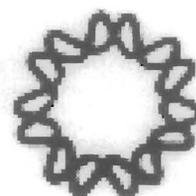


37

35



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA



Maestría
digitalize de

REACCIONES DE ALCOHOLISIS UTILIZANDO ALFA-AMILASA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

PRESENTA LA ALUMNA

ROSA ISELA SANTAMARIA GUTIERREZ



255679



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Esta tesis se desarrolló en el laboratorio del Dr. Agustín López-Munguía Canales, en el Instituto de Biotecnología de la UNAM, en el periodo de agosto de 1995 a septiembre de 1997.

Este trabajo de investigación se realizó gracias al apoyo económico otorgado por CONACyT y DGAPA (IN-212696).

DEDICATORIAS

A MI MADRE.

Por toda la confianza que me has brindado y por tu amor.
Por tu apoyo y comprensión en los momentos difíciles.

Mil gracias.

A MI PADRE.

Por que sin tener tu presencia cerca de mi se que me has apoyado.

Gracias.

A MIS HERMANOS, HILARIO, FIDEL Y ALEJANDRO.

Por que sin ustedes saberlo han sido mi ejemplo y mi guía.

Gracias.

A JUAN PABLO.

Gracias por tu amor y tu apoyo.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Agustín López no solo por haberme dado la oportunidad de estar en su laboratorio sino también por todas sus enseñanzas tanto académicas como humanas, por su gran calidad humana, por la confianza depositada en mi, porque ha sido un ejemplo a seguir de voluntad y dedicación.

A la M. en B. María Elena Rodríguez Alegría, por su colaboración en la realización de este trabajo de investigación, porque sin su ayuda este trabajo para mi hubiera sido mil veces más complicado. Por haberme brindado su amistad y su apoyo en todos los momentos difíciles.

A mi comité tutorial: Dr. Agustín López, Dr. Rafael Vázquez, Dra. Gloria Saab y M. en B. Roberto Singuenza por la asesoría brindada.

A los miembros del jurado, Dr. Agustín López-Munguía, Dra. Gloria Soberón, Dr. Eduardo Bárzana, Dra. Gloria Saab y Dr. Guillermo Gosset, por revisar la tesis y por sus valiosos comentarios.

Al Dr. Gabriel del Río por toda su ayuda y colaboración para explicar los resultados de este trabajo y darme la oportunidad de conocer un poco más de mi enzima.

Al técnico laboratorista Fernando González por su ayuda y sus enseñanzas en las técnicas de análisis.

A todas las personas que de una u otra forma han estado conmigo y me han brindado amistad: Aleida, José y Pepito; Claudia, Laura y Julieta; Came, Mónica, Lolita y Humberto, Male y Alfredo, Vero, Eduardo, Gabriel.

A todos los del laboratorio por hacer más felices mis días aquí: Male, Moni, Nadia, Vanesa, Lolita, Lariza (y Gustavo), Mariana, Chella, Fer, Gabriel, Vero, Maripaz, Doña Aure y Agustín.

A todas las personas que han contribuido a mi formación académica y humana.

INDICE GENERAL

	Páginas
I. Resumen	
II. Introducción	1
III. Objetivos	4
IV. Generalidades	
IV.1. Reacciones de alcoholólisis	5
IV.1.1. Síntesis de alquil-glicósidos	7
IV.1.2. Alquil-glicósidos y sus aplicaciones	8
IV.1.3. Alcoholólisis general de azúcares	9
IV.1.4. Alcoholólisis utilizando almidón como sustrato	11
IV.2. α -amilasa	12
IV.2.1. Características generales de la α -amilasa	12
IV.2.2. Estructura de la α -amilasa	14
IV.2.3. Mecanismo de acción	14
IV.2.4. Patrón de hidrólisis	15
IV.2.5. Reacciones llevadas a cabo por la α -amilasa	15
IV.2.6. α -amilasa en reacciones de alcoholólisis	17
IV.3. Glucoamilasa	18
V. Estrategia Experimental	20
VI. Materiales y Métodos	
VI.1. Materiales	21
VI.2. Técnicas Analíticas	23
VI.2.1. Determinación de actividad enzimática	23
VI.2.2. Análisis de productos de reacción	24
VI.2.3. Gel de electroforesis y de acoplamiento	26
VI.3. Sistema de reacción para la alcoholólisis	27
VI.4. Selección de la α -amilasa	28

VI.5. Reacciones de transglicosidación	28
VI.6. Obtención de la constante de Michaelis-Menten de la α -amilasa seleccionada	28
VI.7. Efecto del metanol en la estabilidad y velocidad inicial de la α -amilasa	28
VI.8. Efecto de la presencia de metanol en la conversión a largo plazo de la α -amilasa	29
VI.9. Reacción de hidrólisis de butil-glucósido con α -amilasa	29
VI.10. Efecto de la concentración de almidón en la reacción de alcoholólisis	29
VI.11. Efecto de la concentración de metanol en la reacción de alcoholólisis	30
VI.12. Método de cuantificación de los productos de alcoholólisis	30
VI.12.1. Glucoamilasa en reacciones de alcoholólisis	30
VI.12.2. Glucoamilasa en reacciones de condensación	31
VI.12.3. Glucoamilasa en reacción de hidrólisis de metil-glucósido	31
VI.12.4. Gel de electroforesis y de acoplamiento de la glucoamilasa	31
VI.13. Cuantificación de los productos de alcoholólisis utilizando glucoamilasa	32
VI.14. Selección del sustrato más adecuado para la alcoholólisis	32
VII. Resultados y Discusión	
VII.1. Selección de la α -amilasa	33
VII.2. Caracterización de la α -amilasa de <i>A. niger</i> E1	42
VII.2.1. Determinación de la constante de Michaelis-Menten	42
VII.2.2. Efecto del metanol en la α -amilasa E1	43
VII.3. Reacción de hidrólisis de butil-glucósido con la α -amilasa E1	47
VII.4. Selección de la concentración de almidón en la reacción de alcoholólisis	47
VII.5. Selección de la concentración de metanol en la reacción de alcoholólisis	49
VII.6. Perfil de metil-glicósidos formados en la reacción de alcoholólisis con la α -amilasa E1	50
VII.7. Cuantificación de la reacción de alcoholólisis utilizando glucoamilasa	53
VII.7.1. Estudio control de la glucoamilasa en reacciones de alcoholólisis	53
VII.8. Selección del sustrato más adecuado para la alcoholólisis con α -amilasa E1	61
VIII. Conclusiones	64
IX. Perspectivas	65
X. Bibliografía	66
XI. Apéndice	72

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Mecanismos propuestos para las glicosidasas que invierten (a) y para las glicosidasas que retienen (b) la configuración anomérica de sus sustratos en sus productos (figura tomada de McCarter y Withers, 1994)	6
Figura 2. Reacciones de alcoholólisis y de hidrólisis con cuatro α -amilasas disponibles utilizando como sustratos almidón al 1.2% p/v y metanol al 20% v/v.	34
Figura 3. Cromatoplasmas de reacciones de transglicosidación con las α -amilasas utilizando 80 mM de maltosa en las condiciones establecidas para cada enzima.	37
Figura 4. Ruta propuesta por Kuriki et al. (1996) para la entrada de la molécula de agua necesaria para la hidrólisis del sustrato por la neopululanasa.	39
Figura 5. Alineamiento de diferentes α -amilasas y algunas CGTasas.	40
Figura 6. Representación de Lineweaver-Burk de datos de velocidad inicial de hidrólisis de la α -amilasa de <i>A. niger</i> E1 empleando almidón como sustrato, con 4.8 U/mL de enzima, a pH 4 y 60°C.	42
Figura 7. Efecto de la concentración de metanol en la estabilidad de la α -amilasa de <i>A. niger</i> E1 incubada a pH 4 y 60°C.	43
Figura 8. Efecto de la concentración de metanol en la velocidad de reacción de la α -amilasa de <i>A. niger</i> E1 con 1.2% p/v de almidón como sustrato, a pH 4 y 60°C.	45
Figura 9. Efecto de la presencia de metanol en la conversión a largo plazo de la α -amilasa de <i>A. niger</i> E1. Conversión de almidón medida como equivalentes de glucosa liberados después de 5 hrs. de reacción de la amilasa utilizando 15% p/v de almidón a 60°C y pH 4.	46

- Figura 10. Placas de cromatografía TLC donde se muestran los productos de hidrólisis y alcoholólisis de la α -amilasa de *A. niger* E1 a varias concentraciones de almidón utilizando 20% v/v de metanol a 60°C y pH 4. 48
- Figura 11. Cromatoplas de TLC donde se presentan los productos de hidrólisis y de alcoholólisis para reacciones con α -amilasa de *A. niger* E1 a diferentes concentraciones de metanol utilizando almidón al 3% p/v, 60°C y pH 4. 49
- Figura 12. Perfil de productos obtenidos de una reacción de alcoholólisis de la α -amilasa de *A. niger* E1 con 6% p/v de almidón y 40% v/v de metanol, a 60°C y pH 4 y de una reacción control sin metanol en las mismas condiciones. 51
- Figura 13. Cromatogramas de HPLC de productos de alcoholólisis a los 15 minutos y 5 horas de reacción con α -amilasa de *A. niger* E1 utilizando almidón al 6% p/v y metanol al 40% v/v, 60°C y pH 4. 52
- Figura 14. Reacciones control de alcoholólisis con las glucoamilasas GA1 y GA2 utilizando almidón y maltosa como sustratos, a 40 ó 60°C y a pH 4. 54
- Figura 15. Reacciones de alcoholólisis de la glucoamilasa GA1 con glucosa y metil-glucósido o maltosa y metil-glucósido como sustratos con 30% de metanol a pH 4 y 60°C. 56
- Figura 16. Cromatoplas de reacción de alcoholólisis de glucoamilasa GA1 con almidón 6% p/v y metanol 30% v/v, con una actividad volumétrica de 2.19 U/mL, a 60°C y pH 4. 57
- Figura 17. Gel de electroforesis, acrilamida 10%; de las enzimas GA1 y α -amilasa E1. 58
- Figura 18. Cromatoplas de la reacción de hidrólisis de metil-glucósido al 6% p/v con la glucoamilasa GA1, a pH 4 y 40 ó 60°C, y con una actividad volumétrica de 42 U/mL. 60

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Glicosidasas más utilizadas en reacciones de alcoholólisis y los sustratos con los que se han llevado a cabo las reacciones.	9
Tabla 2. Actividades enzimáticas de las α -amilasas comerciales medidas por el método de DNS.	24
Tabla 3. Composición de maltodextrinas tipo 125 D.E. 25 utilizadas como estándar para la identificación de productos de reacción, Rfs de TLC y tiempos de retención de HPLC de cada una de ellas.	25
Tabla 4. Principales productos de la hidrólisis exhaustiva de almidón con las α -amilasas.	35
Tabla 5. Determinación de la eficiencia de alcoholólisis con diferentes sustratos utilizando α -amilasa de <i>A. niger</i> E1 y 40% de metanol y utilizando glucoamilasa GA2 para la cuantificación de los productos de alcoholólisis.	61

I. RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la capacidad de la α -amilasa para llevar a cabo reacciones de alcoholólisis. Para ello, se llevaron a cabo reacciones de alcoholólisis con diferentes amilasas disponibles comercialmente, dos de origen fungal producidas por *Aspergillus niger* (E1 y E2) y dos de origen bacteriano, producidas por *Bacillus licheniformis* (E3) y *B. stearothermophilus* (E4). Se empleó almidón soluble como sustrato donador y metanol como alcohol aceptor. El análisis en Cromatografía en Capa Fina (TLC) de las reacciones demuestran la producción de alquil-glicósidos con las enzimas fungales pero no con las enzimas bacterianas, estableciéndose una hipótesis a nivel estructural para explicar este comportamiento en colaboración con el grupo de Ingeniería de Proteínas del IBT. Se seleccionó además a la enzima denominada E1 para analizar el comportamiento de la α -amilasa en reacciones de alcoholólisis. Se efectuaron estudios del efecto de la concentración de almidón y de metanol en la reacción, observándose una mayor producción de metil-glicósidos al aumentar la concentración de ambos sustratos. El mejor rendimiento de alcoholólisis en condiciones manejables experimentalmente se obtuvo con 6% p/v de almidón y 40% v/v de metanol. Bajo estas condiciones de reacción se observó una mayor producción del metil-maltósido en comparación con los otros metil-glicósidos e inclusive que la propia maltosa. Se desarrolló un método enzimático para la cuantificación indirecta de los productos de alcoholólisis. Utilizando glucoamilasa después del tiempo de reacción de la α -amilasa fue posible hidrolizar los oligosacáridos y metil-glicósidos formados a glucosa y metil-glucósido respectivamente, con el fin de cuantificar este último vía Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC). De esta manera la producción de metil-glucósido refleja la cantidad de alcohol destinado a la alcoholólisis y la de glucosa refleja el tamaño de los glucósidos. Adicionalmente se probaron maltodextrinas de hasta 10 unidades de glucosa y almidón hidrolizado como sustratos. Sin embargo, se observó que la alcoholólisis se realiza de manera más eficiente con almidón en comparación con otros sustratos, concluyéndose que es este el sustrato más adecuado.

II. INTRODUCCION

Anteriormente casi en forma generalizada se pensaba en las soluciones acuosas como el único medio para la catálisis enzimática. Sin embargo, en los últimos años ha quedado claro a través de diversas investigaciones que tanto las enzimas libres como las contenidas en células completas pueden ser utilizadas de manera efectiva en muy diversos medios con propiedades muy alejadas a las de una simple solución acuosa. En efecto, una amplia proporción de reacciones pueden llevarse a cabo en solventes orgánicos, en fase gaseosa o en fluidos supercríticos. Este tipo de sistemas se describe como “medios no convencionales”. En muchos de estos casos no se requiere más agua que una cantidad pequeña cubriendo al biocatalizador. Su comportamiento puede ser radicalmente diferente en términos de estabilidad y/o especificidad que en solución acuosa sin que hasta la fecha sea posible una predicción adecuada, en parte como reflejo de la poca experiencia que se tiene en este tipo de sistemas y en parte también por su mayor complejidad (Halling, 1994).

La biocatálisis no convencional en solventes orgánicos ha recibido una creciente atención dadas las ventajas potenciales que presenta la utilización de enzimas en mezclas de solvente orgánico con agua o en solventes orgánicos puros, entre las cuales destacan:

- la relativamente alta solubilidad de muchos compuestos no polares en solventes orgánicos, los cuales pueden ser utilizados como sustratos para la reacción biocatalítica,
- la habilidad de utilizar enzimas hidrolíticas en reacciones de síntesis en medios no acuosos al poder manipular las condiciones del equilibrio termodinámico de la reacción,
- la posibilidad de disminuir reacciones laterales indeseables en medios acuosos, así como inhibiciones por producto o por exceso de sustrato,
- la relativa facilidad para recobrar tanto los productos como el biocatalizador (Laane et al. 1987),
- el aumento de la estabilidad térmica de las enzimas ya que se requiere de agua para inactivarlas a altas temperaturas (Dordick, 1989).

Recientemente se ha propuesto que a través de una elección correcta del solvente orgánico, es posible manipular la especificidad del sustrato, la enantioselectividad, la selectividad proquiral, la regioselectividad y la quimioselectividad de reacciones catalizadas por enzimas (Wescott y Klivanov, 1994).

Sin embargo, la aplicación de solventes orgánicos en biocatálisis tiene algunas desventajas ya que las enzimas pueden ser inactivadas por el microambiente no acuoso; por otro lado, el medio de reacción orgánico puede cambiar el mecanismo y la cinética de la reacción catalítica, resultando, en la mayoría de los casos, en una disminución en la velocidad de reacción. Todos estos efectos son individuales en naturaleza y dependen no solo de la enzima sino también de las condiciones específicas usadas como son: el sustrato, el solvente, la temperatura y el pH (Ulbrich-Hofmann y Selisko, 1993).

Muchas enzimas hidrolíticas, principalmente proteasas y lipasas (Dordick, 1989), se han aplicado exitosamente en sistemas con solventes orgánicos para la síntesis de enlaces peptídicos y ésteres, respectivamente, ya sea por hidrólisis reversa o por transesterificación de los sustratos activados.

En el caso de las lipasas, existen algunas investigaciones donde se han utilizado para la síntesis de ésteres de azúcares y ácidos grasos (Oguntimein et al. 1993; Klivanov, 1990), aunque se conoce mucho menos acerca de la síntesis de alquil-glicósidos catalizada por las glicosidasas. Tanto los ésteres de azúcar como los alquil-glicósidos son usados como surfactantes, sin embargo, los ésteres de azúcares son inestables en condiciones alcalinas (Ljunger et al. 1994), por lo que resulta de mayor interés el estudio de la síntesis de los alquil-glicósidos.

Por otro lado, dentro del laboratorio de Tecnología Enzimática del IBT en donde se llevó a cabo este trabajo, se han realizado estudios de reacciones de alcoholisis utilizando β -galactosidasa e invertasa. En el primer caso se estudiaron dos sistemas, uno de dos fases con alcoholes inmiscibles en agua (García-Garibay, datos no publicados) y otro de micelas invertidas (Salgado, 1997) utilizando como sustratos lactosa y p-nitrofenil-galactósido. En ambos casos se lograron rendimientos de alcoholisis del 100%. Sin embargo, la baja disponibilidad del p-nitrofenil-galactósido, así como la baja solubilidad de la lactosa en los alcoholes, dificultan el empleo de esta enzima en reacciones de alcoholisis. En relación a la invertasa, en donde la disponibilidad del sustrato no representa ninguna dificultad, la enzima demostró una baja estabilidad en presencia de alcoholes miscibles e inmiscibles en agua, además de que se observó una mayor especificidad hacia la hidrólisis que hacia la alcoholisis (Rodríguez et al. 1996 y 1997).

Paralelamente el grupo de Ingeniería de Proteínas del IBT inició estudios estructurales con la enzima α -amilasa de *B. stearothermophilus* dado que esta enzima resultaba un modelo adecuado para estudios de relación estructura-función (Ramírez, 1994; Del Río, 1997). La α -amilasa es una endoenzima que hidroliza almidón y otros polímeros de glucosa con enlaces α 1 \rightarrow 4. Tanto la enzima como el sustrato son de alta disponibilidad. Se tiene además un antecedente en el que se menciona que esta enzima es capaz de llevar a cabo reacciones de alcoholólisis. Matsubara (1961) reporta que la α -amilasa de *A. oryzae* es capaz de producir alquil-maltósidos por transferencia de la maltosa a diferentes alcoholes cuando se utilizan aril-maltósidos como sustratos. Por lo anterior, al no encontrarse reportes de investigaciones básicas sobre el funcionamiento de la α -amilasa en reacciones de alcoholólisis, se seleccionó a esta enzima como una alternativa interesante para el estudio de la reacción de alcoholólisis, complementando el trabajo estructural que realiza el grupo de Ingeniería de Proteínas.

III. OBJETIVOS

Objetivo general:

Estudiar el potencial de la α -amilasa en su capacidad para llevar a cabo reacciones de alcoholólisis.

Objetivos específicos:

Probar la capacidad de varias α -amilasas de llevar a cabo reacciones de alcoholólisis.

Estudiar el efecto de la concentración de sustratos para determinar las condiciones más adecuadas para la reacción de alcoholólisis.

Determinar el sustrato más adecuado para que la α -amilasa lleve a cabo la reacción de alcoholólisis.

IV. GENERALIDADES

IV.1. Reacciones de alcoholisis.

Bajo condiciones fisiológicas las glicosidasas hidrolizan enlaces glicosídicos; sin embargo, es posible llevar a cabo la reacción de síntesis si se cambia el equilibrio de la reacción y esto puede obtenerse cuando dicha reacción se realiza en un medio predominantemente orgánico, con baja actividad de agua.

Enzimáticamente el enlace glicosídico se hidroliza al actuar una molécula de agua como aceptor de electrones; sin embargo, ha sido demostrado que las glicosidasas pueden catalizar la síntesis de los denominados alquil-glicósidos cuando la reacción se lleva a cabo en presencia de algún alcohol y éste actúa como aceptor de electrones. A este tipo de reacción de síntesis se le denomina alcoholisis. Los mecanismos de ambas reacciones son similares.

El mecanismo de hidrólisis de las glicosidasas toma lugar vía una catálisis general ácida que requiere dos residuos catalíticos, un ácido donador de un protón y una base/nucleófilo. Esta hidrólisis puede ocurrir por dos tipos de mecanismos; aquel en que se hidroliza el enlace glicosídico con una inversión neta de la configuración del carbono anomérico, y aquel en el que existe una retención de la configuración. Los mecanismos difieren en que las glicosidasas que invierten la configuración operan vía un desplazamiento directo del agua, mientras que las glicosidasas que la retienen utilizan un mecanismo de doble desplazamiento que involucra un intermediario glicosil-enzima antes de que entre la molécula de agua. En ambos mecanismos se emplea un par de residuos ácido carboxílicos en el sitio activo. En el mecanismo de retención, el oxígeno glicosídico es protonado por el ácido catalítico y existe una asistencia nucleofílica para la salida de una parte del sustrato dada por la base del otro ácido catalítico, formándose el intermediario glicosil-enzima con la parte del sustrato que se retiene; este intermediario es hidrolizado por una molécula de agua en un segundo ataque nucleofílico en el carbono anomérico generando un producto con la misma estereoquímica que el sustrato. En el mecanismo de inversión la protonación del oxígeno glicosídico y la salida de una parte del sustrato están acompañados por el ataque de la molécula de agua que es activada por el residuo base del ácido catalítico generándose un producto con estereoquímica opuesta a la del sustrato (Mc Carter y Withers, 1994; Davies y Henrissat, 1995). Esta situación se ilustra en la figura 1.

