQTSKSHEP
YLKSWAQELGVPILSIDYSLAPEAPFPRALEECFFAYCWAIVKHCGLLGSTGERICLAGDS
AGGNLCFTVSLRAAAYGVRVPDGIMAAYPATMLQSAASPSRLLSLMDPLLPVLSKCVS
AYAGGEMEDHSDSDQKALGMMGLVRRDTALLFRDLRLGASSWLNSFLELSGHKSRPNL
VPTPEMRRSVSEAAALAPQGPLGTDSLKYTLHDLSSLSETQDTPELSLSAETLGPTTP
SAVNFLFRPEDAPEEAEARDEISTKEEKVYSVRAAFPEGFHPRRSSQGAIQMPLYSAPIVK
NPFMSPLLAPDSMLQTLPPVHIVACALDPMLDDSVMFARRLRSLGQPVLHVVEDLPHGF
LSLAALCRETRQAAALCVDRIRFILNPPGPATPAGPTTPPV

>Mus_musculus_HSL

MEPAVESAPVGAQASKQGKEGSKNRSRRRWRKGIKASAFSHSMDLRTMTQSLVTLAE
DNMAFFSSQGPGETARRLSNVFAGVREQALGLEPTLGQLLGVAAHFDLDTETPANGYRS
LVHTARCCLAHLLHKSRYVASNRKSIFFRASHNLAELEAYLAALTQLRAMAYYAQRLLTIN
RPGVGLFFEGDEGLTADFLQEYVTLHGKCFYGRCLGFQFTPAIRPFLQTLSIGLVSFGEHYK
RNETGLSVTASSLFTGGRFAIDPELRGAEFERIIQNLDVHFWKAFWNITEIEVLSSLANMAS
TTVRVSRLLSLPPEAFEMPLTSDPRLTVTISPPLAHTGPAPVLARLISYDLREGQDSKVLNS
LAKSEGPRLELRPRPHQAPRSRALVVIHGGGFVAQTSKSHEPYLNWAQELGVPIFSID
YSLAPEAPFPRALEECFFAYCWAIVKHCDDLSTGERICLAGDSAGGNLCITVSLRAAAYG
VRVPDGIMAAYPVTTLQSSASPSRLLSLMDPLLPVLSKCVSAYSGETAEDHFDSDQKA

LGVMGLVQRDTSFLRDLRLGASSWLNSFLELSGRKPQKTTSPPTAESVRPTESMRRSVS
EAALAQPEGLLGTDTLKKLTIKDLSNSEPSDSEMSQSMETLGPSTPSDVNFFLRPGNSQ
EEAEAKDEVPRMDGVPRVRAAFPEGFHPRRSSQGVLMPLYTSPVKNPFMSPLLAPDS
MLKTLPPVHLVACALDPMDDSVMFARRLRDLGQPVTLVKVEDLPHGFLSLAALCRETRQ
ATEFCVQRIRLILTPPAAPLN

>Ovis_aries_HSL

MDLRTMTQSLVTLAEDNMAFFSSQGGEMARRLTGVFVGIREQALGLEPALGRLLSVAH
LFDLDTETPANGYRSLVHTARCCLAHLLHKSRYVASNRRSIFFRSHNLAELEAYLAALTO
LRALAYYAQHLLTTNQPGRLLFFEGDERVIADFLQEYVTLHKGCFYGRCLGFQFTPAIRPFL
QTISIGLVSFGEHYKRNETGIGVTASSLFTGGRFAIDPELARGAEFERIIQNLDVHFWKAFWN
ITEIQVLSLANMASTTVRVSRLLSLPPVAFEMPLTSDPELTVTISPPLAHTGPGPVLVRLIS
YDLREGQNSKELSSFTVSEGPRSLRLRPPQQAPRSRALVVIHGGGFVAQTSKSHEPY
LKSWAQELGVPILSIDYSLAPEAPFPRALEECFYAYCWAVKHCALLGSTGERICLAGDSA
GGNLCFTVSLRAAAYGVRVPDGIMAAYPATMLQSTASPSRLLSLMDPLLPLSVLSKCVSA
YAGAETEDHSDSDQKALGVMGLVQRDTALLRDLRLGASSWLNSFLELGGQKSHLKSVP
KTEPMRRSVSEALTOPEGPLGTNSLKSLLHDLGLRNSDSTDTPELSSAEILSSSAPS
TVNFLLGSEDESEVSEAPEELNSKDRLRGVGSFAFPEGFHPRRCSQGAMWMPLYSAPIVK
NPFMSPLLAPDSMLQTLPPVHIVQGSPTSGS

>Necator_americanus_HSL

MVKVSIEIQDSAGTLRNLVTQLQDIAPSYDYDENTPGNGFRSLVCICDTTVLHVISLQKTVS
EQRGSFVFRLAHYCKELEAFKVINFLIDSLPLCIGNATSMPSGSLFPPLHGSEYKYEML
RGLEQLDSTCFYGRPLGFQFSPSVNRIFRLIGIVLASYSLSWEKGHGPIGSIINTGRFFLSP
EQRALRIIKVTKEADIDFCKGFWNLAELSNMMPKWFSPNMAINELREINWVGPITLETNG
GKVRIPESAHGTGPRPVQIRVLSVHRPHMSPAGSPNQPVSPYIVFHCHGGGYVATSS
KSHETYLRMWAKLLNCTVVSVEYSLAPANPFPRPTEEVLFAYAWIVNNPQLVGVWSGKEM
CMVGDSAGGNLIMSVNLRRIELNVKKKPDGIVPVYTPFLFQYLPSPSRLLSVMDPLLHMGV
VLRCVAAAYTGGYGHVEKKEEATDNTGHKSLQEYVEQVQKSQRFDFAAGGSQSIVSLVQN
VKDPSNHPNVSEPDSFFTQEKKAEEQNEEEEEVEEEDDDTRSVSSVHINSPLHIHLS
STIFDNQLLNLYLIKHPTTKDSLTVVDENGEVIEEAPNTPCDANRGIPSSSSSSNNFNQLSSQI
HKRSLSQLADTAVLAAGHALDNLQDWLEKPSKEKQKLDRTVSHKEAVANQIEEPCVRK
SHLLELLNRSTVPRDPLISPMYASDDIIRQLPPVYFVACHLDPLDDTIAFASRLRTAGGRV
GSVDLLPAVPHGFLNFTLMSPECRRGAKICLQRIKEALGYVETALVSA

