



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**Caracterización estructural y bioquímica de la
esterasa termoestable Ta0887 de
*Thermoplasma acidophilum***

Tesis que presenta
Alejandro Delgado Rey

Para obtener el grado de
Doctor en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:
Dr. Samuel Lara González

San Luis Potosí, S.L.P., octubre de 2026



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Caracterización estructural y bioquímica de la esterasa termoestable Ta0887 de *Thermoplasma acidophilum***” presentada para obtener el Grado de Doctor en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Alejandro Delgado Rey** y aprobada el **14 de septiembre de 2026** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Samuel Lara González
Director de la tesis

Dr. Antonio De León Rodríguez
Miembro del Comité Tutorial

Dra. Lucía Mendoza Viveros
Miembro del Comité Tutorial

Dr. Jesús Israel Morales Jiménez
Miembro del Comité Tutorial



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biología Estructural de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Samuel Lara González.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. de registro 1230785) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

Este trabajo fue financiado por el CONAHCYT, actualmente SECIHTI, a través de los proyectos CB 2017-2018 A1-S-26028 e INFRA-204373.

Asimismo, agradecemos al Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA, IPICYT) por el apoyo técnico y por facilitarnos el acceso a sus instalaciones.

A mi familia

Agradecimientos

Al **Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.**, por brindarme la oportunidad y los medios necesarios para realizar mis estudios de doctorado.

A la **Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación**, por el apoyo económico otorgado mediante la beca de doctorado.

Al **Dr. Samuel Lara González**, por su dirección, su apoyo y por compartir conmigo sus conocimientos durante el desarrollo de este trabajo.

A la **Dra. Leticia Santos Martínez**, por haberme brindado la oportunidad de incorporarme al IPICYT y por concebir el proyecto que dio origen a esta tesis.

A los miembros de mi comité tutorial, el **Dr. Antonio De León Rodríguez**, la **Dra. Lucía Mendoza Viveros** y el **Dr. Jesús Israel Morales Jiménez**, por sus valiosas observaciones y aportaciones.

A la **Dra. Adela Rodríguez Romero** y a la **M. en C. Georgina Espinosa Pérez**, por otorgarnos acceso al Laboratorio Nacional de Estructura de Macromoléculas del Instituto de Química (LANEM-IQ) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y por el apoyo en la colecta, reducción y análisis de los datos de difracción de rayos X.

Al **Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA, IPICYT)**, por el apoyo técnico y por facilitarme el acceso a sus instalaciones.

Al **Dr. Marcelo E. Guerin y a su grupo de laboratorio**, por compartir conmigo sus conocimientos, experiencia y forma de abordar el trabajo científico.

A **Rosa Espinosa Luna**, por su apoyo técnico y por estar siempre atenta a las necesidades del laboratorio.

A **mis compañeros de laboratorio**, por su apoyo, su compañerismo y por compartir conmigo sus conocimientos y experiencias.

A **Maye**, por su apoyo constante y por transmitirme siempre fuerza, alegría y optimismo.

A **mis padres y a mi hermana**, que siempre han sido una fuente constante de apoyo y motivación.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	viii
Lista de figuras	ix
Resumen	x
Abstract	xi
Introducción	1
Características estructurales y catalíticas de las esterases	1
Esterasas termoestables provenientes de arqueas	2
<i>Thermoplasma acidophilum</i>	3
Objetivos	5
Materiales y métodos	6
Análisis bioinformático	6
Clonación, expresión y purificación	6
Dispersión dinámica de luz	8
Caracterización bioquímica	8
Cristalización, colección de datos y determinación de la estructura	10
Resultados	12
Análisis bioinformático de Ta0887	12
Clonación, expresión y purificación de la proteína Ta0887 recombinante	14
Estado oligomérico de Ta0887 en solución	15
Ta0887 es una esterasa termoestable con preferencia por <i>p</i> -NP	16
hexanoato como sustrato	
El residuo catalítico Ser95	20
Estructura general de Ta0887	22
El sitio activo de Ta0887	26
Discusión	29
Conclusiones	33
Referencias	34
Material suplementario 1. Cristales de Ta0887	44
Material suplementario 2. PDB Validation Report de Ta0887	45
Anexo	57

Lista de tablas

Tabla 1. Temperaturas óptimas de reacción y sustratos preferenciales de esterases termoestables provenientes de arqueas.	3
Tabla 2. Especificidad de sustrato de Ta0887 frente a ésteres de <i>p</i> -NP de diferentes longitudes de cadena.	18
Tabla 3. Estadísticas de la colección de datos de difracción de rayos X y del refinamiento.	24
Tabla 4. Análisis de hendiduras de la cavidad de unión al sustrato de Ta0887 en comparación con homólogos estructurales identificados con el servidor DALI.	28

Lista de figuras

Figura 1. Alineamiento de secuencias de la proteína Ta0887 de <i>T. acidophilum</i> con la hidrolasa ht-CarCJ3 de <i>Janthinobacterium</i> .	14
Figura 2. Purificación de Ta0887 mediante cromatografía líquida en dos pasos.	15
Figura 3. Determinación del estado oligomérico de Ta0887 en solución mediante dispersión dinámica de luz.	16
Figura 4. Propiedades bioquímicas de Ta0887.	19
Figura 5. Purificación de la mutante Ser95-Ala.	21
Figura 6. Estabilidad térmica, estado oligomérico y actividad relativa de la mutante Ser95-Ala.	21
Figura 7. Estructura cristalina de Ta0887.	25
Figura 8. Propiedades hidrofóbicas y electrostáticas de Ta0887.	27
Figura S1. Cristales de Ta0887 obtenidos en distintas condiciones de cristalización después de 24 horas a 14 °C.	44

Resumen

Caracterización estructural y bioquímica de la esterasa termoestable Ta0887 de *Thermoplasma acidophilum*

Las esterasas microbianas son enzimas versátiles y estables con una amplia variedad de aplicaciones biotecnológicas. Sin embargo, pocas esterasas han sido caracterizadas de arqueas, una fuente importante de enzimas extremófilas. En este estudio, presentamos la caracterización bioquímica y la estructura cristalina de Ta0887, una nueva esterasa de la arquea termoacidófila *Thermoplasma acidophilum*. La proteína se clonó, expresó y purificó exitosamente como proteína recombinante en *Escherichia coli*. Los ensayos de dispersión de luz revelaron que Ta0887 es un monómero en solución. Los ensayos de actividad utilizando ésteres de *p*-nitrofenil (*p*-NP) confirmaron su actividad esterasa, mostrando una preferencia de sustrato por *p*-NP hexanoato (C6). La sustitución del residuo de serina en la posición 95 por alanina resultó en la abolición completa de la actividad enzimática, confirmando así su papel esencial como el residuo nucleofílico de la tríada catalítica. La enzima presentó una actividad óptima a 65 °C y pH 8.0. De manera notable, Ta0887 exhibió una elevada estabilidad térmica, reteniendo un 66% de actividad residual tras incubarse a 80 °C por 2 horas, en concordancia con su punto medio de desnaturalización térmica de 80.6 °C. La estructura cristalina de Ta0887, resuelta a 1.93 Å, reveló un dominio central α/β -hidrolasa constituido por una lámina β de ocho hebras, rodeadas por siete hélices α , y un dominio tapa compuesto por cuatro hélices α . Ta0887 presenta un bolsillo de unión al sustrato amplio en la interfaz entre los dos dominios, que contiene los residuos conservados Ser95, Asp187 y His215 de la tríada catalítica. Hasta donde sabemos, esta es la primera esterasa caracterizada de *T. acidophilum*. Los hallazgos de este estudio proporcionan una base para la futura ingeniería de Ta0887 con el objetivo de mejorar su potencial para aplicaciones industriales y biotecnológicas.

PALABRAS CLAVE. Carboxilesterasa, Termoestabilidad, Arquea termoacidófila, Difracción de rayos X, α/β -hidrolasa, Dominio tapa.

Abstract

Structural and biochemical insights into the thermostable esterase Ta0887 from *Thermoplasma acidophilum*

Microbial esterases are versatile and stable enzymes with a wide range of biotechnological applications. However, few esterases have been characterized from archaea, an important source of extremophilic enzymes. In this study, we report the biochemical characterization and crystal structure of Ta0887, a novel esterase from the thermoacidophilic archaeon *Thermoplasma acidophilum*. The protein was successfully cloned, expressed, and purified as a recombinant protein in *Escherichia coli*. Light-scattering assays revealed that Ta0887 is a monomer in solution. Activity assays using *p*-nitrophenyl (*p*-NP) esters confirmed its esterase activity, showing a substrate preference for *p*-NP hexanoate (C6). The substitution of the serine residue at position 95 for alanine resulted in the complete abolition of enzymatic activity, thereby confirming its essential role as the nucleophilic residue of the catalytic triad. The enzyme exhibited optimal activity at 65 °C and pH of 8.0. Notably, Ta0887 displayed high thermal stability, retaining 66% residual activity after incubation at 80 °C for 2 hours, consistent with its thermal denaturation mid-point temperature of 80.6 °C. The crystal structure of Ta0887, resolved at 1.93 Å, revealed an α/β -hydrolase core domain consisting of an eight-strand β -sheet, surrounded by seven α -helices, and a cap domain comprising four α -helices. Ta0887 features a large substrate-binding pocket at the interface between the two domains that contains the conserved residues Ser95, Asp187, and His215 of the catalytic triad. To our knowledge, this is the first characterized esterase from *T. acidophilum*. The findings from this study provide a basis for the future engineering of Ta0887 with the aim of enhancing its potential for industrial and biotechnological applications.

KEY WORDS. Carboxyl esterase, Thermostability, Thermoacidophilic archaeon, X-ray diffraction, α/β -hydrolase, Cap domain.

Introducción

Características estructurales y catalíticas de las esterasas

Las esterasas, también conocidas como carboxilesterasas (E.C. 3.1.1.1), son una clase de enzimas presentes en todos los dominios de la vida. Su función natural es catalizar la hidrólisis de enlaces éster, resultando en la formación de un alcohol y un ácido carboxílico [1-3]. Tanto las esterasas (E.C. 3.1.1.1) como las lipasas (triacilglicerol acilhidrolasas, E.C. 3.1.1.3), conocidas en conjunto como enzimas lipolíticas, presentan el plegamiento canónico α/β -hidrolasa. Estas enzimas contienen una tríada catalítica altamente conservada, compuesta por una serina nucleofílica que generalmente se encuentra incluida en un motivo pentapeptídico Gly-X-Ser-X-Gly (donde X puede ser cualquier aminoácido), así como un aspartato o glutamato y una histidina [2, 4, 5]. Sin embargo, las esterasas difieren de las lipasas en que muestran preferencia por acilglicéridos de cadena corta (<10 átomos de carbono) y otros ésteres simples, como el acetato de etilo, el propionato de etilo y el butirato de etilo [1, 6-10].

El plegamiento α/β -hidrolasa está compuesto generalmente por una lámina β central de ocho hebras, con la β_2 antiparalela, conectadas mediante hélices α . Las hebras β están dispuestas en el orden $\beta_1, \beta_2, \beta_4, \beta_3, \beta_5$ – β_8 . Por su parte, las hélices α conectan concretamente las hebras β_3 – β_8 , distribuyéndose a ambos lados de la lámina β central [2]. En el plegamiento, los residuos de la tríada catalítica ocupan posiciones topológicamente conservadas que permiten su proximidad espacial para formar el sitio activo: la serina nucleofílica se localiza en un giro posterior a la hebra β_5 , el residuo ácido (aspartato o glutamato) en un bucle posterior a β_7 y la histidina en un bucle posterior a β_8 [2]. El mecanismo de hidrólisis de enlaces éster comprende dos etapas, la acilación y la desacilación de la enzima. En la primera etapa, la serina catalítica, activada por la histidina, realiza un ataque nucleofílico sobre el carbono carbonílico del sustrato, formando un intermediario tetraédrico. A continuación, se libera el alcohol y se forma un intermediario acil-enzima. Finalmente, en la segunda etapa, una molécula de agua ataca este intermediario, liberando el ácido carboxílico y regenerando la enzima [2, 5].

Además, estas enzimas pueden catalizar reacciones de síntesis en ausencia de agua o en presencia de solventes orgánicos, como la esterificación y transesterificación [2, 11]. Esta versatilidad catalítica, su alta actividad y estabilidad tanto en sistemas acuosos como no acuosos y su capacidad de actuar sobre diversos sustratos sin requerir de cofactores, explican la enorme variedad de aplicaciones biotecnológicas de las esterasas [12-14]. En 2021, la demanda mundial de hidrolasas se valoró en 5.53 mil millones de dólares, con una proyección de crecimiento anual del 6.6% desde 2022 hasta 2030. Las esterasas lideraron el mercado de enzimas hidrolasas con el 34.33% de los ingresos en ese año. Este predominio puede atribuirse a su amplio uso en industrias como la alimentaria, farmacéutica, cosmética, papelera y de gestión ambiental [8, 13, 15, 16].

Esterasas termoestables provenientes de arqueas

El empleo de biocatalizadores estables a altas temperaturas ha cobrado gran relevancia en aplicaciones industriales. La estabilidad térmica puede favorecer una mayor vida útil del biocatalizador y su reutilización en múltiples ciclos de reacción, reduciendo los costos de producción. Asimismo, las altas temperaturas pueden aumentar la solubilidad de los sustratos y mejorar la eficiencia de los procesos [16, 17].

En este contexto, en las últimas décadas se han dedicado grandes esfuerzos a la búsqueda y caracterización de esterasas termoestables provenientes de microorganismos termófilos [4, 17, 18]. La mayoría de las enzimas lipolíticas estudiadas son de origen bacteriano y solo unas pocas provienen de arqueas. Los hábitats naturales de las arqueas son los ambientes extremos, como temperaturas extremadamente altas ($> 70\text{ }^{\circ}\text{C}$) o bajas ($< 0\text{ }^{\circ}\text{C}$), condiciones altamente alcalinas ($\text{pH} > 10$) o ácidas ($\text{pH} < 5$) y ambientes con salinidades extremas ($> 10\%$ de concentración de NaCl). Por lo tanto, las arqueas se consideran una de las fuentes más importantes y prometedoras de enzimas lipolíticas extremófilas [4, 17, 19]. Se han caracterizado esterasas termoestables de distintas arqueas (Tabla 1).

Tabla 1. Temperaturas óptimas de reacción y sustratos preferenciales de esterases termoestables provenientes de arqueas.

Arquea	Esterasa	Temperatura óptima (°C)	Sustrato preferencial	Referencia
<i>Picrophilus torridus</i>	EstA	70	<i>p</i> -NP C2	[20]
	EstB	55	<i>p</i> -NP C2	[20]
<i>Aeropyrum pernix</i> K1	APE1547	90	<i>p</i> -NP C8	[21]
	APE2325	90	<i>p</i> -NP C3	[22]
<i>Nitrososphaera gargensis</i>	EstN1	40	<i>p</i> -NP C3	[23]
<i>Sulfolobus shibatae</i> DSM5389	SshEstI	–	<i>p</i> -NP C4	[24]
<i>Sulfolobus tokodaii</i> strain 7	ST0071	70	<i>p</i> -NP C4	[25, 26]
<i>Sulfolobus solfataricus</i> MT4	SsoEstA	–	<i>p</i> -NP C5	[27]
<i>Sulfolobus solfataricus</i> P2	Est3	80	<i>p</i> -NP C5	[28]
<i>Sulfolobus solfataricus</i> P1	HF586419	80	<i>p</i> -NP C10	[29]
	SsoP1Est	85	<i>p</i> -NP C8	[30]
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	Carboxylesterase	–	<i>p</i> -NP C5	[31, 32]
<i>Pyrobaculum</i> sp. 1860	rP186_1588	80	<i>p</i> -NP C2	[33]
<i>Pyrobaculum calidifontis</i> VA1	Est	90	<i>p</i> -NP C6	[34]
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	AFEST	80	<i>p</i> -NP C6	[35]
	Est-AF	80	<i>p</i> -NP C4	[36]
	AF-Est2	80	<i>p</i> -NP C5	[37]

p-NP, *p*-nitrofenil; C2, acetato; C3, propionato; C4, butirato; C5, valerato; C6, hexanoato; C8, octanoato; C10, decanoato; –, no reportado o no determinado.