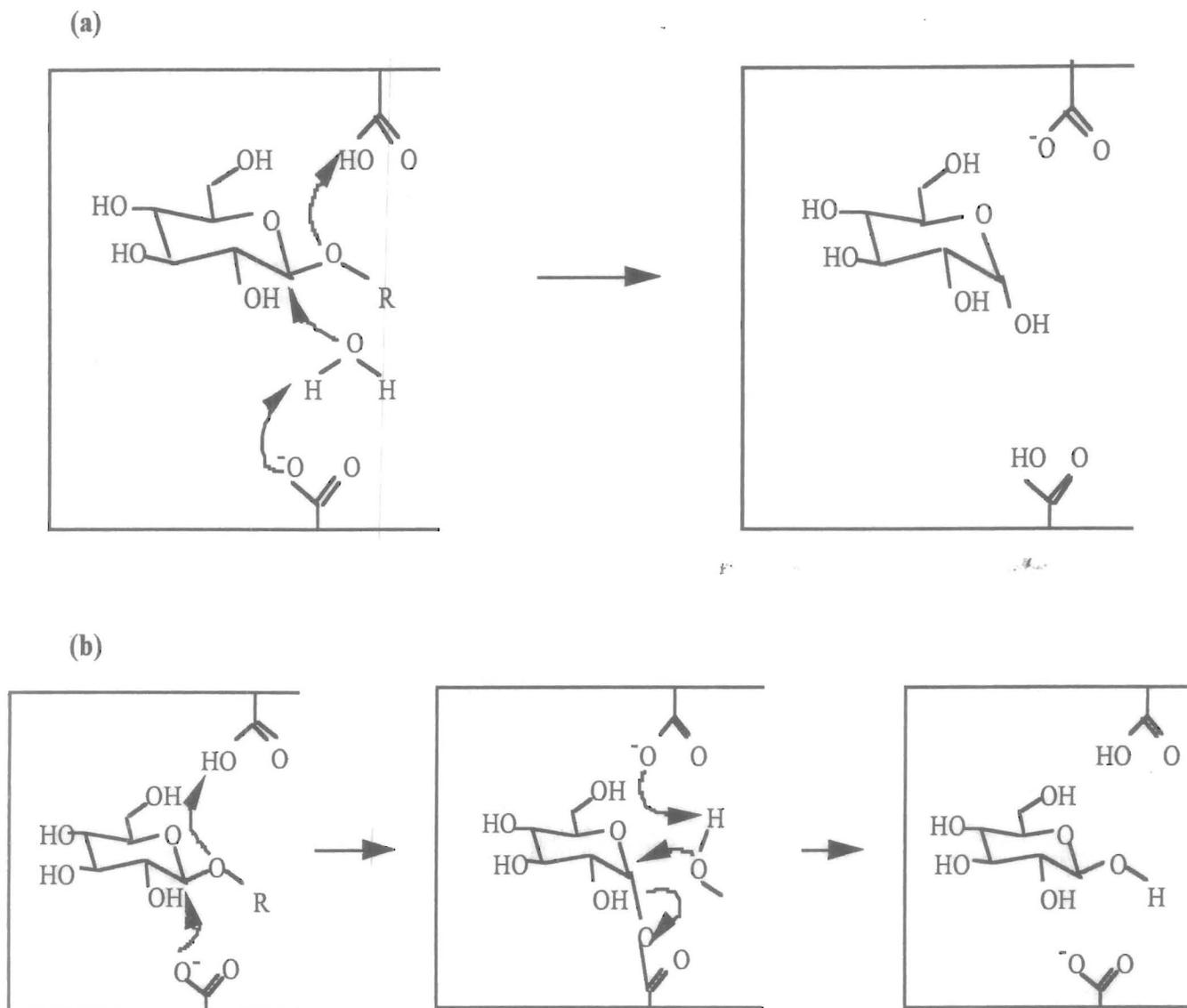


Fig. 1. Mecanismos propuestos para las glicosidasas que invierten (a) y para las glicosidasas que retienen (b) la configuración anomérica de sus sustratos en sus productos (figura tomada de McCarter y Withers, 1994).

Dados estos mecanismos, la alcoholisis se presenta cuando en lugar del grupo hidroxilo del agua es el grupo hidroxilo de un alcohol el que realiza el ataque nucleofílico. Sinnot (1990) menciona que muchas de las glicosidasas que retienen la configuración de sus productos son capaces de transferir el residuo glicosilo a aceptores diferentes al agua por un control cinético, como sería el caso de la β -xilosidasa y la β -galactosidasa, entre otras. En cambio, las enzimas que invierten la configuración no tendrían esta capacidad de transferencia ya que en este caso dicha actividad no sería específica y por tanto habría un reconocimiento indiscriminado en la configuración del sustrato, éste podría ser tanto α como β . El autor menciona que la transferencia de residuos glicosilo toma lugar con inversión de la configuración anomérica sólo cuando no es posible la reversibilidad en el sistema.

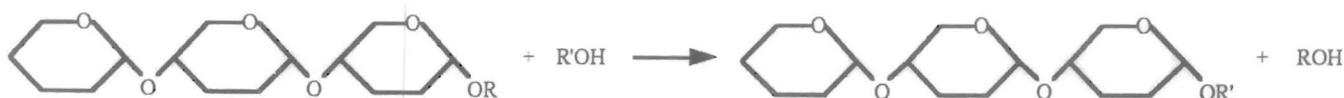
IV.1.1. Síntesis de alquil-glicósidos.

La síntesis de alquil-glicósidos por glicosidasas se lleva a cabo en reacciones alternativas a la de hidrólisis mediante tres vías diferentes:

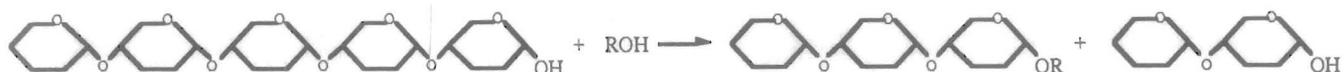
- por condensación o hidrólisis inversa, en donde la enzima forma un enlace entre el alcohol y el sustrato;



- por transglicosidación, en donde la enzima utiliza un alquil-glicósido como sustrato donador y un alcohol diferente como aceptor para formar un alquil-glicósido nuevo;



- por alcoholólisis, en donde la enzima rompe el enlace glicosídico pero en lugar de ser utilizada una molécula de agua como aceptor, se utiliza una molécula del alcohol presente en el sistema.



IV.1.2. Alquil-glicósidos y sus aplicaciones.

Los alquil-glicósidos son un grupo de compuestos formados por la unión de un grupo glicosilo de un azúcar con el grupo alquilo de un alcohol. Cuando los alquil-glicósidos son sintetizados a partir de alcoholes de peso molecular alto, con una cadena lateral no menor de 4 unidades de carbono, éstos adquieren propiedades tensoactivas y pueden ser utilizados como surfactantes no iónicos, además de que presentan actividad antimicrobiana y son biodegradables (Matsumura et al. 1990). Estas propiedades han sido de mucho interés debido a la alta demanda de surfactantes, algunos de ellos inclusive han sido utilizados en las industrias de detergentes, alimentos y farmacéutica (Hughes y Lew, 1970). Sin importar el tamaño de la cadena lateral de los alquil-glicósidos, éstos también pueden funcionar como sustratos para la síntesis de otros productos como los acil-glicósidos (Adelhorst et al. 1990) o de otros compuestos más complejos como los glicósidos cardíacos (Ooi et al. 1984).

El método químico para la síntesis de alquil-glicósidos anoméricamente puros requiere de la protección y desprotección de los grupos hidroxilo de la glucosa o sus derivados para promover la regioselectividad y estereoselectividad, por lo que se requiere de varios pasos para su obtención, además de que se emplean diferentes materiales de alta toxicidad (Nilsson, 1988). En este sentido, las enzimas ofrecen ventajas con respecto a los métodos químicos ya que son regio- y estereo-selectivas y el producto puede ser obtenido en un solo paso de reacción, sin necesidad de proteger los grupos hidroxilo y de usar sustancias químicas o catalizadores peligrosos.

IV.1.3. Alcohólisis general de azúcares.

La síntesis enzimática de los alquil-glicósidos se ha llevado a cabo con varias disacaridasas, dentro de las que se encuentran las mencionadas en la tabla 1. Estas enzimas han sido motivo de diversos estudios en reacciones de alcohólisis. Sin embargo, enzimas que hidrolizan polisacáridos como son las celulasas y α -amilasas han sido poco estudiadas. En el caso de celulasas no se ha encontrado ningún reporte al respecto. En el caso de la α -amilasa se ha reportado la síntesis de alquil-glicósidos utilizando α -amilasa en reacciones de transferencia a partir de aril-maltósidos (Matsubara, 1961). Sin embargo, en este reporte la investigación no tiene la profundidad de la mayoría de los trabajos con las otras glicosidasas.

Tabla 1. Glicosidasas más utilizadas en reacciones de alcohólisis y los sustratos con los que se han llevado a cabo las reacciones.

Enzima	Sustratos utilizados	Referencias
β -glucosidasa	celobiosa, glucosa, metil-glicósido.	Chahid et al. 1992; Panintrarux et al. 1995; Vic y Thomas, 1992; Vulfson et al. 1990.
β -xilosidasa	xilobiosa, xilosa, metil-xilósido.	Drouet et al. 1994; Shinoyama et al. 1988.
β -galactosidasa	lactosa, p-NP-galactósido.	Stevenson et al. 1993; García-Garibay, datos no publicados; Salgado, 1997.
invertasa	sacarosa, fructosa.	Selisko et al. 1990; Straathof et al. 1988; Rodríguez et al. 1996 y 1997.

La β -glucosidasa, enzima que hidroliza la celobiosa, es una de las enzimas más estudiadas en reacciones de síntesis de alquil-glicósidos por mostrar una alta eficiencia en la síntesis. Se ha observado su capacidad de síntesis en reacciones de condensación (Panintrarux et al. 1995; Vic y Thomas, 1992 y Chahid et al. 1992), en reacciones de alcohólisis (Vic y Thomas, 1992), así como en reacciones de trannglicosidación (Vulfson et al. 1990 y Dintinger et al. 1994) utilizando glucosa, celobiosa o metil- β -glicósido respectivamente como sustratos donadores y diferentes alcoholes como aceptores. Ljunger y col. (1994) inclusive inmovilizaron esta enzima en diferentes soportes para llevar a cabo reacciones de

condensación. Sin embargo, es importante resaltar que esta enzima y sus sustratos son de baja disponibilidad y alto costo.

La β -xilosidasa es otra de las enzimas más utilizadas en reacciones de alcoholísis, e inclusive se puede decir que de las enzimas estudiadas, ésta ha sido la más eficiente para la síntesis de alquil-xilósidos. La capacidad de síntesis de estos productos se ha observado tanto por transglicosidación (Drouet et al. 1994) como por alcoholísis (Shinoyama et al. 1988) o condensación (Drouet et al. 1994) utilizando metil- β -xilósido, xilobiosa o xilosa como sustratos donadores respectivamente. No obstante, la síntesis de alquil-xilósidos con esta enzima tiene la desventaja de la baja disponibilidad tanto de la enzima como de sus sustratos.

La β -galactosidasa es otra enzima ampliamente estudiada en reacciones de alcoholísis utilizando lactosa o p-nitrofenol-galactósido como sustratos donadores en diferentes sistemas: sistema de una fase, utilizando alcoholes miscibles en agua (Stevenson et al. 1993), sistema de dos fases utilizando alcoholes inmiscibles en agua (García-Garibay, datos no publicados) y sistema de micelas invertidas (Salgado, 1997). Con esta enzima se han reportado rendimientos de alcoholísis hasta del 100% en los casos en los que se utilizan alcoholes inmiscibles en agua y en micelas invertidas. Al igual que la β -glucosidasa y la β -xilosidasa reportadas en la literatura, ésta tiene la desventaja de una baja disponibilidad de los sustratos. Tiene además otras desventajas, como son la poca solubilidad de la lactosa que dificulta su uso en reacciones con solventes orgánicos y la capacidad de la enzima de hidrolizar al alquil-galactósido generado en la reacción de alcoholísis.

La β -fructofuranosidasa o invertasa es una enzima que representa una excelente opción para catalizar reacciones de alcoholísis dada la amplia disponibilidad tanto de la enzima como de su sustrato, la sacarosa. En este caso se sabe que existe una competencia entre la reacción de alcoholísis, la de hidrólisis de la sacarosa y la hidrólisis del alquil- β -fructósido (Selisko et al. 1990 y Straathof et al. 1988). La síntesis de los alquil-fructósidos con esta enzima puede llevarse a cabo tanto por alcoholísis de la sacarosa, como por condensación de la fructosa con el alcohol, aunque en este último caso con rendimientos mucho menores. Sin embargo, esta enzima resultó ser poco atractiva para su empleo en la síntesis de alquil-fructósidos debido a que se puso en evidencia su baja estabilidad en presencia de alcoholes solubles e insolubles, así como una mayor especificidad hacia la reacción de hidrólisis que hacia la alcoholísis (Rodríguez et al. 1996 y 1997). Además, como ya se mencionó, la enzima es capaz de

reconocer al alquil-fructósido como sustrato lo cual baja el rendimiento de producción y hace que se requiera un mayor control en la reacción para evitar al máximo la hidrólisis del producto.

En estudios hechos por Shinoyama y col. (1988), se concluye que las enzimas adecuadas para la producción de alquil-glicósidos deben satisfacer los siguientes requerimientos:

- alta estabilidad de la actividad glicosidasa en presencia de alcoholes,
- presencia de una gran actividad de transglicosidación, y
- un amplio intervalo de aplicación para varios alcoholes.

IV.1.4. Alcohólisis utilizando almidón como sustrato.

El almidón es un polisacárido muy abundante compuesto por unidades de glucosa. No es un producto uniforme ya que está formado por dos tipos de polímeros: la amilosa, molécula de cadena lineal compuesta por unidades de glucosa con enlaces α 1 \rightarrow 4, y la amilopectina, molécula ramificada compuesta por unidades de glucosa en enlaces α 1 \rightarrow 4 y con ramificaciones en α 1 \rightarrow 6.

La lista de productos que pueden ser obtenidos, al menos en principio, a partir de almidón es muy variada, desde hidrolizados parciales como maltodextrinas y ciclodextrinas, maltosa, glucosa (cuando se lleva a cabo una hidrólisis total), fructosa (vía isomerización de la glucosa), hasta ácidos orgánicos, alcoholes, aminoácidos, ésteres y los productos que nos ocupan en este trabajo, los alquil-glicósidos (Van Beynum y Roels, 1985). Por tanto, aunque no se cuenta con reportes en los que el almidón haya sido utilizado como sustrato para la síntesis enzimática de los alquil-glicósidos, al menos en principio es posible utilizar alguna de las enzimas que lo hidrolizan con este fin, en especial la α -amilasa que rompe los enlaces glicosídicos α ,1-4 que son los más abundantes en el almidón.

IV.2. α -amilasa.

IV.2.1. Características generales de la α -amilasa.

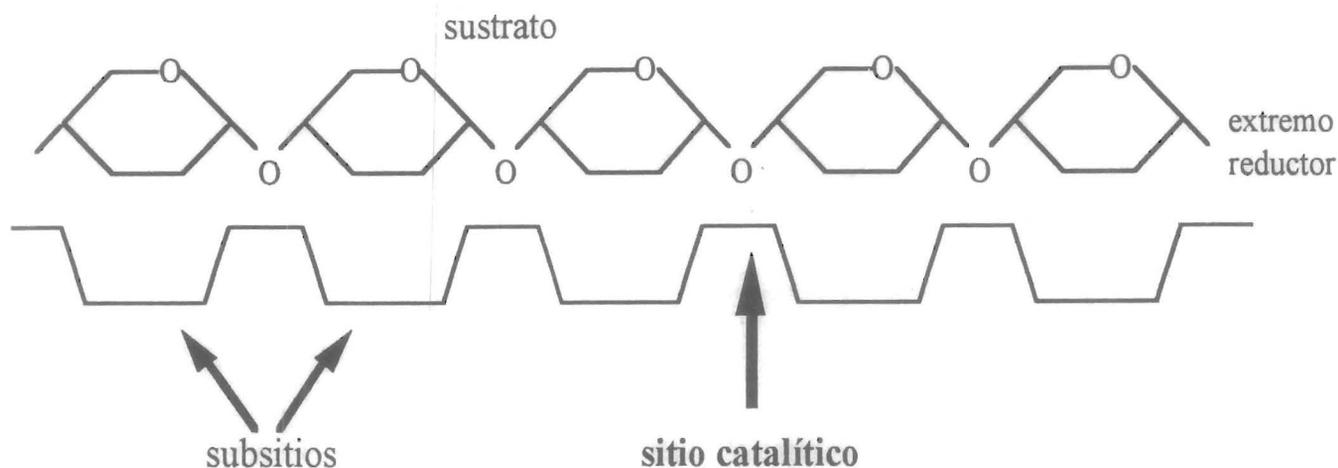
La α -amilasa (clasificada como α -1,4-D-glucan glucanohidrolasa, EC 3.2.1.1, endoamilasa) es una enzima ampliamente distribuida entre los microorganismos (bacterias, hongos, mamíferos) que cataliza la hidrólisis de los enlaces glicosídicos α 1 \rightarrow 4 de polímeros de glucosa como el almidón, maltodextrinas y glucógeno de una manera endo. La dextrinización del sustrato se acompaña por una rápida pérdida en la viscosidad de la solución.

Estas enzimas tienen un rango de pH óptimo entre 2.0 a 10.5, dependiendo de la fuente de la que provienen. En lo referente a la temperatura, existe igualmente un amplio espectro en el cual pueden actuar. Dependiendo de la fuente éstas llegan a tener temperaturas óptimas tan bajas como 25°C, como es el caso de la amilasa de *F. oxysporum*, o superiores a los 100°C en enzimas termoestables como la de *Bacillus licheniformis* (Vihinen y Mäntsälä, 1989). El peso molecular de las enzimas puede variar desde 10 000 hasta 139 000 Da, aunque la mayoría de ellas tienen de 50 000 a 60 000 Da (Fogarty, 1983).

Por otro lado, casi todas las α -amilasas son metaloenzimas que contienen y requieren al menos un ion calcio por molécula. El ion Ca^{2+} es necesario para estabilizar a las enzimas permitiendo un plegamiento adecuado para la actividad y se ha propuesto que una de las regiones conservadas de estas enzimas es la responsable de la unión del ión. En general, las α -amilasas son mucho más termoestables en presencia de calcio que sin él. Estos iones pueden ser removidos de las amilasas por diálisis contra EDTA, el cual quela los iones Ca^{2+} , o por electrodiálisis (Vihinen y Mäntsälä, 1989).

Dependiendo de la fuente de las α -amilasas, éstas también difieren en el patrón de los productos generados de la hidrólisis exhaustiva del almidón. Dichas diferencias se han atribuido a la estructura de sus subsitios; al número de subsitios, a la localización del sitio catalítico entre los susbitios y a la afinidad de cada subsitio (Suganuma et al. 1996). Un subsitio está definido como la región que reconoce e interactúa con un residuo de glucosa del sustrato.

sitio activo de la enzima



Aunque las α -amilasas no pueden ser clasificadas de manera absoluta, estas enzimas han sido agrupadas, de acuerdo a los productos generados después de una hidrólisis exhaustiva del almidón, en dos tipos:

- **sacarificantes**, aquellas α -amilasas que llevan a cabo un 50 a 60% de la hidrólisis, y que por tanto producen un incremento en el poder reductor muy elevado; el tamaño de sus productos es pequeño como maltosa o maltotriosa.
- **licuefactantes**, aquellas que hidrolizan el almidón en un 30 a 40% y que por tanto generan un poder reductor cercano a la mitad del generado por una α -amilasa sacarificante; estas enzimas generan productos con un grado de polimerización mayor como maltopentosa y maltohexosa.

(Vihinen M. y P. Mäntsälä, 1989)

IV.2.2. Estructura de la α -amilasa.

Todas las estructuras de α -amilasas reportadas muestran que el dominio catalítico es un barril $(\alpha/\beta)_8$ o TIM-barrel que consiste en ocho hebras β paralelas rodeadas de ocho α -hélices conectadas por loops característicos. Los residuos responsables de la unión del sustrato y la catálisis se encuentran en el extremo C-terminal de las hebras β o bien en los loops β - α (Ramírez, 1994).