>B_adusta_HSL1

MPVTTTSAIHITPVVIKTLHLLSTKGRKYKDGDETAATDDVFFDEAFHIVKSFIELGTYN
TVESLQAFTNTHVPAPYWAAVSPVMVPLTSCNKAADLLIDWFGPEELQQVVGGEKWWQ
VRGLDGISEWVTEKEYLSDSPLKTEKLLSTEDANILRMEHLETVMMLYVHGGAYFWGSIN
THRYQIIRYARKIKGRAFAVNRYRKAPQYPWPCPLQDVLAAFFLTDPPPDALHKPIPPSKIV
LAGDSAGAGLCITALTVLRDMDVELPAGAVLISPWVDLTHSFPSVMQNTATDIIPPHGFIYK
PSPWVHPQPKNEHARVIPTRTNPPPQPGHADTLRPSKERLADQVDAREKASARENQP
VPSRDLRDEGVQSQAEMMDNSDKENSSPKGSHASSATIREDDPEYEDALSYWEPKPPK
VLMKDPNEQPLELRSQIQIYATNEQLTHPLVSPVLQGSGLNLCPLYIIAGDGEVLRDEIYLA
HKAHPNDYPARKGVLREGRRQKENTKFTKPTKVHLQVFDGMCHVLTVFTFTNSAKYA
YRSIAEFVKHVTNSGDYLERNPFEFHVPPQEISDPAVEEQHSSKRSKRGRPRRQPSKF
GSLFKRYNGDNVPPVDSEVMRTDVNLYRENEEKIKREMDEPAVETIVEQPNPKVELES
GSDSGKSNHGDIPSILMIRERVDIFGHVRPMEPKEDMPVLDIPPRSIGIIEKDPVQRWLTG
QALWDKYSRQANQVEHKREHYVKKFEAMMERARGQGLVMHADGCGPAAARRESTVT
IHSMTTARVSPDRRYGPFIDDEKPSSSIVGRRDNRESIALQKCVYYSAPNTHKTMF

KRKTADAMRAAFDPDDSPTKPSKQSVSEQQTPANMLPMHGLNMWQSILTLFMRKSTAQ
AAKGRKRAGSTLRRASDQVRESANGIGESIG

>B_adusta_HSL2

MIDHLVGRPNPSWKRLQVFFVIFFWLWKILHGNPGGPRILWIRANRALQRFTPWQIVVS
TLTG VYAVRNLDKILGFGSPEPLANLYSSNYYRATWISTGLDAGFATAMSIRPKWLKDICS
VLFSIYYIYATEADEKLRFRRAVPTVEMLRRTTWEKTTNPYIRALSYYPRISIRKLTLP
DSTYQRPITAWLYFSPPEHRLARATEMVLDFPGGGFISMTPEHHEERLRMWAVRTGR
SIEYGKAPEYYPFAIDECFDVYRVLVESAGKLGMSGTSLEIILTGDSAGAHVAVAVMI
ETQLPVPHPALQLNYAALDFNFGSWMSPENLRVLQSEQSSGHLPLGLAEQKDHFKHVS
LSMVGDRKPLRRRRSWRDALRTLSTSPVSEKPAIRSRASAPSVRTVKAVRPALNGR
DLVEEAGALADEEDGADLSTVPEQDRPIHARVRFNPVVSQVDPGPPAEASEAVANGG
HVENKVPLGTRLTMTSRTGYFQDRIISPMRAMAILFIGPHRNPDFASDYHLSPVLAP
ILAQFPPLIMTCGEKDPFVDDNVIFAGRVREAKRARRKELEQLVSGKTAKFGDQLRMT
EVGLDEATLRAAKRELAELASQTEEDWVQLHIFSDWSHGVMQMASLMPEARTVINL
RMEDVFASKRGRRRRYEETGVEGRNRRIASTSTGAVDAGQPTASAASETEVETETDD
MFTTKKRSPPPSVGAKDRINGRRSGSSSRHPQVNTGAVDRQSDSHVRLSTDDSMNG
HRVGTMP EHTSHSPDGVAPSF AASRVVATGASGAGQASAHPGIPSRPSSASKVGGK
QTISESELMRRRRLLD SHLIASDT

>B_adusta_HSL3

MKYNFFWHRQPFKAIYFLYAAIFLLVSLPLWTLALFPAFRPRRSWTF SRTLLFKTAQAM
PVLNLTSLFNLRDPRYYSGKEEEVGLVWIDAAPELVIGEVREYARKNNVSAAPVAA
VGEREPFTKKVGYRARPNEKVILNAHAGAWLILHAGPGSFSHNMCQDMLTRFPQFTR
NVEYRLSQGPPLPQENPFPAALIDMITAYNYLVNGLGFEPNIFVTGDSGGLAFQLAR
YILRAQPPTLALPGAFFLLSPSPDWGGSHMLPHSSMVYNQSTDYIDGFLSGYATRALL
LPSHAFEDPWISPASHEILKKGDFADYPPTLMLTGDVELLADAVKTRDRMVADGVDV
ELVVVPDGTCHMIALPFHDKEKEDTYSMVVPWVKHFS

>4zrsA_Feruloil_Esterasa

MGHHHHHHENLYFQGHMTPELRAKLESLGRDLTPEMLGGTTQIFAAMATGSDPEVEVTR
DLEYGEDPRHRLDLFRKADTRDAPVLVHVHGGGFVMGDKRLAETPFYDNIGVFAAQQGF
VGVTITYRLAPAHQFPSGPEDLAAVVRWLKANVAQYGGDPDKIVLSGXAGAAHVASYIA
HKAHHATEGGGIAGAILMSGIYDTLTATPNEFLIAYYGDDPKGWGPASSMAGLINTEIPL
LTVSEFPEDFQRQAAQFVCAWGMMAHAAYPEMHYLVGHNHLSPAQSIGTEIKAIGRMVA
GFVRRVTR

>4WY5_Rhizomucor_miehei_HSL

MTVGNPPIHPVYAAAFAMKERPPIHTLDLKVRESSEARQLAANIKLPEVIEEDKVVESD
GKTLKLTIVRPPGTEDQILPVLIFLHGGGFVFGSKYTHIKPVRDLTVKANVTVFVDYSLSP
EAKFPTAIEEIYAILWVRENASSLNINAEALAVAGDSAGATLSAAVSIYAKEKGLSAAIKTQ
VLIYPATAVSHAKYESYKLFNGDYILSAEDLKFFSNAYLPAPASELNDKLATLELATKADL
EGLPPALLFTAESDVL RDEGEKYAQQLAEAGVDVAAVRVLGAVHGFITVPVETPQYRFTI
NTIVAHLRDIYAKYNALEHHHHHH

>4WY8_Rhizomucor_miehei_HSL

MAPTVKLPYQCNIADAATIDSTQYPPEVVRKAEAAASIIDDPKALEGLPDVYLEEKTINRKN
GSKIELTITRPLDTENQVLPPIVFFHGGGWVVGSKLTHRRTVYELTVRARAIVFNYSLS
EVRFP TALEECLDAVVVWAKEENAKSINVDPTKLVVAGDSAGGNLSAVVCIRAKQLGLNII
KGQVLIYPVTDNDFETDSYKQFAENYYLTRKLMVWFFDHYIPDKKDRQSIFACPLKASIDD