Thermoplasma acidophilum

La arquea termoacidófila *Thermoplasma acidophilum* es una fuente valiosa de enzimas termoestables con utilidad biotecnológica. Este microorganismo ha sido clave en la elucidación de estructuras proteicas tridimensionales y mecanismos moleculares por su simplicidad y estabilidad molecular en amplios rangos de temperatura y pH [38-45]. Fue aislado por primera vez de una pila de residuos de carbón y sus condiciones óptimas de crecimiento son a una temperatura de 59 °C y a un pH entre 1 y 2 [46]. Las células de esta especie se caracterizan por tener una membrana citoplasmática compuesta por una monocapa de lípidos tetraéter que les confiere mayor resistencia a las condiciones extremófilas [47]. Además, este microorganismo posee un cromosoma circular completamente secuenciado de 1.56 millones de pares de bases y 1,509 marcos abiertos de lectura (ORFs).

Aproximadamente el 55% de los ORFs de este microorganismo codifican proteínas con funciones conocidas o predichas [48], como el ORF Ta0887, que está clasificado como una triacilglicerol lipasa (UniProt: Q9HJS7).

Objetivos

Objetivo general

Caracterizar bioquímica y estructuralmente la proteína Ta0887 de la arquea *Thermoplasma acidophilum*.

Objetivos específicos

- Determinar el estado oligomérico de Ta0887 en solución.
- Establecer la especificidad de la enzima frente a sustratos con cadenas acilo de diferente longitud.
- Identificar la temperatura y el pH a los que la enzima presenta su máxima actividad específica.
- Establecer el efecto de la temperatura sobre la estabilidad de Ta0887.
- Describir el perfil cinético de Ta0887 y determinar los parámetros K_m , V_{max} , k_{cat} y k_{cat}/K_m .
- Determinar la estructura tridimensional de Ta0887 e identificar sus principales características estructurales.

Materiales y métodos

Análisis bioinformático

La secuencia nucleotídica de *Ta0887* se obtuvo de la base de datos de NCBI (National Center for Biotechnology Information). A partir de la secuencia de aminoácidos, se utilizaron distintas herramientas bioinformáticas para predecir *in silico* varios parámetros fisicoquímicos de la proteína. El peso molecular, el punto isoeléctrico teórico y el índice de inestabilidad se estimaron con la herramienta web ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) [49]. La propensión a cristalizar se evaluó utilizando el servidor CRYSTALP2 (<http://biomine.cs.vcu.edu/servers/CRYSTALP2/>) [50]. Los residuos catalíticos se identificaron mediante un alineamiento de secuencias con la herramienta EMBOSS Needle del servidor web EMBL-EBI (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/) [51]. La predicción de la estructura secundaria se llevó a cabo empleando el servidor web Jpred4 (<https://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred/>) [52].

Clonación, expresión y purificación

El gen que codifica la proteína *Ta0887* de *T. acidophilum* (GenBank CAC12016.1) se optimizó de acuerdo con la frecuencia de uso de codones del sistema de expresión heteróloga *Escherichia coli* (*E. coli*). El gen se adquirió como gBlock de Integrated DNA Technologies (IDT) (<https://www.idtdna.com/CodonOpt>). Para clonar el gen, se utilizó un vector pET28 modificado, en el que el sitio de corte para trombina fue sustituido por el de la proteasa 3C del rinovirus humano (HRV-3C). La digestión del gen se realizó con 2 unidades de las enzimas de restricción *NdeI* y *HindIII*, mientras que la del vector fue con 4 unidades de *NdeI* y 2 unidades de *HindIII*. Posteriormente, las reacciones de ligación se llevaron a cabo empleando 5 unidades de ligasa T4 (Roche) con una relación molar 3:1 (inserto:vector). Las células de *E.coli* TOP10 se transformaron con 2 μ L de la reacción de ligación y se cultivaron en medio sólido Luria-Bertani (LB) suplementado con kanamicina (50 μ g mL⁻¹) a 37 °C durante 16 horas. La construcción que contenía el inserto correcto (pET28-*Ta0887*) se identificó

mediante PCR de colonia y ensayos de restricción enzimática y posteriormente se confirmó mediante secuenciación con el método Sanger utilizando los oligonucleótidos externos T7.

La expresión de la proteína se llevó a cabo en células de *E. coli* BL21 Star (DE3) transformadas con la construcción pET28-Ta0887. Las células se cultivaron en 500 mL de medio LB suplementado con kanamicina ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) y la expresión de Ta0887 se indujo mediante la adición de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 0.4 mM cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica a 600 nm de 0.6-0.8. Después de 4 horas de inducción a 37 °C, las células se recolectaron por centrifugación a 10,000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. El pellet celular se resuspendió en 15 mL de buffer de lisis (50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 300 mM NaCl; 10 mM imidazol; 2 mM β -mercaptoetanol) y se lisó por sonicación con pulsos de 15 s ON y 45 s OFF durante 7 minutos 30 segundos a una amplitud del 50%. La fracción soluble se recuperó mediante centrifugación a 12,000 rpm durante 10 minutos a 4 °C y se utilizó para purificar la proteína mediante cromatografía en dos pasos. Primero, la fracción soluble se cargó en una columna de 3 mL de agarosa Ni-NTA (Jena Bioscience), previamente equilibrada con buffer de lisis. A continuación, la columna se lavó con 10 volúmenes de columna (CV) y se realizó una elución en un solo paso con cuatro CV de buffer de lisis suplementado con 500 mM de imidazol. Las fracciones que contenían la proteína recombinante se juntaron y se sometieron a digestión durante 48 horas a 4 °C con cinco unidades de proteasa HRV-3C por mililitro de muestra. A continuación, la proteína sin etiqueta 6XHis se desaló con una columna PD-10 (GE Healthcare Life Sciences) en buffer A (20 mM HEPES, pH 7.0; 50 mM NaCl; 1 mM EDTA; 2 mM β -mercaptoetanol) para proceder con el segundo paso de purificación. En este paso, la proteína se filtró ($0.22 \mu\text{m}$) y se cargó en una columna HiTrap SP (GE Healthcare Life Sciences) equilibrada con el buffer A, a un flujo de 2 mL min^{-1} , utilizando un sistema ÄKTA Purifier (GE Healthcare). La elución de la proteína se realizó con un gradiente lineal del 0% al 50% de buffer B (20 mM HEPES, pH 7.0; 1 M NaCl; 1 mM EDTA; 2 mM β -mercaptoetanol) en 20 CV. Las fracciones que contenían la proteína se juntaron y se almacenaron a 4 °C

para los experimentos posteriores. La expresión y la pureza de la proteína durante el proceso de purificación se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). La mutante Ser95-Ala de Ta0887, obtenida como gBlock de IDT, se clonó, expresó y purificó siguiendo el mismo procedimiento descrito para la enzima de tipo silvestre.

Dispersión dinámica de luz

Los ensayos de dispersión dinámica de luz (DLS) se realizaron en un equipo Zetasizer APS2000 (Malvern) con un volumen final de reacción de 50 μL . La proteína se concentró hasta 1 mg mL^{-1} por ultrafiltración utilizando un dispositivo Vivaspin Turbo 15 con una membrana de 10 kDa (Sartorius) en buffer de purificación (buffer P; 20 mM HEPES, pH 7.0; 155 mM NaCl; 1 mM EDTA; 2 mM β -mercaptoetanol). Como se sugiere, antes de la medición, la muestra se centrifugó a 10,000 rpm durante 4.5 horas a 4 °C [53]. El equipo se programó para realizar 15 mediciones de 40 segundos cada una a 25 °C, con un periodo de preincubación de 5 minutos; el experimento se realizó por triplicado. El peso molecular se estimó a partir del radio hidrodinámico de partícula utilizando el software Malvern Zetasizer, versión 7.03.

Caracterización bioquímica

Los ensayos de actividad enzimática se llevaron a cabo espectrofotométricamente utilizando ésteres de *p*-nitrofenil (*p*-NP) de distintas longitudes de cadena, incluyendo *p*-NP acetato (C2), *p*-NP butirato (C4), *p*-NP hexanoato (C6), *p*-NP octanoato (C8), *p*-NP decanoato (C10), *p*-NP laurato (C12), *p*-NP miristato (C14) y *p*-NP palmitato (C16). Se prepararon soluciones stock de cada sustrato a 10 mM en isopropanol y se sonicaron a una amplitud del 50% con pulsos de 15 s ON y 15 s OFF durante 6 minutos a temperatura ambiente [4, 20, 54, 55]. A menos que se indique lo contrario, la mezcla de reacción estándar (1 mL) consistió en 50 mM de buffer HEPES (pH 7.0), 0.1% de goma arábica, 0.4% de Triton X-100, 0.25% de alcohol polivinílico, 0.4 mM de sustrato y 1.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de enzima. La reacción se realizó a 40 °C durante 4 minutos tras una preincubación de la mezcla a la misma

temperatura antes de añadir la enzima. La reacción se detuvo añadiendo 100 μ L de SDS al 20%. La cantidad de *p*-NP liberado se determinó midiendo la absorbancia a 400 nm en un espectrofotómetro UV/VIS Perkin Elmer Lambda XLS [8, 56, 57]. En todas las mediciones se incluyó un control sin enzima para corregir cualquier autohidrólisis del sustrato. La actividad enzimática se calculó utilizando una curva de calibración con diferentes concentraciones de *p*-NP en las condiciones del ensayo. Cada ensayo se realizó por triplicado. Una unidad de actividad enzimática (U) se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μ mol de *p*-NP por minuto en las condiciones del ensayo [58, 59].

Para la determinación de la temperatura óptima de reacción, el ensayo de actividad se llevó a cabo con *p*-NP butirato a temperaturas comprendidas entre 25 y 90 °C. El pH óptimo se determinó realizando el ensayo de actividad con un buffer de tres componentes (0.05 M ácido acético, 0.05 M MES, 0.1 M Tris), que mantuvo la fuerza iónica constante en un rango de pH de 4.5 a 9.0 [60]. El *p*-NP tiene dos máximos de absorción: uno a aproximadamente 320 nm, que se observa a valores de pH inferiores a 7.0 debido a la abundancia relativa de su forma protonada, y otro a aproximadamente 400 nm, que se observa a valores de pH iguales o superiores a 7.0 debido al predominio de su forma desprotonada [61]. De esta forma, para valores de pH de 4.5 a 6.5, la cantidad de *p*-NP liberado se determinó midiendo la absorbancia a 320 nm, mientras que para pH de 7.0 a 9.0 se determinó midiendo la absorbancia a 400 nm. Para este ensayo, se utilizaron curvas de calibración de *p*-NP a pH 4.5 y 5.5, medidas a 320 nm, junto con una curva a pH 7.5, cuya absorbancia se registró a 400 nm.

La estabilidad térmica de Ta0887 se evaluó incubando la enzima a temperaturas comprendidas entre 50 y 90 °C durante 2 horas y, a continuación, incubándola a 4 °C durante 5 minutos antes de medir la actividad residual con *p*-NP butirato. Para determinar el punto medio de desnaturalización térmica (T_m), se realizó un ensayo de fluorimetría diferencial de barrido (DSF) en un termociclador RT-PCR 7,500 Fast Kit (Applied Biosystems). Las muestras se prepararon a una concentración de proteína de 0.1 mg mL⁻¹ en buffer P con SYPRO ORANGE 5X y un volumen final de 40 μ L. La señal de fluorescencia se midió en un rango de temperaturas de 25 a

95 °C, con incrementos de 1 °C. Las intensidades de fluorescencia de las muestras de proteína se corrigieron restando las de las muestras correspondientes sin proteína. Posteriormente, la T_m se determinó ajustando las intensidades de fluorescencia corregidas a la ecuación de Boltzmann. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Los ensayos de cinética enzimática se realizaron a pH 8.0 utilizando *p*-NP hexanoato a concentraciones comprendidas entre 0.10 y 5.00 mM, con la curva de calibración de *p*-NP correspondiente. Las velocidades iniciales se calcularon estimando la pendiente del tramo lineal de los datos de absorbancia frente al tiempo. Los parámetros cinéticos K_m y V_{max} se calcularon mediante un ajuste no lineal de los datos a la ecuación de Michaelis-Menten, empleando el software GraphPad Prism (versión 10.4.0). Por su parte, la constante catalítica (k_{cat}) se calculó dividiendo la V_{max} , convertida a $\mu\text{mol s}^{-1}$, entre la cantidad molar total de enzima presente en la reacción. Por último, la eficiencia catalítica se calculó como la relación k_{cat}/K_m .

Cristalización, colección de datos y determinación de la estructura

La proteína Ta0887 purificada se concentró hasta 8 mg mL⁻¹ utilizando un concentrador Vivaspin Turbo 15 (Sartorius) con membrana de corte de 10 kDa. La cristalización se llevó a cabo mediante la técnica de difusión de vapor en gota sentada. Se evaluaron 96 condiciones de cristalización de los kits Crystal Screen I y II (Hampton Research). Para cada condición se usaron 50 μL del precipitante correspondiente y las gotas se colocaron en una proporción 1:1 (0.9 μL de proteína y 0.9 μL de precipitante). Las placas se incubaron a 14 °C y se monitorearon en el estereoscopio al momento de poner las gotas, a las 24 horas y posteriormente cada 7 días por 3 meses. Crecieron cristales en 6 de las 96 condiciones evaluadas pasadas 24 horas de incubación (Fig. S1). Los cristales adecuados para el análisis por difracción de rayos X crecieron en 0.1 M HEPES-Na pH 7.5, 10% isopropanol y 20% polietilenglicol 4,000. Estos cristales se crioprotegieron mediante inmersión en la solución de cristalización suplementada con 20% de glicerol. A partir de un único cristal, se colectó un conjunto de datos a

1.93 Å de resolución y a 100 K, utilizando un generador de ánodo rotatorio Rigaku MicroMax 007HF (Cu K α , λ = 1.5418) equipado con un detector DECTRIS-PILATUS 3 R/200K-A.

El conjunto de datos de difracción de Ta0887 se colectó en el laboratorio LANEM-IQ de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Los datos se indexaron, integraron y escalaron utilizando el software HKL3000 [62]. El cristal presentó simetría trigonal y perteneció al grupo espacial P3₂21. Los datos de factores de estructura se analizaron con el programa *phenix.xtriage* del software Phenix [63]. La estructura de Ta0887 se resolvió por reemplazo molecular con Phaser [64], empleando como modelo de búsqueda la estructura de la hidrolasa ht-CarCJ3 (PDB: 1J1I), con la que comparte un 41.8% de similitud de secuencia. Los valores de las funciones de rotación (RFZ) y traslación (TFZ) confirmaron la solución obtenida. Las coordenadas finales se obtuvieron mediante ciclos iterativos de refinamiento con PHENIX y construcción manual del modelo con COOT [65], con el fin de mejorar el ajuste a los mapas de densidad electrónica ponderados por verosimilitud. Después de cada refinamiento en Phenix, se utilizaron los mapas de densidad electrónica $2mF_o-DF_c$ y mF_o-DF_c para realizar los ajustes manuales en el modelo con COOT. Se añadieron moléculas de agua en aquellas posiciones respaldadas tanto por criterios químicos como geométricos y que presentaban una densidad electrónica diferencial $|F_{obs}| - |F_{calc}| > 5\sigma$. El modelo final se validó con MolProbity, disponible en <http://molprobity.biochem.duke.edu/> [66]. Los potenciales electrostáticos de superficie se calcularon a pH 8.0 utilizando el software Adaptive Poisson-Boltzmann Solver (APBS) [67]. La visualización de las superficies electrostáticas e hidrofóbicas se realizó con UCSF Chimera [68]. El análisis de cavidades se llevó a cabo utilizando PDBsum1 [69], y los archivos resultantes se visualizaron con PyMOL [70]. El número de acceso en el PDB, la colección de datos y las estadísticas del modelo final se presentan en la Tabla 3.

