

DESARROLLO DE UN PROGRAMA COMPUTACIONAL PARA DETERMINAR EL PERFIL HIDROLÍTICO DE FERULOIL ESTERASAS

A.F. Sánchez Ortiz^a, M.A. Armendáriz Ruiz^a, J.A. Hernández García^a,
J.C. Mateos Díaz^a, E.J. Herrera López^{a*}.

^a Unidad de Biotecnología Industrial, CIATEJ A.C., Av. Normalistas No. 800, Col. Colinas de la Normal, Guadalajara, Jal., CP 44270, México. *eherrera@ciatej.mx

Resumen

Las feruloil esterasas (FAE) son responsables de la liberación de ácidos hidroxicinámicos (AH) durante la degradación de residuos lignocelulósicos. Éstas han sido clasificadas en cuatro grupos (A-D), basándose en la preferencia por hidrolizar diferentes metil ésteres de AH; dentro de las más estudiadas se encuentran las FAE tipo A y B de *Aspergillus niger* (*An*), que liberan preferentemente el ácido ferúlico y cafeico de residuos agroindustriales, respectivamente. En la actualidad, el cuello de botella para la búsqueda y selección de FAE con perfiles hidrolíticos interesantes es el tiempo requerido tanto para determinar su actividad sobre un gran número de muestras y los distintos sustratos, como el análisis de la enorme cantidad de datos generados. La primera limitante puede solventarse con ayuda de un lector de microplacas que permite el análisis espectrofotométrico de un gran número de sustratos y enzimas; sin embargo, el análisis de datos sigue siendo lento y poco eficiente. En el presente trabajo se propone el empleo de un programa desarrollado en MATLAB 7[®] para la obtención del perfil hidrolítico de las FAE de *An*. Con este programa fue posible obtener de manera eficiente y automática, múltiples perfiles hidrolíticos de FAE hacia diferente sustratos, en los cuales se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.99 entre la actividad determinada de manera tradicional y con el programa desarrollado.

Introducción

Durante la degradación de los residuos lignocelulósicos las FAE (EC 3.1.1.73) son responsables de hidrolizar la unión éster entre los ácidos hidroxicinámicos y los polisacáridos de la hemicelulosa y pectina de la pared celular de las plantas, liberando monómeros o dímeros del ácido. En general, las FAE muestran una amplia especificidad por sustratos pertenecientes al grupo de los AH (*e.g.* ácido *p*-cumárico, cafeico, ferúlico y sinapínico). Por lo anterior, se han clasificado en 4 grupos (A-D), en base a la secuencia primaria de la proteína y a su preferencia por hidrolizar metil ésteres de AH [1]. Dentro de las más estudiadas se encuentran las FAE tipo A y B de *An*. Estas enzimas pueden liberar del 10 al 100% del ácido cafeico y ferúlico unido covalentemente a diferentes residuos agroindustriales. Generalmente, los perfiles hidrolíticos se determinan cromatográfica o espectrofotométricamente como lo reporta Ramírez y col. [2]. A pesar que los ensayos espectrofotométricos en lectores de microplacas permiten analizar un gran número de sustratos y enzimas, el procesamiento de la enorme cantidad de datos generados es lento y subjetivo, por lo que surge la necesidad de emplear herramientas computacionales que permitan agilizar dicho análisis. El sistema multiplataforma del software MATLAB 7[®] contiene un gran número de herramientas especializadas, tales como procesamiento de señales, solución de sistemas de ecuaciones diferenciales, análisis estadístico avanzado, etc. [3]. Además, provee soporte de alto nivel en programación, simulación y visualización de

ciencia y aplicaciones ingenieriles [4]. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es diseñar un programa computacional en MATLAB 7[®] que permita agilizar el cálculo, además de graficar el perfil hidrolítico de FAE con una preferencia por sustrato diferente, como las de *An*.

Metodología

Determinación de la actividad feruloil esterasa.

La velocidad máxima de reacción de las FAE tipo A y B de *An* se determinó espectrofotométricamente evaluando la hidrólisis a 415nm de cuatro metil esteres de ácidos hidroxycinámicos: (1) metil *p*-cumarato (MpC), (2) metil cafeato (MC), (3) metil ferulato (MF) y (4) metil sinapinato (MS) en presencia de *p*-nitrofenolato (pNP, indicador) a 30°C y pH 7.2 [2]. Posteriormente, el perfil hidrolítico se determinó con la ecuación 1 de manera manual empleando EXCEL[™].

$$\text{Actividad feruloil esterasa} \left(\frac{\text{U}}{\text{ml}} \right) = \frac{Abs_{415}/dt * V_{rxn} * FD}{Coef_{pNP} * V_{enz}} \quad (1)$$

Donde: Abs_{415}/dt indica la variación de la absorbancia máxima a 415 nm con respecto al tiempo en DO/min; V_{rxn} el volumen de reacción en litros; FD el factor de dilución de la enzima; $Coef_{pNP}$ el coeficiente de extinción molar del pNP a 415 nm y V_{enz} el volumen de la enzima en mililitros.