LRVLPRALVITAEADVLREEGEAYARKLIEAGNDVTAVRYLGIHGFNLTLSPTGSEILDHI
VAWLQKTWKLEHHHHHH

>Lactobacillus_rhamnosis_Esterasa

MADEEAMLAQVQASWAQTAARDKARYADERVPEDVHWETEYRYEQSADPQQTNLNLYY
PAKRRNATMPTVIDIHGGGWYFGDRNLNRNYCRYLASQGYAVMGMGYRLLPDVDLRGQ
IQDIFASLRWLSHFQPGQGFDDHVLTTGDSAGGHLASLVACIQQSAELQELFGVSRVNF
NFTLVALVCPVAEPSKLPEAAGDMSDMAAFYLDKLSGGDQALVDHLNFSQVVKGLDLPP
FMLIGGQNDQSFYLSQALLKVF DANHVTYTTKLWPASAGPHLKHVFNQHWEPESIET
NLEMLRTFDALSQQDQAEENEFE

>Ferroplasma_Carboxilesterasa

MPLDPRIKKLLESGFVVPKASVDEVRKIFRQLASAAAPKAEVRKVEDIKIPGSET SINARV
YFPKAKGPYGVLVYLHGGGFVIGDVESYDPLCRAITNACNCVVSVDYRLAPEYKFPSAVI
DSFDATNWIYNLNDKFDGEMGIAIAGDSAGGNLAAVVALLSKGKLDLKYQILIYPVGFDS
VSRSMIEYSDGFFLTREHIEWFGSQYLRSPADLLDFRFSPIIAQDLSGLPPALITAEYDPLR
DQGEAYANRLLQAGVPVTSVRFNVIHGFLSFFPLIDQGGKDAIGLIGSVLRRTFYDKS

>D_melanogaster_Kinurenina_formamidasa

AGHMYNPRCKDLDRDYFPSYHTTRFQDQPEPNLAVLEHFVRVTKQHGRELTEKQGITVD
HLRYGEGRQLVDVFYSEKTTNQAPLVFVHGGYWQEMDMSMSCSIVGPLVRRGYRVAV
MDYNLCPQVTLEQLMTQFTHFLNWIFDYTEMKVSSLTFAGHSAGAHLLAQILMRPNVITA
QRSKMVWALIFLCGVYDLRELSNLESVNPKNILGLNERNIESVSPMLWEYTDVTVWNSTK
IYVVAEHDSTTFIEQSRHYADVLRKKGKASFTLFKGYDHFDIIEETAIDDSVSRFLRNIE
IE

>Moraxella_sp_Lipasa

MPILPVPALNALLTKTIKTIKGAAKNAHQHHVLHHTLKGLDNLPAPVLERINRRLKASTAE
QYPLADAHLRLILAISNKLKRPLAIDKLPKLRQKFGTDAVSLQAPSVWQQNADASGSTENA
VSWQDKTIANADGGDMTVRCYQKSTQNSERKSTDEAAMLFFHGGGFCIGDIDTHHEFCH
TVCAQTGWAVVSVDYRMAPEYPAPTALKDCLAAYAWLAEHSQSLGASPSRIVLSGDSAG
GCLAALVAQQVIKPIDALWQDNNQAPAADKKNVNDTFKNSLADLPRPLAQLPLYPVTDYEA
EYPSWELYGEGLLLDHNDAEVFN SAYTQHSGLPQSHPLISVMHGDNTQLCPSYIVVAELD
ILRDEGLAYAELLQKEGVQVQTYTVL GAPHGFINLMSVHQGLGNQTTYIINEFACLVQNL
TSEGDKPNLRA

>Candida_cylindracea_Lipasa

MKLCLLALGA AVAAAPTATLANGDTITGLNAIVNEKFLGIPFAEPPVGT LRFKPPVPYASL
NGQQFTLYGPLCMQMNPMGSFEDTL PKNARHLVLQSKIFQVVL PNDEDCLTIN VIRPPGT
RASAGLPVMLWIFGGGFELGGSSLFPGDQMVAKSVLMGKPVIVSMNYRVASWGFLAG
PDIQNEGSGNAGLHDQRLAMQWVADNIAGFGGDPSKVTIYGELAGSMSTFVHLVWNDG
DNTYNGKPLFRAAIMQLGCMVPLDPVDGTYGTEIYNQVVASAGCGSASDKLACL RGLLQ
DTLYQATS DTPGVLA YPSLRLLYLPRPDGTFITDDMYALVRDGYAHVPV IIGDQNDGTL
FGLLLNVT TDAQARAYFKQLFIHASDAEIDTLMAAYTSDITQGLPFDTGIFNAITPQFKRIL
ALLGDLAFTLARRYFLNYYQGGTKYSFLLKQLLGLPVLTGFHGNDIIWQDYLVGSGSVIYN
NAFI AFANDLDPNKAGLWTNWPTYTSSLQLGNNLMQINGLGLYTGKDNFRPDAYSALFS
NPPLFFV

>Rhizomucor_miehei_Lipasa

MVLKQRANYLGFLIVFFTAFLVEAVPIKRQSNSTVDSLPLIPSRTSAPSSSPSTTDPEAPA
MSRNGPLPSDVETKYGMALNATSYDSDVQAMSIDGGIRAATSQEINELTYTTLSANSY
CRTVIPGATWDCIHCDATEDLKIKTWSTLIYDTNAMVARGDSEKTIYIVFRGSSSIRNWIAD
LTFVPVSYPPVSGTKVHKGFLDSYGEVQNELVATVLDQFKQYPSYKVAVTGHSLLGGATA
LLCALGLYQREEGLSSSNLFLYTQGGQPRVGDPAFANYVVSTGIPYRRTVNERDIVPHLPP
AAFGLHAGEEYWITDNSPETVQVCTSDLETSDCSNSIVPFTSVLDHLSYFGINTGLCT

>BaEstB_HSL

MESIRLSNAAGTISNDILAQVTFANEAIYPLLEKRRAEIEENVTRKTFRYGALPGSEMDEVYYP
SSTPSGKAPVLAFLVHGGAYVHGSKTHPPPGDLIYKNVGAFYASQGFVTVIPDYRKLPGMK
WPDAPSDIASALTFLVAHSSDVNASAPTAADVQNIPLVGHSAAGAIASDVLLAPGLLPANV
RRSVRGLIVFGGMMHYRGGLEYPIPPFVLPGYGTDEDVRAHEPLGLLESASDEIVRGLPD
VLMVLSEHDVAAMRAAVTDFRSALAEARTGKDVPLLAQGHNHISPHYALSSGEGEEWGH
DVIRWMRAKLASGNGVPATE