Los sitios activos de varias α -amilasas han sido estudiados por modificaciones químicas, mutagénesis y análisis cinéticos. Los aminoácidos que se han considerado como activos por múltiples estudios de mutagénesis sitio dirigida, de alineamiento de secuencias y conservación de los mismos están ubicados ya sea en las hebras β (cerca de los extremos C-terminal) o en los loops que unen el extremo C-terminal de las hebras β al extremo N-terminal de la α -hélice adyacente. Los residuos que se encuentran en los loops son capaces de un gran movimiento conforme se une el sustrato. Dichos aminoácidos son el Asp 206, Asp 297 y Glu 230, usando la numeración de la α -amilasa de *A. oryzae*, aunque aún no se ha logrado establecer con certeza cuáles de estos tres residuos ácidos son los dos catalíticos (Ramírez, 1994).

IV.2.3. Mecanismo de acción.

Las α -amilasas son enzimas hidrolíticas específicas para los enlaces glicosídicos α 1 \rightarrow 4 que retienen la configuración en sus productos, es decir, que los productos generados por la enzima tienen una configuración anomérica α .

Como ya se mencionó, el mecanismo propuesto para este tipo de enzimas que retienen la configuración, es un mecanismo de doble desplazamiento en el cual se presenta la protonación inicial del oxígeno glicosídico por uno de los residuos catalíticos, y un ataque nucleofílico al sustrato por parte del otro residuo catalítico que resulta en la formación de un intermediario glicosil-enzima, aunque no se sabe aún con certeza si este intermediario es de carácter covalente o se trata de un intermediario ión carboxonio. El segundo ataque nucleofílico se presenta con el ataque de una molécula de agua hacia este intermediario con la subsecuente liberación del producto con la misma configuración α del sustrato (Davies y Henrissat, 1995).

IV.2.4. Patrón de hidrólisis.

El patrón de acción de una α -amilasa está definido a partir de los productos mayoritarios generados durante la hidrólisis del almidón y es característico de cada α -amilasa y de las condiciones experimentales bajo las cuales se lleva a cabo la reacción. Existen diferentes modelos o mecanismos usados para explicar el patrón de hidrólisis de las amilasas. Estos modelos son:

- el ataque al azar: en donde la amilasa se une al sustrato al azar, rompe un enlace y ambos fragmentos son disociados de la enzima, para después atacar otra molécula de sustrato;
- el ataque preferencial: en donde la enzima exhibe una preferencia por hidrolizar ciertos enlaces en posiciones específicas en el sustrato; y
- el ataque múltiple o repetitivo: en donde la enzima hidroliza al sustrato al azar liberando solo un fragmento, mientras que el otro es atacado nuevamente en una o más ocasiones antes de que se disocie por completo el intermediario glicosil-enzima.

La enzima puede pasar de un mecanismo a otro dependiendo de las condiciones experimentales. Puede también utilizar una combinación de estos mecanismos, en donde la contribución de cada mecanismo al patrón de acción total depende de la estructura y largo de la cadena del sustrato. Se ha observado que en la hidrólisis de polímeros grandes el ataque inicial parece ser al azar, mientras que en sustratos de cadena corta el ataque se vuelve altamente específico (Fogarty, 1983).

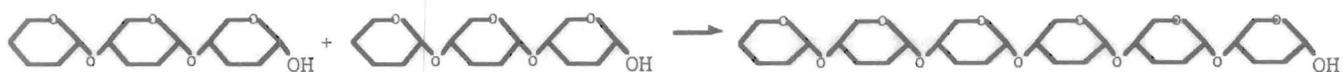
IV.2.5. Reacciones llevadas a cabo por la α -amilasa.

Bajo ciertas condiciones, las α -amilasas no sólo pueden llevar a cabo la reacción simple de hidrólisis unimolecular, sino que también pueden realizar procesos en los que se utiliza más de una molécula de sustrato, como es el caso de la condensación y la transglicosidación.

En la hidrólisis simple se rompe el enlace glicosídico del sustrato formándose dos productos:



En la condensación dos sustratos se polimerizan para formar un nuevo enlace glicosídico:



En la transglicosidación, después del rompimiento del enlace glicosídico del sustrato y la formación del intermediario enzima-glicosil, el grupo glicosilo es transferido a otra molécula de sustrato aceptora; este proceso es similar a la hidrólisis con la diferencia de que no es una molécula de agua la aceptora del grupo glicosilo sino otra molécula de sustrato:



Estos mecanismos alternos dependen de la concentración de sustrato y del largo de la cadena del mismo. Sustratos de cadena pequeña tienen mayor oportunidad de formar un complejo no productivo y por lo tanto se favorecen cualquiera de estos dos procesos alternos. Por otra parte, una concentración alta de sustrato aumenta la probabilidad de una interacción con una segunda molécula de sustrato. Ambos factores contribuyen a una competencia entre estas reacciones alternas y el proceso de hidrólisis (Wong, 1995).

IV.2.6. α -amilasa en reacciones de alcoholólisis.

La α -amilasa es una enzima muy utilizada a nivel industrial para la hidrólisis de almidón, la producción de jarabes ricos en maltosa, como aditivo en cervecería y en panadería. Se trata de una de las enzimas de mayor producción a nivel mundial, con un mercado para más de 300 toneladas anuales, producción superada solo por la producción de proteasas bacterianas y la amiloglucosidasa o glucoamilasa (Bárzana y López-Munguía, 1993). Esta alta disponibilidad de la enzima la hace una muy buena opción para catalizar reacciones de alcoholólisis, además de la alta disponibilidad y bajo costo del sustrato (almidón).

Por otro lado, uno de los objetivos primordiales en la biotecnología enzimática a la fecha es la búsqueda de nuevas aplicaciones para las enzimas ya existentes adaptándolas a nuevas condiciones de proceso, ya sea por ingeniería de proteínas o por ingeniería de solventes. Por lo tanto, el estudio de la α -amilasa en reacciones de alcoholólisis está justificado no solo por el hecho de poder llevar a la obtención de alquil-glicósidos, productos con un alto valor agregado, sino también porque constituye una nueva aplicación de esta enzima en la síntesis orgánica.

El hecho de que la α -amilasa tenga un mecanismo de retención de la configuración es otro antecedente adecuado en la selección de esta enzima para reacciones de alcoholólisis ya que se tiene reportado que las enzimas con este tipo de mecanismo son capaces de transferir el residuo glicosilo a aceptores diferentes al agua (Sinnot, 1990), como es el caso de la β -xilosidasa, β -galactosidasa y la β -glucosidasa, enzimas para las que, como ya se mencionó, se ha reportado un buen rendimiento en reacciones de alcoholólisis. Por otro lado, no se tiene reportado que la enzima sea capaz de hidrolizar sus productos de alcoholólisis, como es el caso de la invertasa y la β -galactosidasa.

Matsubara (1961), reporta que la α -amilasa de *Aspergillus oryzae* cataliza la transferencia de la maltosa de fenil- o p-nitrofenil- α -maltósido a metanol, etanol o n-butanol resultando en la formación del correspondiente alquil- α -maltósido en diferentes proporciones dependiendo del alcohol utilizado y del tiempo de reacción. Por otro lado, Graber y Combes (1990) reportan la transferencia de unidades de glucosa de maltotetraosa a polioles como el sorbitol utilizando igualmente la α -amilasa de *A. oryzae*; sin embargo, mencionan que la presencia del polirol modifica el patrón de hidrólisis de la enzima favoreciendo la formación de productos de bajo grado de polimerización en comparación con los productos formados en solución acuosa. A pesar de estos antecedentes, no existen reportes de estudios

más detallados de la síntesis de alquil-glicósidos con α -amilasa de ningún origen, por lo cual resulta muy interesante el estudio de esta enzima en reacciones de alcoholólisis.

IV.3. Glucoamilasa.

Como se describe más adelante, la glucoamilasa fue empleada en el curso de este proyecto con el fin de cuantificar los productos de alcoholólisis generados por la α -amilasa, ya que esta enzima es capaz de hidrolizar tanto a los productos de hidrólisis como a los de alcoholólisis obtenidos de la reacción con α -amilasa hasta glucosa y metil-glicósido respectivamente, y éste último puede ser cuantificado vía HPLC.

La glucoamilasa es una exo-enzima que cataliza la hidrólisis de los enlaces glicosídicos α 1 \rightarrow 4, aunque también puede hidrolizar los enlaces α 1 \rightarrow 6, pero a una velocidad mucho menor, removiendo unidades de glucosa sucesivamente del extremo no reductor del sustrato y produciendo exclusivamente glucosa en su configuración β . Además, la velocidad de hidrólisis se incrementa con el largo de la cadena del sustrato (Wong, 1995). El mecanismo de acción de esta enzima es de inversión de la configuración (Sinnot, 1990), por lo que en principio no debe de realizar alcoholólisis. La glucoamilasa tiene un pH óptimo entre 4.0 y 4.4, con estabilidad en un rango de pH de 3.5 a 5.5. La temperatura a la cual es estable es entre 40 y 65°C con un rango óptimo de 58 a 65°C en la hidrólisis del almidón. Esta enzima es una glicoproteína que contiene de 5 a 20% de carbohidratos, principalmente manosa, glucosa, galactosa y glucosamina. El peso molecular varía dependiendo de la fuente de la enzima y muchas existen en formas múltiples (Wong, 1995).

Se sabe que la glucoamilasa, además de las reacciones de hidrólisis, es capaz de llevar a cabo reacciones de síntesis por hidrólisis inversa o condensación. Para ello se requiere D-glucosa como sustrato en altas concentraciones o en sistemas agua-solvente orgánico, con este último a altas concentraciones, produciendo maltosa e isomaltosa principalmente. También pueden producirse otros oligosacáridos mayores de hasta 4 residuos de glucosa (Rastall et al. 1991; Laroute y Willemot, 1989; Adachi et al. 1984). De igual forma, se ha observado su capacidad de sintetizar alquil-glicósido en este mismo tipo de reacciones de condensación utilizando glucosa como sustrato en sistemas alcohol-agua

(Laroute y Willemot, 1992). Sin embargo no se conocen datos en los que se reporte que la glucoamilasa sea capaz de realizar reacciones de alcoholisis utilizando otros sustratos como almidón o maltodextrinas.

Sinnot (1990), menciona la incapacidad de las enzimas que invierten la configuración de sus productos para transferir residuos glicosilo a alcoholes de bajo peso molecular debido a que si este tipo de actividad de transferasa fuera posible con estas enzimas sería no específica y por tanto tendrían que ser indiscriminadas anoméricamente, es decir que habría un reconocimiento indiscriminado por la configuración del sustrato, pudiendo hidrolizar en el caso de la glucoamilasa tanto almidón como celulosa.

V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

En términos generales, las etapas que se cubrieron en el desarrollo de este proyecto, tuvieron como estrategia el estudiar o cubrir las siguientes etapas:

- a) Reacciones de alcoholólisis con metanol y almidón utilizando diferentes α -amilasas en las condiciones de reacción favorables para cada enzima.
- b) Selección de la enzima con base en el rendimiento de alcoholólisis.
- c) Caracterización cinética de la enzima seleccionada.
- d) Efecto del metanol en la estabilidad y actividad de la enzima seleccionada.
- e) Selección de la concentración de sustratos adecuada para la alcoholólisis.
- f) Establecimiento de un método de cuantificación de los productos de alcoholólisis.
- g) Selección del sustrato más adecuado para la alcoholólisis.

VI. MATERIALES Y METODOS

VI.1. Materiales.

- Enzimas
 - α -amilasa de *Aspergillus niger* de Genencor, sólida, grado industrial, designada E1
 - α -amilasa de *Aspergillus niger* de Enzyme Biosystems, sólida, grado industrial, E2
 - α -amilasa de *Bacillus licheniformis* de Biotecsa, Termamyl 120L, líquida, grado industrial, E3
 - α -amilasa obtenida de una cepa de *Bacillus stearothermophilus*, líquida, E4
 - glucoamilasa liofilizada de *Aspergillus niger* de Lakeside-Boheringer, sólida, pureza 99%, GA1
 - glucoamilasa de *Aspergillus niger* de Enmex, Diazyme polvo, sólida, grado industrial, GA2
- Solución amortiguadora de acetato de sodio 0.1M pH 4, 5.5 y 6, y solución cloruro de calcio 0.5 M
- Almidón soluble, maltodextrinas (con oligosacáridos de 4 hasta 10 unidades de glucosa), maltosa, metil-glucósido y glucosa de Sigma
- Metanol grado reactivo de Fisher
- Maltodextrinas tipo 125 DE 25
- Solución etanol:butanol:agua 5:3:2
- Acetonitrilo grado HPLC
- solución alcohólica de α -naftol y ácido sulfúrico
- Solución de acrilamida 30%T y 2.7%C Bis. 29.2 g de acrilamida de Bio-Rad y 0.8 g de Bis y aforar a 100 mL
- Solución amortiguadora separadora 1.5M Tris-Cl pH 8.8. 18.15 g de Tris, ajustar a pH 8.8 con HCl y aforar a 100 mL
- Solución amortiguadora concentradora 0.5M Tris-Cl pH 6.8. 3 g de Tris, ajustar a pH 6.8 con HCl y aforar a 50 mL
- Solución SDS 10%
- Solución iniciadora, persulfato de amonio 10%
- Solución amortiguadora 2X para tratamiento de muestras 0.125M Tris-Cl pH 6.8, 4% SDS, 20% glicerol, 10% 2-mercaptoetanol y 0.005% azul de bromofenol

- Solución amortiguadora de corrida 0.025M Tris pH 8.3, 0.192 M glicina y 0.1% SDS. 12 g de Tris, 57.6 g de glicina, 4 mL de solución SDS 10% y aforar a 4 L
- Solución de tñido. 62.5 mL de una solución stock de azul de Coomassie R-250 al 1%, 250 mL de metanol, 50 mL de ácido acético y 500 mL de agua
- Solución de desteñido I. 50% metanol, 10% ácido acético aforado con agua
- Solución de desteñido II. 7% ácido acético, 5% metanol aforado con agua
- Solución de para reactivar las proteínas en el gel de acrilamida: acetato de sodio 0.1 M pH4, CaCl₂ 0.05 g/L y Tritón X100 0.1%
- Solución de yoduro, lugol:agua 1:20

Las condiciones de reacción se cambiaron dependiendo de la enzima y de la fuente de la misma de acuerdo a los antecedentes encontrados en la literatura. Las condiciones óptimas para las α -amilasas están bien estudiadas y reportadas. Para las amilasas fungales se tienen reportados rangos de pH y temperatura óptimos de 3.5 a 5.5 y de 40°C a 65°C respectivamente; de la α -amilasa de *B. licheniformis* se reportan rangos de pH óptimo de 5.0 a 8.0 y de temperatura óptima de 70°C a 90°C (Fogarty, 1983); en cuanto a las condiciones para la enzima de *B. stearothermophilus* se tienen reportadas condiciones óptimas de pH 5.5 y 70°C (Vihinen y Mäntsälä, 1990). Dados estos antecedentes, se trabajó con las α -amilasas fungales a 60°C y con un pH de 4.0, a la enzima de *B. licheniformis* a 60°C y pH 6 y a la enzima de *B. stearothermophilus* a pH 5.5 y 70°C. En cuanto a las glucoamilasas, éstas en general tiene rangos de pH y temperatura óptimos de 4.5-5.0 y de 40°C a 60°C respectivamente. Las enzimas utilizadas durante este trabajo se usaron a un pH de 4 y a 40°C ó 60°C.

La solución de CaCl₂ se utilizó en las reacciones con las amilasas bacilares. Tanto en las reacciones de medición de actividad como en las reacciones de alcoholisis se empleó esta solución de tal manera que en la mezcla de reacción de la amilasa bacilar E3 se tuviera CaCl₂ a una concentración final de 31.2 mM y en el caso de la bacilar E4 una concentración final de 10 mM.

VI.2. Técnicas Analíticas.

VI.2.1. Determinación de actividad enzimática.

La actividad enzimática, tanto de las amilasas como de las glucoamilasas, se determinó midiendo los azúcares reductores liberados por unidad de tiempo durante la reacción de hidrólisis de almidón por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).

El método de DNS se basa en la reducción del ácido 3,5-dinitrosalicílico a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico por el grupo carbonilo libre de los azúcares reductores. El complejo formado es medido espectrofotométricamente a 540 nm, siendo la densidad óptica proporcional a la concentración de azúcares reductores (Miller, 1959).

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen total de 10.5 mL con una solución de almidón soluble a una concentración final de 1.2% p/v y una solución enzimática a una concentración final de 0.03 mg proteína/mL para la amilasa fungal E1, 0.015 mg proteína/mL para la amilasa fungal E2, 0.0015 mg proteína/mL para la amilasa bacteriana E3 y 0.002 mg proteína/mL para la amilasa bacteriana E4, en las condiciones especificadas para cada enzima. Se tomaron muestras los primeros 10 minutos de reacción para obtener la velocidad inicial de reacción. Para medir la actividad de las glucoamilasas se procedió de manera similar, a la misma concentración de almidón (1.2% p/v) pero con una concentración final de enzima de 0.036 mg proteína/mL.

La solución de almidón para medir actividad se preparó de la siguiente forma:

1.25 g de almidón soluble disueltos en 20 mL de agua destilada se adicionaron a 70 mL de agua destilada en ebullición con agitación constante para evitar la formación de grumos. Se mantuvo en ebullición durante 3 minutos, y cuando la solución se enfrió a temperatura ambiente se aforó a 100 mL con agua destilada.

Esta solución se degrada fácilmente por retrogradación así que se preparó cada vez que se hicieron determinaciones de actividad.

Una unidad de actividad se definió como la cantidad de enzima capaz de liberar un μmol de azúcar reductor, medido como equivalentes de glucosa, en un minuto.

En la tabla 2 se muestran las actividades medidas con este método.

Tabla 2. Actividades enzimáticas de las α -amilasas comerciales medidas por el método de DNS.

enzima α -amilasa	actividad (UI/mg proteína) ^a
<i>A. niger</i> E1 ^b	161
<i>A. niger</i> E2	136
<i>B. licheniformis</i> E3 ^c	3602
<i>B. stearothermophilus</i> E4 ^d	248

^a actividad medida utilizando como sustrato 1.2% p/v de almidón

^b condiciones utilizadas para enzimas E1 y E2 pH 4 a 60°C

^c utilizando pH 6 a 60°C como condiciones de reacción

^d utilizando pH 5.5 y 70°C como condiciones de reacción

VI.2.2. Análisis de productos de reacción.

La identificación de los productos de alcoholisis se hizo por Cromatografía en Capa Fina, TLC, y por Cromatografía Líquida de Alta Presión, HPLC. Para el primer caso se usaron placas para TLC de Whatman de silica gel de 60A°, con medidas de 10×10 cm y 200 μm de espesor. Se aplicó 1 μL de muestra de reacción o de solución estándar. Se empleó una mezcla butanol:etanol:agua en proporciones 3:5:2 como fase móvil y el revelado se realizó con una solución alcohólica de α -naftol y ácido sulfúrico (Fried y Sherma, 1986) y calentando a 100°C. Se utilizaron como estándares una solución de maltodextrinas 3% (tabla 3) y una solución de metil-glucósido 0.6%.

Tabla 3. Composición de maltodextrinas tipo 125 D.E. 25 utilizadas como estándar para la identificación de productos de reacción, Rfs de TLC y tiempos de retención de HPLC de cada una de ellas.

oligosacárido	porcentaje en la solución	Rf	tiempo retención ^a
glucosa (G1)	0.5%	0.59	3.7
maltosa (G2)	4.0%	0.52	5.45
maltotriosa (G3)	29.4%	0.41	7.77
maltotetraosa (G4)	8.55%	0.31	11.41
maltopentosa (G5)	13.4%	0.22	16.76
maltohexosa (G6)	12.5%	0.18	24.02
maltoheptosa (G7)	5.6%	0.13	-
maltooctosa (G8)	1.4%	-	-
oligosacáridos mayores	24.65%	-	-

^a tiempos obtenidos utilizando una columna para carbohidratos aminada

Con el método de análisis TLC se lograron identificar solo dos de los productos de alcoholisis, el metil-maltósido y el metil-glucósido, con Rf's de 0.69 y 0.74 respectivamente, aunque no se descartaba la existencia de otros productos de reacción.

Para el análisis con HPLC se utilizó un cromatógrafo Waters-Millipore con detector de índice de refracción Waters 410 y un inyector automático Waters 717. Las muestras fueron filtradas previamente al análisis, el cual se llevó a cabo en una columna para carbohidratos Nova-Pak® aminada de 4.6mm×250mm utilizando como fase móvil una mezcla de acetonitrilo:agua 70:30 eluida a un flujo de 1.4 mL/min. Mediante esta técnica fue posible diferenciar entre productos de alcoholisis de aquellos productos de hidrólisis de bajo peso molecular, de hasta 6 unidades de glucosa.

VI.2.3. Gel de electroforesis y de acoplamiento.

