

Lezione 12

Le Idrolasi: Esterasi

Le esterasi hanno una minore applicabilità industriale rispetto a lipasi e fosfolipasi, a causa delle loro caratteristiche.

Le esterasi, o carbossilesterasi, *in vivo* idrolizzano il legame estereo che si trova su molecole più semplici di trigliceridi e fosfogliceridi.

Le esterasi, a differenza di lipasi e fosfolipasi, hanno una grande specificità di substrato. Ogni esterasi ha il suo substrato naturale ma, data l'abbondanza di legami esterei in natura, questi enzimi possono operare su una moltitudine di substrati. La maggior parte dei metaboliti che contengono legami esterei sono metaboliti secondari, che quindi si ritrovano in un numero limitato di organismi, e così anche le esterasi che li metabolizzano. **Importante tabella sotto**

Table 1
Differences between lipases and carboxyl esterases

Property	Lipase	Esterase
Preferred substrates	Triglycerides (long-chain), secondary alcohols	Simple esters, triglycerides (short-chain)
Interfacial activation/lid	Yes	No
Substrate hydrophobicity	High	High to low
Enantioselectivity	Usually high	High to low to zero
Solvent stability	High	High to low

Il fatto che ogni esterasi ha specificità verso uno specifico legame estereo in uno specifico substrato le rende poco appetibili industrialmente. La scelta di una esterasi deve essere quindi mirata alla reazione di interesse. Come si vede dalla tabella sopra, data la variabilità nelle proprietà delle esterasi, l'utilità di un enzima rispetto ad un altro va valutata in base alla reazione specifica che si intende ottenere.

Le esterasi, come le lipasi, sono delle *serina idrolasi* che hanno la stessa triade catalitica formata da acido aspartico-istidina-serina, ed operano con il medesimo meccanismo di reazione. Nella triade catalitica non c'è la variabilità dell'acido aspartico che può essere sostituito da acido glutammico, si ha sempre acido aspartico nelle esterasi conosciute.

Caratteristiche

Dato che le esterasi raggruppano enzimi molto diversi per la specificità di substrato diventa difficile classificarle, anche per quanto riguarda le applicazioni industriali.

Delle classificazioni vengono fatte in base sulla specificità di substrato, da parte dei biotecnologi, allo scopo di ricollegare subito un enzima ad un substrato specifico. Da parte dei biologi spesso la classificazione è fatta mediante allineamento di sequenza, allo scopo di studiarne l'evoluzione nel tempo.

Sulle esterasi c'è carenza di letteratura, e questo si riflette nella carenza di applicabilità industriale, dovuta alle poche informazioni disponibili. Spesso non si hanno informazioni sull'optimum di pH dell'enzima, sulla attività in solventi organici, sulla specificità e sulla stereoselezione.

Le estereasi meglio caratterizzate sono usate per reazioni enantioselettive, chemosettive e regioselettive, in generale quindi per la loro selettività (come tutti gli enzimi??).

Applicazioni

Produzione di Naprossene

Il naprossene è un FANS che al livello industriale può essere prodotto come racemo o come enantiomero puro. Il processo di risoluzione cinetica dell'enantiomero è effettuato mediante una esterasi.

Produzione del linalolo

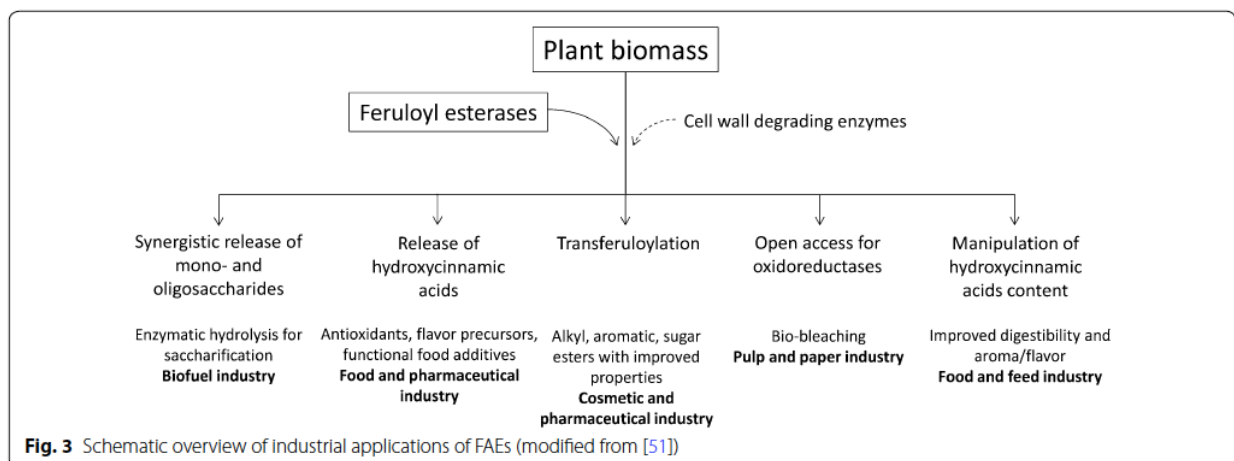
Il linalolo è un aroma utilizzato nell'industria cosmetica. Il linalolo ha uno stereocentro, ed una esterasi è utilizzata per la risoluzione cinetica.