>A_nidulans_HSL1

MIGMLNRPMPDVTLRIGLDHVLGRPSTRFRKVQVIAVFLFWSYLLRGNKHGPPVVRGI
SARLSRRLTVWQTTVVVVLWLYFCRNFAKIVGLESPEPLANLYSRSFRRATWITTALDAGF
WTAMRVRPKWLRDILSLIGTVYYLFAAEQADDKVRVRATLTVEHLRVSWNKGTTPYLW
ALASLVRPRLTRYPPRAIRPRRQSIYTEPTNAWLYFDGPMSALREQTCIVLDIPGGGFV
SMTPRHSEDRLAWAGKTKLPILSLNYKKAPEYPYPYALNECYDVYHSIFTTRGRCLGLA
GDVPPRIILTGDAGANLAVGTALMVLQSSDRRPSLAQGQSSLPAPDGLVLSYPALNMKI
ESWMSEEHVALIQDKSTNRSVVQRKMDYKRLTPFATPGASSDDLQKNSYLSEPDLETG
ALVEEAKGSKIDEDEEALDMQTAYLANNQPKKIQTRLAVSSMISYVNDRILSPEMMRAMVI
LYIGPHNRPDFNTDYLLSPVLAPEALLAQFPKTYIITGERDPLVDDTVVFAGRLRQAKLRRF
QERQELGLEKSQRRFNEKDYEVSLLPGISHGFMQAGFFPDSWKHIYRCAAWIQTLVD
MANIKKSSPSTSSRNLSNSHTSKSDFNQATRPSHKRTLGESSADEDKPLEMSIGKMGPL
TPMVCNSTEGDSDGHVPTPMVEAETETEVEETEQSPRTSDITSSSKADDQKSTGGRRPR
GRHARSTGLGRRRTFAPSNINIAPEWASDPVSPMRPRESSLCSLPSEEDLLRRRMSGLA
GGLMGIGEGARTP

>A_nidulans_Deacetilasa_HSL2

MTTSRWWLYVQAVFWRCLMRLGMIFHNIPHRPPSPSFSRSFSPSGSSKVVVLQFYCPPGY
SQTRKEGRRLPVVNFHGGGFTLGGPSDDSRWAQAVLSEVGAVVSVGYRRAPEHPFP
AAVDDGVLALQYLASHAVELGLDISRIALSGFSAGGNLAVTVPLRFRDMLIQAEHEGWLS
RADSTVQLVSPTASDLHIVALFCWYPILDFEEPREHRRAMSIEPNKTLPSFFTNLFDSEYL
PDLEQRKSPYASPVHATDDALRDSLPHDIFFICEWDMLLNEGQLFCRRLQDINKHVRAM
MVEKARHAWDKSPNPFRRNTTEVNILYKDACADMKAIFEK

>A_nidulans_HSL3

MTWSYVPVIQRASDKTGSNIKKSQRYANAPFRVAEKVQKPEFAGYWVYCDKSTESCLEL
ADLVLFHLHGGGYVMGHPLDNAPELLLIAEALSRRNHKAIVFSLEYTLVPTAPLPTQLDQTI
AAYTWLVSELHINPSKLYLIGESAGGHLILSLLNALYERASSQVPIALPKPAVVFLVSPWVN
LNPCGVDAAKAKNQDLDRSAAFKHVLERFSNLVLHGASPAYLKLHGSFAQPVPGRGSKW
DILPVTWVSAGTAEPLFRFDIEEFVRVARRDGADVRFELADGKVHVWQSVEARQQEAK
FLALALEEDNARLMPGYRHIAELIYDLLEGRA

>P_cinnabarinus_HSL1

MASDLLKYQPFKGLYLTYFFSSFFFIRVPLWLIWYLP SRNRPKPSWPLTRCVFIMGLREIM
RLPKELGLRERDPIPAKGLKNAELVVEGLLEDSDAFCEIRRAAGITGVK PASIPAY
WFKPESSLSQEVKARPGERTFLHLHGGAFFHLGSARPDSTAANITRGLLAHSEKLD RALA
VDYRLAATSPNPFMNPYPAALLDCIAAYRYLVVEAGFEPKNIIIVGDSAGGNLAFALVRHFV
ENNIPGLAPPGLLSLSSWLDLSFSHVSAESSYARNAPTDIFPLGNTPEAQRESYANRAY
LGLLDREEARTNPYISPASAHIKSTEGLFKGFPRTFISAGGAEKILDDSKVAAERLQADGV
NVTIDIVPDAVHDFMTFTWHEPERTEGLKRACKWLNS

>P_cinnabarinusHSL2

MDRGFYGSGVPIEHCVNRFTPWQLIVSTLTGVYAVRNLDKILGLAAPEPLANLYSPSYR
ATWIAIGLDAGFATAMTIRPRWLKDICSVLFSIYYIYASEADEKIRKYRAVPTVEMLR TTWE
KTTNPYIRKLSHLPHVSTRRKILLARPKDSTSRRPITTWLFFAPPADQLSQATDLILDFPGG
GFVSMTEPHHEERLRMWAIRTGKPVLSVDYAKAPEYPYPFSEIDECFDLYRVLVETSGIVIG
MSGRKLNICTGDSAGAHIAVCVMYKILETQMNLPHPLALVLNYAALDFNFTSWMTPQNLR
VLQTEQSSGHLPLAEQKDHLRHVSPLSMVGDRKIPRRRRSLRDTLRTIASSTTPKM PPL
RSRHTTSSIKHVSSLDLDDSNDEGGAMGDIEDEAFSRVKEEDKPLHARIRFDPQVSQLELE
QAPRPPEPAEDTYVQTISREKAPIGTRLTMTSRTGYFQDRIISPSMMRAMAILYIGPYRNP
DFQSDYQLSPILAPDHLLAQFPPLLMSCGEKDPFVDDTLIFAGRIRKAKRARRTELERIFAG
KSALHGEHLRMSAASPHLPPGIGRNVNNGREETMRALQREHERLSRETEEDWVQMHIFS
EWSHGYLQMPSLMREAKVINDLADWMEEVFDRDAVAFAFEARAARSAAVS SSSFPVPG
HGIPGAAGVSSDRRGATSPEKTRRMSTMTATKREEHDTDGFTSATETSELDTDEV LTF
SPKRRSPSSLASNGSSFAARRFSWL