Para conocer el grado de pureza de la glucoamilasa GA1 y de la α -amilasa con la que se estaba trabajando se llevaron a cabo geles de electroforesis y de acoplamiento. Las preparaciones enzimáticas de glucoamilasa GA1 y α -amilasa E1 se analizaron por electroforesis. Se preparó un gel de acrilamida al 10% mezclando las soluciones siguientes:

gel superior 0.67 ml de solución de acrilamida
 1.25 ml de solución amortiguadora stacking pH 6.8
 50 μ l de SDS 10%
 3 ml de agua
 25 μ l de solución iniciadora
 5 μ l de TEMED

gel inferior 3.33 ml de solución de acrilamida
 2.5 ml de solución amortiguadora separating pH 8.8
 100 μ l de SDS 10%
 3.96 ml de agua
 100 μ l de solución iniciadora
 10 μ l de TEMED

El gel de acoplamiento para medir actividad se preparó con una solución 0.8% p/v de agarosa y 2% p/v de almidón.

VI.3. Sistema de reacción para la alcoholólisis.

Se realizaron reacciones de alcoholólisis con tres diferentes sustratos: almidón, almidón previamente hidrolizado y maltodextrinas. En el caso en que se utilizó almidón como sustrato, el sistema se preparó de la siguiente manera:

Se colocó el almidón en reactores enchaquetados de 20 mL con la solución amortiguadora al pH adecuado para cada enzima, estas soluciones se esterilizaron a 121°C y 15 lb/in² durante 15 minutos para gelatinizar al almidón. Posteriormente se adicionó el metanol y se iniciaron las reacciones al agregar la solución enzimática de forma tal que el volumen total de reacción se mantuviera en 10 mL. Las reacciones se siguieron durante 5 a 24 horas manteniendo la temperatura constante adecuada para cada enzima. Se tomaron 0.5 mL de mezcla de reacción cada determinado tiempo y se desactivaron durante 10 minutos a temperatura de ebullición para su posterior análisis en TLC.

En estas reacciones se utilizó la cantidad de enzima adecuada para asegurar que se llegara al patrón de corte específico (cuando los productos de reacción no cambian con tiempos largos de reacción), sin importar que la actividad volumétrica fuera diferente.

En las reacciones en que se utilizó almidón hidrolizado para la alcoholólisis el sistema se preparó de la forma ya mencionada, solo que se agregó la solución enzimática antes de añadir el metanol, y se dejó reaccionar durante 10 minutos, después de lo cual se adicionó el metanol para iniciar la reacción de alcoholólisis. Las muestras de reacción igualmente fueron desactivadas a temperatura de ebullición por 10 minutos para su posterior análisis por TLC y HPLC.

Cuando se utilizaron maltodextrinas como sustrato sólo se preparó la solución a la concentración requerida y se llevó a cabo la reacción en un volumen total de 0.5 mL. Se tomaron 25 µL de muestra y se desactivaron a temperatura de ebullición para su posterior análisis por TLC y HPLC. Las maltodextrinas utilizadas en estas reacciones son un producto de Sigma que contiene oligosacáridos desde maltotetraosa (G4) hasta maltodecaosa (G10).

VI.4. Selección de la α -amilasa.

Se llevaron a cabo reacciones de alcoholólisis con las diferentes α -amilasas empleando almidón al 1.2% p/v, metanol al 20% v/v y actividades de 4.8 U/mL para la amilasa E1, 2 U/mL para la amilasa E2, 5.4 U/mL para la amilasa E3 y 0.5 U/mL para la amilasa E4. La reacción se siguió durante 5 horas. Posteriormente se analizaron las muestras por TLC.

VI.5. Reacciones de transglicosidación.

Se llevaron a cabo reacciones de transglicosidación con las cuatro α -amilasas disponibles utilizando maltosa 80 mM como sustrato y con 10.08 U/mL de amilasa E1, 2 U/mL de amilasa E2, 5.4 U/mL de amilasa E3 y 0.5 U/mL de amilasa E4. Las reacciones se siguieron durante 5 horas bajo las condiciones de pH y temperatura adecuadas para cada enzima, a excepción de la reacción con amilasa E4 que se hizo a pH6 y 60°C. El análisis de las muestras de reacción se realizó por TLC.

VI.6. Obtención de la constante de Michaelis-Menten de la amilasa seleccionada.

Para la caracterización de la enzima seleccionada se construyó una gráfica de Michaelis-Menten y con los datos se obtuvo la representación de Lineweaver-Burk utilizando almidón como sustrato y con 4.8 U/ml de enzima en el volumen total de reacción a pH 4 y 60°C. Se utilizaron concentraciones de almidón desde 0.2% hasta 6% p/v y se midió la velocidad inicial de hidrólisis durante los primeros 10 minutos de todas las reacciones.

VI.7. Efecto del metanol en la estabilidad y velocidad inicial de la α -amilasa.

La estabilidad de la enzima se midió incubándola en solución amortiguadora a 60°C con diferentes concentraciones de metanol, 0, 20% y 40% v/v y determinando la actividad enzimática cada determinado tiempo durante 5 horas con el método de DNS. Se utilizó como sustrato almidón 1.2% p/v y una actividad volumétrica de 4.8 U/mL.

Para determinar el efecto del metanol en la velocidad inicial de la enzima se midió la cantidad de azúcares reductores liberados con el reactivo DNS durante los primeros 10 minutos de reacción con concentraciones de metanol de 0, 10, 20, 30 y 40% v/v, utilizando almidón al 1.2% p/v, 4.8 U/mL de enzima, a pH 4 y 60°C.

VI.8. Efecto de la presencia de metanol en la conversión a largo plazo de la α -amilasa.

El efecto de la presencia de metanol en la conversión a largo plazo de la amilasa se realizó utilizando 15% p/v de almidón, con 201.6 U/ml de enzima a 60°C y pH 4 y con concentraciones de metanol de 0, 10, 20, 30 y 40% v/v. Se determinó la cantidad de azúcares reductores liberados después de 5 horas de reacción por el método de DNS.

VI.9. Reacción de hidrólisis de butil-glucósido con α -amilasa.

Con la α -amilasa seleccionada se llevó a cabo una prueba de hidrólisis de butil-glucósido para comprobar si la enzima es capaz de hidrolizar los productos que pueden formarse en la reacción de alcoholisis. La reacción se realizó utilizando como sustrato butil- α -glucósido al 1% p/v y una actividad volumétrica de 4.8 U/mL y se siguió durante 5 horas. Las muestras se analizaron con el reactivo DNS para verificar la producción de glucosa libre.

VI.10. Efecto de la concentración de almidón en la reacción de alcoholisis.

Una vez seleccionada la α -amilasa más adecuada para la reacción de alcoholisis, se probaron 3 concentraciones de almidón 2.5, 6 y 15% p/v, manteniendo constante la concentración de metanol en 20% v/v y con actividades volumétricas de 4.8 U/mL, 10.08 U/mL y 201.6 U/mL respectivamente. Las reacciones se siguieron durante 5 y 24 horas y las muestras se analizaron por TLC.

VI.11. Efecto de la concentración de metanol en la reacción de alcoholólisis.

Con la α -amilasa seleccionada se hicieron reacciones variando la concentración de metanol desde 20% hasta 50% v/v, utilizando una concentración de almidón del 3% p/v y una actividad volumétrica de 10.08 U/mL. Las muestras de reacción se analizaron por TLC.

VI.12. Método de cuantificación de los productos de alcoholólisis.

La cuantificación de los productos de alcoholólisis se llevó a cabo enzimáticamente. Teniendo en cuenta el antecedente reportado por Nishimura y col. (1994) en donde para la cuantificación y purificación de oligoglicósidos de hidroquinona se utiliza glucoamilasa que hidroliza estos productos a glucósidos de hidroquinona. Este mismo método se utilizó para la cuantificación de los productos de alcoholólisis obtenidos en este trabajo, no sin antes realizar reacciones de control para comprobar que la glucoamilasa no es capaz de realizar alcoholólisis.

VI.12.1. Glucoamilasa en reacciones de alcoholólisis.

Se llevaron a cabo reacciones de alcoholólisis con las dos glucoamilasas, GA1 y GA2. El sistema de reacción consistió en una solución de almidón, preparada de la misma forma que en la reacción de alcoholólisis para α -amilasa, o una solución de maltosa, con concentraciones de 2.5 ó 6% p/v de sustrato y 40% v/v de metanol, a pH 4, 40° ó 60°C, en un volumen total de 10 mL y con una actividad volumétrica de 42 U/ml. El análisis de estas reacciones se realizó por TLC.

Se realizó también una reacción de alcoholólisis con la glucoamilasa GA1 utilizando almidón al 6% p/v y metanol al 30% v/v, a pH 4 y 60°C, en un volumen total de 10 mL, pero con una actividad volumétrica de 2.19 U/mL para disminuir la velocidad de reacción. El análisis de esta reacción se realizó igualmente por TLC.

VI.12.2. Glucoamilasa en reacciones de condensación.

Se realizaron reacciones de condensación con la glucoamilasa GA1 utilizando como sustratos 1% p/v de metil-glucósido, 1% p/v de glucosa ó maltosa y 30%v/v de metanol en el volumen total de reacción (10 mL), a pH 4, 60°C y con una actividad volumétrica de 42 U/mL. Las muestras de reacción se analizaron por TLC.

VI.12.3. Glucoamilasa en reacción de hidrólisis de metil-glucósido.

Se llevó a cabo una reacción con glucoamilasa GA1 en la hidrólisis del metil-glucósido para comprobar si la enzima puede hidrolizar este sustrato. La reacción se llevó a cabo con 6% p/v de metil-glucósido a pH 4, 60°C, con una actividad volumétrica de 42 U/mL y se analizó por TLC.

VI.12.4. Gel de electroforesis y de acoplamiento de la glucoamilasa.

La pureza de la glucoamilasa GA1 se analizó en un gel de acrilamida y un gel de acoplamiento.

La solución enzimática se preparó agregando a un volumen de solución enzimática GA1 al 0.5% un volumen igual de solución amortiguadora 2X para tratamiento de muestras y se mantuvo a temperatura de ebullición durante 10 minutos. Este mismo tratamiento se le dió a una solución de α -amilasa de *A. niger* E1 al 0.5%. Después de colocar las muestras en el gel, éste se corrió a un voltaje constante de 20 mA. El gel entonces se dividió en dos partes, una para hacer el gel de acoplamiento y otra para teñir y ver las proteínas. El teñido del gel se hizo con la solución azul de Coomassie durante 1 hr y después se destiñó con las solución I y II con agitación constante.

Dado que el gel de acrilamida se llevó a cabo en condiciones desnaturalizantes, se realizaron dos lavados de éste con una solución amortiguadora de Tritón X100, CaCl₂ y acetato de sodio durante 20 minutos en baño de hielo y con agitación, con el fin de reactivar las proteínas presentes en el gel.

Posteriormente se observó la actividad de las proteínas reactivadas al realizar un acoplamiento del gel de acrilamida con un gel de almidón, incubados durante 24 horas a 37°C. Después del tiempo de incubación, el gel de almidón se separó y se tiñó con una solución de yoduro.

VI.13. Cuantificación de los productos de alcoholólisis utilizando glucoamilasa.

La cuantificación de los productos de alcoholólisis se llevó a cabo añadiendo glucoamilasa después de concluida la reacción con α -amilasa. Al término de la reacción de alcoholólisis con α -amilasa a pH 4 y 60°C, se bajó y estabilizó la temperatura a 40°C, se agregó la cantidad de glucoamilasa necesaria para obtener una actividad volumétrica de 42 U/mL y se continuó la reacción por dos horas más, después de las cuales, un análisis por TLC y HPLC demostraron que todos los oligosacáridos son hidrolizados, dando como productos metil-glucósido y glucosa. La cuantificación del metil-glucósido se realizó por HPLC utilizando las condiciones antes mencionadas para el análisis.

Para determinar el porcentaje de alcoholólisis total en la reacción se utilizó la cantidad de metil-glucósido obtenida en la reacción de alcoholólisis, la densidad del metanol, el peso molecular del metanol, el peso molecular del metil-glucósido, y se utilizó un peso molecular aproximado del almidón o de las maltodextrinas según el caso de 3.24×10^8 g/mol y 1638 g/mol respectivamente. En el Apéndice se presenta la manera en que se realizó la cuantificación de la reacción de alcoholólisis.

VI.14. Selección del sustrato más adecuado para la alcoholólisis.

Se llevaron a cabo reacciones de alcoholólisis con la α -amilasa E1 y con diferentes sustratos: almidón, almidón previamente hidrolizado y maltodextrinas de Sigma, utilizando 6% p/v de sustrato, 40% v/v de metanol, 10.08 U/mL de enzima, 60°C y pH 4. Las reacciones se siguieron durante 5 horas. Después del tiempo de reacción de la amilasa se bajó la temperatura a 40°C y se agregó 42 U/mL de glucoamilasa para continuar con la reacción durante 2 horas más. Al término del tiempo de reacción las muestras se analizaron por HPLC.

VII. RESULTADOS Y DISCUSION

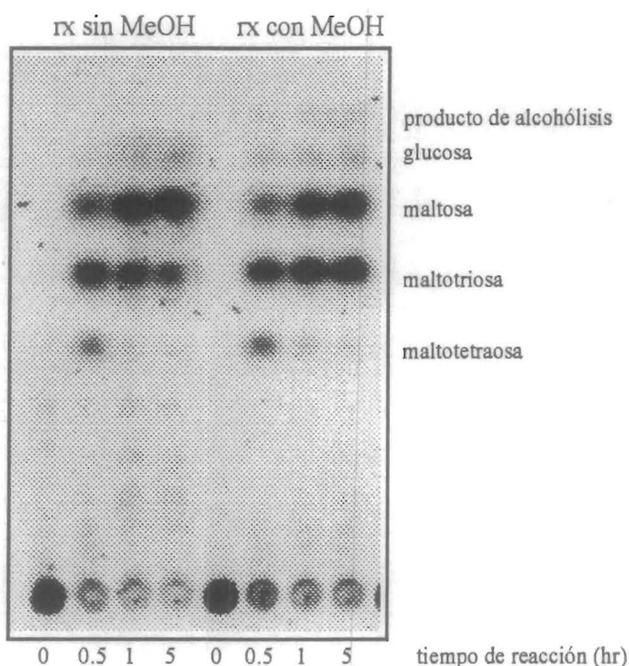
VII.1. Selección de la α -amilasa.

La selección de la α -amilasa más adecuada se realizó con base en la capacidad de la enzima para llevar a cabo la reacción de alcoholólisis, empleando como sustratos almidón al 1.2% p/v y metanol al 20% v/v.

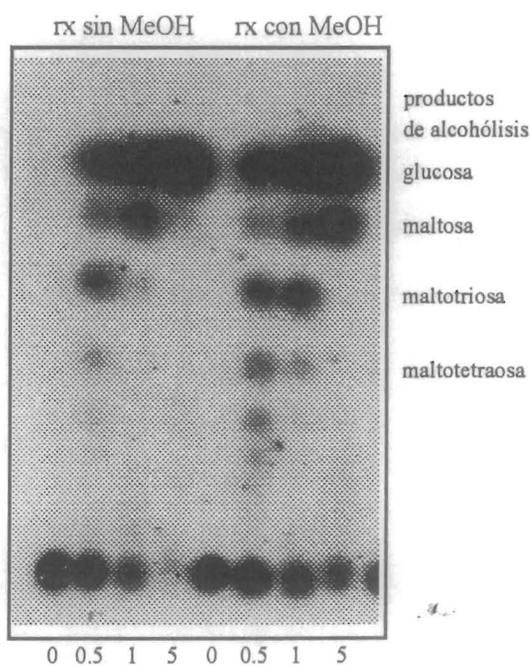
Las pruebas de alcoholólisis se realizaron utilizando metanol como modelo de alcohol aceptor por ser éste el alcohol de menor peso molecular y por ser soluble en agua. En el laboratorio en el que se realizó este trabajo, Rodríguez et al. (1996), estudiando a la invertasa en reacciones de alcoholólisis, encontraron mejores rendimientos de metil-fructósido con 20% v/v de metanol. Con este antecedente, se decidió iniciar las pruebas de alcoholólisis con las cuatro α -amilasas empleando metanol al 20% v/v.

Dado que las enzimas con las que se contaba fueron de diferente origen (dos fungales y dos bacterianas) y grado industrial, el criterio para determinar la cantidad de enzima que permitiera compararlas adecuadamente fue la cantidad necesaria para que en una reacción de hidrólisis analizada por TLC ya no se observaran cambios en el patrón de productos después de una hora de reacción. Los principales productos de hidrólisis así como las cantidades de enzima utilizadas se muestran en la tabla 4.

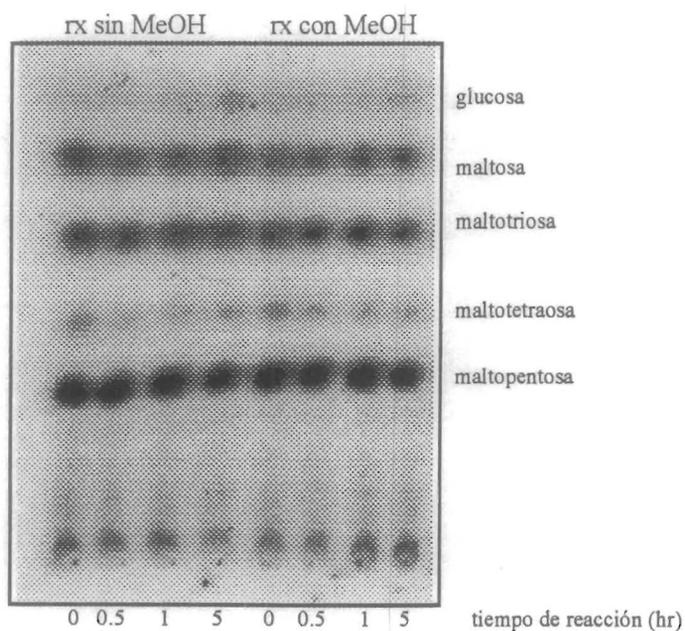
Las reacciones de alcoholólisis se realizaron en las condiciones de pH y temperatura reportadas para cada enzima y fueron analizadas por TLC, con un tiempo de reacción de 5 horas. En todas las reacciones se corrió un control en el que no se añadió metanol para observar la diferencia de los productos generados cuando hay metanol. En la figura 2 se presentan tanto los ensayos de alcoholólisis como los de hidrólisis con cada una de las enzimas.



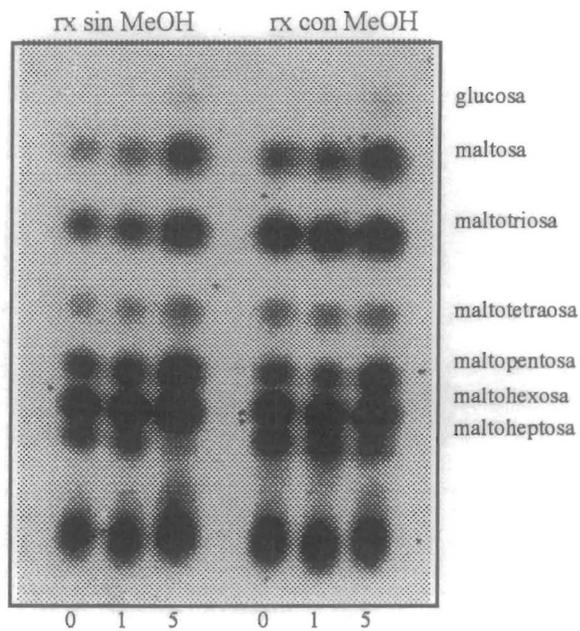
Cromatograma de alcoholisis de la α -amilasa de *A. niger* E1



Cromatograma de alcoholisis de la α -amilasa de *A. niger* E2



Cromatograma de alcoholisis de la α -amilasa de *B. licheniformis* E3



Cromatograma de alcoholisis de la α -amilasa de *B. stearoferophilus* E4

Fig. 2. Reacciones de alcoholisis y de hidrólisis con cuatro α -amilasas disponibles utilizando como sustratos almidón al 1.2% p/v y metanol al 20% v/v.

Tabla 4. Principales productos de la hidrólisis exhaustiva de almidón con las α -amilasas.

α -amilasa	actividad utilizada ^a (UI/mL)	productos de hidrólisis	clasificación de enzima
fungaE1	4.8	G2 y G3 ^b	sacarificante
fungaE2	2	G1	sacarificante
bacteriaE3	5.4	G5 y G3	licuefactante
bacteriaE4	0.5	G6, G5 y G3	licuefactante

^a actividades volumétricas medidas utilizando 1.2% p/v de almidón a las condiciones establecidas para cada enzima.

^b abreviaciones según la tabla 3.

En las reacciones en presencia de metanol con las α -amilasas fungaE1 y E2 se aprecia un producto que no se encuentra en la reacción de hidrólisis que, al parecer, es un producto de alcoholólisis. Por el contrario, en las reacciones con las enzimas de origen bacteriano E3 y E4 los productos de reacción son los mismos con y sin metanol, ya que no se observan diferencias en las cromatoplasmas. Esto indica que no hay reacción de alcoholólisis con las enzimas bacterianas, al menos en las condiciones del ensayo.