Resultados

Análisis bioinformático de Ta0887

Según la base de datos GenBank, el ORF *Ta0887* consta de 708 pb que codifican una proteína de 235 aminoácidos, la cual ha sido clasificada como una triacilglicerol lipasa (número de acceso CAC12016.1). El peso molecular de la proteína Ta0887, estimado por ProtParam, fue de 26.7 kDa. Su punto isoeléctrico teórico fue de 7.03 y su índice de inestabilidad (II) fue de 20.3; valores inferiores a 40 predicen que la proteína es estable, mientras que valores superiores a 40 indican que la proteína puede ser inestable [49]. La propensión a cristalizar, estimada mediante el servidor web CRYSTALP2, fue favorable, con un valor de confianza de 0.59. Este valor se define como la diferencia entre las probabilidades de los dos posibles resultados (cristalizable y no cristalizable) y se expresa en una escala de 0 a 1, donde 1 indica la máxima confianza en la predicción [50]. Además, se realizó una búsqueda de secuencias proteicas homólogas a Ta0887 con el método mmseqs2 en la base de datos Protein Data Bank (PDB). Este análisis identificó a la hidrolasa ht-CarCJ3 de *Janthinobacterium* sp. cepa J3 (PDB: 1J1I) como la proteína más cercana con una estructura experimental conocida, con un 41.8% de similitud. El alineamiento de la secuencia de Ta0887 con la de la hidrolasa ht-CarCJ3 permitió identificar los residuos Ser95, Asp187 y His215 como la tríada catalítica, con Ser95 ubicada en el motivo conservado G-X-S-X-G, característico de las enzimas lipolíticas (Fig. 1).

En 1999, Arpigny y Jaeger clasificaron por primera vez las enzimas lipolíticas bacterianas en ocho familias (Familia I-VIII), basándose en la similitud de las secuencias de aminoácidos y en sus propiedades fisiológicas [6, 71]. Esta clasificación se ha ampliado recientemente hasta incluir 35 familias de enzimas lipolíticas (Familia I-XXXV) [5, 72]. La familia V comprende enzimas lipolíticas de microorganismos mesófilos (*Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas oleovorans*, *Acetobacter pasteurianus*), psicrófilos (*Moraxella* sp., *Psychrobacter immobilis*) y termófilos (*Sulfolobus acidocaldarius*) [6]. Ta0887 presenta un 39.4% de similitud de secuencia de aminoácidos con la esterasa putativa de *H. influenzae* (GenBank AAC21862), un 37.3% con la lipasa de *Moraxella* sp. (GenBank CAA37863) y un

35.9% con la enzima lipolítica de *S. acidocaldarius* (GenBank AAC67392). Además, las enzimas pertenecientes a esta familia comparten una similitud significativa de secuencia de aminoácidos (20-25%) con varias enzimas bacterianas no lipolíticas, como hidrolasas de epóxidos, deshalogenasas y haloperoxidasas, que también presentan el plegamiento α/β -hidrolasa y una tríada catalítica [6]. Esto también se observó en Ta0887, que presenta una similitud de secuencia del ~30% con múltiples hidrolasas de epóxidos (PDB: 7AC0), deshalogenasas (PDBs: 3WI7, 5MXP, 1Y37) y haloperoxidasas (PDBs: 3FOB, 1A7U, 1BRO). Por lo tanto, el análisis de secuencias reveló que Ta0887 pertenece a la familia V de enzimas lipolíticas.

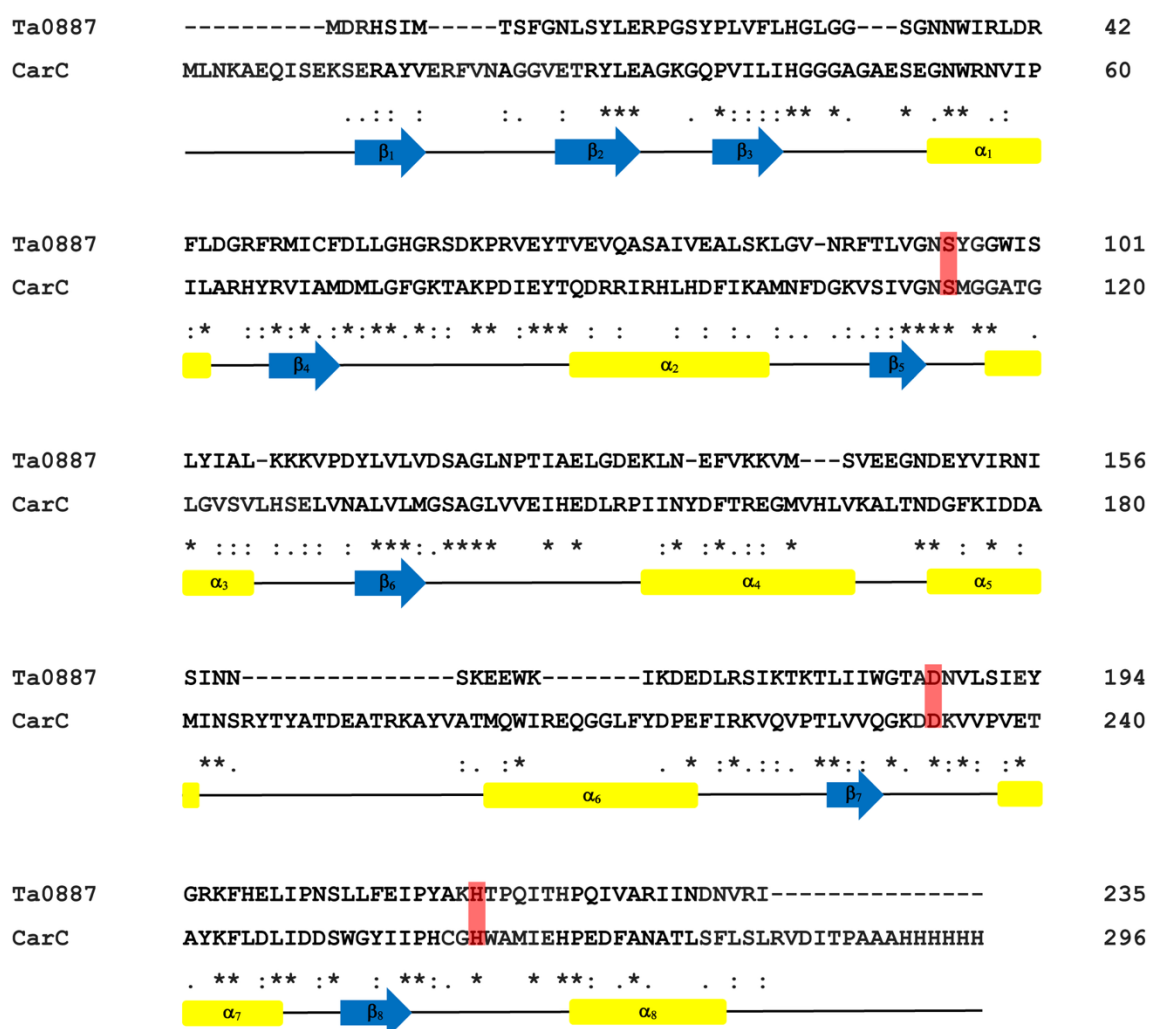


Figura 1. Alineamiento de secuencias de la proteína Ta0887 de *T. acidophilum* con la hidrolasa ht-CarCJ3 de *Janthinobacterium*. Los residuos catalíticos de CarC están conservados en Ta0887 (Ser95, Asp187, His215; sombreados en rojo) [73]. El alineamiento de secuencias se realizó con la herramienta EMBOSS Needle del servidor web EMBL-EBI (https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/psa/emboss_needle) [51]. La predicción de la estructura secundaria de Ta0887, realizada utilizando el servidor web Jpred4 (<https://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred/>), se muestra debajo del alineamiento [52]. Los rectángulos amarillos representan hélices α , mientras que las flechas azules indican hebras β .

Clonación, expresión y purificación de la proteína Ta0887 recombinante

La secuencia del gen *Ta0887* se optimizó para su expresión en *E. coli* y se clonó en el vector de expresión pET28. La construcción pET28-Ta0887 resultante se confirmó por secuenciación. Se realizaron ensayos de expresión en células de *E. coli* BL21 Star (DE3) a diferentes temperaturas, tiempos de inducción y concentraciones de IPTG. Las condiciones óptimas de expresión se obtuvieron con 0.4 mM de IPTG durante 4 horas a 37 °C (datos no mostrados).

La proteína recombinante se purificó mediante cromatografía líquida en dos pasos. En el primer paso, mediante cromatografía de afinidad a níquel, la proteína eluyó con 500 mM imidazol (Fig. 2A). Las fracciones que contenían la proteína se juntaron y se trataron con la proteasa 3C del rinovirus humano para eliminar la etiqueta 6XHis presente en el extremo N-terminal (Fig. 2C). En el segundo paso, la proteína se purificó mediante cromatografía de intercambio iónico, resultando en la elución de Ta0887 a una concentración promedio de 155 mM de NaCl (Fig. 2B,C). La cantidad de proteína purificada, después de juntar las fracciones que contenían la proteína, fue de 9.6 miligramos por litro de cultivo.

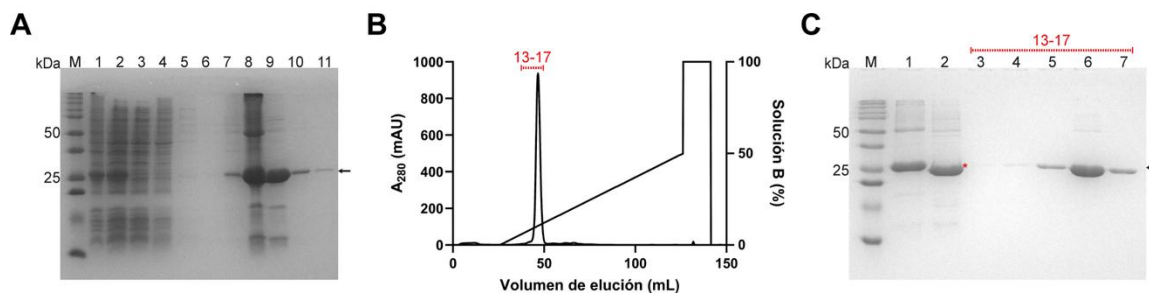


Figura 2. Purificación de Ta0887 mediante cromatografía líquida en dos pasos. **(A)** Análisis por SDS-PAGE al 15% de Ta0887 purificada por cromatografía de afinidad a níquel. Las muestras se tiñeron con Coomassie R250. M: marcador de peso molecular, 1: fracción de sonificado celular, 2: fracción de proteína soluble, 3: fracción no retenida, 4-5: fracciones de lavado, 6-11: proteínas eluidas con 500 mM de imidazol. **(B)** Cromatograma de la purificación de Ta0887 por cromatografía de intercambio iónico. El eje derecho de la ordenada representa el porcentaje de buffer B, el eje izquierdo de la ordenada representa la absorbancia a 280 nm y el eje de abscisas representa el volumen de elución. Las fracciones colectadas de la elución están señaladas en rojo. **(C)** Análisis mediante SDS-PAGE al 17% de las fracciones correspondientes al pico mostrado en el panel (B). M: marcador de peso molecular, 1: proteína purificada por afinidad a níquel, 2: proteína tratada con la proteasa HRV-3C, 3-7: fracciones correspondientes al pico del cromatograma. La flecha negra en (A), así como la flecha negra y el asterisco rojo en (C), indican la banda correspondiente a Ta0887.

Estado oligomérico de Ta0887 en solución

El peso molecular estimado de Ta0887 fue de 26.7 kDa. En el análisis de las muestras por SDS-PAGE durante el proceso de purificación, se observó una banda intensa de alrededor de 25 kDa. Sin embargo, este peso molecular se determinó bajo condiciones desnaturalizantes. Para evaluar el peso molecular y el estado oligomérico de la proteína en condiciones nativas, se llevaron a cabo experimentos de dispersión dinámica de luz (DLS). En estos experimentos, se determinó un radio hidrodinámico de Ta0887 de 2.4 ± 0.6 nm, correspondiente a un peso molecular estimado de 25.4 ± 1.0 kDa (Fig. 3). Por lo tanto, se concluyó que Ta0887 es un monómero en condiciones nativas.

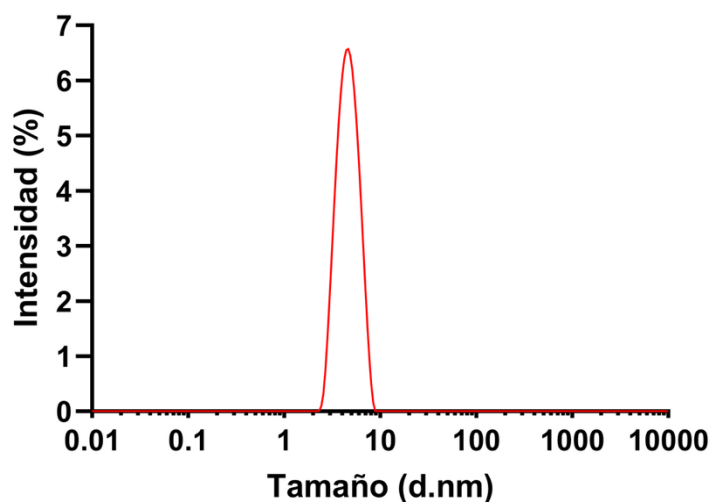


Figura 3. Determinación del estado oligomérico de Ta0887 en solución mediante dispersión dinámica de luz. El ensayo se realizó a una concentración de proteína de 1 mg mL⁻¹ en 20 mM HEPES (pH 7.0), 155 mM NaCl, 1 mM EDTA y 2mM β-mercaptoetanol. El eje de ordenadas corresponde a la intensidad, mientras que el eje de abscisas corresponde al diámetro de partícula. El análisis mostró un único pico correspondiente a un peso molecular de 25.4 ± 1.0 kDa, consistente con el peso molecular teórico de Ta0887.

Ta0887 es una esterasa termoestable con preferencia por *p*-NP hexanoato como sustrato

Para determinar la especificidad de sustrato de Ta0887, se evaluó su actividad utilizando ésteres de *p*-NP de diferentes longitudes de cadena, desde *p*-NP acetato (C2) hasta *p*-NP palmitato (C16). Ta0887 exhibió una marcada preferencia por sustratos de cadena corta a media (C2-C8), mostrando la mayor actividad específica con *p*-NP hexanoato (C6; Tabla 2; Fig. 4A). También se observó una alta actividad hidrolítica con *p*-NP butirato (C4), con un 66% de la actividad máxima. Por el contrario, se observaron niveles bajos de actividad con *p*-NP decanoato, *p*-NP laurato, *p*-NP miristato y *p*-NP palmitato (C10-C16; Tabla 2; Fig. 4A). Estos resultados indican que Ta0887 es una esterasa.

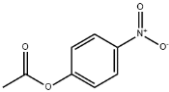
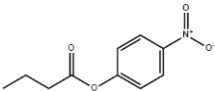
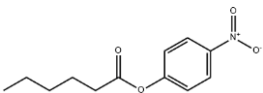
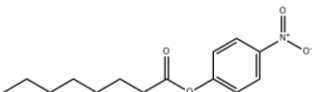
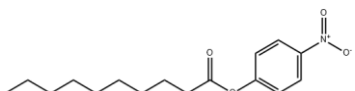
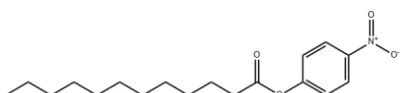
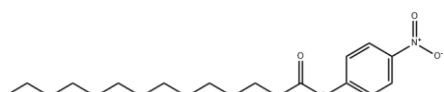
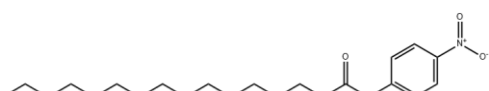
La temperatura óptima de reacción de Ta0887 se determinó en 65 °C (10.0 ± 0.1 U/mg), tras evaluar su actividad en un rango de temperaturas de 25 a 90 °C (Fig. 4B). A la temperatura óptima de crecimiento de *T. acidophilum* (~60 °C), Ta0887 presentó un 89% de su actividad máxima. La actividad disminuyó hasta el 34% a

los 80 °C y fue prácticamente nula a los 90 °C. De manera similar, se estableció su pH óptimo de reacción en 8.0 (13.5 ± 0.1 U/mg) tras medir su actividad en un rango de pH de 4.5 a 9.0 (Fig. 4C). La enzima mostró niveles de actividad superiores al 60% en el rango de temperaturas de 50 a 75 °C y de pH de 6.5 a 8.5, lo que indica que Ta0887 presenta un amplio rango de temperaturas y valores de pH de reacción.