Desarrollo e implementación del programa en MATLAB 7[®].

El programa consiste en una serie de archivos de texto, también llamados archivos “m”, donde se introducen los algoritmos necesarios para la entrada y procesamiento de los datos, así como del cálculo y gráficas de la actividad enzimática. Como primer paso se alimentan los datos de absorbancias obtenidos del lector de microplacas xMark[™] de Bio-Rad para cada una de las feruloil esterasas sobre los distintos sustratos, éste organiza la información en vectores que permiten determinar la velocidad máxima de la reacción enzimática. Posteriormente, el programa emplea dichas velocidades máximas para calcular automáticamente la actividad feruloil esterasa por triplicado y obtener el perfil hidrolítico del promedio de la actividad de cada hidrolasa hacia los cuatro sustratos evaluados con su desviación estándar. En la figura 1 se muestra el diagrama de flujo que describe la estructura del programa.

Resultados

La actividad de la feruloil esterasa tipo A y B de *An* sobre los cuatro metil hidroxycinamatos determinada con el método manual (EXCEL) y el programa automático desarrollado (MATLAB) presentó una correlación del 99%, esto indica que existe una relación directa entre los datos obtenidos de ambas formas (Tabla 1).

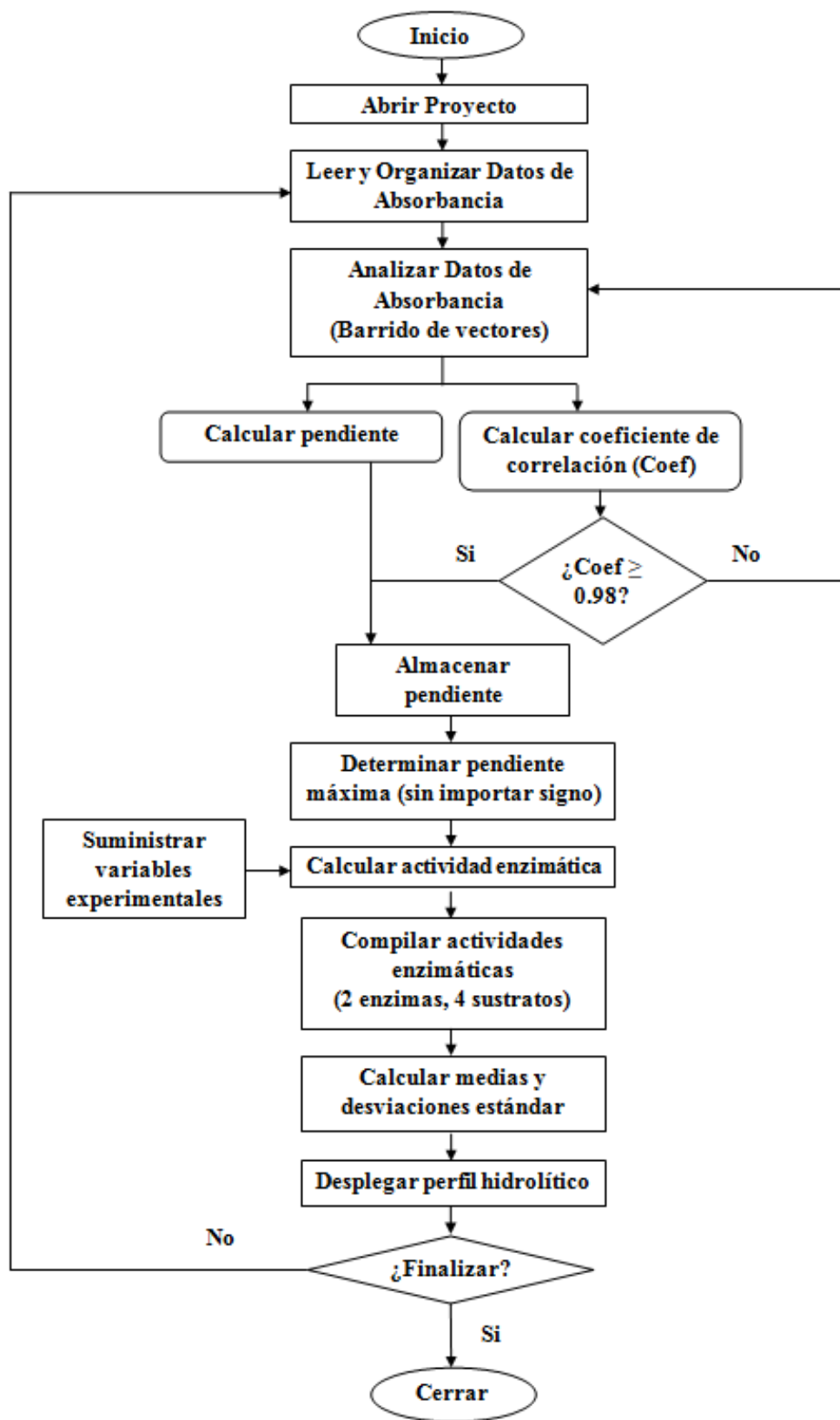


Figura 1. Diagrama de flujo de la estructura del programa en MATLAB 7®.