Matsubara (1961) reporta la formación de alquil-maltósidos con la α -amilasa de *Aspergillus oryzae*, utilizando p-nitrofenil-maltósido y fenil-maltósido como sustratos. Las enzimas fungales utilizadas en este trabajo son de *A. niger*, enzima con una similitud estructural del 99% con la amilasa de *A. oryzae*, por lo cual no es de sorprender que en el caso de estas enzimas se obtuvieran productos de alcoholólisis.

Por otro lado, todas las α -amilasas llevan a cabo la hidrólisis de su sustrato con un mecanismo de retención de la configuración y de las glicosidasas que se sabe que realizan reacciones de alcoholólisis o tienen este mecanismo de acción, como en el caso de la β -galactosidasa y la β -xilosidasa, o su mecanismo es desconocido, como en el caso de la invertasa. Sinnott (1990) menciona que existen muchas glicosidasas con mecanismo de retención de la configuración que transfieren residuos glicosilo tanto al agua como a otro tipo de moléculas que pueden ser aceptores de dicho grupo, ya sean otras

moléculas de sustrato o alcoholes de bajo peso molecular, como lo es el metanol. Por estos antecedentes, se esperaba que tanto las α -amilasas bacilares como las fungales pudieran llevar a cabo alcoholísis; sin embargo los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que esto no sucede. Para tratar de explicar por qué las amilasas de origen fungal llevan a cabo reacciones de alcoholísis y no así las de origen bacteriano, se realizó un análisis a nivel estructural de las enzimas en colaboración con el grupo de Ingeniería de Proteínas.

Está reportado que la α -amilasa de *Bacillus subtilis* del tipo sacarificante puede tanto hidrolizar como transglicosidar, a diferencia de la enzima del mismo microorganismo pero del tipo licuefactante que solo hidroliza (Suganuma et al. 1996). Como se observa en la tabla 4, de las enzimas con las que se trabajó, las amilasas fungales se clasifican como sacarificantes y las enzimas bacterianas como licuefactantes, por lo cual sería posible establecer una relación entre la capacidad de alcoholísis y la capacidad de transglicosidación de estas enzimas. Si este es el caso, las enzimas fungales además de hidrolizar también deben llevar a cabo reacciones de transglicosidación, mientras que las α -amilasas bacterianas solo deben catalizar la hidrólisis. Para comprobar esta hipótesis se realizaron reacciones de transglicosidación con las cuatro α -amilasas usando maltosa 80mM como sustrato en las condiciones establecidas para cada una de las enzimas y analizando los productos de reacción por TLC. Estos resultados se muestran en la figura 3.

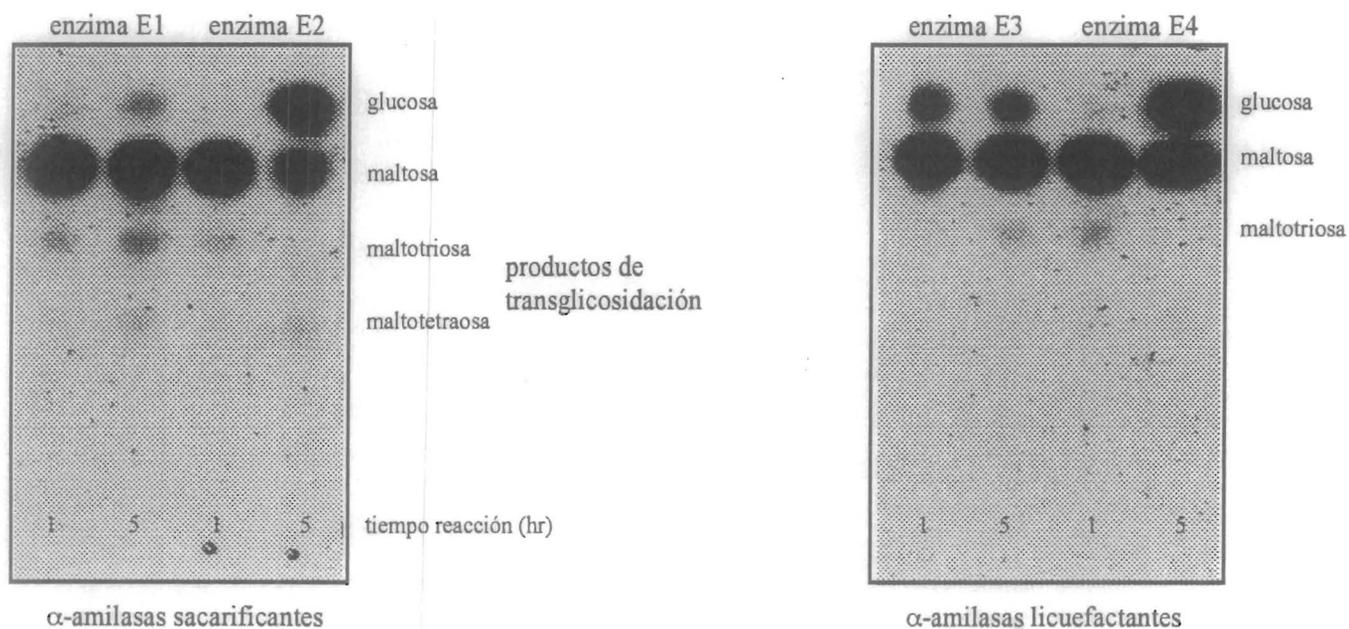


Fig. 3. Cromatoplasmas de reacciones de transglicosidación con las α -amilasas utilizando 80 mM de maltosa en las condiciones establecidas para cada enzima.

Los resultados muestran que las enzimas fungales E1 y E2 producen por transglicosidación oligosacáridos más grandes, maltotriosa y maltotetraosa, a partir de la maltosa. En cambio, las enzimas de origen bacteriano E3 y E4 hidrolizan un poco la maltosa sin producir de manera significativa otros oligosacáridos de mayor peso molecular. Puede entonces concluirse que estas últimas no realizan reacciones de transglicosidación, confirmando así una posible relación entre las capacidades de alcoholólisis y de transglicosidación.

Paralelamente, se realizó un análisis comparativo a nivel estructural entre las amilasas con las que se trabajó, incluyendo también a las ciclodextrin-glucosiltransferasas (CGTasas) y la neopululanasa, todas glicosidasas con capacidad de transglicosidación, tomando como base para la comparación la relación entre la capacidad de transglicosidación y la capacidad de alcoholólisis. Kuriki et al. (1996) proponen un mecanismo para la hidrólisis y la transglicosidación de la neopululanasa similar al mecanismo propuesto para la hidrólisis con α -amilasa. El mecanismo consiste en que el residuo ácido catalítico rompe el enlace glicosídico liberándose el lado reductor del sustrato y formándose un intermediario glicosil-enzima, el cual es atacado por una molécula de agua en el caso de la hidrólisis o bien por otra molécula del sustrato en el caso de la transglicosidación. El mecanismo de transglicosidación se explica como un proceso bi-sustrato en donde dos moléculas de sustrato entran al sitio activo en sucesión rápida. En cambio, en el caso de la hidrólisis, una molécula de agua localizada cerca del enlace glicosídico que debe ser roto ataca al intermediario. Con base a este modelo, Kuriki y col. (1996) predicen que la actividad de transglicosidación se puede incrementar inhibiendo la entrada de la molécula de agua. Kuriki y col. (1996) propusieron tres residuos principales en una posible ruta para la entrada de la molécula de agua atacante, la cual se muestra en la figura 4. Estos residuos son: Met-375, Ser-422 y Tyr-377, este último correspondiente a la Tyr-252 en la α -amilasa de *A. oryzae*. Cambiando el residuo Tyr-377 por Phe, lograron incrementar la actividad de transglicosidación de la enzima al incrementar la hidrofobicidad del camino de entrada de la molécula de agua. Similarmente, lograron el efecto contrario, al disminuir esta actividad cambiando este residuo por otro más polar. La hipótesis propuesta es que al introducir residuos hidrofóbicos en la ruta de entrada de la molécula de agua usada en la hidrólisis del enlace glicosídico, se excluye a la molécula de agua y consecuentemente se incrementa la actividad de transglicosidación.

FIG. 5. A possible mechanism of hydrolysis and transglycosylation by neopullulanase. The progress of α -(1 \rightarrow 4) transglycosylation reaction is shown. *a*, binding of maltotriose to the active center. The attack of the proton of Glu-357 (in un-ionized form) on the glucosidic linkage releases the reducing end glucose (transparent ball and stick). *b*, cleavage of glucosidic linkage and formation of carbonium cation intermediate. The intermediate is stabilized by Asp-328. *c*, incoming of water molecule or another maltotriose molecule into the active cleft. The water and maltotriose come into the cleft from the upper left of the figure. *d*, formation of maltopentaose as the result of the attack of the maltotriose molecule on the intermediate. This completes the α -(1 \rightarrow 4) transglycosylation reaction. If the water molecule attacks the intermediate, the hydrolysis reaction would be completed with formation of maltose. The main chain of neopullulanase is indicated by a yellow tube. The side chain of catalytic residue (E357, Glu-357; D328, Asp-328; D424, Asp-424) are shown by red sticks. The side chains of the target amino acid (Y377, Tyr-377; M375, Met-375; S422, Ser-422) selected for mutagenesis are shown by green sticks. Maltooligosaccharides are illustrated by a ball and stick model where carbons are gray and oxygens are red, respectively. The water molecule is indicated by a blue sphere of 1.4 Å radius. The reducing end of maltooligosaccharides is located in the upper part of the figures.

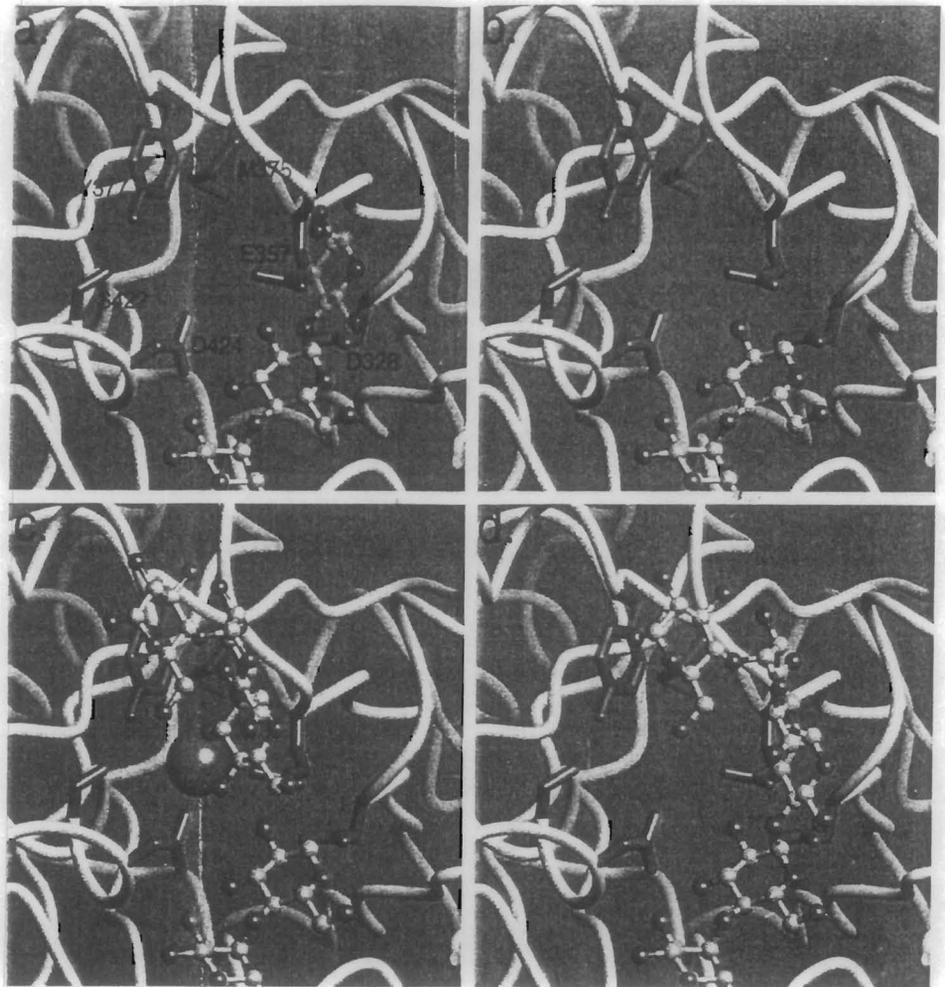


Fig. 4. Ruta propuesta por Kuriki et al. (1996) para la entrada de la molécula de agua necesaria para la hidrólisis del sustrato por la neopululanasa.

Por otro lado, se realizó un alineamiento de α -amilasas y CGTasas de diferentes fuentes, para establecer el carácter del residuo 252, correspondiente al residuo 377 mutado por Kuriki y col. (1996). En la figura 5 se presenta este alineamiento.

swiss ^a	FSSP ^b		
amya_aspor	2taa ^c	RiDtvkhvqkdfwpgynkaa~gvycigEv	lny
amy_aspsh	2taa ^c	RiDtvkhvqkdfwpgynkaa~gvycigEv	lny
amy_bacli	1bpl ^d	RlDavkhiflrdvnhvrekt~emftvaEy	fdv
amy_bacst	1bpl ^e	RlDavkhifpdlsvrsqt~plftvgEy	fda
cdgt_bacst	1cyg ^f	RmDavkhmpfgwqkslmdeidpvftfgEw	ldf
cdgu_bacsi	1cdg ^g	RmDavkhmpfgwqksfmaavnvpvftfgEw	ldf
cdgt_bacsi	1ciuh ^h	RvDavkhmplgwqkswmssiypvftfgEw	ldf
		R D kh	E d
		204-6--9-10	230 251

^aSwiss: Se refiere al nombre que recibe la proteína en la base de datos Swiss-Prot.

^bFSSP: Se refiere al nombre que recibe la proteína en la base de datos del Protein Data Bank.

^c2taa: α -amilasa de *Aspergillus oryzae* (taka-amilasa),

^d1bpl amy_bacsi: α -amilasa de *B. licheniformis*,

^e1bpl amy_bacst: α -amilasa de *B. stearothermophilus*,

^f1cyg: CGTasa de *B. stearothermophilus*,

^g1cdg: CGTasa de *B. circulans*,

^h1ciuh: CGTasa de *B. thermoanaerobacterium*.

Las letras en mayúsculas indican residuos invariantes. Las minúsculas aquellas posiciones que varían en menos del 20% de las secuencias analizadas, siendo éstas 21 en total, aunque aquí solo se muestran las que están en relación a las amilasas con las que se realizó este trabajo. Abajo de los alineamientos se indican el número de la posición correspondiente a la estructura de la taka-amilasa.

Fig. 5. Alineamiento de diferentes α -amilasas y algunas CGTasas.

En el alineamiento se observa que el residuo 252, en el caso de la amilasa de *A. oryzae* es tirosina, en el caso de las CGTasas es fenilalanina, un residuo no polar, y en el caso de las amilasas de *B. licheniformis* y de *B. stearothermophilus* es alanina o valina respectivamente. Las enzimas con mayor capacidad de transglicosidación, como las CGTasas o las amilasas fungales, tienen residuos no polares y/o grandes en esta posición, mientras que las enzimas más hidrolíticas, como las amilasas bacterianas tienen residuos más pequeños apolares. Esto concuerda con lo reportado por Kuriki et al. (1996). Los resultados sugieren que las capacidades de transglicosidación y de alcoholólisis presentes en las enzimas sacarificantes y no así en las enzimas licuefactantes, no están dadas por la afinidad al sustrato o por los residuos involucrados directamente en el sitio activo, sino por los residuos alrededor o cercanos al sitio activo, que facilitan o no la entrada de las moléculas de agua. Para comprobar esto el grupo de Ingeniería de Proteínas del IBT está construyendo una mutante de la amilasa de *B. stearothermophilus*, cuyo gen está disponible, para sustituir a la Ala-252 por Phe. Se espera que la mutante lleve a cabo tanto alcoholólisis como transglicosidación.

Con los resultados de alcoholólisis obtenidos hasta este momento se seleccionó a la amilasa de *A. niger* E1 para continuar con los experimentos dado que los productos de alcoholólisis generados con esta enzima se obtuvieron en mayor cantidad que los producidos con la enzima de *A. niger* E2. Además, la ausencia de matosa y maltotriosa en digestiones llevadas a cabo con la amilasa E2 sugieren que se encuentra contaminada con glucoamilasa, ya que las α -amilasas por ser enzimas hidrolíticas endo, sólo generan productos de hidrólisis que van desde maltohexosa (en el caso de las amilasas licuefactantes), hasta maltosa (en el caso de amilasas sacarificantes o maltogénicas), pero no glucosa como producto principal.

VII.2. Caracterización de la α -amilasa de *A. niger* E1.

VII.2.1. Determinación de la constante de Michaelis-Menten.

Una vez elegida la α -amilasa de *A. niger* E1 como modelo de estudio, para continuar con las reacciones de alcoholisis, se procedió a la caracterización de la misma.

Se realizó un estudio cinético de la amilasa utilizando diferentes concentraciones de almidón, con 4.8 U/mL de enzima a pH 4 y 60°C. Los resultados se presentan en la figura 6, en la que se muestra la representación de Lineweaver-Burk a partir de la cual se obtuvo la constante de Michaelis, k_m y la velocidad máxima, V_{max} .

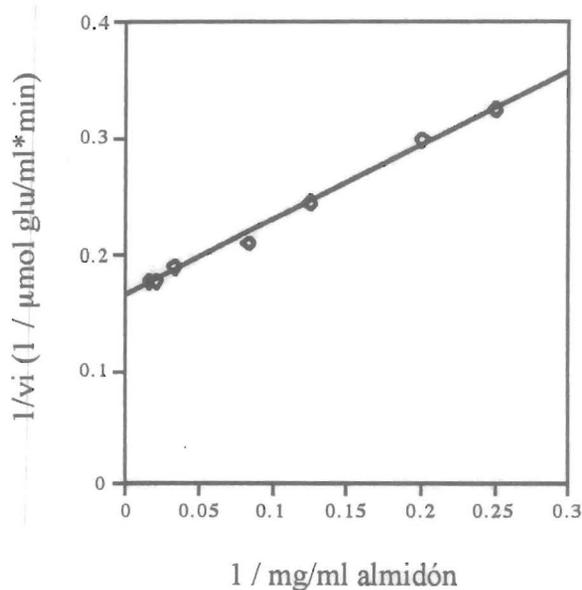


Fig. 6. Representación de Lineweaver-Burk de datos de velocidad inicial de hidrólisis de la α -amilasa de *A. niger* E1 empleando almidón como sustrato, con 4.8 U/mL de enzima, a pH 4 y 60°C.

De la gráfica de Lineweaver-Burk se obtuvieron valores de velocidad máxima, V_{max} , de $6.1 \mu\text{mol glu/mL}\cdot\text{min}$ y una constante de Michaelis-Menten, k_m , de $3.9 \text{ mg almidón/mL}$. En literatura se tiene reportado un K_m de 3.3 mg/mL para la α -amilasa de *A. niger* cuando se utiliza almidón como sustrato (Vihinen y Mäntsälä, 1989), por lo que el valor obtenido en este trabajo es muy similar al reportado.

VII.2.2. Efecto del metanol en la α -amilasa E1.

Se ha reportado que los solventes orgánicos tienen un poder desnaturizante sobre las enzimas debido principalmente al microambiente no acuoso que se genera (Ulbrich-Hofmann y Selisko, 1993). Por otro lado, es importante conocer la estabilidad de una enzima en presencia de los solventes si se quiere utilizar racionalmente en este tipo de medios. Por este motivo se decidió realizar un estudio sobre la estabilidad de la α -amilasa E1 en presencia de metanol, almacenando la enzima a 20 y 40% v/v de metanol a 60°C , y analizando la evolución de la actividad. Los resultados se muestran en la figura 7.

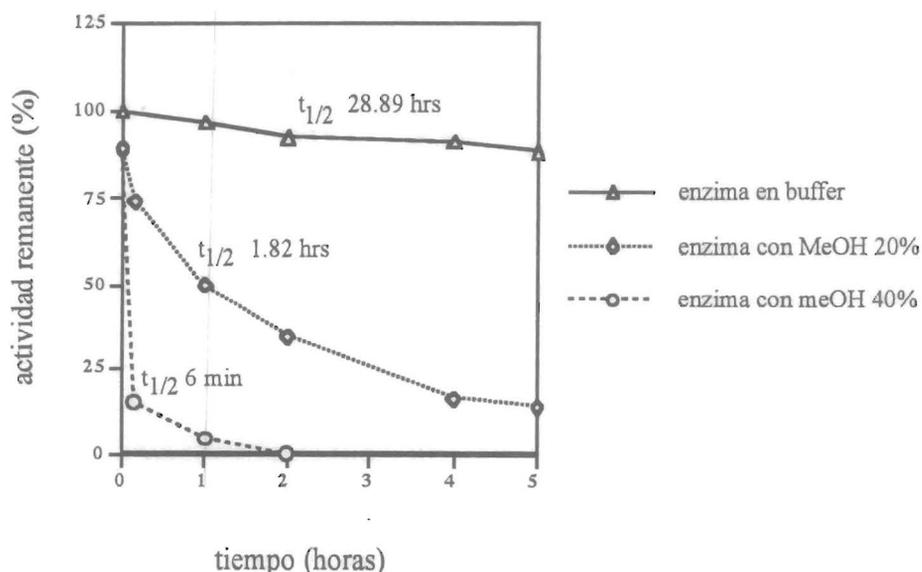


Fig. 7. Efecto de la concentración de metanol en la estabilidad de la α -amilasa de *A. niger* E1 incubada a pH 4 y 60°C .