Para evaluar la estabilidad térmica, Ta0887 se incubó durante 2 horas a temperaturas comprendidas entre 50 y 90 °C. A continuación, la enzima se enfrió a 4 °C y se midió su actividad residual. No se observó pérdida de actividad hasta los 75 °C. A los 80 °C, Ta0887 mostró un 66% de actividad residual y a temperaturas superiores la actividad fue prácticamente nula (Fig. 4D). Estos resultados fueron consistentes con los obtenidos en un ensayo de fluorimetría diferencial de barrido (DSF). En este ensayo, el punto medio de desnaturalización térmica (T_m) de Ta0887 en el buffer en el que se purificó fue de 80.6 ± 0.2 °C (Fig. 4E). La proteína exhibió una curva de transición sigmoidea muy pronunciada entre 72 y 85 °C, lo que sugiere un plegamiento homogéneo y compacto. Estos resultados indican que Ta0887 es termoestable y activa hasta los 80 °C.

Los parámetros cinéticos de Ta0887 se determinaron a pH 8.0 para *p*-NP hexanoato. La enzima mostró una cinética clásica de Michaelis-Menten, con valores de K_m y V_{max} de 1.0 ± 0.1 mM y 0.037 ± 0.002 $\mu\text{mol min}^{-1}$, respectivamente (Fig. 4F). Por su parte, la eficiencia catalítica de Ta0887 se determinó en 10.9 ± 0.5 $\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$.

Tabla 2. Especificidad de sustrato de Ta0887 frente a ésteres de *p*-NP de diferentes longitudes de cadena.

Sustrato	Estructura química	Actividad específica (U/mg)	Actividad relativa (%)
<i>p</i> -NP acetato (C2)		1.1 ± 0.3	16 ± 5
<i>p</i> -NP butirato (C4)		4.6 ± 0.1	66 ± 2
<i>p</i> -NP hexanoato (C6)		7.0 ± 0.1	100 ± 1
<i>p</i> -NP octanoato (C8)		3.1 ± 0.1	44 ± 1
<i>p</i> -NP decanoato (C10)		0.8 ± 0.2	12 ± 3
<i>p</i> -NP laurato (C12)		0.5 ± 0.4	8 ± 5
<i>p</i> -NP miristato (C14)		0.3 ± 0.2	4 ± 3
<i>p</i> -NP palmitato (C16)		0.2 ± 0.3	3 ± 5

Los valores representan la media ± desviación estándar de tres experimentos independientes. La actividad relativa se calculó considerando la actividad frente a *p*-NP hexanoato (C6) como el 100%.

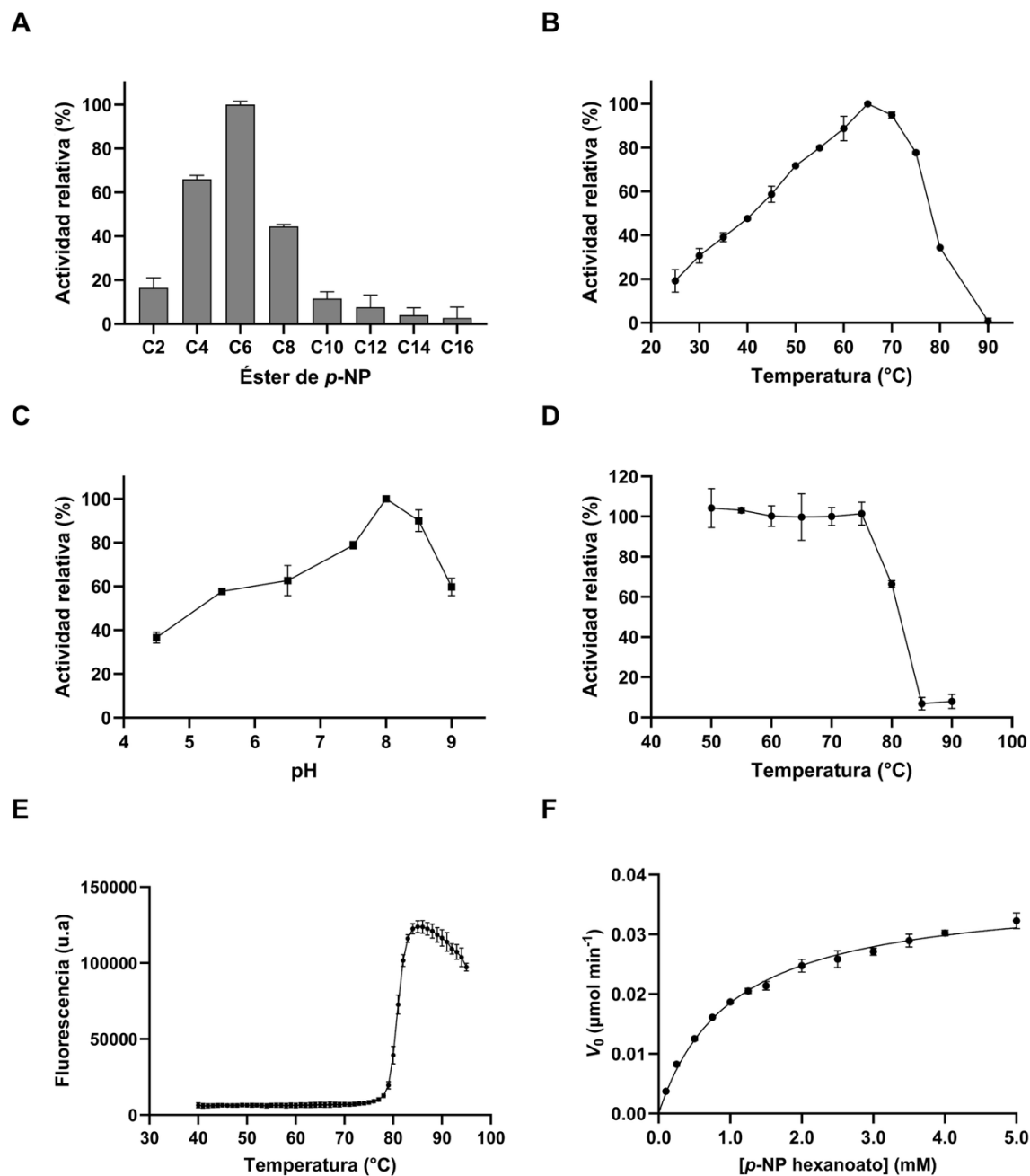


Figura 4. Propiedades bioquímicas de Ta0887. **(A)** La especificidad de sustrato de Ta0887 se evaluó utilizando diferentes ésteres de *p*-NP (C2-C16). La actividad de Ta0887 frente a *p*-NP hexanoato (C6) se estableció como el 100%. **(B)** Efecto de la temperatura sobre la actividad de Ta0887. **(C)** Efecto del pH sobre la actividad de Ta0887. En ambos paneles, (B) y (C), el punto en el que se observó la mayor actividad se estableció como el 100%. **(D)** Estabilidad térmica de Ta0887. La enzima se preincubó durante 2 horas a temperaturas comprendidas entre 50 y 90 °C y, a continuación, se midió su actividad residual. La actividad de Ta0887 sin preincubar se consideró como el 100%. **(E)** Curva de desnaturalización térmica de Ta0887 en el buffer P (20 mM HEPES,

pH 7.0; 155 mM NaCl; 1 mM EDTA; 2 mM β -mercaptoetanol). El valor estimado de T_m se calculó ajustando los datos a la ecuación de Boltzmann. El eje de ordenadas corresponde a la fluorescencia en unidades arbitrarias y el eje de abscisas corresponde a la temperatura. **(F)** Velocidades iniciales de Ta0887 en función de la concentración de *p*-NP hexanoato (C6). Los parámetros cinéticos K_m y V_{max} se determinaron mediante un análisis de regresión no lineal con la ecuación de Michaelis-Menten. En todos los paneles, los resultados corresponden al promedio de tres experimentos independientes y las barras de error representan la desviación estándar.

El residuo catalítico Ser95

Para validar el papel de la Serina en la posición 95, identificada como residuo catalítico en el análisis bioinformático, se generó una mutación puntual por Alanina (Ser95-Ala). Esta construcción se expresó y purificó utilizando la misma metodología descrita para la enzima de tipo silvestre. Su purificación se muestra en la Fig. 5. La estabilidad térmica de la mutante Ser95-Ala, determinada mediante DSF, exhibió un valor comparable al observado para la enzima de tipo silvestre (T_m de 83.2 ± 0.1 °C; Fig. 6A). Además, mediante DLS se observó un único pico, correspondiente a un peso molecular estimado de 32.3 ± 3.0 kDa, consistente con la presencia del monómero en solución (Fig. 6B). Posteriormente, se determinó la actividad de la mutante Ser95-Ala usando *p*-NP hexanoato como sustrato. Como se esperaba, la mutante no mostró actividad detectable bajo las mismas condiciones experimentales empleadas para la enzima de tipo silvestre (Fig. 6C). Estos resultados sugieren que la mutación en la posición 95 no afecta al plegamiento de la proteína y confirman el papel esencial de la serina nucleofílica en la actividad catalítica de Ta0887.

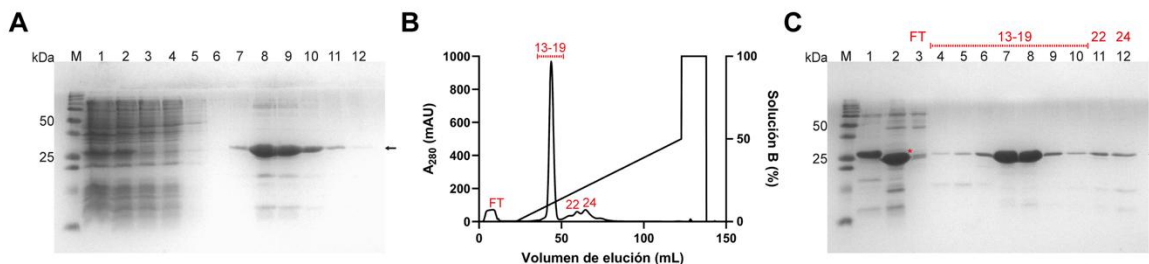


Figura 5. Purificación de la mutante Ser95-Ala. **(A)** Análisis por SDS-PAGE al 17% de la mutante Ser95-Ala purificada por cromatografía de afinidad de níquel. Las muestras se tiñeron con Coomassie R250. M: marcador de peso molecular, 1: fracción de sonificado celular, 2: fracción de proteína soluble, 3: fracción no retenida, 4-5: fracciones de lavado, 6-12: proteínas eluidas con 500 mM de imidazol. **(B)** Cromatograma de la purificación de la mutante Ser95-Ala por cromatografía de intercambio iónico. La fracción no retenida (FT) y las fracciones eluidas (13-19, 22 y 24) están señaladas en rojo. **(C)** Análisis mediante SDS-PAGE al 17% de las fracciones señaladas en rojo en el panel (B). M: marcador de peso molecular, 1: proteína purificada por afinidad a níquel, 2: proteína tratada con la proteasa HRV-3C, 3: fracción no retenida (FT), 4-10: fracciones 13 a 19, correspondientes al pico principal del cromatograma, 11: fracción 22, 12: fracción 24. Se agruparon las fracciones 15 a 19. La flecha negra en (A), así como la flecha negra y el asterisco rojo en (C), indican la banda correspondiente a la mutante Ser95-Ala.

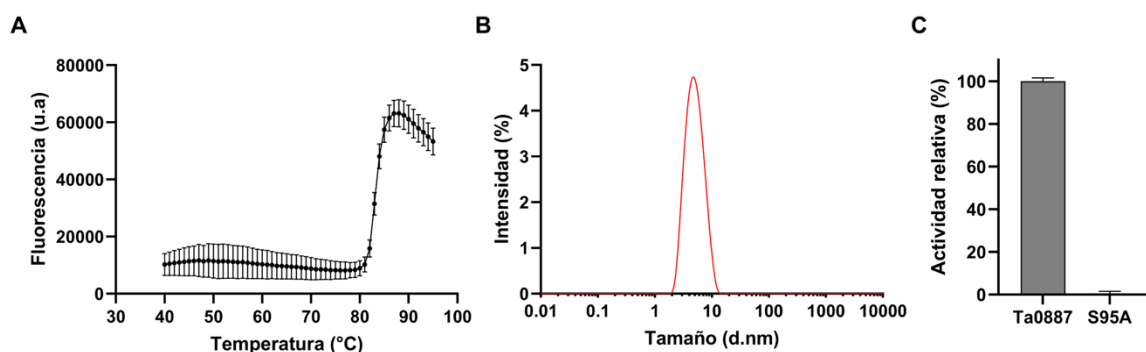


Figura 6. Estabilidad térmica, estado oligomérico y actividad relativa de la mutante Ser95-Ala. **(A)** Curva de desnaturalización térmica de la mutante Ser95-Ala en el buffer P (20 mM HEPES, pH 7.0; 155 mM NaCl; 1 mM EDTA; 2 mM β -mercaptoetanol). El valor estimado de la T_m se calculó ajustando los datos a la ecuación de Boltzmann. **(B)** Determinación del estado oligomérico de la mutante Ser95-Ala mediante dispersión dinámica de luz. Estas mediciones se realizaron a una concentración de proteína de 1 mg mL⁻¹ en el buffer P. El análisis mostró un único pico correspondiente a un peso molecular estimado de 32.3 ± 3.0 kDa, consistente con un estado monomérico en condiciones nativas. **(C)** Actividad relativa de Ta0887 y de la mutante Ser95-Ala

con *p*-NP hexanoato. La actividad de Ta0887 se estableció como el 100%. Los datos representan la media $\pm$ desviación estándar de tres réplicas independientes.

Estructura general de Ta0887

Ta0887 se cristalizó en el grupo espacial $P3_221$, con dimensiones de celda unitaria de $a = 117.05 \text{ \AA}$, $b = 117.05 \text{ \AA}$, $c = 91.71 \text{ \AA}$, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 90^\circ$, $\gamma = 120^\circ$. La estructura cristalina se determinó mediante el método de reemplazo molecular, utilizando como modelo la estructura de la proteína homóloga ht-CarCJ3 de *Janthinobacterium* sp. cepa J3 (PDB: 1J1I). Los valores de LLG, RFZ, TFZ y PAK fueron de 4041, 4.2, 62.9 y 0, respectivamente. El LLG (log-likelihood gain) mide cuánto mejor predice los datos de difracción el modelo obtenido en comparación con una distribución aleatoria de los mismos átomos. El RFZ y el TFZ corresponden a los Z-scores de las funciones de rotación y traslación, respectivamente, e indican el número de desviaciones estándar que separan el valor de la solución de la media. Por su parte, el valor de PAK indica el número de choques de empaquetamiento. En Phaser, valores de TFZ superiores a 8 y de LLG superiores a 60 generalmente indican una solución correcta del reemplazo molecular, mientras que una orientación correcta puede presentar valores de RFZ inferiores a 4 [64]. Por tanto, los valores de TFZ y LLG, junto con la ausencia de choques de empaquetamiento, respaldaron la solución obtenida.

El análisis de los datos de difracción con el programa *phenix.xtriage* del software Phenix mostró un coeficiente de Matthews de $3.43 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$ y un factor B de Wilson de $16.19 \text{ \AA}^2$. El coeficiente de Matthews, definido como la relación entre el volumen de la unidad asimétrica y el peso molecular de todas las moléculas de proteína presentes en ella, permite estimar el número probable de moléculas de proteína y el contenido de solvente en la unidad asimétrica. En este caso, el contenido de solvente estimado fue de aproximadamente 64% [74, 75]. El factor B de Wilson se obtiene a partir de la disminución de la intensidad de difracción al aumentar la resolución y proporciona una estimación del factor B global de los datos de difracción. Además, el análisis no mostró indicios de anomalías, como cristales gemelos o presencia de anillos de hielo. La existencia de cristales gemelos implica la presencia de dominios cristalinos con diferentes orientaciones,

cuyos patrones de difracción se superponen parcial o completamente [76]. Por su parte, la presencia de anillos de hielo se debe a la difracción de múltiples cristales de hielo orientados aleatoriamente, que pueden alterar las intensidades medidas [77].

