



DETERMINACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD ALQUILO DE FERULOIL ESTERASAS MEDIANTE UN MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO DE ALTO RENDIMIENTO

Mariana Armendáriz-Ruiz¹, Daniel A. Grajales¹, Nelly García-Galaviz, Alí Asaff Torres², Jorge Rodríguez-González¹, Juan Carlos Mateos-Díaz¹, ¹Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Departamento de Biotecnología Industria, Zapopan, Jalisco C.P. 45019; ²Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Departamento de Biotecnología Industrial, Hermosillo, Sonora, C.P. 83304, jcmateos@ciatej.mx
Palabras clave: Esteres de ferúlico, especificidad, feruloil esterasas.

Introducción. Las feruloil esterasas (FAEs) son enzimas capaces de hidrolizar y sintetizar ésteres alquílicos de ácidos hidroxycinámicos (AH), muchos de los cuales poseen actividad anticancerígena, antioxidante, entre otras. Por lo anterior es de interés conocer la alquil especificidad de las FAEs, ya que esto permitirá dilucidar su potencial en la síntesis selectiva de un éster de AH en particular. Sin embargo, los estudios sobre la alquil especificidad de las FAEs son aún escasos, probablemente debido a la falta de sustratos comerciales, así como de métodos rápidos de búsqueda y selección adecuados.

En este trabajo se emplearon las FAEs tipo A (AnFAEA) y B (AnFAEB) de *Aspergillus niger*, ya ampliamente estudiadas y caracterizadas, como modelo para el desarrollo de un Método Espectrofotométrico de Alto Rendimiento para determinar la especificidad (MEAR-E) alquilo de FAEs. El método propuesto podría acelerar el proceso de búsqueda y selección de nuevas FAEs selectivas con aplicación potencial en síntesis de ésteres de AH de interés biotecnológico.

Metodología. La producción y purificación de la AnFAEA y AnFAEB se realizó como Record y Levasseur^{1,2}. La síntesis de los ésteres de AH con distinta longitud de cadena alquilo se realizó con HCl y su purificación por cromatografía en columna. La especificidad se determinó empleando distintos ésteres de AH (5mM) en presencia de *p*-nitrofenol (pNP: 0.5mM), dimetil sulfóxido (10% v/v) y CHAPS (0.15% p/v) a 30°C y pH 7.2. La actividad se determinó como Ramírez³, monitoreando la disminución de la absorbancia a 410nm en un lector de microplacas de 96 pozos (X-Mark BioRad). Una unidad de actividad hidrolítica corresponde a 1µmol de AH liberado por minuto.

Resultados. El perfil de hidrólisis de la AnFAEA y AnFAEB sobre metil *p*-cumarato, cafeato, ferulato y sinapinato (MpC, MC, MF y MS) se obtuvo con el MEAR-E propuesto en este trabajo (Fig.1).

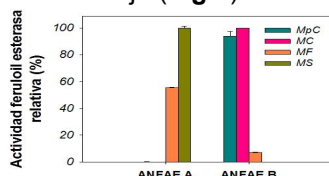


Fig. 1. Perfil de hidrólisis de la AnFAEA y AnFAEB sobre ésteres metílicos hidroxilados (MpC y MC) y metoxilados (MF y MS).

El perfil de la AnFAEA muestra una marcada preferencia por los ésteres metoxilados (MS>MF>MpC) mientras que la AnFAEB lo hace por los hidroxilados (MC>MpC>MF),

resultados que concuerdan con lo reportado en la literatura^{1,2}.

Posteriormente se evaluó la especificidad alquilo sobre metil, etil, propil y butil ferulato (MF, EF, PF y BF) en ausencia y presencia de detergente (Fig.2). En general, la actividad específica de ambas FAEs sobre los sustratos evaluados fue mayor en presencia de CHAPS (Fig.2), y en particular con los menos solubles (PF y BF), indicando que probablemente este detergente favorece la solubilidad y por ende la actividad conforme se incrementa la longitud de la cadena alquilo. La alquil especificidad de la AnFAEA sobre emulsiones estabilizadas con CHAPS (Fig.2A) mostró un perfil (MF<EF<PF<BF) semejante al de lipasas (hasta 4 veces mayor actividad con BF que con MF). Mientras que la especificidad alquilo de la AnFAEB (Fig.2B) es similar (MF>EF>PF>BF) al de carboxil esterasas (hasta 3 veces menor actividad con BF que con MF). Esto posiblemente sea resultado de un vestigio evolutivo del ancestro de la AnFAEA (lipasa de *Rhizomucor miehei*). Estos resultados enriquecen lo reportado hasta el momento en la literatura, ya que la FAE tipo C de *Talaromyces stipitatus* y *Sporotrichum thermophile* han mostrado una especificidad alquilo marcada por el EF y PF, respectivamente^{4,5}.

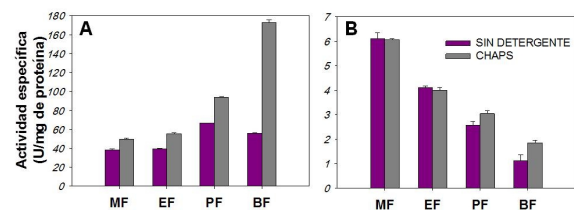


Fig. 2. Especificidad alquilo de la AnFAE A (A) y AnFAE B (B) sobre metil, etil, propil y butil ferulato (MF, EF, PF, BF) en ausencia y presencia de detergente (CHAPS).

Conclusiones. Este estudio demostró que es posible determinar de manera rápida la especificidad alquilo de FAEs empleando diferentes ésteres de AH con un MEAR-E, previo a su aplicación en biocatálisis.

Agradecimiento. Al proyecto 2012-07-190698 del FOMIX-Jalisco.

Bibliografía. 1. Record E., Asther M., Sigoillot C., Pagès S., Punt P.J., Delattre M., Haon M., van den Hondel C.A., Sigoillot J.C., Lesage-Meessen L., Asther M. (2003). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62 (4): 349-355. 2. Levasseur A., Benoit I., Asther M., Asther M., Record E. (2004). *Protein Expr. Purif.* 37 (1): 126-133. 3. Ramírez, L., Arrizon, J., Sandoval, G., Cardador, A., Bello-Mendoza, R., Lappe, P., and Mateos-Díaz, J., (2008). *Appl. Biochem. Biotechnol.* 151(2): p. 711-723. 4. Vafiadi, C., Topakas, E., Christakopoulos, P., and Faulds, C.B., (2006). *Journal Biotech.* 125(2): p. 210-221. 5. Vafiadi, C., Topakas, E., Wong, K., Suckling, I. and Christakopoulos, P., (2005). *Tetrahedron-Asymmetr.* 16: 373-379.