Aplicando a los datos un modelo de primer orden de cinética de desactivación se obtuvo la constante de desactivación de la reacción sin metanol y con 20% v/v de metanol. En estos casos se obtuvo el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) utilizando la ecuación:

$$k = \frac{\ln 2}{t_{1/2}}$$

donde k es la constante de desactivación de primer orden y corresponde a la pendiente de graficar el logaritmo natural de actividad contra el tiempo.

En el caso de la reacción con 40% v/v de metanol, por ser tan rápida la velocidad de desactivación, el tiempo de vida media se obtuvo directamente de la gráfica 7, en donde se observa que el tiempo al cual se obtiene el 50% de desactivación es de aproximadamente 6 minutos.

Los resultados demuestran que la enzima es muy susceptible a la presencia de metanol ya que tanto a 20% como a 40% v/v de metanol se observa una importante pérdida de actividad. A diferencia de la reacción sin metanol en donde se tiene una vida media de 28.89 horas, en la reacción con 20% de metanol la enzima tiene una vida media de 1.82 horas y después de 5 horas de incubación la actividad remanente es menor del 20%. Con 40% de metanol el efecto desactivador es mucho más marcado, con un tiempo de vida media de 6 minutos. Por otro lado, se observa una pérdida de actividad rápida en cuanto el alcohol entra en contacto con la enzima, lo cual ocasiona que la reacción no se inicie con el 100% de actividad como en el caso de la enzima incubada en solución amortiguadora. Este mismo comportamiento se ha observado también para la invertasa en reacciones de alcoholisis (Rodríguez et al. 1997).

Con el objetivo de estudiar el efecto del metanol en la velocidad de reacción de la enzima medida en velocidad inicial se realizaron reacciones a diferentes concentraciones de metanol empleando 1.2% p/v de almidón. Los resultados se presentan en la figura 8.

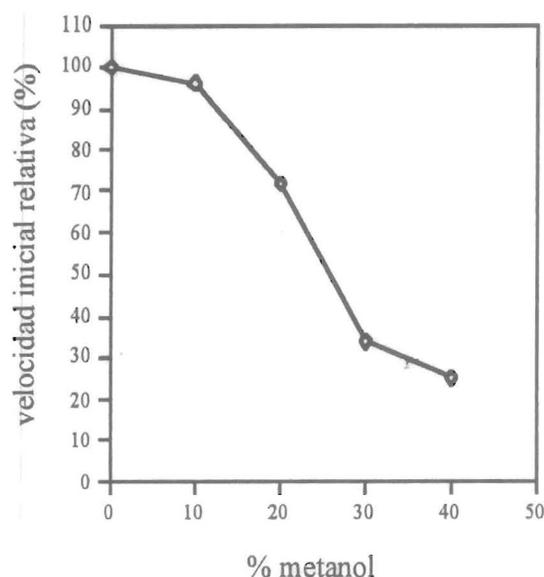


Fig. 8. Efecto de la concentración de metanol en la velocidad de reacción de la α -amilasa de *A. niger* E1 con 1.2% p/v de almidón como sustrato, a pH 4 y 60°C.

Los resultados muestran que conforme se aumenta la concentración de metanol la velocidad inicial de la enzima disminuye. Este tipo de comportamiento ha sido reportado para otras enzimas en presencia de solventes orgánicos (Ulbrich-Hofmann y Selisko, 1993; Vázquez-Duhalt et al. 1993; Rodríguez et al. 1997). Vázquez-Duhalt et al. (1993) mencionan que en estos sistemas el proceso de desnaturalización sucede en una manera de tipo umbral, donde después de que se alcanza una cierta concentración de solvente orgánico, se observa un cambio abrupto en las propiedades catalíticas de las enzimas disueltas. La concentración umbral está definida, de acuerdo con Torres et al. (1996), como la concentración del solvente orgánico a la cual ocurre la mitad de la inactivación. En este caso la concentración umbral de metanol resultó ser de 25%v/v.

A pesar de la baja concentración de metanol a la cual la enzima es susceptible de desactivación, con una concentración umbral de 25%, se sabe que la presencia del sustrato ejerce un efecto estabilizador en las enzimas no perceptible cuando solo se incubaba en solución amortiguadora o cuando se mide la velocidad inicial en presencia de metanol. De manera que para determinar dicho efecto, se llevaron a cabo reacciones en presencia de metanol empleando 15% p/v de almidón y se siguieron durante un periodo de 5 horas. Los datos de conversión después del periodo mencionado se reportan en la figura 9.

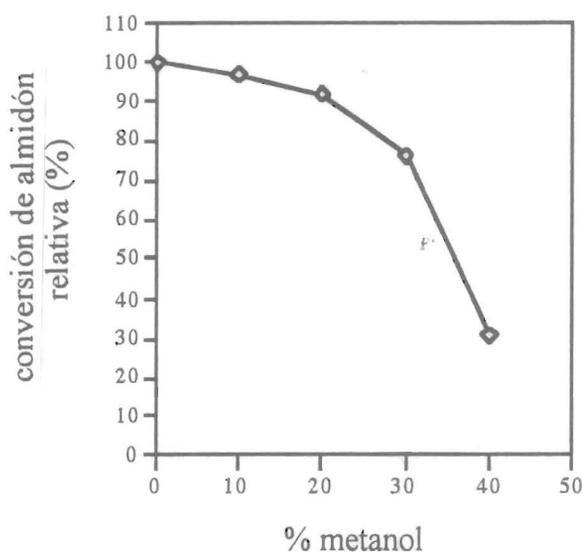


Fig. 9. Efecto de la presencia de metanol en la conversión a largo plazo de la α -amilasa de *A. niger* E1. Conversión de almidón medida como equivalentes de glucosa liberados después de 5 hrs. de reacción de la amilasa utilizando 15% p/v de almidón a 60°C y pH 4.

Los resultados permiten concluir que las concentraciones de metanol tanto de 10% como de 20% v/v metanol no influyen de manera perceptible en la conversión del almidón, ya que en ambos casos se llega prácticamente a la misma conversión (más del 90%), al igual que en el control efectuado en ausencia de metanol. Con el 30% de metanol la conversión baja como consecuencia de la desactivación pero no tan drásticamente como en el caso de 40% de metanol en donde solo se tiene una conversión del 30%. Estos resultados demuestran el efecto estabilizador que ejerce el sustrato en las reacciones con metanol, aún a concentraciones del 30% y 40% de metanol, ya que, de acuerdo con las

predicciones hechas a partir de los datos obtenidos en la figura 7, se esperaban conversiones menores a las obtenidas.

VII.3. Reacción de hidrólisis de butil-glucósido con la α -amilasa E1.

Algunas glicosidasas que llevan a cabo reacciones de alcoholisis también reconocen el alquil-glucósido como sustrato y lo hidrolizan regenerando el alcohol correspondiente y el glucósido. Con el fin de constatar si la α -amilasa es capaz de hidrolizar los alquil-glucósidos que pudiera generar durante una reacción de alcoholisis se llevó a cabo un ensayo utilizando como sustrato butil- α -glucósido al 1%, a 60°C y pH 4, evaluándose la reacción durante 5 horas por medición de azúcares reductores. La liberación de glucosa indicaría la hidrólisis del butil-glucósido. Durante las 5 horas que se mantuvo la reacción no se observó incremento del poder reductor, concluyéndose que la enzima no reconoce al butil-glucósido como sustrato.

VII.4. Selección de la concentración de almidón en la reacción de alcoholisis.

Con el objetivo de aumentar la eficiencia de dicha reacción, se procedió a determinar el efecto de la concentración de almidón sobre la reacción de alcoholisis empleando para ello la amilasa seleccionada, a pH 4, 60°C y con una concentración de metanol de 20% v/v.

Se probaron cuatro concentraciones de almidón, 1.2, 2.5, 6 y 15% p/v. Los resultados se analizaron por TLC y se presentan en la figura 10. Como se puede observar en las cromatoplacas, se forman al menos dos productos de alcoholisis, que se presume son metil-maltósido, con Rf de 0.69, y metil-glucósido, con Rf de 0.74. El metil-glucósido fue posible identificarlo plenamente utilizando el estándar, metil-glucósido de Sigma, el cual se observó que tiene un Rf de 0.75, comparable con el obtenido con el producto de la reacción de alcoholisis. A pesar de que solo se observan estos dos productos, no se descarta la formación de otros productos.

Los resultados muestran además que al aumentar la concentración de almidón se incrementan tanto la concentración de los productos de alcoholísis como la de los productos de hidrólisis. Estos resultados se explican si se considera lo reportado por Graber y Combes (1990) en relación a que un incremento en la concentración del sustrato favorece las reacciones de transglucosidación. La reacción de alcoholísis se puede manejar como una reacción de transglucosidación, sólo que en lugar de transferir el grupo glicosilo a otro azúcar se transfiere al alcohol. Por otro lado, también puede tratarse de un efecto debido a la disminución en el contenido de agua disponible para la reacción ya que se sabe que el almidón atrapa agua al momento de gelatinizarse por lo que no está disponible para la enzima.

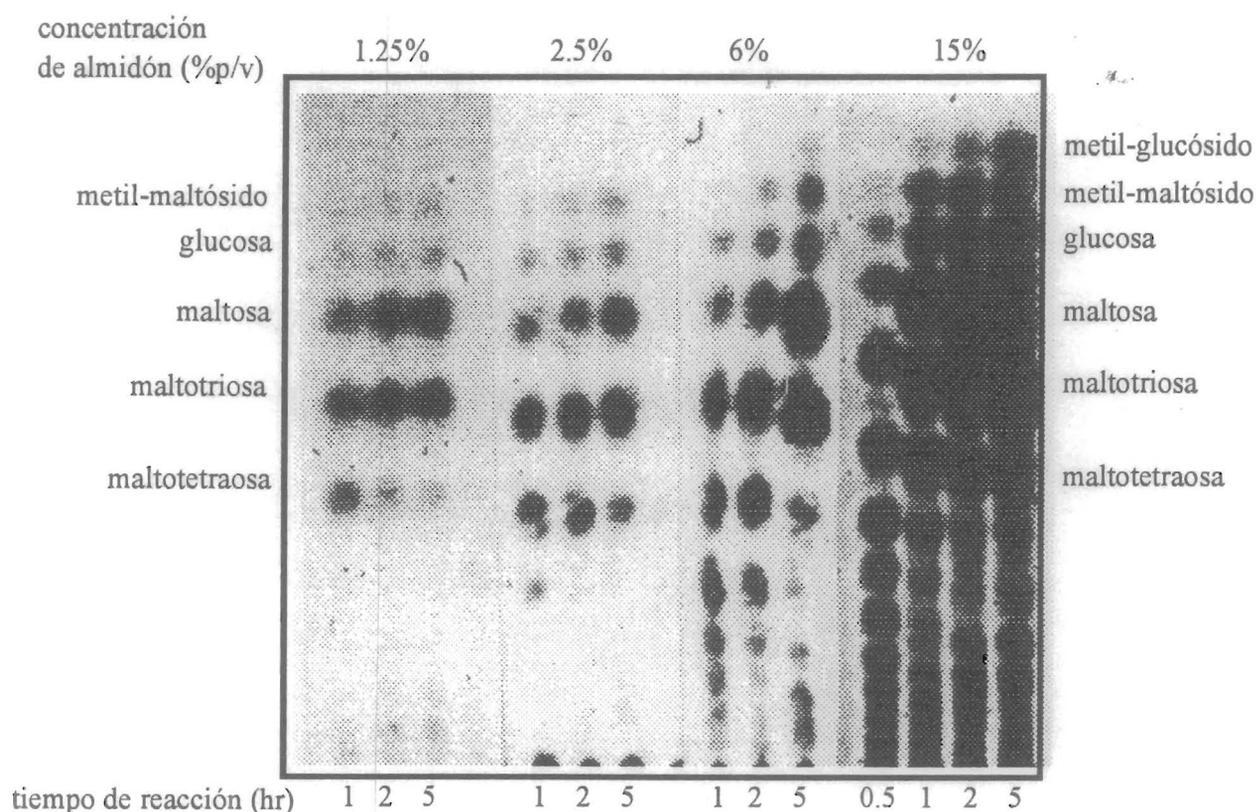


Fig. 10. Placas de cromatografía TLC donde se muestran los productos de hidrólisis y alcoholísis de la α -amilasa de *A. niger* E1 a varias concentraciones de almidón utilizando 20% v/v de metanol a 60°C y pH 4.

Con los resultados obtenidos se eligió una concentración de 6% p/v de almidón para continuar con los experimentos de alcoholólisis ya que, a pesar de que se aumenta la reacción de interés con el incremento del almidón, el manejo técnico de las soluciones de almidón es complicado por arriba de 6%.

VII.5. Selección de la concentración de metanol en la reacción de alcoholólisis.

Con el objetivo de encontrar un compromiso entre el efecto desestabilizador del metanol y la reacción de alcoholólisis, buscando minimizar el primero y maximizar la segunda, se realizaron ensayos para conocer el efecto de la concentración de metanol en la reacción de alcoholólisis utilizando almidón al 3% p/v para facilitar el manejo técnico de las mezclas de reacción, a 60°C, pH 4 y con metanol al 20, 30, 40 y 50% v/v. Las reacciones se analizaron por TLC. Los resultados se presentan en la figura 11.

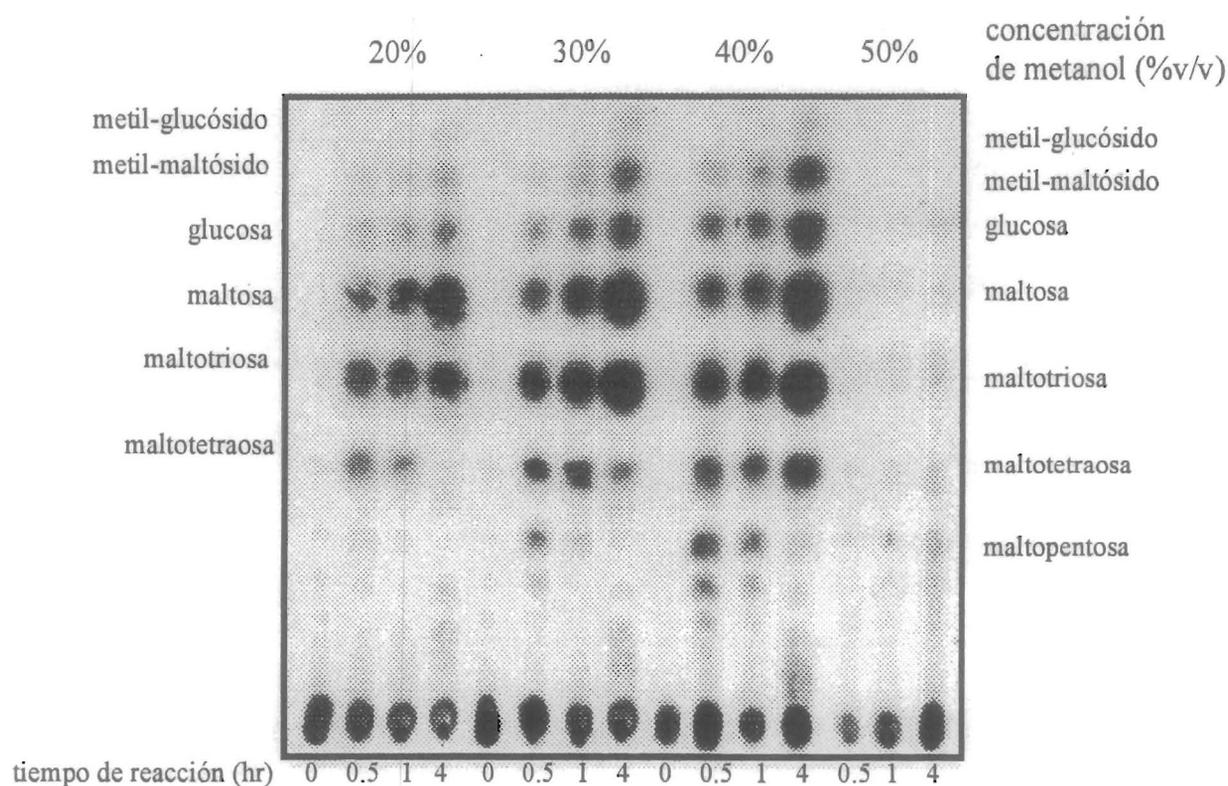


Fig. 11. Cromatoplasmas de TLC donde se presentan los productos de hidrólisis y de alcoholólisis para reacciones con α -amilasa de *A. niger* E1 a diferentes concentraciones de metanol utilizando almidón al 3% p/v, 60°C y pH 4.

Se observa un aumento de la concentración de los productos de alcoholólisis conforme se incrementa la concentración de metanol, desde 20% hasta 40% v/v. Este comportamiento se explica por la competencia entre el agua y el alcohol para atacar al intermediario glicosil-enzima, por lo que aumentando la concentración del metanol se favorece el ataque por el alcohol y la formación de los alquil-glicósidos. Sin embargo, cuando la concentración de metanol es tan alta como 50% el efecto desestabilizador en la enzima es determinante y se desactiva. En este sentido no es posible favorecer la alcoholólisis aumentando la concentración de metanol más allá de lo permitido por la estabilidad de la enzima.

En función de los resultados obtenidos, y tomando en cuenta el compromiso entre la desactivación de la enzima y la reacción de interés, se seleccionó una concentración del 40% v/v de metanol para continuar con las reacciones de alcoholólisis.

VII.6. Perfil de metil-glicósidos formados por la reacción de alcoholólisis con la α -amilasa E1.

Hasta esta etapa del estudio, el análisis de las reacciones de alcoholólisis con α -amilasa ha sido cualitativo, utilizando para ello TLC. Con el objeto de cuantificar y observar otros posibles productos de alcoholólisis se utilizó la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) bajo las condiciones de concentración de almidón y de metanol que se establecieron como las más adecuadas para la producción de alquil-glicósidos, 6% p/v y 40% v/v respectivamente.

En la figura 12 se presentan dos cromatogramas; uno obtenido de una reacción de alcoholólisis, a 60°C y pH 4, y otro como control, correspondiente a una reacción sin metanol en las mismas condiciones de reacción.

Como no se cuenta con estándares de los posibles metil-glicósidos formados durante la reacción de alcoholólisis, con excepción del metil-glucósido, y tampoco se cuenta con algún reporte de la literatura en el que se mencione el uso de α -amilasa en alcoholólisis con almidón y sus productos, éstos fueron identificados comparándolos con los productos obtenidos en la reacción de hidrólisis y con estándares de oligosacáridos.

En la figura 12 se observan los productos obtenidos en la reacción de alcoholisis, los cuales no se encuentran en la reacción sin metanol y tampoco son oligosacáridos de glucosa. Es altamente probable que estos productos sean los metil-glicósidos formados en la reacción de alcoholisis, desde metil-maltósido hasta metil-maltopentaósido. Se observa también que en la reacción sin metanol se forman glucosa, maltosa y maltotriosa, con mayor producción de maltosa que de los otros oligosacáridos (resultado no mostrados); en cambio, en la reacción con metanol se forman oligosacáridos de hasta 6 unidades de glucosa, con mayor producción de maltotriosa, además de los metil-glicósidos. Esta modificación en el perfil de productos obtenidos puede ser resultado de la presencia del metanol en el medio de reacción. Graber y Combes (1990) reportan un cambio en el perfil de productos de hidrólisis de las α -amilasas de *A. oryzae* y de *B. subtilis* cuando la reacción se lleva a cabo en presencia de sorbitol y etanol respectivamente. Sin embargo, en estos casos el patrón cambia hacia la formación de productos de bajo grado de polimerización en comparación con los productos obtenidos en solución acuosa.