El modelo final se refinó utilizando PHENIX a una resolución de 1.93 Å, con valores de R_{work} y R_{free} de 0.170 y 0.199, respectivamente; la diferencia entre ambos fue de 0.029, inferior a 0.05. Diferencias superiores a este valor pueden indicar un sobreajuste de los datos, por lo que estos valores son consistentes con un modelo adecuadamente refinado (Tabla 3). Su geometría se evaluó con MolProbity [66], que indicó una elevada calidad estereoquímica, con un score de MolProbity de 1.06, correspondiente al percentil 100 entre estructuras de resolución comparable, y con el 96.8 % de los residuos en las regiones favorables del gráfico de Ramachandran. El reporte completo de validación de la estructura de Ta0887, generado durante su depósito en Protein Data Bank, se presenta en el Material suplementario 2.

La unidad asimétrica (ASU) está compuesta por dos monómeros, con una desviación cuadrática media (RMSD) de 0.34 Å para los átomos C α . La principal diferencia estructural entre ambos monómeros se observa en la región comprendida entre los residuos 128 y 146, que forma parte del dominio tapa. La estructura de Ta0887 comprende un dominio central con el plegamiento canónico α/β -hidrolasa característico de las esterasas (residuos 1–123 y 168–235) y un dominio tapa ubicado entre los residuos 123 y 168 (residuos 124–167). El dominio central está compuesto por una lámina β de ocho hebras (β 1– β 8), con la β 2 antiparalela, rodeadas por siete hélices α que forman un sándwich $\alpha/\beta/\alpha$. Las hélices α 1, α 10 y α 11 se sitúan en uno de los lados del sándwich, mientras que las hélices α 2, α 3, α 8 y α 9 se encuentran en el otro. Por su parte, el dominio tapa está formado por las hélices α 4 a α 7 (Fig. 7A,B). El bolsillo de unión al sustrato, que contiene los residuos catalíticos Ser95, Asp187 y His215, se localiza en la interfaz entre ambos dominios (Fig. 7B,C).

Tabla 3. Estadísticas de la colección de datos de difracción de rayos X y del refinamiento.

	Ta0887
Colección de datos	
Grupo espacial	P3 ₂ 21
Dimensiones de celda unitaria	
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	117.05, 117.05, 91.71
α , β , γ (°)	90, 90, 120
Longitud de onda	1.54178
Resolución (Å)	50.00–1.93 (1.96–1.93) ^a
Coefficiente de Matthews (Å ³ Da ⁻¹)	3.43
N.º total de reflexiones	624532
N.º de reflexiones únicas	54668
Compleitud (%)	100 (100) ^a
<i>R</i> _{merge}	0.120 (0.937) ^a
<i>I</i> / σ (<i>I</i>) promedio	18.9 (2.6) ^a
Redundancia	11.4 (8.3) ^a
Refinamiento	
Resolución (Å)	50.00–1.93
N.º de reflexiones	54617
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free}	0.170/0.199 ^b
Factor B promedio (Å²)	
Global	19.39
A partir del gráfico de Wilson	18.05
N.º de monómeros en ASU	2
N.º de residuos	469
N.º de átomos	7727
N.º de moléculas de agua	308
Desviaciones RMS respecto del ideal	
Longitudes de enlace (Å)	0.012
Ángulos de enlace (°)	1.131
Score de choques estéricos	1.35 ^c
Rotámeros favorables (%)	96.03 ^c
Rotámeros desfavorables (%)	0.00 ^c
Estadísticas del gráfico de Ramachandran (%)	
Regiones favorables	96.8 ^c
Regiones no permitidas	0.00 ^c
Código PDB	10XN

^aLos valores entre paréntesis corresponden al último intervalo de resolución.

^bEl valor de *R*_{free} se calculó utilizando un subconjunto independiente del 5% de las reflexiones excluidas durante el refinamiento.

^cEl análisis de los choques estéricos, las conformaciones favorables de los rotámeros y el gráfico de Ramachandran se realizó con MolProbity.

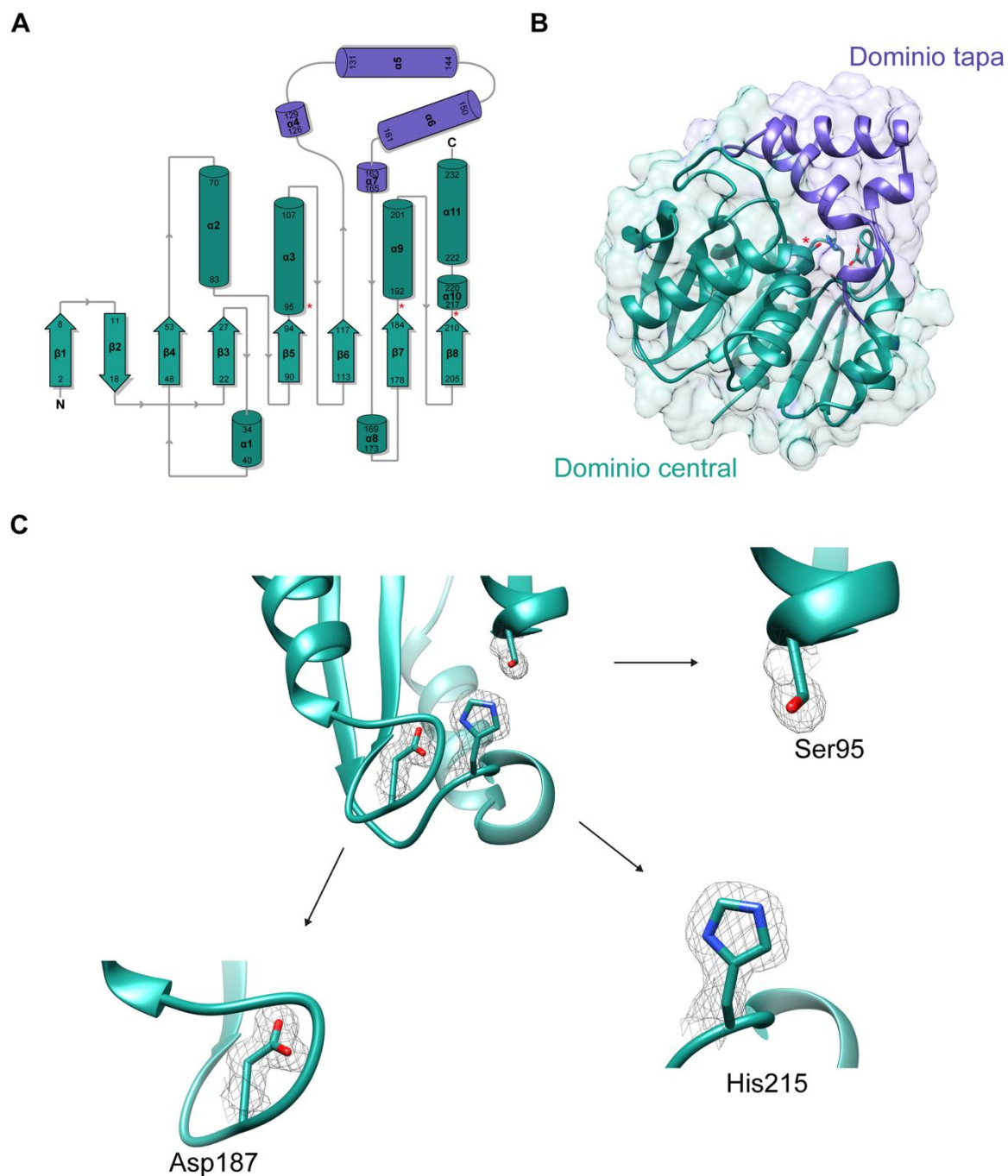


Figura 7. Estructura cristalina de Ta0887. El dominio central y el dominio tapa se muestran en turquesa y en violeta, respectivamente. **(A)** La topología de Ta0887 consta de ocho hebras β (flechas) y once hélices α (cilindros). La ubicación de los residuos catalíticos se indica con un asterisco rojo. **(B)** Representación en cintas de la estructura cristalina de Ta0887. El dominio central, que presenta un plegamiento α/β -hidrolasa, se muestra orientado hacia abajo en turquesa; en la parte superior, el dominio tapa α -helicoidal se muestra en violeta. El residuo catalítico Ser95 se indica con un asterisco rojo. **(C)** Vista detallada del sitio activo, con los residuos conservados de

la tríada catalítica Ser95, His215 y Asp187 representados como varillas. Las flechas indican vistas ampliadas de los residuos, mostrando sus correspondientes mapas de densidad electrónica $2mF_o - DF_c$ contorneados a 1.5σ .

El sitio activo de Ta0887

El sitio activo está constituido por los residuos Ser95, His215 y Asp187, que forman la tríada catalítica. La serina nucleofílica Ser95 forma parte del motivo conservado G-X-S-X-G, situado en un giro pronunciado que conecta la hebra $\beta 5$ con la hélice $\alpha 3$. His215 se localiza en el bucle que conecta la hebra $\beta 8$ con la hélice $\alpha 10$, mientras que Asp187 se sitúa entre la hebra $\beta 7$ y la hélice $\alpha 9$. Se observan enlaces de hidrógeno entre los residuos de la tríada catalítica. El átomo O γ de Ser95 se encuentra a una distancia de 2.74 Å del nitrógeno (N $\epsilon 2$) de His215. Por su parte, el N $\delta 1$ de His215 se encuentra a 2.94 Å del O $\delta 2$ de Asp187. Ser95 está rodeada por los residuos Leu30, Leu90, Tyr96, Ala120, Ile126, Leu129, Phe137, Val141, Val189 y Leu190, que forman una región hidrofóbica parcialmente oculta en la zona central del bolsillo de unión al sustrato (Fig. 8A,B). El bolsillo de unión al sustrato es de gran tamaño y se extiende a ambos lados de Ser95 a lo largo de la interfaz entre el dominio central y el dominio tapa. En el bolsillo predominan las cargas positivas (Fig. 8C). Además, un análisis de hendiduras realizado con las herramientas de PDBsum [69, 78] determinó que el volumen del bolsillo de unión al sustrato de Ta0887 era de 3293.2 Å³ (Fig. 8D; Tabla 4). A continuación, se realizó una búsqueda con el servidor DALI [79] para identificar homólogos estructurales capaces de utilizar sustratos similares a los de Ta0887. Las esterasas seleccionadas para el análisis incluyeron las de *Exiguobacterium antarcticum* (EaEst, PDB: 5H3H), *Thermogutta terrifontis* (TtEst, PDB: 4UHC), *Alistipes shahii* (AsFAE, PDB: 7DQ9), una esterasa identificada en una biblioteca metagenómica de tierra negra amazónica (Ade1, PDB: 8V16) y una esterasa de *Archaeoglobus fulgidus* (AF-Est2, PDB: 5FRD). El análisis de hendiduras con PDBsum reveló variaciones significativas en el tamaño de las cavidades, con volúmenes comprendidos entre 966.1 y 5423.6 Å³. A pesar de poseer el menor número de residuos, Ta0887 exhibe una cavidad notablemente grande en comparación con las demás esterasas, con la excepción de Ade1, cuya

cavidad es de mayor tamaño. Este hallazgo sugiere que Ta0887 podría utilizar otros sustratos, probablemente de mayor volumen, aún por identificar.

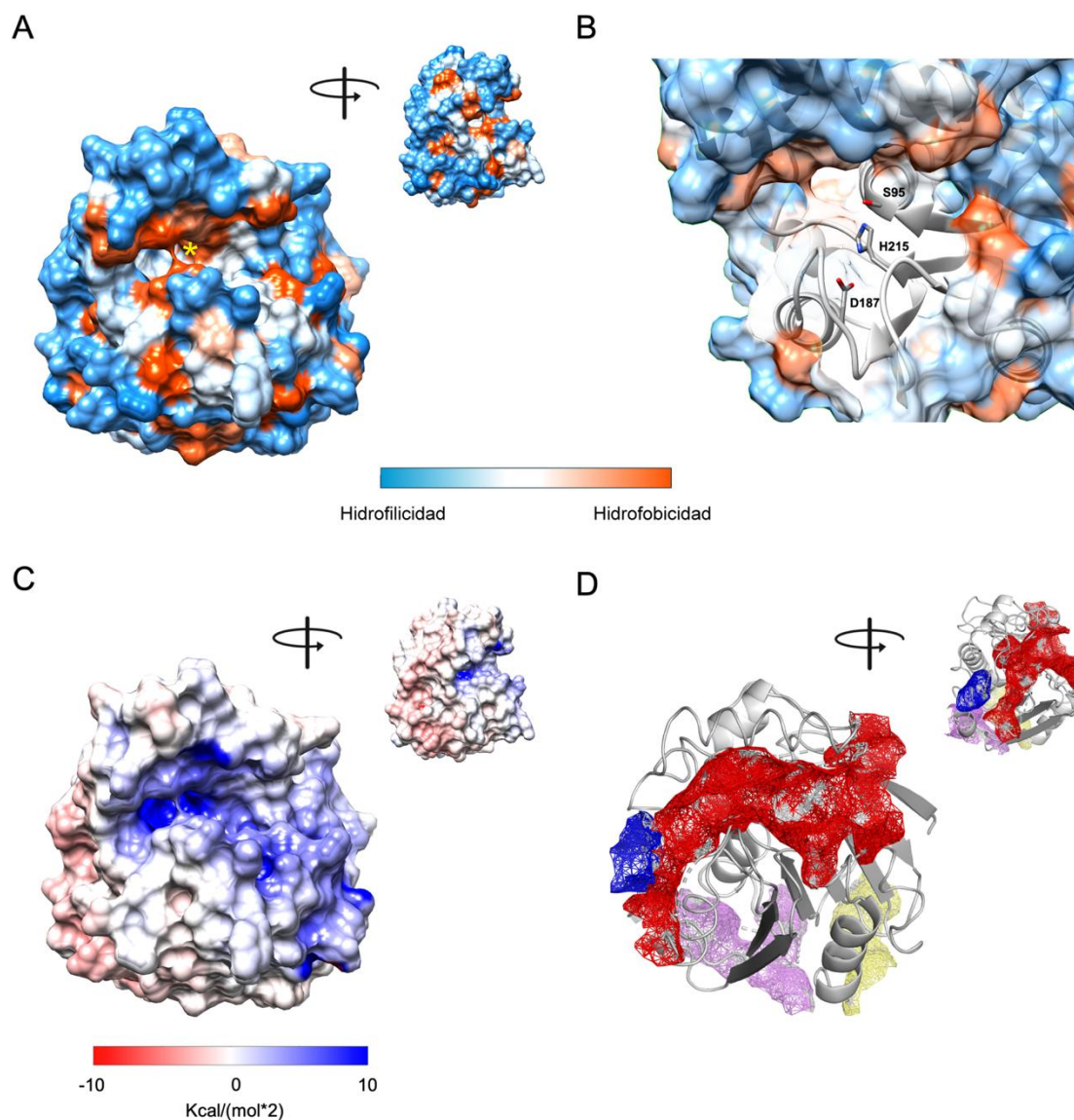


Figura 8. Propiedades hidrofóbicas y electrostáticas de Ta0887. **(A)** Representación de la superficie hidrofóbica de Ta0887. La región hidrofóbica (rojo anaranjado) que rodea a Ser95 (asterisco amarillo) es visible en el centro del bolsillo de unión al sustrato; las regiones hidrofílicas se muestran en azul claro. **(B)** Vista detallada de la región hidrofóbica mencionada anteriormente en (A). Los residuos de la tríada catalítica se representan como varillas. Ser95 se localiza en el fondo del bolsillo, dentro de una región hidrofóbica. La figura en (A) se rotó 45° hacia la izquierda alrededor del eje vertical y se muestra una sección transversal de la proteína. **(C)** Representación de la superficie de Ta0887 que muestra su potencial electrostático calculado. Las regiones con

carga positiva se muestran en azul y las regiones con carga negativa en rojo. En el bolsillo de unión al sustrato predominan las cargas positivas. **(D)** Superficie de unión al sustrato de Ta0887, con un volumen de 3293.2 Å³, determinado mediante un análisis de hendiduras con las herramientas de PDBsum. Los paneles (A), (B) y (C) se generaron con UCSF Chimera; el panel (D) se generó con PyMOL.