>P_coccineus_HSL1_

MIDHLLGRPSVGWKRTQVILVIVFWWRILRGDPNGPKFLWIRNANRALRRFTPWQLIVST
LTGVYAVRNLDKILGLAAPEPLAKLYSPSYRATWIAIGLDAGFATAMTIRPRWLRDICSVL
FSVYYIYANEADEKIRKYRAVPTVEMLR TTWEKTTNPYLRRLSHLPHVSIRRKILLARPKD
STSRRPITTWLFFAPPDQLSQATDLILDFPGGGGFVSMTEPHHEERLRMWAIRTGKPVLS
VDYAKAPEYPYPFSEIDECFDLYRVLVETSGIVIGMSGRRLNVICTGDSAGAHIAVCVMYKIL
ETQMNLPHPLALVLNYAALDFNFTSWMTPQNLRVLQTEQSSGHLPLAEQKDHLRHISP
LSMVGDRKIPRRRRSLRDTLRTIASPTTPKM PPLRSRHTTSSIKHFSSFDSSYDEGGEM
GDVEDAGSTRVNEEDKPLRARIRFDPHVSQMELEQAPRTPEPAADAHDQAVQKEQAPIG
TRLTMTSRTGYFQDRIISPSMMRAMAILYIGPHRNPDFQSDYQLSPILAPDHLLAQFPPLL
MSCGEKDPFVDDTLIFAGRVRKAKRARRADLERILAGKSALHGEHLRMSAALPHLPPGVG
RNDNIGREETLRALQREYERLASETEEDWVQMHIFSEWSHGYLQMPSLMRQAKVINDL
ADWMEELFERDAANIVEARAARSATTTSSSSAAAPGWAHVNGIPGAAGVSSDRRGATS
PPKARRMSTTAAARRVAEPDGLTSATETSELDTDEV LTFSPKRRSPSPNSFTFSNGSSS
SSFTTRRLSHGRKGPSPSPSTPKLNPAANGDAVPALQEGHERELMEAATI QNGGELH
RSDILHDVRLVAPQVSRELA AAAAATANGGLRVGSPPKRPGSAVPAIATTFASGAGTPTP
HKDRGATPGGGQTISESELMRRRRLLD SHLISADSAR

>P_coccineus_HSL2

MASRLLKYQPFKGLYLTYFFSSLLLVRVPLWLIWFLPSRNRPKASWPITRCIYIMGIRKLMS
LPRELGVRRKHPVPPPAEGPLKNAKLWIKGLSDSDVFCGEVRKAAMITGVKPV DIAAY
WFKPGSSLLGDV/KAKPGERTFLHLHGGAFFHLGSAHPDVATSDITHGLVAHSKS IERILAV
EYRLSATYDPPANPIPAALLDCLAAYRYLVVDAGFEPQNI AVAGDSAGGNLAFALVRHLV
ENTIPSLPPPGRLVGFSSWLDLSFSRRSPEDSFMRNVASDIFASGPGARFGEYAVPAYLG

PINREEAKTNRYLSPSSPHITPVEGMFKGFPKTFISAGDAEILLDDSAVAERLKADGV DV
TVDIVPDAVHDFMVKWHEPERTEALRRVCSWLDD

>P_coccineus_HSL3

MSFAFRSQPLKAFFLLGTVAIYAIAIPVWALTNALPSWRPRRSWPLKRAVLVNLVRLYVGI
TYHIGAPPPPPLESYEKDAPSIVWVEPATPDLIVGEIRELAEQNGVKPVKVGGFWLGPKG
PDGVAGQRASPGERVVYHLHGGAHVRETSHPSGSMGPGYEGLIKCFGPQTRIFSLEYRL
ASAAPYPTANPFPSLLDAIAGYHYLLHDVGFSPQQIIISGDSAGGGIALNLARYLALANLP
SLPQAGALLLLSPTMDWGKTYAADPSSAFRRNVRSDFVAAIMENDYTPrALRGKLPEDF
VRKSLWISPGSREAEWARGAFAGLPPTFILAGGTEQTL DGMRAVRDRMCEDMGEGRLT
YVEIPDAAHDILMIKWFEPQRTQALSKITEWAGGL

>T_atroviridae_HSL1

MIDHVLGRPSSKSRRLQVLAVLSFWTFYLYKGHKHGSPFAQSISKLLSRRLTAWQTAIITM
LYLYAARNFSAVLGLASPEPMANMYDPTYRATWVLTALDAGFWTAMKIRTKWLRDIASI
VFSLYYLVAAEKKADEKVRKVRGMITVDHLRVAWNKGTTPYLGFLQRLMRPRFTRWPPRQ
VRIPRPANSDYKEYVSAWLYYDGPLADLEHHDRLVLDIPGGGFVAMDPRCNDKLF AWA
AKTGLPILSIDYKKAPEYPYPYALNECFDVYVTLVKSRGRCIGMSGKEIPKIIVTGDSAGN
LAVATTLMVLETGISHYRRASGVGKLPDPGLVCFYPTLDMNIGNWMSDEQMSLIRDRR
MRKTNKSIIRKSMQYNLDLVGTPHSDNEDESPPAEPPNADTRPEYCHAGPRSLSSSR
ASDEKKEGAVSHRAEPLKTRLATASMISYFNDRVLTPEMMRAMIILYIGAHRNP DFTQDYF
LSPVLAPEELLENFPKTYFMTGERDPLVDDTVIFAGRLRRAKEAAARRELSRSSILDENWT
FDDKEVTEVLLIPGTSHGFMQFPGVYPPAWKHFD RSAAWFDQLFTDAETQRVEQARQA
SRLKNQNNQMTNGAFRRQSAEISSGDEDRPLEISMTKMSRGRSTTQNGDVNNTSNGH
DSPVNGSTDTTESNSPLPVHGDRNHGRRGKKSIRGNKSLVKLASEDLLGRRMHGLASG
LTSTGDDE

>T_atroviridae_HSL2

MAEIKTTTHVYKTVNGLELTIDVSTPATAQANNIALIHFHGGFLLFGDKTSFPPYWLINVCK
KRGWYATASYRLLPEAKGHDILEDSDLA VRWVYNNISRRIIIAGSSAGGHVAFTTAASPL
CPKPLALLCVYGMIDFLNGRYVHPGRLLRGGIPNEDEILKEIDAAIQGAKVIDGYPIPPDLEA
SQRFKWSSVMHQAARYIDVLTHSPGLEKIAKEGVQVIPEEHRPLFPATFGLNANFPPTIL
MHGDADDLVDFELSSSVATKLQNA GVNHFERVAGQGHGFDCTENIDLDAEKNVEDRD
GTREILKRIVELLERYTRDN