Feruloil Esterasi

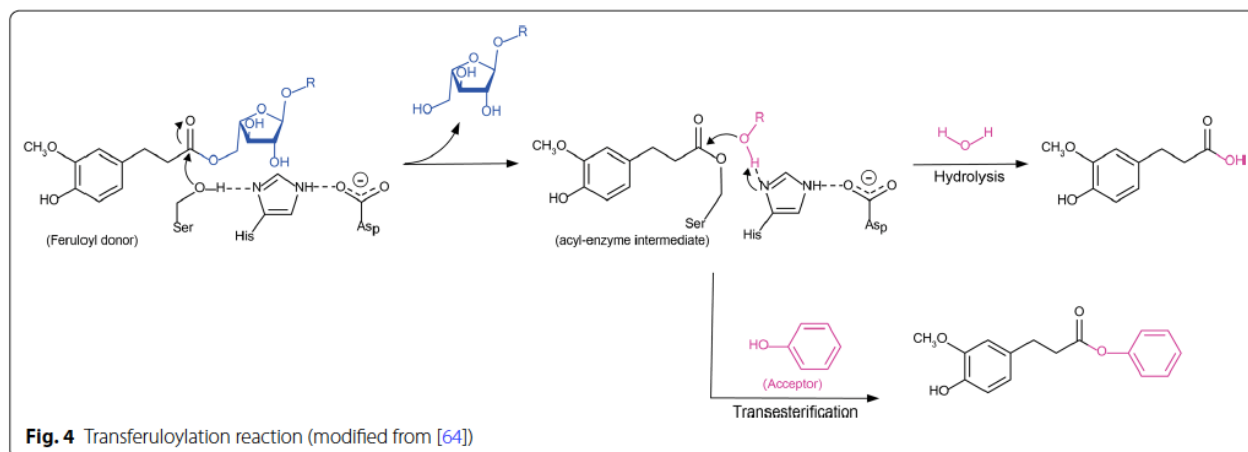
Sono enzimi che lavorano su derivati complessi. Questi sono dei polisaccaridi modificati con catene aromatiche che legano più catene di polisaccaridi. Queste esterasi idrolizzano in maniera specifica le catene aromatiche, liberando il composto che prende il nome di *acido ferulico*.

Questi derivati sono costituenti principale delle pareti cellulari batteriche, e possono essere ottenuti dalla biomassa che deriva dalla lavorazione del legno. L'acido ferulico è una piccola molecola che rientra nelle *value added chemicals*, che può essere utilizzato per la produzione di bioetanolo, antiossidanti e come precursore di aromi alimentari, come ad esempio la vanillina.

Partendo dalle biomasse ed usando enzimi quali le feruloil esterasi ed enzimi che degradano le pareti cellulari si possono ottenere vari prodotti, presentati nello schema sotto.



Le feruloil esterasi possono dare una reazione di transferuloilazione, che effettivamente è una transesterificazione dove viene sostituita la parte alcolica dello zucchero con un altro alcol, ottenendo un nuovo estere.



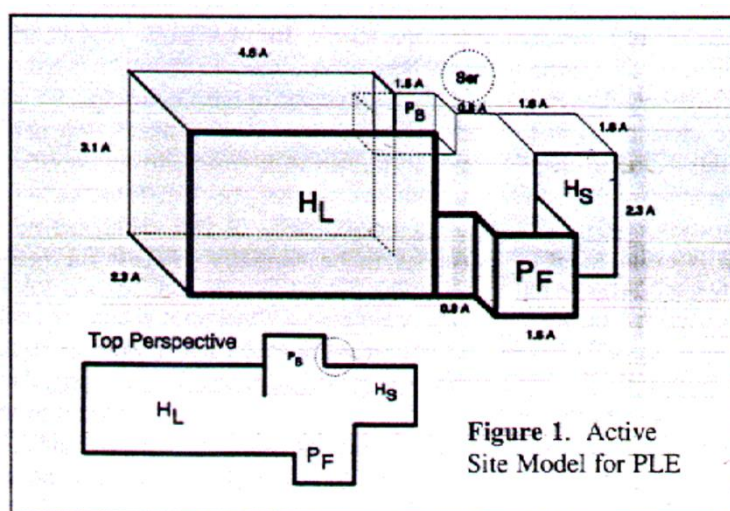
La feruloil esterasi permette quindi di degradare dei network polisaccaridici, rilasciando sia acido ferulico che le catene polisaccaridiche, che possono essere a loro volta ulteriormente trasformate. La degradazione del network polisaccaridico permette l'accesso agli enzimi alle catene polisaccaridiche, che ha importanti risvolti nell'industria tessile e nell'industria cartiera. Il componente base di entrambe queste industrie è la cellulosa, che si ottiene da materiale vegetale che va degradato per ottenerla, anche per mezzo di ossidoreduttasi necessarie alla degradazione di queste strutture. Questa procedura si chiama candeggio nell'industria tessile, e viene classicamente fatta con procedure chimiche di ossidazione, con ossidanti inquinanti (acqua ossigenata). L'uso della feruloil esterasi assieme alle ossidoreduttasi permette di avere processi di biotrasformazione più sostenibili.