Tabla 4. Análisis de hendiduras de la cavidad de unión al sustrato de Ta0887 en comparación con homólogos estructurales identificados con el servidor DALI.

Proteína	PDB	Longitud (residuos)	Z-score ^a	RMSD ^a (Å)	Volumen de la cavidad de unión al sustrato (Å ³) ^b
Ta0887	10XN	235	-	-	3293.2
EaEst	5H3H	272	29.5	2.1	966.1
TtEst	4UHC	282	28.2	2.3	1480.4
AsFAE	7DQ9	265	27.2	2.3	2348.2
Ade1	8V16	274	27.3	2.4	5423.6
AF-Est2	5FRD	260	26.8	2.2	2249

^aLos valores se obtuvieron mediante el análisis realizado con el servidor DALI.

^bEl volumen de la cavidad de unión al sustrato se estimó utilizando las herramientas de PDBsum.

Discusión

En este estudio, la esterasa Ta0887 de *T. acidophilum* se clonó, purificó y caracterizó con éxito bioquímica y estructuralmente. Basándose en el análisis de su secuencia de aminoácidos con secuencias homólogas, la enzima se clasificó en la familia V de enzimas lipolíticas [6]. La tríada catalítica de Ta0887, constituida por Ser95, Asp187 y His215, presenta la Ser95 nucleofílica dentro del motivo pentapeptídico G-N-S-Y-G. Hasta donde sabemos, este motivo se reporta por primera vez en esterasas caracterizadas [6]. Los experimentos de DLS revelaron que Ta0887 se encuentra como monómero en solución, lo que es consistente con lo descrito previamente para sus homólogos AsFAE de *Alistipes shahii* (42.4% de similitud de secuencia, PDB: 7DQ9) y AF-Est2 de la arquea hipertermófila *Archaeoglobus fulgidus* (34.5% de similitud de secuencia, PDB: 5FRD) [37, 80]. Los estudios de especificidad de sustrato confirmaron que Ta0887 es una esterasa, ya que exhibe una clara preferencia por ésteres de *p*-NP de cadena corta a media, observándose la mayor actividad específica con *p*-NP hexanoato (C6). La esterasa homóloga AF-Est2 presenta un perfil de actividad similar, mostrando preferencia por *p*-NP valerato (C5), seguido de *p*-NP butirato y *p*-NP octanoato [37]. De forma similar, la esterasa AFEST, también identificada en *A. fulgidus*, muestra su mayor actividad frente a *p*-NP hexanoato [35]. Entre los ésteres de *p*-NP, los sustratos preferidos por la mayoría de las carboxilesterasas arqueales caracterizadas son *p*-NP valerato y *p*-NP hexanoato [27-29, 31, 32, 34, 35]. Este perfil de especificidad también es consistente con el observado en las enzimas lipolíticas de la familia V [81].

La actividad óptima de Ta0887 se determinó a 65 °C y pH 8.0, similar a la reportada para la esterasa ST0071 de *S. tokodaii* (70 °C, pH 8.0) [25]. Dos esterasas de la arquea termoacidófila *S. solfataricus* P1 [29, 30] y la esterasa de *S. acidocaldarius* [31], también exhibieron un pH óptimo de reacción de 8.0. Por su parte, AsFAE presenta un pH óptimo de 8.5 y una temperatura óptima de 40 °C, en concordancia con la naturaleza mesófila de *A. shahii* [80]. El pH óptimo de reacción de Ta0887 (pH 8.0) difiere significativamente del pH óptimo de crecimiento de *T. acidophilum* (pH 1.0-2.0) y del pH intracelular del organismo (pH

5.5) [46, 82]. Este comportamiento, también observado en las esterases de *S. tokodaii* [25], *S. solfataricus* P1 [29, 30] y *S. acidocaldarius* [31], sugiere que las esterases de arqueas termoacidófilas pueden presentar una actividad óptima en condiciones de pH diferentes a las del organismo. Muchos ésteres son estables en condiciones neutras o ligeramente alcalinas, por lo que este comportamiento podría deberse a una adaptación evolutiva destinada a preservar la estabilidad del sustrato y garantizar una hidrólisis eficiente [25]. Además, las características del sitio activo de Ta0887 podrían estar favoreciendo interacciones electrostáticas específicas con el sustrato o un estado de protonación óptimo para la reacción en condiciones de pH ligeramente alcalino.

A pesar de su potencial como fuente de enzimas termoestables con aplicaciones industriales y biotecnológicas, hasta la fecha se han caracterizado pocas esterases de arqueas. En este sentido, los ensayos de termoestabilidad de Ta0887 demostraron que es una esterase altamente termoestable, que mantiene aproximadamente un 66% de actividad residual tras 2 horas de incubación a 80 °C, en concordancia con su T_m de 80.6 °C. Cabe señalar que en estudios previos se han descrito resultados comparables. Por ejemplo, la esterase ST0071 mantiene aproximadamente el 100% de su actividad después de una incubación de 2 horas a 80 °C, mientras que su actividad disminuye gradualmente a temperaturas superiores [25]. De manera similar, la esterase homóloga AF-Est2 de *A. fulgidus* mostró una pérdida de actividad tras 30 minutos de incubación a temperaturas superiores a 80 °C, con una inactivación completa después de la incubación a 95 °C [37]. Por su parte, la esterase Est3 de *S. solfataricus* P2 retuvo una actividad residual inferior al 20% tras 2 horas de incubación a 80 °C [28]. Estudios posteriores permitirán determinar el potencial uso industrial o biotecnológico de Ta0887.

Por otra parte, la estructura cristalina de Ta0887 reveló un dominio central con el plegamiento canónico α/β -hidrolasa, típico de las esterases, y un dominio tapa α -helicoidal. Este dominio tapa está presente en otras esterases que comparten más de un 31% de similitud de secuencia con Ta0887. En estas esterases, al igual que en Ta0887, el dominio está compuesto principalmente por hélices α , aunque

también puede incluir hebras β [37, 80, 83-86]. La tríada catalítica de Ta0887, ubicada en el bolsillo de unión al sustrato, presenta una disposición espacial análoga a la de AsFAE (PDB: 7DQ9), aunque la cavidad es de mayor tamaño en Ta0887.

Como se ha demostrado en estudios previos, el tamaño, la forma, la orientación y la disposición espacial del dominio tapa con respecto al dominio central determinan de manera crítica la especificidad de sustrato. Esto se logra mediante la formación de un bolsillo de unión al sustrato única [84, 85, 87]. Esto podría explicar la preferencia de Ta0887 por sustratos de cadena corta a media (C2-C8), en contraste con AsFAE, que muestra actividad únicamente frente a sustratos de cadena corta (C2-C4) [80]. Los residuos del bolsillo de unión también influyen en la especificidad de sustrato. Sayer y colaboradores [88] demostraron que la presencia de residuos polares y cargados en el bolsillo de unión al sustrato de la enzima TtEst2 de *Thermogutta terrifontis* favorece la unión de ésteres de *p*-NP de cadena corta, como el *p*-NP butirato. En este sentido, la composición del sitio activo de Ta0887 podría estar relacionada con su perfil de especificidad. Por otro lado, Wei y colaboradores [80] identificaron residuos clave en el bolsillo de unión al sustrato de AsFAE. Estos residuos, al ser mutados por alanina, aumentaron significativamente la K_m , confirmando el papel esencial de estos residuos en el reconocimiento, la unión y la afinidad por el sustrato. En otro estudio, el residuo Glu154 del motivo pentapeptídico de Est19 de *Pseudomonas* sp. E2-15 se mutó a Asp. Esta modificación redujo significativamente la actividad de la enzima frente a su sustrato preferencial, mientras que aumentó su actividad con sustratos de cadena más larga (*p*-NP decanoato (C10) y *p*-NP laurato (C12)). Esta sustitución dio lugar a una cavidad de unión más profunda en Est19, lo que dificultó la orientación de sustratos pequeños y facilitó el acceso de sustratos más grandes [8]. Asimismo, el papel de residuos específicos del dominio tapa en la determinación de la especificidad de sustrato se ha confirmado mediante mutagénesis [11, 80, 84, 86]. Por ejemplo, Zhu y colaboradores sustituyeron por alanina los residuos Asn121 y His125 en la hélice $\alpha 4$ del dominio tapa de EprEst. Estas mutaciones, al eliminar los contactos estéricos, aumentaron la actividad de

EprEst frente a *p*-NP butirato en 2.5 y 3.5 veces, respectivamente [84]. Por su parte, Wei y colaboradores sustituyeron por alanina los residuos Glu129 y Lys130 del dominio tapa de AsFAE, demostrando que las cadenas laterales más cortas mejoraron tanto la afinidad como la eficiencia catalítica frente a sus sustratos [80]. Estos resultados ponen de manifiesto el papel fundamental del dominio tapa en el establecimiento de un bolsillo de unión al sustrato característico que determina la especificidad de sustrato.

En conjunto, estas observaciones apoyan que las características del dominio tapa y del bolsillo de unión al sustrato de Ta0887 contribuyen a explicar su preferencia por ésteres de *p*-NP de cadena corta y media.

Conclusiones

En este estudio, clonamos y sobreexpresamos el gen *Ta0887* de *Thermoplasma acidophilum* en *Escherichia coli* para posteriormente purificar la enzima recombinante y caracterizarla bioquímica y estructuralmente. Aunque Ta0887 está anotada como una lipasa, nuestros resultados demuestran que se trata de una nueva esterasa altamente termoestable con un dominio tapa α -helicoidal que determina su especificidad de sustrato. Hasta donde sabemos, esta es la primera esterasa caracterizada de *T. acidophilum*.

La capacidad de Ta0887 para catalizar eficientemente la hidrólisis de ésteres de *p*-NP de cadena corta y media, junto con su actividad óptima a 65 °C y pH 8.0 y su notable estabilidad térmica, sugiere un potencial uso de la enzima en la industria alimentaria. Esta esterasa podría aplicarse en el procesamiento de alimentos, como en la modificación de productos lácteos y en la mejora de las propiedades sensoriales de los alimentos mediante la síntesis de compuestos que contribuyen al aroma y al sabor [14]. La futura evaluación del efecto de solventes, surfactantes e iones metálicos sobre la actividad de Ta0887, así como la caracterización de la reacción de transesterificación, permitirá ampliar significativamente su rango de aplicaciones biotecnológicas. Finalmente, la estructura cristalina resuelta de Ta0887 establece un punto de partida sólido para el diseño de mutaciones puntuales en residuos específicos del bolsillo de unión al sustrato y del dominio tapa, con el fin de profundizar en la relación entre su estructura y su función, mejorar su rendimiento catalítico y ampliar su potencial biotecnológico.

Referencias

1. Levisson, M., et al., *Crystal Structure and Biochemical Properties of a Novel Thermostable Esterase Containing an Immunoglobulin-Like Domain*. Journal of Molecular Biology, 2009. **385**(3): p. 949–962.
2. Casas-Godoy, L., et al., *Lipases: an overview*. Methods Mol Biol, 2012. **861**: p. 3–30.
3. Lai, O.M., et al., *Lipase/Esterase: Properties and Industrial Applications*. Encyclopedia of Food Chemistry, 2019.
4. Zhu, Y., et al., *Molecular cloning and characterization of a new and highly thermostable esterase from Geobacillus sp. JM6*. J Basic Microbiol, 2015. **55**(10): p. 1219–31.
5. Kovacic, F., et al., *Classification of Lipolytic Enzymes from Bacteria*, in *Aerobic Utilization of Hydrocarbons, Oils and Lipids*, F. Rojo, Editor. 2018, Springer International Publishing: Cham. p. 1–35.
6. Arpigny, J.L. and K.E. Jaeger, *Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties*. The Biochemical journal, 1999. **343 Pt 1**(Pt 1): p. 177–183.
7. Jaeger, K.E., B.W. Dijkstra, and M.T. Reetz, *Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases*. Annual Review of Microbiology, 1999. **53**(Volume 53, 1999): p. 315–351.
8. Liu, X., et al., *Identification and Biochemical Characterization of a Novel Hormone-Sensitive Lipase Family Esterase Est19 from the Antarctic Bacterium Pseudomonas sp. E2-15*. Biomolecules, 2021. **11**(11).
9. Bornscheuer, U.T., *Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis*. FEMS Microbiology Reviews, 2002. **26**(1): p. 73–81.

10. Fenster, K.M., K.L. Parkin, and J.L. Steels, *Intracellular esterase from Lactobacillus casei LILA: nucleotide sequencing, purification, and characterization*. J Dairy Sci, 2003. **86**(4): p. 1118–29.
11. Sha, L., et al., *Structure-directed bioengineering the lid1 of cold-adapted Pseudomonas sp. TB11 esterase to boost catalytic capacity*. Int J Biol Macromol, 2024. **255**: p. 128302.
12. Kourist, R., H. Brundiek, and U.T. Bornscheuer, *Protein engineering and discovery of lipases*. European Journal of Lipid Science and Technology, 2010. **112**(1): p. 64–74.
13. Miguel-Ruano, V., et al., *Biochemical and Structural Characterization of a novel thermophilic esterase EstD11 provide catalytic insights for the HSL family*. Computational and Structural Biotechnology Journal, 2021. **19**: p. 1214–1232.
14. Zarafeta, D., et al., *Metagenomic mining for thermostable esterolytic enzymes uncovers a new family of bacterial esterases*. Scientific Reports, 2016. **6**(1): p. 38886.
15. Research, G.V., *Hydrolase Enzymes Market Size, Share & Trends Analysis Report By Product (Esterase, Glycosylase), By Application (Pharmaceutical, Food & Beverage), By Region, And Segment Forecasts, 2022 - 2030*. 2022.
16. De Luca, V. and L. Mandrich, *Chapter 13 - Lipases/esterases from extremophiles: main features and potential biotechnological applications*, in *Physiological and Biotechnological Aspects of Extremophiles*, R. Salwan and V. Sharma, Editors. 2020, Academic Press. p. 169–181.
17. Hamdan, S.H., et al., *Thermostable lipases and their dynamics of improved enzymatic properties*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2021. **105**(19): p. 7069–7094.
18. Lagarde, D., et al., *High-Throughput Screening of Thermostable Esterases for Industrial Bioconversions*. Organic Process Research & Development, 2002. **6**(4): p. 441–445.

19. Meghwanshi, G.K., et al., *Archaeal lipolytic enzymes: Current developments and further prospects*. Biotechnology Advances, 2022. **61**: p. 108054.
20. Hess, M., M. Katzer, and G. Antranikian, *Extremely thermostable esterases from the thermoacidophilic euryarchaeon *Picrophilus torridus**. Extremophiles, 2008. **12**(3): p. 351–64.
21. Gao, R., et al., *Cloning, purification and properties of a hyperthermophilic esterase from archaeon *Aeropyrum pernix* K1*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2003. **24-25**: p. 1–8.
22. Wang, B., et al., *A novel phospholipase A2/esterase from hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix* K1*. Protein Expression and Purification, 2004. **35**(2): p. 199–205.
23. Chow, J., et al., *The Thaumarchaeon *N. gargensis* carries functional bioABD genes and has a promiscuous *E. coli* Δ bioH-complementing esterase EstN1*. Scientific Reports, 2018. **8**(1): p. 13823.
24. Ejima, K., et al., *Molecular cloning and characterization of a thermostable carboxylesterase from an archaeon, *Sulfolobus shibatae* DSM5389: Non-linear kinetic behavior of a hormone-sensitive lipase family enzyme*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2004. **98**(6): p. 445–451.
25. Suzuki, Y., K. Miyamoto, and H. Ohta, *A novel thermostable esterase from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus tokodaii* strain 7*. FEMS Microbiology Letters, 2004. **236**(1): p. 97–102.
26. Angkawidjaja, C., et al., *Structure and stability of a thermostable carboxylesterase from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus tokodaii**. The FEBS Journal, 2012. **279**(17): p. 3071–3084.
27. Morana, A., et al., *A carboxylesterase from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*: cloning of the gene, characterization of the protein*. Gene, 2002. **283**(1): p. 107–115.