>Aspergillus_sydowii

MPFLTSIRQMAHLVITIKAKFLRALILTYAHLRPHQKLSPDIVEYIPATSNTTKTSKDQPRRI
KTYIYLPPKQTPSSTFSSTSAPSPVLITACGSGFIIPGLGLDDPYCHTIATKTSHVVIDIDYRV
APENPFPSAINDVISVNWVLAQPARFDKARISIGGFSAGGNIAASVAANYFPPGTFRDLV
EFYPVVDASHKPGEKVPVIPVERWRDAKKGKGDGGSQTPKPPLGGMGSPDGVMLFM
RDCYLAGDVSEGMLKDPRVSPVYADVERFPRRICFVTCEYDVLAREAEELAERIKEGREV
VVHRVKGCGHAFDKYCKPGSEREKVKDQVYEIVADFLRG

Anexo 5. Análisis filogenéticos

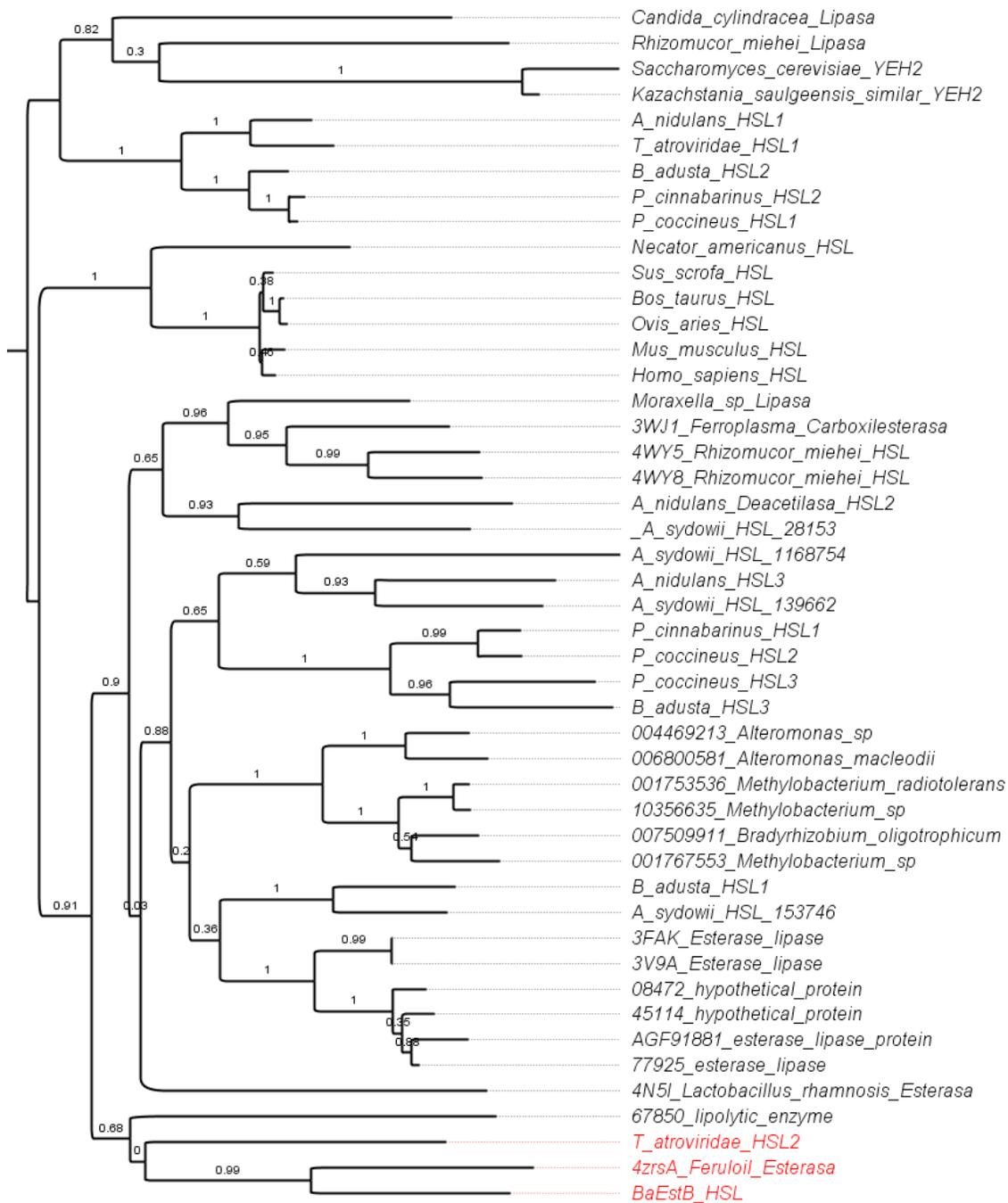


Figura 19. Árbol filogenético de 47 secuencias de aminoácidos. Algoritmo de agrupamiento máxima verosimilitud, bajo 1000 réplicas bootstrap. Con una matriz de reemplazamiento BLOSUM 62. La filogenia muestra que el ortólogo más cercano de *BaEstB* es la feruloil esterasa *4zrsA* y que estas se encuentran estrechamente relacionadas con una HSL de *Trichoderma atroviride*.