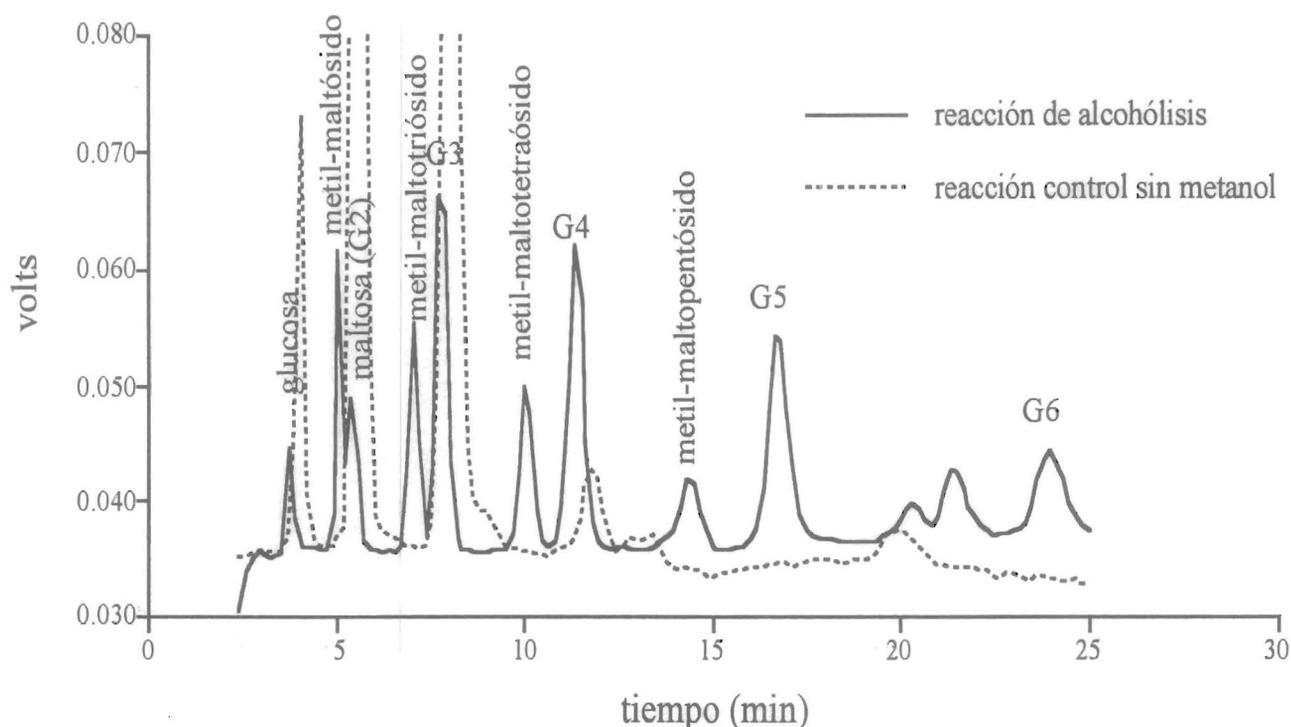


Fig. 12. Perfil de productos obtenidos de una reacción de alcoholisis de la α -amilasa de *A. niger* E1 con 6% p/v de almidón y 40% v/v de metanol, a 60°C y pH 4 y de una reacción control sin metanol en las mismas condiciones. G3 es maltotriosa; G4 es maltotetraosa; G5 es maltopentosa y G6 es maltohexosa.

Respecto al perfil de los metil-glicósidos sintetizados en la reacción de alcoholísis, se observa que la concentración de metil-maltósido es mayor en comparación al resto de los metil-glicósidos y aún que de la misma maltosa. La formación del metil-maltósido podría muy probablemente provenir de la hidrólisis de metil-glicósidos de alto peso molecular. Sin embargo, también podría provenir de la transferencia directa de maltosa al alcohol, ya que se trata de una enzima maltogénica. En la figura 13 se muestra la evolución de los productos de la reacción de alcoholísis a los 15 minutos y después de 5 horas de reacción. Se observa que el perfil de los productos de alcoholísis es el mismo desde el principio de la reacción hasta las 24 horas, descartando la posibilidad de la formación del metil-maltósido por hidrólisis de metil-glicósidos de mayor peso molecular. Se concluye por lo tanto que la enzima tiene preferencia por metilar oligosacáridos pequeños como la maltosa.

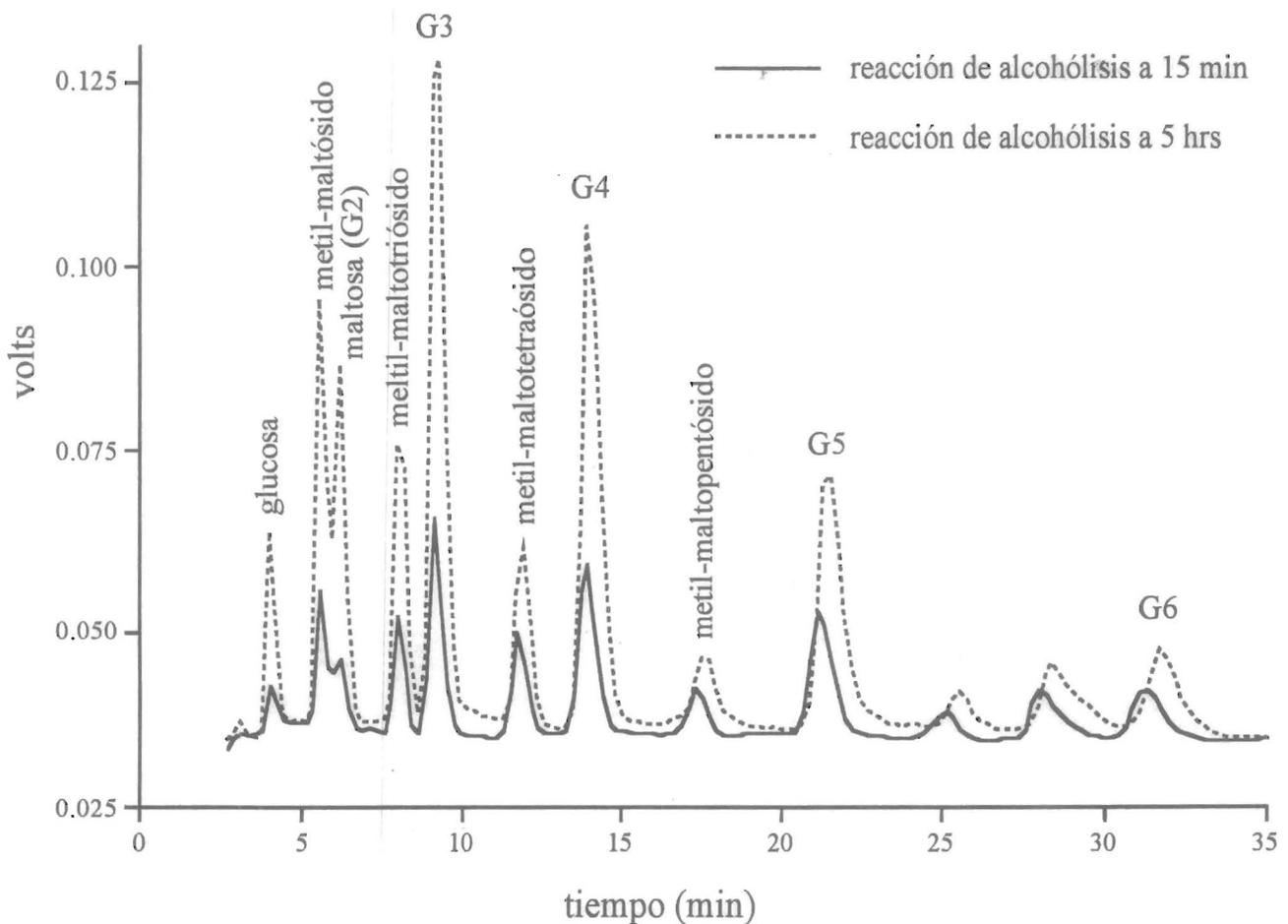


Fig. 13. Cromatogramas de HPLC de productos de alcoholísis a los 15 minutos y 5 horas de reacción con α -amilasa de *A. niger* E1 utilizando almidón al 6% p/v y metanol al 40% v/v, 60°C y pH 4. G3 es maltotriosa, G4 es maltotetraosa, G5 es maltopentosa y G6 es maltohexosa.

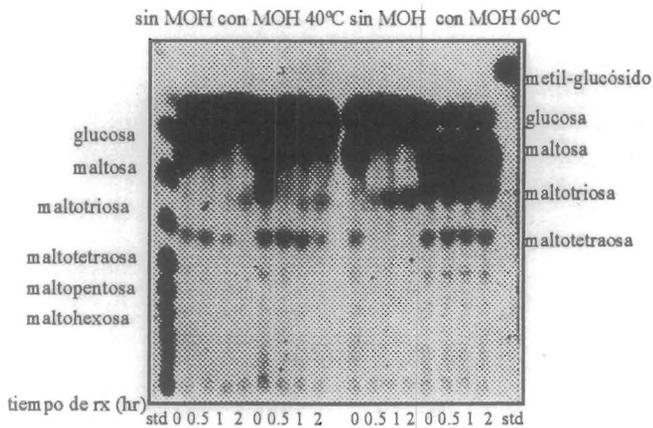
VII.7. Cuantificación de la reacción de alcoholólisis utilizando glucoamilasa.

Una vez establecido el hecho de que existe una amplia gama de metil-glicósidos obtenidos durante la reacción de alcoholólisis con la α -amilasa de *A. niger* E1 y dada la dificultad de cuantificar dichos productos por no contar con estándares, a excepción del metil-glucósido, se prosiguió a buscar un método con el cual fuera posible la cuantificación.

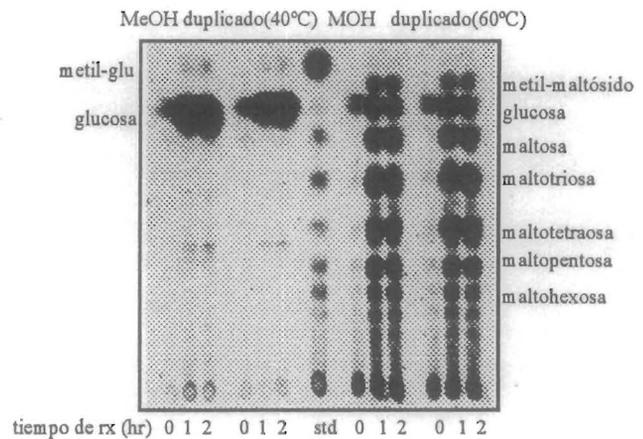
Nishimura et al. (1994), reportaron el aislamiento de una enzima de *Bacillus subtilis* identificada como α -amilasa capaz de glicosidar compuestos fenólicos como la hidroquinona, formando oligoglicósidos de hidroquinona y establecieron un método para la purificación de los mismos que consiste en hidrolizar a estos productos obtenidos durante la reacción hasta glucósido de hidroquinona utilizando para ello una glucoamilasa. Este método de cuantificación sería adecuado en este sistema ya que en las reacciones de alcoholólisis con α -amilasa se observan varios metil-glicósidos además de los oligosacáridos producidos por la hidrólisis, que serían hidrolizados a metil-glucósido y glucosa respectivamente si se introduce al sistema glucoamilasa después de concluida la reacción con α -amilasa. Sin embargo, es necesario realizar diferentes controles para comprobar que la glucoamilasa no es capaz de llevar a cabo reacciones de alcoholólisis.

VII.7.1. Estudio control de la glucoamilasa en reacciones de alcoholólisis.

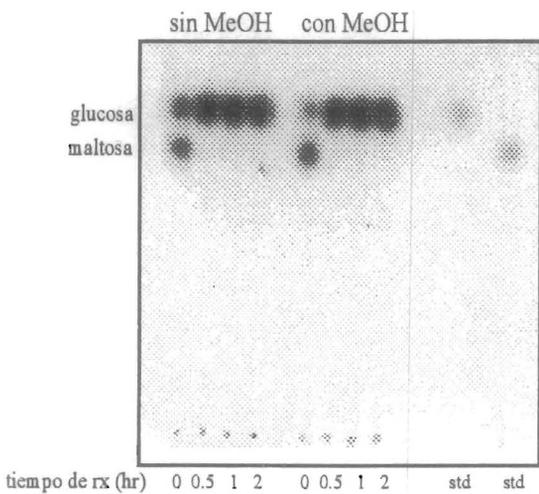
Para comprobar que la glucoamilasa no es capaz de llevar a cabo reacciones de alcoholólisis se realizaron ensayos control con dos glucoamilasas: una glucoamilasa liofilizada de *Aspergillus niger* de Boheringer-Lakeside, con 99% de pureza, GA1, y otra grado industrial con el nombre comercial de Diazyme, GA2. Con estas enzimas se llevaron a cabo reacciones en presencia de metanol utilizando almidón y maltosa como sustratos al 2.5% ó 6% p/v, metanol al 40% v/v, a pH 4 y a 40 ó 60°C y se analizaron por TLC. En la figura 14 se muestran las cromatoplacas de estos ensayos.



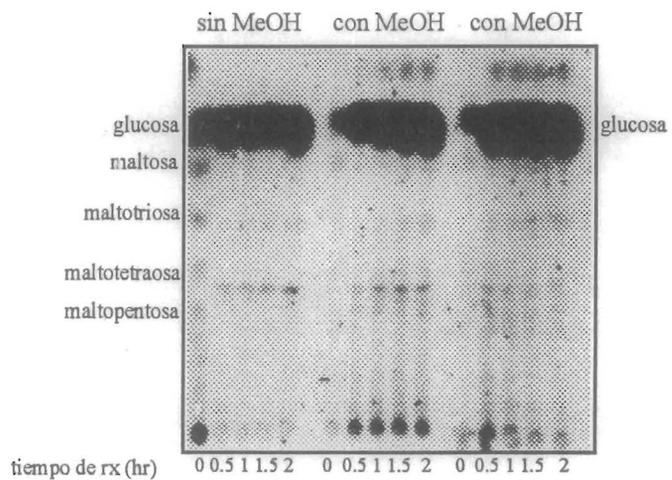
Cromatograma de alcoholisis con glucoamilasa G1 con maltosa 6% a dos temperaturas 40° y 60°C



Cromatograma de alcoholisis con glucoamilasa G1 con almidón 6% a dos temperaturas 40° y 60°C



Cromatograma de alcoholisis con glucoamilasa G2 con maltosa 2.5% a 40°C



Cromatograma de alcoholisis con glucoamilasa G2 con almidón 6% a 40°C

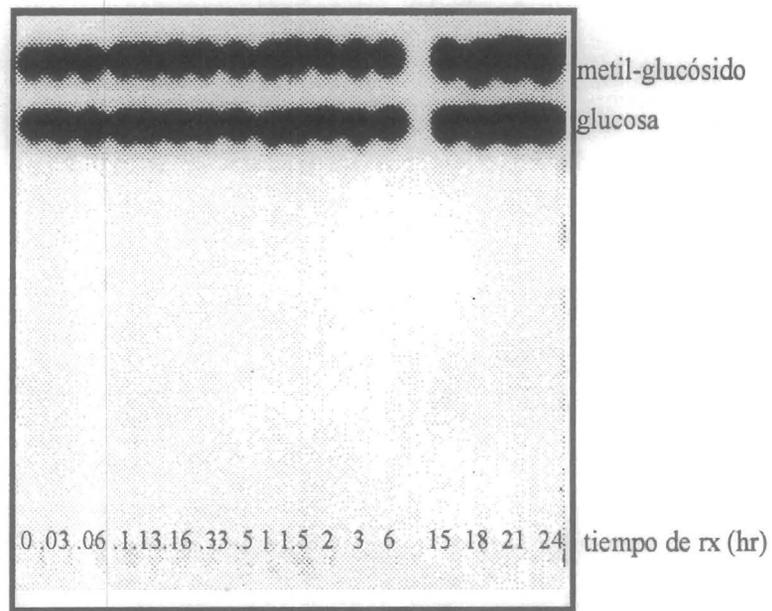
Fig. 14. Reacciones control de alcoholisis con las glucoamilasas GA1 y GA2 utilizando almidón y maltosa como sustratos, a 40 ó 60°C y a pH 4.

Los resultados muestran que en las reacciones con almidón sorprendentemente se observan metil-glicósidos, tanto a 40°C como a 60°C, en cambio en las reacciones con maltosa solo se observa hidrólisis. Por otro lado, en la reacción en presencia de almidón con GA1, a 40°C se observa el metil-glucósido mientras que a 60°C además se observa metil-maltósido en un perfil parecido al obtenido en la reacción de alcoholisis con α -amilasa.

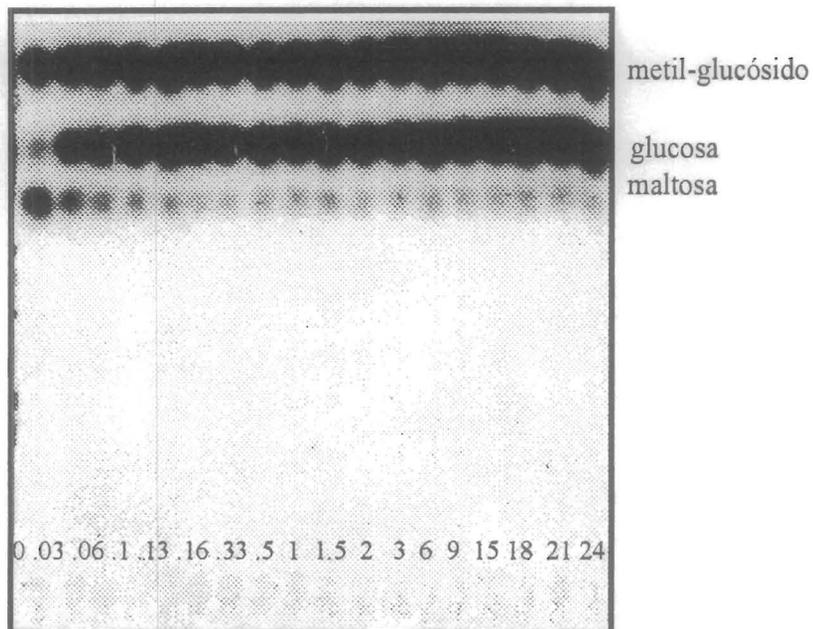
Dado que el mecanismo de reacción de la glucoamilasa es el de una exo-enzima que produce solo β -glucosa (Sierks y Svensson, 1996), es posible explicar la producción del metil-glucósido si en lugar de que la molécula de agua ataque al intermediario glicosil-enzima, éste sea atacado por una molécula de metanol. Sin embargo, no es posible explicar la producción del metil-maltósido mediante este mecanismo. Por otro lado, existe la posibilidad de que el metil-maltósido se sintetice por condensación de una molécula de metil-glucósido con una molécula de glucosa, ambas formadas durante la reacción. Para descartar esta hipótesis se realizaron varios experimentos.

Se llevaron a cabo reacciones con la glucoamilasa GA1 utilizando dos sustratos, glucosa ó maltosa y metil-glucósido, ambos sustratos al 1% y con 30% de metanol, a 60°C y pH 4. Estos resultados se presentan en la figura 15, donde se puede observar que no existe condensación del metil-maltósido a partir de metil-glucósido con glucosa.

Así mismo, se realizó otro ensayo con la misma enzima, GA1, utilizando almidón al 6% p/v y metanol al 30% v/v pero con aproximadamente 20 veces menos enzima (2.19 U/mL) siguiéndose la reacción durante 24 horas con el fin observar la cinética de aparición del metil-maltósido y descartar la posibilidad de que el metil-maltósido se estuviera formando a partir del metil-glucósido por condensación con otro oligosacárido y posterior hidrólisis para formar el metil-maltósido. Estos resultados se presentan en la figura 16 en donde se demuestra que la producción del metil-maltósido antecede a la formación del metil-glucósido. Este resultado descarta, por un lado la producción del metil-maltósido a partir del metil-glucósido y por otro la síntesis de metil-maltósido por acción de la glucoamilasa dado el mecanismo de acción de la enzima. Los resultados indican una posible contaminación con α -amilasa y para comprobarlo se realizaron geles de electroforesis.



Cromatograma de reacción de alcoholisis de glucoamilasa GA1 con glucosa y metil-glucósido como sustratos y 30% MeOH, a pH 4 y 60°C



Cromatograma de reacción de alcoholisis de glucoamilasa GA1 con maltosa y metil-glucósido como sustratos y 30% MeOH, a pH 4 y 60°C

Fig. 15. Reacciones de alcoholisis de la glucoamilasa GA1 con glucosa y metil-glucósido o maltosa y metil-glucósido como sustratos, con 30% de metanol a pH 4 y 60°C.

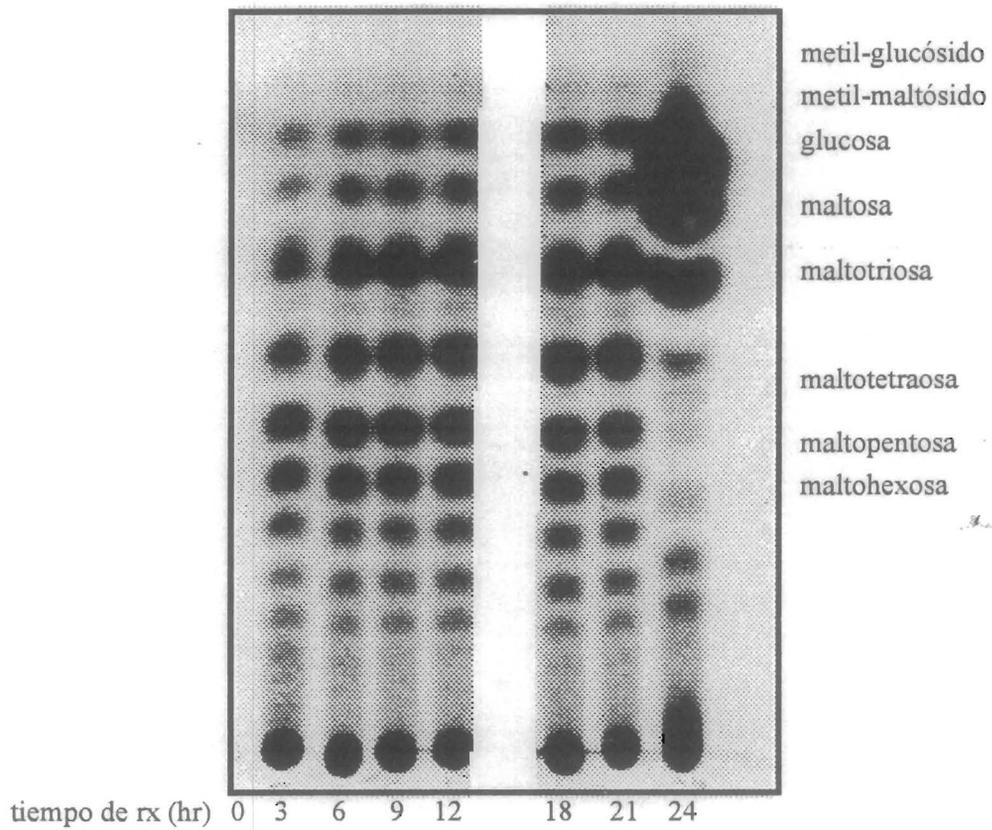


Fig. 16. Cromatoplaca de reacción de alcoholisis de glucoamilasa GA1 con almidón 6% p/v y metanol 30% v/v, con una actividad volumétrica de 2.19 U/mL, a 60°C y pH 4.

