



INMOVILIZACIÓN EN SOPORTE DE LA FERULOIL ESTERASA TIPO B DE *Aspergillus sp.* Y SU EFECTO SOBRE LA SÍNTESIS DE BUTIL HIDROXICINAMATOS

Ana Daniela Vega-Rodríguez^a, Daniel Alberto Grajales-Hernández^a, Mariana Armendáriz-Ruiz^a, Jorge Alberto Rodríguez-González^a, Ali Asaff-Torres^b, Juan Carlos Mateos-Díaz^a

^aUnidad de Biotecnología Industrial, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco. Jalisco, C.P. 45019. ^bUnidad de Biotecnología Industrial, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. Sonora, C.P. 83304. jcmateos@ciatej.mx

Palabras clave: feruloil esterasa, inmovilización, esterificación

Introducción. Las feruloil esterases (Faes; E.C. 3.1.1.73) son carbohidrato esterases capaces de llevar a cabo la hidrólisis y síntesis de ésteres de ácidos hidroxycinámicos. En el grupo de trabajo se ha demostrado que la Fae tipo B de *Aspergillus sp.* (AspFaeB) posee una actividad específica de hidrólisis sobre metil hidroxycinamatos hasta 2.4 veces mayor que otras Faes tipo B¹. Sin embargo, su velocidad de síntesis empleando sistemas ternarios de reacción sobre butil hidroxycinamatos es hasta 1000 veces mayor que lo reportado en la literatura². Por lo anterior, es necesario generar un biocatalizador por inmovilización con esta actividad feruloil esterasa que nos permita su recuperación y reutilización. Particularmente, la inmovilización en soporte es ideal para sistemas continuos de reacción, sin embargo, este tipo de inmovilización puede modificar la actividad y la selectividad enzimática³. Debido a que los ácidos hidroxycinámicos, como el ácido ferúlico y cafeico están comúnmente presentes en mezcla en distintos los residuos agroindustriales, como en los del café, la preferencia del biocatalizador por este tipo de sustratos es de suma importancia. Por lo tanto, en este trabajo se realizó por primera vez, un estudio de inmovilización de la AspFaeB en distintos soportes, con el fin de evaluar su efecto sobre su preferencia por sustrato y seleccionar el biocatalizador con mayor estabilidad operacional para la síntesis de butil hidroxycinamatos biológicamente activos.

Metodología. 100 mg de acarreadores se incubaron con 0.1 mg proteína de un extracto enzimático de la AspFaeB durante 4 h a 30 °C. Para la unión epóxido covalente se empleó un buffer fosfatos 1 M pH 7, mientras que para la unión hidrofóbica un buffer fosfatos 100 mM pH 7, para unión iónica y amino covalente buffer fosfatos 2.5 mM pH 7 y para la unión por afinidad un buffer Tris-HCl 20 mM con NaCl 150 mM pH 7.4. Se determinó la actividad enzimática residual en el sobrenadante y la actividad expresada en los inmovilizados sobre 4-nitrofenol butirato⁴. Posteriormente, para la síntesis de butil ferulato (BF) y butil cafeato (BC) se empleó una solución equimolar de ácido cafeico y ferúlico (5 mM) en un sistema ternario (butanol/isooctano/agua; 18/78/4; v/v/v) con 100 mg de los inmovilizados o 0.1 mg de AspFaeB libre. La conversión se monitoreó mediante HPTLC (2/1/0.03; hexano/acetato de etilo/ácido acético; v/v/v) a 310 nm. La estabilidad operacional se estimó con la conversión global lograda, después de 3 ciclos de 24h de reacción.

Resultados. En la **Tabla 1** se observa que las resinas iónicas (**7-9**) presentaron el mayor porcentaje de inmovilización (>95 %). Sin embargo, la resina de unión covalente (**2**) tuvo la mayor actividad expresada (49.3 %). La pérdida de actividad enzimática durante la inmovilización en soporte ya ha sido previamente reportada⁵ y se atribuye a posibles cambios conformacionales de la enzima por las uniones covalentes o bien, a que durante la

unión iónica o hidrofóbica la orientación de la enzima no es la adecuada para la catálisis.

Tabla 1. Inmovilización en soporte y estabilidad operacional en la síntesis de butil hidroxycinamatos.

Soporte	Ei (%)	Ae (%)	C1/C2 (CG %)	Ciclos/CG (%)
Enzima libre	ND	ND	1.78 (66.7)	ND
1. ECR8205F	16.7	0	0 (0)	ND
2. ECR4204F	32.9	49.3	1.7 (44.4)	3/<10
3. Amino C6	98.8	ND	0 (0)	ND
4. ECR1090F	20.4	0	0 (0)	ND
5. ECR1030M	19.1	0	0.89 (20.7)	ND
6. ECR8806F	27.2	0	0.98 (26.8)	ND
7. DEAE	99.3	36.6	2.25 (46.9)	3/38.9
8. 3-aminopropyl	99.5	14.1	0 (0)	ND
9. VP OC 1065	98.2	23.9	0 (0)	ND
10. Con A Seph. 4B	89.6	25.8	1.70 (69.7)	3/50.9

En verde resinas covalentes, en azul las resinas hidrofóbicas, en naranja las resinas iónicas y en morado la resina de afinidad. Ei. Enzima inmovilizada. Ae. Actividad expresada. C1/C2. Conversión BF/BC a las 24 h. CG. Conversión global.

Dos inmovilizados de interacción hidrofóbica (**5** y **6**) fueron capaces de llevar a cabo la síntesis con una CG entre 20 y 27 %, a pesar de no presentar Ae (**Tabla 1**), mientras que de los tres inmovilizados iónicos (Ae: 14-37 %) únicamente el **7** fue capaz de realizar la síntesis con una CG de 47 %. La presencia de actividad únicamente en síntesis en los soportes hidrofóbicos se puede deber muy posiblemente a la desorción de la enzima. Mientras que la falta de actividad en síntesis de las resinas iónicas **8** y **9** probablemente se debe a una interacción de la resina con los sustratos. Los inmovilizados **2**, **7** y **10** poseen una CG 44.4, 46.9 y 69.7 %, respectivamente; por lo tanto, se decidió evaluar su estabilidad operacional. Al final del tercer ciclo, el inmovilizado **10** logró una CG de 50.9 %, demostrando ser el biocatalizador con mayor estabilidad operacional durante la síntesis de butil hidroxycinamatos y manteniendo la preferencia de la enzima libre por el ácido ferúlico (C1/C2=1.7).

Conclusiones. La inmovilización por afinidad de AspFaeB permite conservar la preferencia por el ácido ferúlico de la enzima libre, además de presentar la mayor estabilidad operacional.

Agradecimientos. Al CONACyT por la beca de posgrado de Daniel Grajales y Daniela Vega. Al proyecto Problemas Nacionales 2017-01-6267 por el financiamiento.

Bibliografía. 1. Vega A.D, *et al.* (2017) Síntesis quimio-enzimática de bioconjugados de ácido o-cumárico con actividad antifúngica para aplicación agrícola. CIATEJ. 2. Antonopoulou, *et al.* (2018), *Catalysts*, 8, 242. 3. Rodrigues, R, *et al.* (2012) *Chem Soc Rev.* 4. Kordel, M, *et al.* (1991), *J Bacteriol*, 173 (4836-4841). 5. Sheldon, R. A, (2007), *Adv Synth Catal*, 349 (1289-1307).