28. Kim, S. and S.B. Lee, *Thermostable Esterase from a Thermoacidophilic Archaeon: Purification and Characterization for Enzymatic Resolution of a Chiral Compound*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2004. **68**(11): p. 2289–2298.
29. Nam, J.-K., Y.-J. Park, and H.-B. Lee, *Cloning, expression, purification, and characterization of a thermostable esterase from the archaeon Sulfolobus solfataricus P1*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2013. **94**: p. 95–103.
30. Park, Y.-J., S.Y. Choi, and H.-B. Lee, *A carboxylesterase from the thermoacidophilic archaeon Sulfolobus solfataricus P1; purification, characterization, and expression*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 2006. **1760**(5): p. 820–828.
31. Sobek, H. and H. Görisch, *Purification and characterization of a heat-stable esterase from the thermoacidophilic archaeobacterium Sulfolobus acidocaldarius*. The Biochemical journal, 1988. **250**(2): p. 453–458.
32. Sobek, H. and H. Görisch, *Further kinetic and molecular characterization of an extremely heat-stable carboxylesterase from the thermoacidophilic archaeobacterium Sulfolobus acidocaldarius*. Biochemical Journal, 1989. **261**(3): p. 993–998.
33. Shao, H., L. Xu, and Y. Yan *Biochemical Characterization of a Carboxylesterase from the Archaeon Pyrobaculum sp. 1860 and a Rational Explanation of Its Substrate Specificity and Thermostability*. International Journal of Molecular Sciences, 2014. **15**, 16885–16910 DOI: 10.3390/ijms150916885.
34. Hotta, Y., et al., *Extremely Stable and Versatile Carboxylesterase from a Hyperthermophilic Archaeon*. Applied and Environmental Microbiology, 2002. **68**(8): p. 3925–3931.
35. Manco, G., et al., *Cloning, Overexpression, and Properties of a New Thermophilic and Thermostable Esterase with Sequence Similarity to Hormone-Sensitive Lipase Subfamily from the Archaeon Archaeoglobus fulgidus*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2000. **373**(1): p. 182–192.

36. Kim, S.-B., W. Lee, and Y.-W. Ryu, *Cloning and characterization of thermostable esterase from Archaeoglobus fulgidus*. The Journal of Microbiology, 2008. **46**(1): p. 100–107.
37. Sayer, C., et al., *Structural and biochemical characterisation of Archaeoglobus fulgidus esterase reveals a bound CoA molecule in the vicinity of the active site*. Scientific Reports, 2016. **6**(1): p. 25542.
38. Löwe, J., et al., *Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon T. acidophilum at 3.4 Å resolution*. Science, 1995. **268**(5210): p. 533–9.
39. Seemüller, E., et al., *Proteasome from Thermoplasma acidophilum: a threonine protease*. Science, 1995. **268**(5210): p. 579–82.
40. Russell, R.J.M., et al., *The crystal structure of citrate synthase from the thermophilic Archaeon, Thermoplasma acidophilum*. Structure, 1994. **2**(12): p. 1157–1167.
41. Arnott, M.A., et al., *Thermostability and Thermoactivity of Citrate Synthases from the Thermophilic and Hyperthermophilic Archaea, Thermoplasma acidophilum and Pyrococcus furiosus*. Journal of Molecular Biology, 2000. **304**(4): p. 657–668.
42. Nemoto, N., T. Oshima, and A. Yamagishi, *Purification and Characterization of Geranylgeranylglyceryl Phosphate Synthase from a Thermoacidophilic Archaeon, Thermoplasma acidophilum*. The Journal of Biochemistry, 2003. **133**(5): p. 651–657.
43. Santos, L., et al., *Thermoplasma acidophilum TAA43 is an archaeal member of the eukaryotic meiotic branch of AAA ATPases*. 2004. **385**(11): p. 1105–1111.
44. Vinogradov, E., et al., *Cell surface glycoproteins from Thermoplasma acidophilum are modified with an N-linked glycan containing 6-C-sulfofucose*. Glycobiology, 2012. **22**(9): p. 1256–1267.
45. Yasutake, Y., et al., *Structural Insights into Unique Substrate Selectivity of Thermoplasma acidophilum d-Aldohexose Dehydrogenase*. Journal of Molecular Biology, 2007. **367**(4): p. 1034–1046.

46. Darland, G., et al., *A thermophilic, acidophilic mycoplasma isolated from a coal refuse pile*. Science, 1970. **170**(3965): p. 1416–8.
47. Smith, P.F., et al., *Characterization of the membranes of Thermoplasma acidophilum*. Journal of bacteriology, 1973. **116**(2): p. 1019–1028.
48. Ruepp, A., et al., *The genome sequence of the thermoacidophilic scavenger Thermoplasma acidophilum*. Nature, 2000. **407**(6803): p. 508–513.
49. Gasteiger, E., et al., *Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server*, in *The Proteomics Protocols Handbook*, J.M. Walker, Editor. 2005, Humana Press: Totowa, NJ. p. 571–607.
50. Kurgan, L., et al., *CRYSTALP2: sequence-based protein crystallization propensity prediction*. BMC Structural Biology, 2009. **9**(1): p. 50.
51. Madeira, F., et al., *The EMBL-EBI Job Dispatcher sequence analysis tools framework in 2024*. Nucleic Acids Research, 2024. **52**(W1): p. W521–W525.
52. Drozdetskiy, A., et al., *JPred4: a protein secondary structure prediction server*. Nucleic Acids Research, 2015. **43**(W1): p. W389–W394.
53. Lorber, B., et al., *Protein analysis by dynamic light scattering: Methods and techniques for students*. Biochemistry and Molecular Biology Education, 2012. **40**(6): p. 372–382.
54. Li, J. and X. Liu, *Identification and Characterization of a Novel Thermophilic, Organic Solvent Stable Lipase of Bacillus from a Hot Spring*. Lipids, 2017. **52**(7): p. 619–627.
55. Kordel, M., et al., *Extracellular lipase of Pseudomonas sp. strain ATCC 21808: purification, characterization, crystallization, and preliminary X-ray diffraction data*. J Bacteriol, 1991. **173**(15): p. 4836–41.
56. Mateos Diaz, J.C., et al., *Lipase from the thermotolerant fungus Rhizopus homothallicus is more thermostable when produced using solid state fermentation*

than liquid fermentation procedures. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006. **39**(5): p. 1042–1050.

57. Liu, X., et al., *Characterization of a Novel Esterase Est33 From an Antarctic Bacterium: A Representative of a New Esterase Family*. *Frontiers in Microbiology*, 2022. **13**.

58. Hasan, F., A.A. Shah, and A. Hameed, *Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review*. *Biotechnology Advances*, 2009. **27**(6): p. 782–798.

59. Massadeh, M. and F. Sabra, *Production and characterization of lipase from Bacillus stearothermophilus*. *AFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY*, 2011. **10**: p. 13139–13146.

60. Ellis, K.J. and J.F. Morrison, *Buffers of constant ionic strength for studying pH-dependent processes*. *Methods Enzymol*, 1982. **87**: p. 405–26.

61. Syedd-León, R., et al., *Revisiting the fundamentals of p-nitrophenol analysis for its application in the quantification of lipases activity. A graphical update*. *Uniciencia*, 2020. **34**: p. 31–43.

62. Minor, W., et al., *HKL-3000: the integration of data reduction and structure solution - from diffraction images to an initial model in minutes*. *Acta Crystallographica Section D*, 2006. **62**(8): p. 859–866.

63. Adams, P., et al., *PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66(pt 2):213-221. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 2010. **66**: p. 213–21.

64. McCoy, A.J., et al., *Phaser crystallographic software*. *J Appl Crystallogr*, 2007. **40**(Pt 4): p. 658–674.

65. Emsley, P. and K. Cowtan, *Coot: Model-Building Tools for Molecular Graphics*. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 2005. **60**: p. 2126–32.

66. Chen, V., et al., *MolProbity: All-Atom Structure Validation for Macromolecular Crystallography*. Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography, 2010. **66**: p. 12–21.
67. Jurrus, E., et al., *Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite*. Protein Science, 2018. **27**(1): p. 112–128.
68. Pettersen, E.F., et al., *UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis*. Journal of Computational Chemistry, 2004. **25**(13): p. 1605–1612.
69. Laskowski, R.A., *PDBsum1: A standalone program for generating PDBsum analyses*. Protein Science, 2022. **31**(12): p. e4473.
70. Schrödinger, L.L.C., *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 3.1*.
71. Ali, Y.B., R. Verger, and A. Abousalham, *Lipases or Esterases: Does It Really Matter? Toward a New Bio-Physico-Chemical Classification*, in *Lipases and Phospholipases: Methods and Protocols*, G. Sandoval, Editor. 2012, Humana Press: Totowa, NJ. p. 31–51.
72. Hitch, T.C.A. and T. Clavel, *A proposed update for the classification and description of bacterial lipolytic enzymes*. PeerJ, 2019. **7**: p. e7249.
73. Habe, H., et al., *Crystal structure of a histidine-tagged serine hydrolase involved in the carbazole degradation (CarC enzyme)*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003. **303**(2): p. 631–639.
74. Matthews, B.W., *Solvent content of protein crystals*. Journal of Molecular Biology, 1968. **33**(2): p. 491–497.
75. Chruszcz, M., et al., *Analysis of solvent content and oligomeric states in protein crystals--does symmetry matter?* Protein Sci, 2008. **17**(4): p. 623–32.
76. Zwart, P.H., et al., *Surprises and pitfalls arising from (pseudo)symmetry*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2008. **64**(Pt 1): p. 99–107.

77. Thorn, A., et al., *AUSPEX: a graphical tool for X-ray diffraction data analysis*. Acta Crystallographica Section D, 2017. **73**(9): p. 729–737.
78. Laskowski, R.A., et al., *PDBsum: Structural summaries of PDB entries*. Protein Science, 2018. **27**(1): p. 129–134.
79. Holm, L., *Dali server: structural unification of protein families*. Nucleic Acids Research, 2022. **50**(W1): p. W210–W215.
80. Wei, X., et al., *The α -Helical Cap Domain of a Novel Esterase from Gut Alistipes shahii Shaping the Substrate-Binding Pocket*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021. **69**(21): p. 6064–6072.
81. He, J., et al., *Characterization of a Novel Esterase Belonging to Family V from Marinobacter flavimaris*. Journal of Ocean University of China, 2024. **23**(1): p. 221–232.
82. Searcy, D.G., *Thermoplasma acidophilum: Intracellular pH and potassium concentration*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 1976. **451**(1): p. 278–286.
83. Lee, C.W., et al., *Crystal Structure and Functional Characterization of an Esterase (EaEST) from Exiguobacterium antarcticum*. PLoS One, 2017. **12**(1): p. e0169540.
84. Zhu, C., et al., *Structural Insights into a Novel Esterase from the East Pacific Rise and Its Improved Thermostability by a Semirational Design*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021. **69**(3): p. 1079–1090.
85. Park, S.Y., et al., *High-resolution structure of ybfF from Escherichia coli K12: a unique substrate-binding crevice generated by domain arrangement*. J Mol Biol, 2008. **376**(5): p. 1426–37.
86. Luan, Z.-J., et al., *Substrate channel evolution of an esterase for the synthesis of cilastatin*. Catalysis Science & Technology, 2015. **5**(5): p. 2622–2629.

87. Zheng, X., et al., *Crystal Structure of a Novel Esterase Rv0045c from Mycobacterium tuberculosis*. PLOS ONE, 2011. **6**(5): p. e20506.
88. Sayer, C., et al., *The Structure of a Novel Thermophilic Esterase from the Planctomycetes Species, Thermogutta terrifontis Reveals an Open Active Site Due to a Minimal 'Cap' Domain*. Frontiers in Microbiology, 2015. **6**.

Material suplementario 1. Cristales de Ta0887

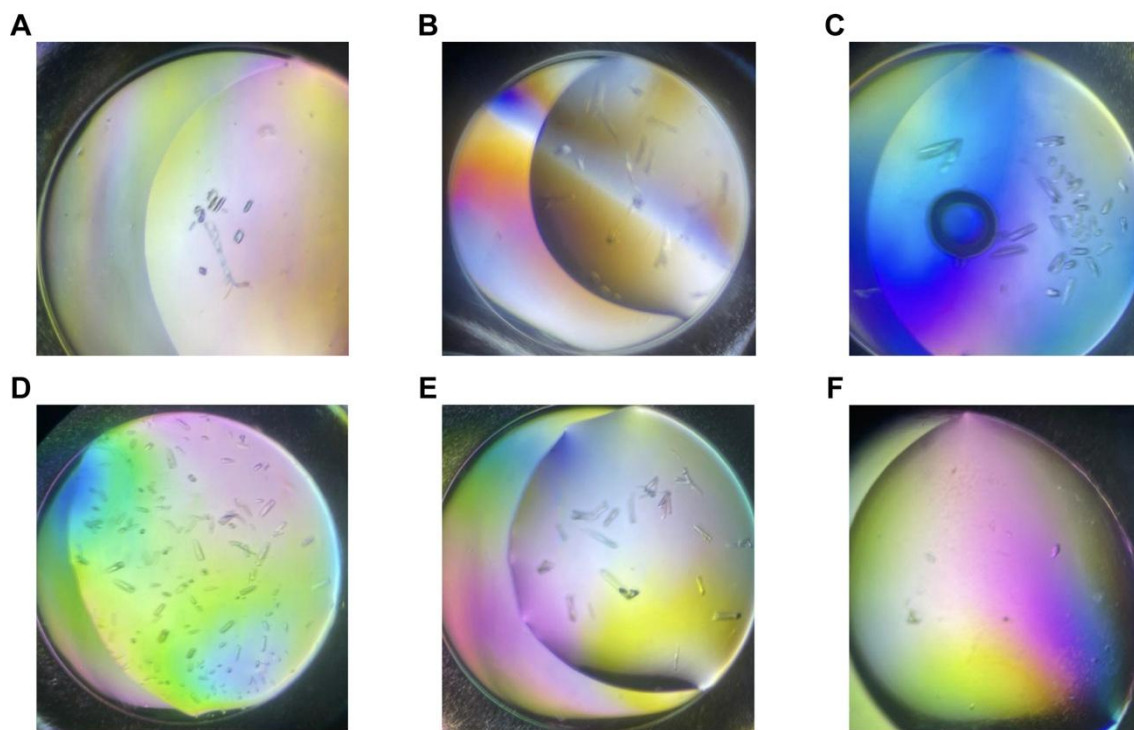


Figura S1. Cristales de Ta0887 obtenidos en distintas condiciones de cristalización después de 24 horas a 14 °C. **(A)** Crystal Screen I, condición 10. **(B)** Crystal Screen I, condición 15. **(C)** Crystal Screen I, condición 40. **(D)** Crystal Screen I, condición 41. **(E)** Crystal Screen I, condición 44. **(F)** Crystal Screen II, condición 38. Se colectó un conjunto de datos de difracción de rayos X a 1.93 Å de resolución a partir de un cristal del panel (D).

Material suplementario 2. PDB Validation Report de Ta0887



Full wwPDB X-ray Structure Validation Report ⓘ

Feb 12, 2026 – 03:57 PM EST

PDB ID : 10XN / pdb_000010xn
Title : Crystal structure of a thermophilic esterase from Thermoplasma acidophilum.
Deposited on : 2026-02-11
Resolution : 1.93 Å(reported)

This wwPDB validation report is for manuscript review

This is a Full wwPDB X-ray Structure Validation Report.

This report is produced by the wwPDB biocuration pipeline after annotation of the structure.

We welcome your comments at validation@mail.wwpdb.org

A user guide is available at

<https://www.wwpdb.org/validation/2017/XrayValidationReportHelp>

with specific help available everywhere you see the ⓘ symbol.