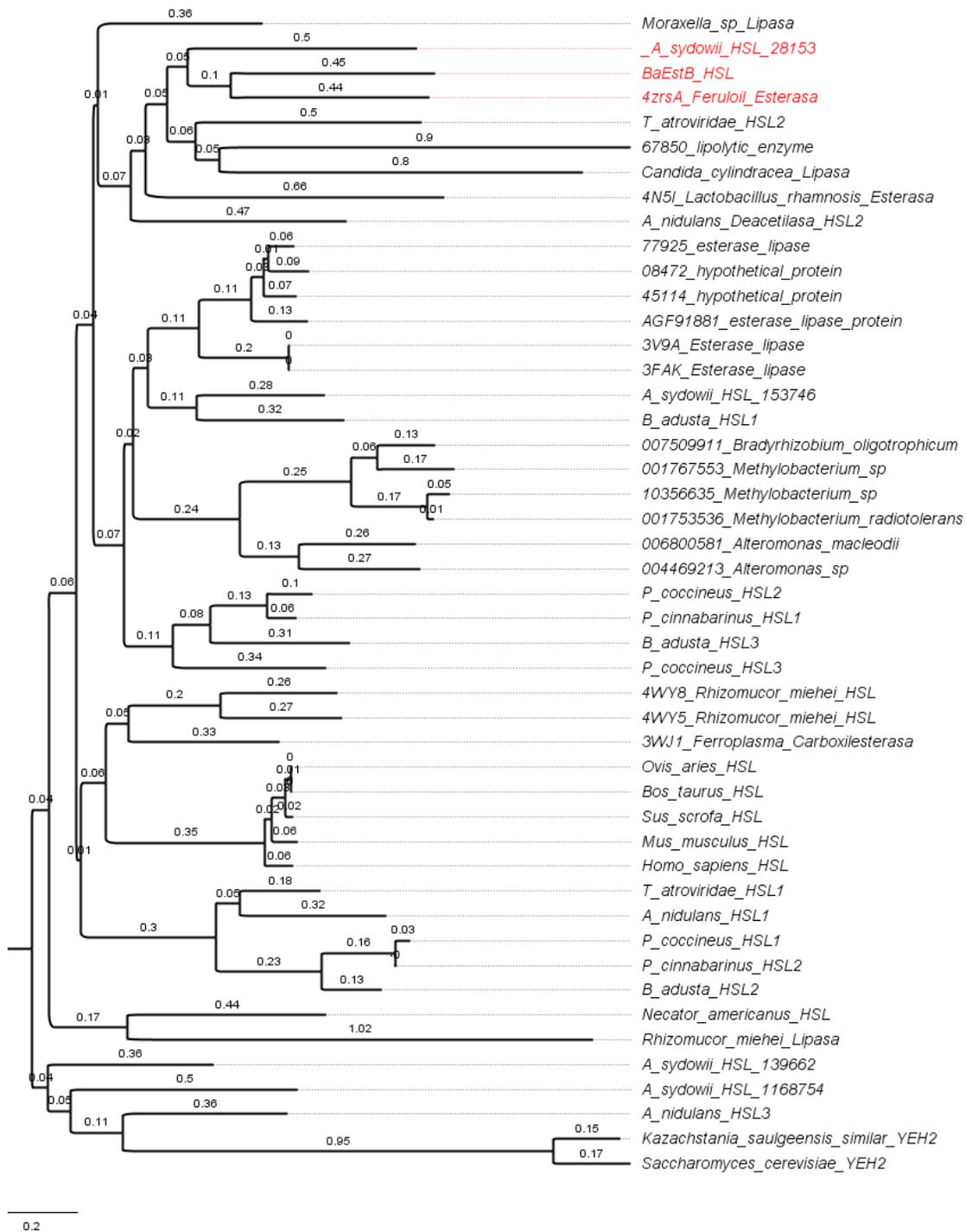


Figura 20. Árbol filogenético de 47 secuencias de aminoácidos. Algoritmo de agrupamiento Neighbor joining, bajo 1000 réplicas bootstrap. La filogenia muestra que el ortólogo más cercano de *BaEstB* es la feruloil esterasa *4zrsA* y que estas se encuentran estrechamente relacionadas con una HSL de *Aspergillus sidowii*

Anexo 6. Composición de medios de cultivo

Composición de medio mínimo dextrosa (MD) y medio mínimo metanol (MM)

Medio MD

Reactivo	Concentración (%)
YNB	1.34
Biotina	4×10^{-5}
Dextrosa	2

Medio MM

Reactivo	Concentración (%)
YNB	1.34
Biotina	4×10^{-5}
Metanol	0.5

Anexo 7. Curva estándar de BSA

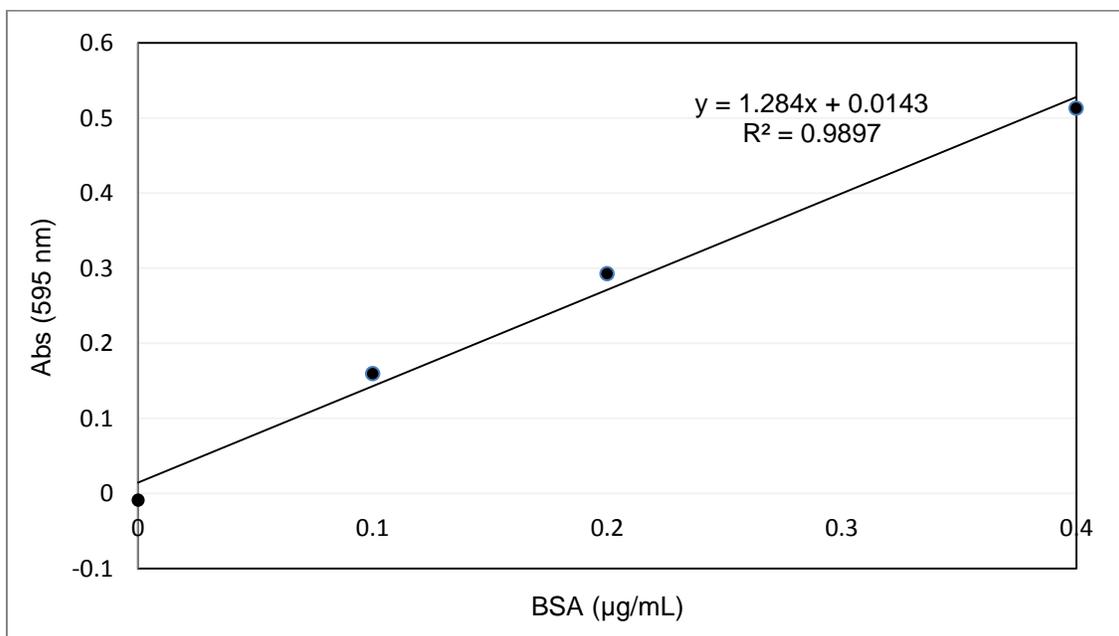
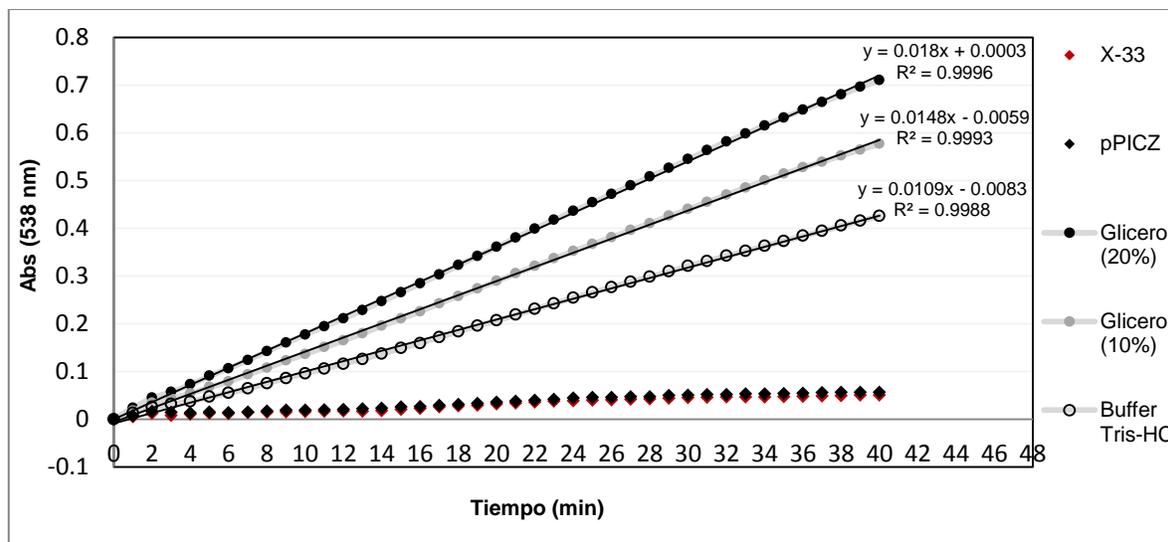


Figura 65. Curva estándar con albumina de suero bovino. $[\text{BaEstB}] = 0.00173 \text{ mg/mL}$.