Pig liver esterasi

La PLE è una esterasi derivata dal fegato di suino, la quale deve la sua specificità alla particolare forma del suo sito enzimatico (come tutti gli enzimi insomma...). Il sito enzimatico contiene la triade catalitica. Questo sito catalitico può essere rappresentato come quattro cavità, la cui forma regola la disposizione del substrato al suo interno, disponendolo in modo che gli aminoacidi catalitici possano esplicare la loro funzione. Delle quattro cavità, l'enzima ha due cavità polari e due apolari.

In uno studio si è visto come, utilizzando substrati ciclici con cicli a

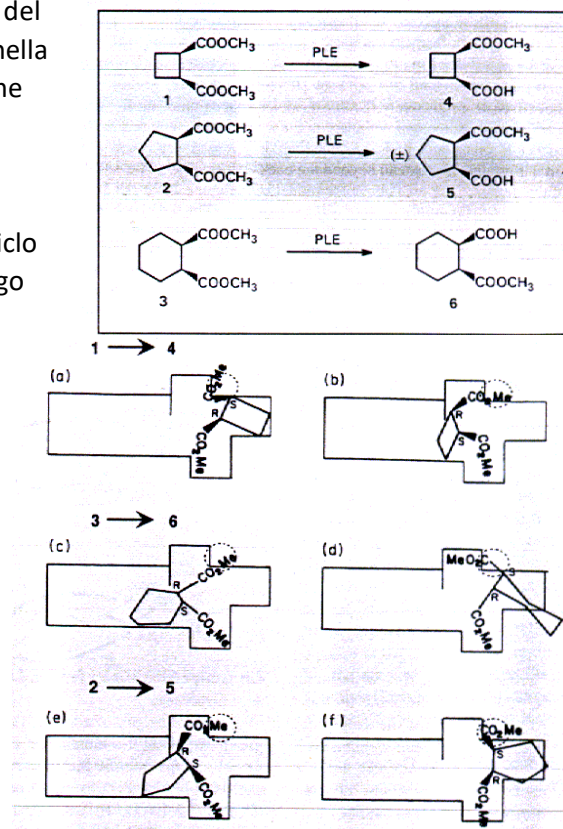
4, 5 e 6 atomi di carbonio legati a due gruppi esterici, cambia la stereoselezione al variare del numero di



*H_L = hydrophobic large; H_S = hydrophobic small;
 P_F = polar front; P_B = polar back*

atomi del ciclo, che è lipofilo, e quindi dell'ingombro sterico del ciclo stesso, che influisce sul posizionamento del substrato nella tasca. Questi substrati prostereogenici sono stati testati come substrati della esterasi per valutarne la stereoselettività, e quindi la preferenza nella produzione di un enantiomero rispetto ad un altro. Si è visto che l'enzima mostra stereoselezione quando come substrato usa molecole con ciclo a 4 carboni ed a 6 carboni, mentre il ciclo a 5 carboni dà luogo alla formazione del racemo, probabilmente perché il ciclo a 5 non è stabile nella tasca grande né in quella piccola dell'enzima, e quindi si lega con una orientazione meno costante al sito catalitico.

Nelle esterasi non è prevedibile la stereoselezione di un enantiomero a priori, a differenza delle lipasi dove c'è la regola di Kazlauskas, per cui vanno fatte prove sperimentali.



Parlando di lipidi, abbiamo visto che ω -3 ed ω -6 sono precursori biosintetici importanti, ed acidi grassi essenziali, per una nutrizione adeguata nell'uomo. Il latte artificiale, che era stato introdotto negli anni 70, si voleva arricchire da un punto di vista nutrizionale con acidi grassi essenziali per il neonato. Si è pensato di utilizzare come carrier un disaccaride che veniva esterificato con acidi grassi essenziali. Si è ottenuta una molecola, l'*olestra*, con un ingombro sterico importante, che non veniva metabolizzata dal nostro organismo e non poteva quindi fornire apporto nutrizionale al latte artificiale.

Dato che non poteva essere metabolizzata dall'organismo, si pensò quindi di usarla come olio per frittura a basso, o nullo, contenuto calorico. In europa questo composto è vietato, perché molto lipofilo e per questo sequestra nel tratto digerente le vitamine lipofile, causando carenze vitaminiche, soprattutto nella vitamina K.