The types of validation reports are described at

<http://www.wwpdb.org/validation/2017/FAQs#types>.

The following versions of software and data (see [references ⓘ](#)) were used in the production of this report:

MolProbity	: 4-5-2 with Phenix2.0
Mogul	: 2022.3.0, CSD as543be (2022)
Xtriage (Phenix)	: 2.0
EDS	: 3.0
Percentile statistics	: 20231227.v01 (using entries in the PDB archive December 27th 2023)
CCP4	: 9.0.010 (Gargrove)
Density-Fitness	: 1.0.12
Ideal geometry (proteins)	: Engh & Huber (2001)
Ideal geometry (DNA, RNA)	: Parkinson et al. (1996)
Validation Pipeline (wwPDB-VP)	: 2.48

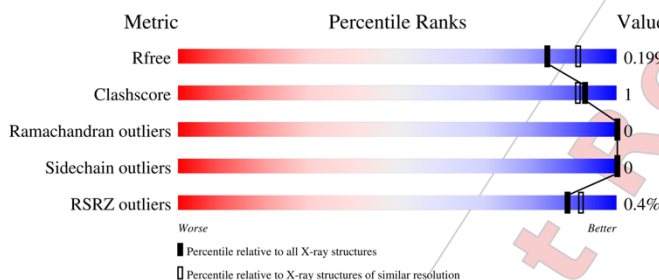
1 Overall quality at a glance ⓘ

The following experimental techniques were used to determine the structure:

X-RAY DIFFRACTION

The reported resolution of this entry is 1.93 Å.

Percentile scores (ranging between 0-100) for global validation metrics of the entry are shown in the following graphic. The table shows the number of entries on which the scores are based.



Metric	Whole archive (#Entries)	Similar resolution (#Entries, resolution range(Å))
R _{free}	164625	1306 (1.94-1.94)
Clashscore	180529	1400 (1.94-1.94)
Ramachandran outliers	177936	1387 (1.94-1.94)
Sidechain outliers	177891	1387 (1.94-1.94)
RSRZ outliers	164620	1306 (1.94-1.94)

The table below summarises the geometric issues observed across the polymeric chains and their fit to the electron density. The red, orange, yellow and green segments of the lower bar indicate the fraction of residues that contain outliers for >=3, 2, 1 and 0 types of geometric quality criteria respectively. A grey segment represents the fraction of residues that are not modelled. The numeric value for each fraction is indicated below the corresponding segment, with a dot representing fractions <=5%. The upper red bar (where present) indicates the fraction of residues that have poor fit to the electron density. The numeric value is given above the bar.

Mol	Chain	Length	Quality of chain
1	A	238	93% 6%
1	B	238	96%

2 Entry composition [i](#)

There are 4 unique types of molecules in this entry. The entry contains 7727 atoms, of which 3688 are hydrogens and 0 are deuteriums.

In the tables below, the ZeroOcc column contains the number of atoms modelled with zero occupancy, the AltConf column contains the number of residues with at least one atom in alternate conformation and the Trace column contains the number of residues modelled with at most 2 atoms.

- Molecule 1 is a protein called Triacylglycerol lipase related protein.

Mol	Chain	Residues	Atoms						ZeroOcc	AltConf	Trace
1	A	235	Total	C	H	N	O	S	0	7	0
			3808	1220	1902	324	357	5			
1	B	234	Total	C	H	N	O	S	0	0	0
			3581	1167	1770	302	337	5			

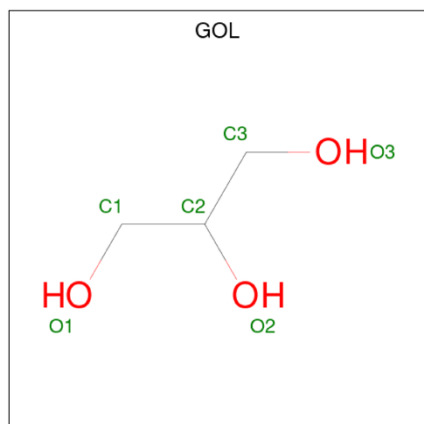
There are 6 discrepancies between the modelled and reference sequences:

Chain	Residue	Modelled	Actual	Comment	Reference
A	-2	GLY	-	expression tag	UNP Q9HJS7
A	-1	PRO	-	expression tag	UNP Q9HJS7
A	0	HIS	-	expression tag	UNP Q9HJS7
B	-2	GLY	-	expression tag	UNP Q9HJS7
B	-1	PRO	-	expression tag	UNP Q9HJS7
B	0	HIS	-	expression tag	UNP Q9HJS7

- Molecule 2 is SODIUM ION (CCD ID: NA) (formula: Na).

Mol	Chain	Residues	Atoms		ZeroOcc	AltConf
2	A	1	Total	Na	0	0
			1	1		
2	B	1	Total	Na	0	0
			1	1		

- Molecule 3 is GLYCEROL (CCD ID: GOL) (formula: C₃H₈O₃).



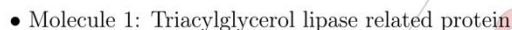
Mol	Chain	Residues	Atoms				ZeroOcc	AltConf
3	A	1	Total	C	H	O	0	0
			14	3	8	3		
3	B	1	Total	C	H	O	0	0
			14	3	8	3		

- Molecule 4 is water.

Mol	Chain	Residues	Atoms		ZeroOcc	AltConf
4	A	165	Total	O	0	0
			165	165		
4	B	143	Total	O	0	0
			143	143		

i

- Molecule 1: Triacylglycerol lipase related protein



4 Data and refinement statistics

Property	Value	Source
Space group	P 32 2 1	Depositor
Cell constants a, b, c, α , β , γ	117.05Å 117.05Å 91.71Å 90.00° 90.00° 120.00°	Depositor
Resolution (Å)	49.33 – 1.93 49.33 – 1.93	Depositor EDS
% Data completeness (in resolution range)	99.9 (49.33-1.93) 94.1 (49.33-1.93)	Depositor EDS
R_{merge}	0.12	Depositor
R_{sym}	(Not available)	Depositor
$\langle I/\sigma(I) \rangle^1$	2.09 (at 1.94Å)	Xtriage
Refinement program	PHENIX 1.21.2_5419	Depositor
R, R_{free}	0.170 , 0.199 0.170 , 0.199	Depositor DCC
R_{free} test set	2020 reflections (3.70%)	wwPDB-VP
Wilson B-factor (Å ²)	16.2	Xtriage
Anisotropy	0.276	Xtriage
Bulk solvent k_{sol} (e/Å ³), B_{sol} (Å ²)	0.42 , 42.7	EDS
L-test for twinning ²	$\langle L \rangle = 0.48$, $\langle L^2 \rangle = 0.31$	Xtriage
Estimated twinning fraction	0.034 for -h,-k,l	Xtriage
F_o, F_c correlation	0.95	EDS
Total number of atoms	7727	wwPDB-VP
Average B, all atoms (Å ²)	21.0	wwPDB-VP

Xtriage's analysis on translational NCS is as follows: *The largest off-origin peak in the Patterson function is 4.07% of the height of the origin peak. No significant pseudotranslation is detected.*

¹Intensities estimated from amplitudes.

²Theoretical values of $\langle |L| \rangle$, $\langle L^2 \rangle$ for acentric reflections are 0.5, 0.333 respectively for untwinned datasets, and 0.375, 0.2 for perfectly twinned datasets.

5 Model quality

5.1 Standard geometry

Bond lengths and bond angles in the following residue types are not validated in this section: GOL, NA

The Z score for a bond length (or angle) is the number of standard deviations the observed value is removed from the expected value. A bond length (or angle) with $|Z| > 5$ is considered an outlier worth inspection. RMSZ is the root-mean-square of all Z scores of the bond lengths (or angles).

Mol	Chain	Bond lengths		Bond angles	
		RMSZ	# Z >5	RMSZ	# Z >5
1	A	0.58	0/1971	0.67	0/2669
1	B	0.54	0/1851	0.63	0/2516
All	All	0.56	0/3822	0.65	0/5185

There are no bond length outliers.

There are no bond angle outliers.

There are no chirality outliers.

There are no planarity outliers.

5.2 Too-close contacts

In the following table, the Non-H and H(model) columns list the number of non-hydrogen atoms and hydrogen atoms in the chain respectively. The H(added) column lists the number of hydrogen atoms added and optimized by MolProbity. The Clashes column lists the number of clashes within the asymmetric unit, whereas Symm-Clashes lists symmetry-related clashes.

Mol	Chain	Non-H	H(model)	H(added)	Clashes	Symm-Clashes
1	A	1906	1902	1882	7	0
1	B	1811	1770	1775	3	0
2	A	1	0	0	0	0
2	B	1	0	0	0	0
3	A	6	8	8	0	0
3	B	6	8	8	0	0
4	A	165	0	0	0	0
4	B	143	0	0	0	0
All	All	4039	3688	3673	10	0

The all-atom clashscore is defined as the number of clashes found per 1000 atoms (including hydrogen atoms). The all-atom clashscore for this structure is 1.

All (10) close contacts within the same asymmetric unit are listed below, sorted by their clash magnitude.

Atom-1	Atom-2	Interatomic distance (Å)	Clash overlap (Å)
1:B:16:LEU:HD11	1:B:35:ASN:OD1	1.93	0.68
1:B:57:GLY:HA2	1:B:63:LYS:HG2	1.93	0.50
1:A:122:LEU:HD13	1:A:197:LYS:HD3	1.94	0.49
1:A:138:VAL:O	1:A:142:MET:HG2	2.13	0.48
1:A:16:LEU:HD11	1:A:35:ASN:OD1	2.16	0.44
1:A:4:HIS:HB2	1:A:15:TYR:CZ	2.54	0.42
1:A:89:PHE:CE2	1:A:91:LEU:HG	2.54	0.42
1:A:192:ILE:HD11	1:A:209:GLU:CD	2.45	0.41
1:A:199:HIS:HA	1:A:205[B]:SER:OG	2.21	0.41
1:B:94:ASN:HA	1:B:117:VAL:O	2.21	0.40

There are no symmetry-related clashes.

5.3 Torsion angles [i](#)

5.3.1 Protein backbone [i](#)

In the following table, the Percentiles column shows the percent Ramachandran outliers of the chain as a percentile score with respect to all X-ray entries followed by that with respect to entries of similar resolution.

The Analysed column shows the number of residues for which the backbone conformation was analysed, and the total number of residues.

Mol	Chain	Analysed	Favoured	Allowed	Outliers	Percentiles	
1	A	240/238 (101%)	234 (98%)	6 (2%)	0	100	100
1	B	232/238 (98%)	223 (96%)	9 (4%)	0	100	100
All	All	472/476 (99%)	457 (97%)	15 (3%)	0	100	100

There are no Ramachandran outliers to report.

5.3.2 Protein sidechains [i](#)

In the following table, the Percentiles column shows the percent sidechain outliers of the chain as a percentile score with respect to all X-ray entries followed by that with respect to entries of similar resolution.

The Analysed column shows the number of residues for which the sidechain conformation was analysed, and the total number of residues.

Mol	Chain	Analysed	Rotameric	Outliers	Percentiles	
1	A	212/210 (101%)	212 (100%)	0	100	100
1	B	193/210 (92%)	193 (100%)	0	100	100
All	All	405/420 (96%)	405 (100%)	0	100	100

There are no protein residues with a non-rotameric sidechain to report.

Sometimes sidechains can be flipped to improve hydrogen bonding and reduce clashes. There are no such sidechains identified.

5.3.3 RNA ⓘ

There are no RNA molecules in this entry.

5.4 Non-standard residues in protein, DNA, RNA chains ⓘ

There are no non-standard protein/DNA/RNA residues in this entry.

5.5 Carbohydrates ⓘ

There are no oligosaccharides in this entry.

5.6 Ligand geometry ⓘ

Of 4 ligands modelled in this entry, 2 are monoatomic - leaving 2 for Mogul analysis.

In the following table, the Counts columns list the number of bonds (or angles) for which Mogul statistics could be retrieved, the number of bonds (or angles) that are observed in the model and the number of bonds (or angles) that are defined in the Chemical Component Dictionary. The Link column lists molecule types, if any, to which the group is linked. The Z score for a bond length (or angle) is the number of standard deviations the observed value is removed from the expected value. A bond length (or angle) with $|Z| > 2$ is considered an outlier worth inspection. RMSZ is the root-mean-square of all Z scores of the bond lengths (or angles).

Mol	Type	Chain	Res	Link	Bond lengths			Bond angles		
					Counts	RMSZ	$\# Z > 2$	Counts	RMSZ	$\# Z > 2$
3	GOL	B	302	-	5,5,5	0.12	0	5,5,5	0.49	0
3	GOL	A	302	-	5,5,5	0.23	0	5,5,5	0.60	0

In the following table, the Chirals column lists the number of chiral outliers, the number of chiral centers analysed, the number of these observed in the model and the number defined in the Chemical Component Dictionary. Similar counts are reported in the Torsion and Rings columns.

'-' means no outliers of that kind were identified.

Mol	Type	Chain	Res	Link	Chirals	Torsions	Rings
3	GOL	B	302	-	-	0/4/4/4	-
3	GOL	A	302	-	-	0/4/4/4	-

There are no bond length outliers.

There are no bond angle outliers.

There are no chirality outliers.

There are no torsion outliers.

There are no ring outliers.

No monomer is involved in short contacts.

5.7 Other polymers [i](#)

There are no such residues in this entry.

5.8 Polymer linkage issues [i](#)

There are no chain breaks in this entry.

6 Fit of model and data [i](#)

6.1 Protein, DNA and RNA chains [i](#)

In the following table, the column labelled '#RSRZ > 2' contains the number (and percentage) of RSRZ outliers, followed by percent RSRZ outliers for the chain as percentile scores relative to all X-ray entries and entries of similar resolution. The OWAB column contains the minimum, median, 95th percentile and maximum values of the occupancy-weighted average B-factor per residue. The column labelled 'Q < 0.9' lists the number of (and percentage) of residues with an average occupancy less than 0.9.

Mol	Chain	Analysed	<RSRZ>	#RSRZ > 2	OWAB(Å ²)	Q < 0.9
1	A	235/238 (98%)	-0.76	0 100 100	8, 18, 31, 37	5 (2%)
1	B	234/238 (98%)	-0.56	2 (0%) 81 85	13, 22, 36, 52	0
All	All	469/476 (98%)	-0.66	2 (0%) 89 92	8, 20, 34, 52	5 (1%)

All (2) RSRZ outliers are listed below:

Mol	Chain	Res	Type	RSRZ
1	B	131	ASP	4.9
1	B	129	LEU	3.2

6.2 Non-standard residues in protein, DNA, RNA chains [i](#)

There are no non-standard protein/DNA/RNA residues in this entry.

6.3 Carbohydrates [i](#)

There are no oligosaccharides in this entry.

6.4 Ligands [i](#)

In the following table, the Atoms column lists the number of modelled atoms in the group and the number defined in the chemical component dictionary. The B-factors column lists the minimum, median, 95th percentile and maximum values of B factors of atoms in the group. The column labelled 'Q < 0.9' lists the number of atoms with occupancy less than 0.9.

Mol	Type	Chain	Res	Atoms	RSCC	RSR	B-factors(Å ²)	Q < 0.9
3	GOL	A	302	6/6	0.93	0.08	18,25,30,31	0
2	NA	A	301	1/1	0.96	0.10	29,29,29,29	0
2	NA	B	301	1/1	0.97	0.09	32,32,32,32	0

Continued on next page...

Continued from previous page...

Mol	Type	Chain	Res	Atoms	RSCC	RSR	B-factors($\text{\AA}^2$)	Q<0.9
3	GOL	B	302	6/6	0.97	0.07	14,25,33,33	14

6.5 Other polymers [i](#)

There are no such residues in this entry.

Anexo

Artículo publicado

Delgado-Rey, A., Llamas-García, M.L., Montero-Morán, G.M., Santos, L. and Lara-González, S. (2026). Structural and biochemical insights into the thermostable esterase Ta0887 from *Thermoplasma acidophilum*. *FEBS Open Bio*. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.70327>