Anexo 8. Actividades volumétricas y específicas de *BaEstB* en diferentes soluciones

A)



B)

Solución	Actividad Volumétrica (U/mL)	Actividad Específica (U/mg)
Glicerol (20%)	0.011	6.35
Glicerol (10%)	0.0094	5.43
Buffer Tris-HCl	0.0069	3.98

Figura 66. A) Absorbancia obtenida de los ensayos de actividad respecto al tiempo, utilizando como sustrato al 2-naftil acetato y como controles negativos los sobrenadantes de la cepa *P. pastoris* X-33 silvestre y la cepa *P. pastoris* X-33/pPICZ α A, rombos rojos y negros, respectivamente. Los círculos negros, grises y vacíos corresponden a la enzima purificada preservada en glicerol al 20%, al 10% y en buffer Tris HCl 50 Mm + Triton X-100 al 0.1%, pH 7, respectivamente. B) Actividades volumétricas y específicas de *BaEstB* preservada en diferentes soluciones.

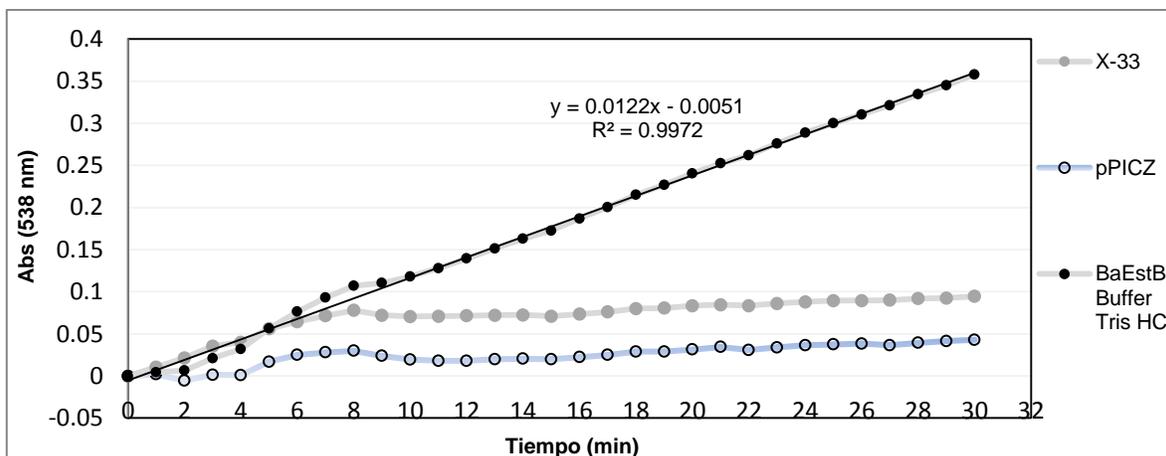


Figura 67. Absorbancia obtenida de los ensayos de actividad respecto al tiempo, utilizando como sustrato al 2-naftil acetato y como controles negativos los sobrenadantes de la cepa *P. pastoris* X-33 silvestre y la cepa *P. pastoris* X-33/pPICZ α A, ciclos grises y vacíos respectivamente. Los círculos negros, corresponden a la enzima purificada. En este ensayo se utilizó como buffer de reacción: Tris HCl 10 mM + Triton X-100 al 0.1%, pH 7. Actividad volumétrica y específica de *BaEstB* (0.0077 U/mL y 4.45 U/mg respectivamente).



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 21- octubre - 2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María del Rayo Sánchez Carbente (Tutor)
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa
Dra. Rosa Estela Quiroz Castañeda
Dr. Ramón Alberto Batista García
Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís

Tesis: Estudio *in silico* de la interacción de la esterasa HSL BaEstB de *Bjerkandera adusta* con sustratos esterificados y evaluación de su actividad *in vitro*

Alumno que la presenta a revisión: **DANIEL HERNANDEZ FUENTES**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DRA. MARIA DEL RAYO SANCHEZ CARBENTE



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 18 OCTUBRE 2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María del Rayo Sánchez Carbente (Tutor)
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa
Dra. Rosa Estela Quiroz Castañeda
Dr. Ramón Alberto Batista García
Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís

Tesis: Estudio *in silico* de la interacción de la esterasa HSL BaEstB de *Bjerkandera adusta* con sustratos esterificados y evaluación de su actividad *in vitro*

Alumno que la presenta a revisión: DANIEL HERNANDEZ FUENTES

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. ALEXANDRE TOSHIRRICO CARDOSO TAKETA



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 10 octubre 2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María del Rayo Sánchez Carbente (Tutor)
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa
Dra. Rosa Estela Quiroz Castañeda
Dr. Ramón Alberto Batista García
Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís

Tesis: Estudio *in silico* de la interacción de la esterasa HSL BaEstB de *Bjerkandera adusta* con sustratos esterificados y evaluación de su actividad *in vitro*

Alumno que la presenta a revisión: DANIEL HERNANDEZ FUENTES

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse
como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. RAMON ALBERTO BATISTA GARCIA



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 7 Octubre / 2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María del Rayo Sánchez Carbente (Tutor)
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa
Dra. Rosa Estela Quiroz Castañeda
Dr. Ramón Alberto Batista García
Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís

Tesis: Estudio *in silico* de la interacción de la esterasa HSL BaEstB de *Bjerkandera adusta* con sustratos esterificados y evaluación de su actividad *in vitro*"

Alumno que la presenta a revisión: DANIEL HERNANDEZ FUENTES

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse
como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. ALEXIS JOAVANY RODRIGUEZ SOLIS



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 10 de octubre 2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María del Rayo Sánchez Carbente (Tutor)
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa
Dra. Rosa Estela Quiroz Castañeda
Dr. Ramón Alberto Batista García
Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís

Tesis: Estudio *in silico* de la interacción de la esterasa HSL BaEstB de *Bjerkandera adusta* con sustratos esterificados y evaluación de su actividad *in vitro*"

Alumno que la presenta a revisión: DANIEL HERNANDEZ FUENTES

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse
como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DRA. ROSA ESTELA QUIROZ CASTAÑEDA