Por otra parte cuando la actividad se calcula con pendientes inferiores a 10 mDO/min la desviación estándar fue mayor al 10% con ambos métodos de cálculo, esto no es de sorprenderse, ya que el error experimental es mayor cuando el método espectrofotométrico se emplea sobre los límites inferiores de detección, como es el caso. En el caso contrario, es decir, en el cálculo de actividades empleando pendientes superiores a 10 mDO/min, se obtuvieron desviaciones estándar superiores con el método automático que con el método manual, esto debido a que el método automático está programado para calcular la pendiente máxima tomando el mismo número de datos, lo que puede variar en el método manual de acuerdo al criterio del operador. Sin embargo, esta desviación no es mayor al 7%, siendo un error aceptable dentro de los métodos espectrofotométricos miniaturizados [2].

Tabla 1. Actividad feruloil esterasa obtenida por ambos métodos.

	Sustrato	EXCEL (Manual)		MATLAB (Automático)	
		Media (U/ml)	Desviación Estándar	Media (U/ml)	Desviación Estándar
FAEA	MpC	0.13	0.018	0.15	0.022
	MC	0	0	0.05	0.03
	MF	8.9	0.11	9.83	0.03
	MS	31.1	0.78	32.89	1.38
FAEB	MpC	18.16	0.66	19.18	1.06
	MC	20.1	0.4	20.71	0.99
	MF	1.65	0.009	2.26	0.15
	MS	0	0.2	0.02	0.03

En la figura 2 se muestra el perfil hidrolítico de la feruloil esterasa tipo A y B de *Aspergillus niger* obtenidos con ambos métodos de cálculo. Cabe resaltar que tanto el perfil hidrolítico de la feruloil esterasa tipo A (Figura 2 A-C) como el de la tipo B (Figura B-D) concuerdan con los reportados en la literatura [1].

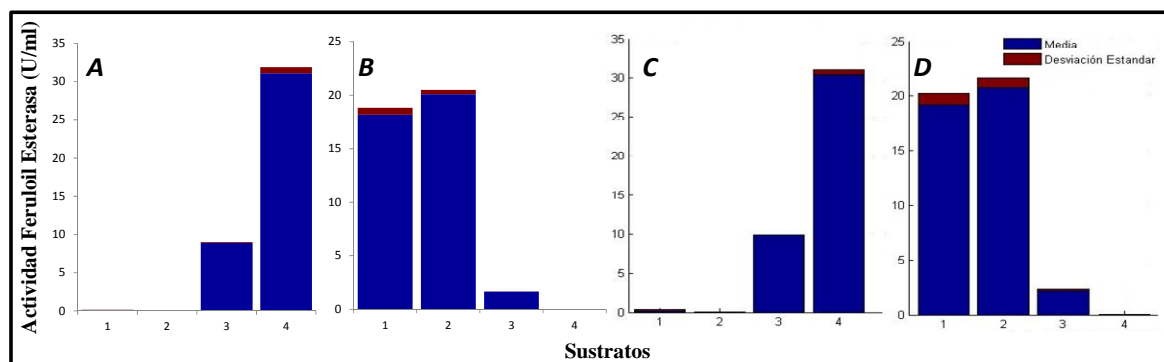


Figura 2. Perfil hidrolítico de las FAE de *An* sobre metil hidroxicinamatos. Sustratos: 1 MpC; 2 MC; 3 MF; 4 MS. El perfil hidrolítico obtenido con EXCEL se muestra en A: FAE A y B: FAE B. El perfil hidrolítico obtenido con MATLAB se muestra en C: FAE A y D: FAE B.

Conclusiones

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran la eficiencia en el empleo de MATLAB, puesto que permiten un rápido análisis de datos obtenidos experimentalmente, además se evita el error humano al transcribir un gran número de datos. Cabe resaltar que el programa descrito en este trabajo puede también determinar automáticamente parámetros bioquímicos como pH y temperatura óptimos a partir de archivos “m” y no se limita a sólo la determinación de actividades feruloil esterasa. Además, tiene el potencial de generar de manera automática múltiples perfiles de selectividad de diferentes hidrolasas bajo distintas condiciones de reacción.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por las becas de posgrado otorgadas con número 283294 y 290747. Así también a los proyectos CONACYT Ciencia Básica y FOMIX-Jalisco (128894 y 190698) por el financiamiento recibido para la realización de este trabajo.

Referencias

1. Crepin, V.F., C.B. Faulds, and I.F. Connerton, *Functional classification of the microbial feruloyl esterases*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004. 63 (6): p. 647-652.
2. Ramírez, L., et al., *A new microplate screening method for the simultaneous activity quantification of feruloyl esterases, tannases and chlorogenate esterases*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2008. 151(2-3): p. 711-723.
3. Kepner, J., *Parallel MATLAB for multicore and multinode computers*. Society for Industrial and Applied Mathematics (SIAM), 2009.
4. Borse, G.J., *Numerical methods with MATLAB: a resource for scientist and engineers*. International Thomson Publishing, 1996.