Se elaboró un gele de acrilamida para determinar la pureza de la glucoamilasa GA1 y ubicar la posible actividad contaminante de α -amilasa en un gel de acoplamiento. El gel se preparó como se menciona en la sección de Materiales y Métodos y en él se aplicaron muestras de la glucoamilasa GA1, además de la α -amilasa E1. El gel de acrilamida obtenido se muestra en la figura 17.

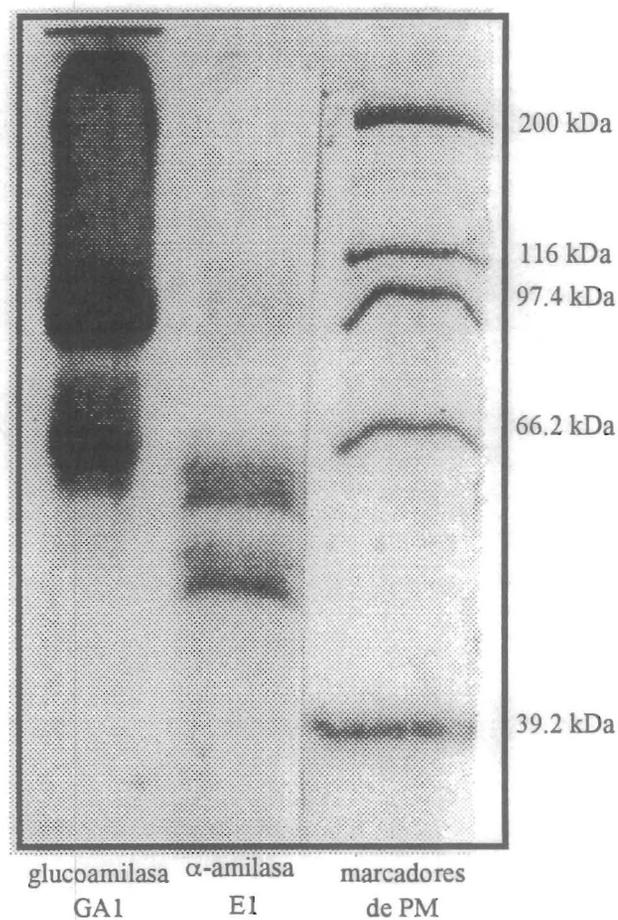


Fig. 17. Gel de electroforesis, acrilamida 10%, de las enzimas GA1 y α -amilasa E1.

En los resultados se observa que ambas preparaciones, tanto la glucoamilasa GA1 como la α -amilasa E1 no están puras, pues presentan varias proteínas contaminantes. Algunas de estas proteínas presentaron actividad sobre un gel de almidón acoplado al gel de acrilamida previamente activado (resultados no mostrados), aunque no se puede determinar con precisión si una de ellas es α -amilasa o se trata de isoenzimas de la glucoamilasa ya que se sabe que la glucoamilasa de *A. niger* existe en dos formas GAI, de 616 aminoácidos y PM de 71kD y GAII de 61kD (Wong, 1995). Sin embargo, Marshall (1978), al desarrollar un método para la determinación cuantitativa de α -amilasa en preparaciones enzimáticas de glucoamilasa, determinó la presencia de α -amilasa en la glucoamilasa GA1 de *A. niger*, con la cual se trabajó en el presente proyecto. Con los resultados obtenidos se llegó a la conclusión de que la glucoamilasa no presenta actividad de alcoholólisis, sino la α -amilasa con la cual está contaminada, aunque de acuerdo con el proveedor, la pureza alcanza un 99%.

Por otro lado, es importante determinar si la glucoamilasa es capaz de hidrólizar el metilglucósido. Para ello se llevó a cabo una reacción con la glucoamilasa GA1 utilizando 6%p/v de metilglucósido, a pH 4, 40 ó 60°C y con una actividad volumétrica de 42 U/mL. La reacción se analizó por TLC y se presenta en la figura 18. Los resultados demuestran que la glucoamilasa no hidroliza al metilglucósido a ninguna de las dos temperaturas ya que no se observa glucosa. De esta manera se demuestra que la enzima es adecuada para la cuantificación aproximada de la alcoholólisis no importando si se trata de una preparación industrial o con alto grado de pureza.

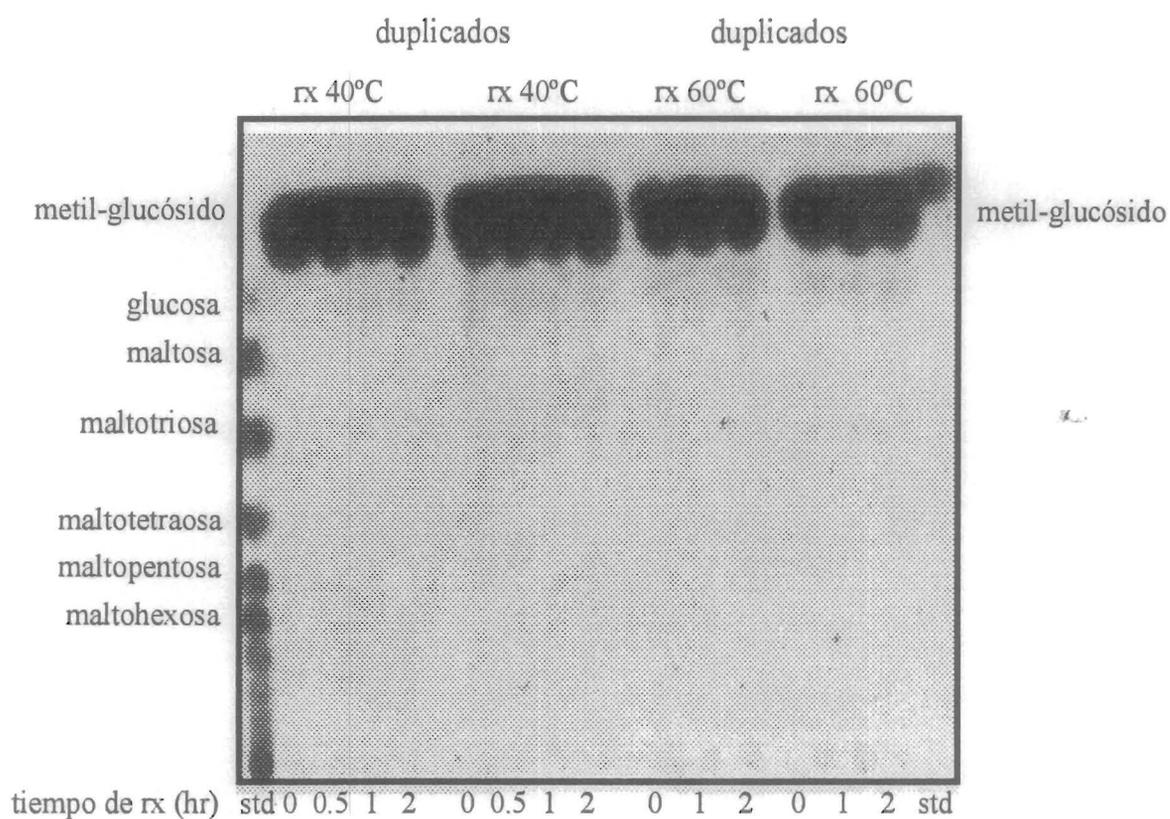


Fig. 18. Cromatoplaqa de la reacción de hidrólisis de metil-glucósido al 6% p/v con la glucoamilasa GA1, a pH4 y 40 ó 60°C, y con una actividad volumétrica de 42 U/mL.

VII.8. Selección del sustrato más adecuado para la alcoholólisis con α -amilasa E1.

Con el objeto de determinar el sustrato más adecuado para la alcoholólisis de la α -amilasa se llevaron a cabo reacciones utilizando diferentes sustratos: almidón, una mezcla de maltodextrinas que contienen oligosacáridos de cuatro hasta diez unidades de glucosa, y almidón previamente hidrolizado sin determinar el tamaño de los oligosacáridos obtenidos de la hidrólisis. Se llevaron a cabo reacciones con la α -amilasa E1 utilizando los diferentes sustratos y con metanol al 40% v/v, a pH 4 y 60°C; la cuantificación de los productos de alcoholólisis se realizó utilizando la glucoamilasa, a pH 4 y 40°C, sin desactivar a la amilasa. En la tabla 5 se presenta un resumen de la cuantificación de la reacción de alcoholólisis.

Tabla 5. Determinación de la eficiencia de alcoholólisis con diferentes sustratos utilizando α -amilasa de *A. niger* E1 y 40% de metanol y utilizando glucoamilasa GA2 para la cuantificación de los productos de alcoholólisis.

sustrato	metilglucósido (mg/ml)	%metanol de alcoholólisis ^a	%alcoholólisis en reacción ^b
almidón 6%	2.32	0.12	3.24
almidón 15%	8.9	0.47	12.4
almidón hidrolizado 6%	0.9	0.05	1.25
maltodextrinas 6% ^c	1.19	0.06	1.82

^a El porcentaje de metanol representa la cantidad de metanol que se utiliza para la formación de los metil-glicósidos.

^b El porcentaje de alcoholólisis representa el porcentaje del sustrato total que en lugar de ser hidrolizado por la enzima es metilado.

^c Oligosacáridos que van desde 4 hasta 10 unidades de glucosa.

En los resultados se observa que el mejor sustrato resultó ser el almidón comparado con las maltodextrinas y el almidón hidrolizado; además, como ya se mencionó con anterioridad, al aumentar la concentración del almidón se favorece la reacción de alcoholólisis, aunque el manejo de soluciones de almidón mayores del 6% p/v es complejo. Un comportamiento similar lo reporta Nishimura et al. (1994) con una enzima aislada de *Bacillus subtilis*, identificada como α -amilasa, capaz de glicosidar hidroquinona y formar glicósidos de hidroquinona con una eficiencia de glicosidación del 22.4, 24.8 y 32.4% cuando utiliza como sustratos maltotriosa, maltopentosa y almidón soluble respectivamente. Con los resultados obtenidos en este trabajo se concluyó que el almidón soluble es el sustrato más adecuado para las reacciones de alcoholólisis cuando se utiliza la α -amilasa de *A. niger* E1.

Matsubara (1961) reporta la transferencia de maltosa empleando la α -amilasa de *A. oryzae* de fenil-maltósido (8.5% p/v) ó p-nitrofenil-maltósido (9.2% p/v) hacia metanol (1 M) con un porcentaje de transferencia de 8.1% y 9.2% respectivamente. Es importante aclarar que los resultados reportados por este autor son con base en el sustrato hidrolizado y no a la concentración de sustrato inicial. Comparando estos resultados con los obtenidos en este trabajo cuando se utilizó una concentración de almidón del 15%, donde se obtuvo un porcentaje de alcoholólisis del 12.4%, se observa un porcentaje de alcoholólisis un poco mayor al obtenido por Matsubara (1961) a pesar de que este autor utiliza una concentración de metanol 9 veces menor a la empleada en este estudio (1 M en lugar de 9.89 M).

Por otro lado, cuando la concentración de almidón se disminuye al 6%, el porcentaje de alcoholólisis es 4 veces menor a lo obtenido en la reacción con 15% de almidón. Graber y Combes (1990) reportan la transferencia de unidades de glucosa a sorbitol utilizando una α -amilasa de *A. oryzae* del 3% de los productos de reacción cuando utilizan 2% de maltotetraosa y 4 M de sorbitol, un porcentaje de transferencia un poco menor al obtenido en este estudio cuando se utiliza almidón al 6%.

A pesar del aumento en los productos de alcoholólisis obtenidos al utilizar almidón soluble en una concentración del 15% p/v, el porcentaje de alcoholólisis es mucho menor al de la hidrólisis. En ninguna de las reacciones llevadas a cabo en este estudio se logró que la alcoholólisis fuese la reacción dominante. Esto puede deberse a la alta concentración de agua presente en la reacción, (siendo ésta de 30.2 M, comparada con la concentración de metanol que es de 10 M, en una reacción con 15% p/v de almidón y 40% v/v de metanol) la cual no es posible disminuir debido principalmente a la inestabilidad que tiene la enzima en el metanol, además de que el almidón para ser gelatinizado requiere de agua y si se aumenta la concentración de metanol se tienen problemas de precipitación del almidón.

Los resultados obtenidos demuestran que la α -amilasa de *A. niger* E1 es capaz de llevar a cabo la síntesis de metil-glicósidos en reacciones de alcoholólisis. Sin embargo, los rendimientos obtenidos en el presente trabajo son menores a los obtenidos con otras glicosidasas en este tipo de reacciones, como en el caso de la β -xilosidasa (Shinoyama, 1988) y la β -galactosidasa (García Garibay, datos no publicados), en donde se han obtenido rendimientos de hasta el 100% en producción de alquil-glicósidos, y aún en el caso de la invertasa (Rodríguez et al. 1996) en donde los mayores rendimientos obtenidos son del 30% en alcoholólisis.

Bajo las condiciones en que se trabajó, la α -amilasa resultó ser un enzima poco eficiente en las reacciones de alcoholólisis, sin embargo, el presente estudio así como un estudio más profundo del por qué no lo son ayudarían a comprender un poco más sobre el comportamiento de las enzimas en presencia de solventes orgánicos.

VIII. CONCLUSIONES

- Bajo las condiciones en que se desarrolló este trabajo, se demostró la capacidad de las α -amilasas de origen fungal utilizadas para llevar a cabo reacciones de alcoholólisis. No así de las enzimas de origen bacteriano. Hasta el momento se está avanzando en una demostración experimental basada en una explicación estructural de este comportamiento.
- De las reacciones de alcoholólisis con las α -amilasas se seleccionó la enzima denominada E1 por ser la la más eficiente de las amilasas en alcoholólisis.
- Se comprobó el efecto de la concentración de los sustratos en la alcoholólisis de la α -amilasa de *Aspergillus niger* E1; un aumento en la concentración de ambos sustratos, tanto almidón como metanol, favorece la alcoholólisis, aunque la hidrólisis es mayoritaria en cualquier momento.
- Se observaron grandes indicios de que la α -amilasa comercial de *A. niger* E1 tiene preferencia por metilar oligosacáridos pequeños como la maltosa, aunque también puede metilar oligosacáridos más grandes.
- Se estableció como método de cuantificación de alcoholólisis el uso de la glucoamilasa de *Aspergillus niger*. El método se basa en la hidrólisis de los metil-glicósidos a equivalentes de metil-glucósido.
- Se determinó que el almidón es el sustrato más adecuado para las reacciones de alcoholólisis con respecto a las maltodextrinas de 4 hasta 10 unidades de glucosa y del almidón previamente hidrolizado.

IX. PERSPECTIVAS

Se está llevando a cabo una colaboración con el Dr. Gabriel del Río, del grupo de Ingeniería de Proteínas del IBT. El Dr. Gabriel del Río construyó dos mutantes de la α -amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, sustituyendo la alanina 252 por tirosina y por fenilalanina. Hasta el momento se están haciendo pruebas de alcoholólisis con las dos enzimas mutantes comparándolas con la enzima silvestre. Estas construcciones ayudarán a comprender más la relación función-estructura de estas enzimas; es decir, obtener una explicación a nivel estructural de la relación de la capacidad de alcoholólisis con la estructura de la enzima.

Se recomienda también llevar a cabo un estudio más profundo de la α -amilasa en alcoholólisis:

- estudiar el efecto en la alcoholólisis de introducir un cosolvente en el medio de reacción que ayude a disminuir la actividad de agua;
- efectuar un perfil de pH y de temperatura para la reacción de alcoholólisis buscando las condiciones que favorezcan dicha reacción;
- probar alcoholes de mayor peso molecular para saber si es capaz de generar alquil-glicósidos con capacidad biosurfactante.

X. BIBLIOGRAFIA

Adachi S., Y. Ueda y K. Hashimoto. 1984. Kinetics of formation of maltose and isomaltose through condensation of glucose by glucoamylase. *Biotechnol. Bioeng.* 26:121-127.

Adelhorst K., F. Björkling, S. E. Godtfredsen y O. Kirk. 1990. Enzyme Catalysed Preparation of 6-o-acylglucopyranosides. *Synthesis.* 112-115.

Ajandouz E. H. y G. J. Marchis-Mouren. 1995. Subsite mapping of porcine pancreatic alpha-amylase I and II using 4-nitrophenyl- α -maltooligosaccharides. *Carbohydr. Res.* 268:267-277.

Allen J. D. y J. A. Thoma. 1978. Multimolecular Substrate Reactions Catalyzed by Carbohydrases. *Aspergillus oryzae* α -Amylase Degradation of Maltooligosaccharides. *Biochemistry.* 17(12):2338-2344.

Bárzana E. y A. López-Munguía. 1993. La Tecnología Enzimática. Cap. 4. En Biotecnología Alimentaria. García Garibay, Quintero Ramírez y López-Munguía ed. México. 103-123.

Chahid Z., D. Montet, M. Pina y J. Graille. 1992. Effect of water activity on enzymatic synthesis of alkylglycosides. *Biotechnol. Let.* 14(4):281-284.

Davies G. y B. Henrissat. 1995. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure.* 3:853-859.

Del Río G. 1997. Estudio del sitio catalítico de una α -amilasa por medio de ingeniería de proteínas. Tesis para Doctorado en Biotecnología. Instituto de Biotecnología UNAM.

Dintinger T., D. Dutheil-Bouëdec, M. Bouchonneau y C. Tellier. 1994. Synthesis of β -mercaptoethylglycosides by enzymatic reverse hydrolysis and transglycosylation. *Biotechnol. Let.* 16(7):689-692.

Dordrick J. S. 1989. Enzymatic catalysis in monophasic organic solvents. *Enzyme Microb. Technol.* 11:194-210.

- Drouet P., M. Zhang y M. D. Legoy. 1994. Enzymatic synthesis of alkyl β -D-xylosides by transxylosylation and reverse hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.* 43:1075-1080.
- Fogarty W. M. Microbial Amylases. En Microbial Enzymes and Biotechnology. W. M: Fogarty ed. 1983. U.S.A. 1-34.
- Fried B. y J. Shelma. 1986. *Thin Layer Chromatography Techniques and Appl.* 2a. ed. Cap. 17. Dekker Inc. N.Y. 287.
- García-Garibay M., A. López-Munguía y E. Bárzana. Utilización de β -galactosidasa en reacciones de alcoholisis. Datos no publicados.
- Graber M. y D. Combes. 1990. Action pattern of alpha-amylase from *Aspergillus oryzae* in concentrated media. *Biotechnol. Bioeng.* 36:12-18.
- Halling P. J. 1994. Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventional media: theory, tests, and recommendations for experimental design and analysis. *Enzyme Microb. Technol.* 16:178-202.
- Hughes y Lew. 1970. Physical and functional properties of some higher alkyl polyglucosides. *J. Am. Chem. Soc.* 47:162-167.
- Kuriki T., H. Kaneko, M. Yanase, H. Takata, J. Shimada, S. Handa, T. Takada, H. Umeyama y S. Okada. 1996. Controlling substrate preference and transglycosylation activity of neopullulanase by manipulating steric constraint and hydrophobicity in active center. *J. Biol. Chem.* 271(29):17321-17329.
- Klibanov A. M. 1990. Asymmetric transformations catalyzed by enzymes in organic solvents. *Acc. Chem Res.* 23:114-120.
- Laane, S. Boeren, K. Vos y C. Veeger. 1987. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotechnol. Bioeng.* 30:81-87.
- Laroute V. y R. Willemot. 1989. Glucose condensation by glucoamylase in organic solvents. *Biotechnol. Lett.* 11(4):249-254.

Laroute V. y R. Willemot. 1992. Glucoside synthesis by glucoamylase or β -glucosidase in organic solvents. *Biotechnol. Let.* 14(3):169-174.

Ljunger G., P. Adlercreutz y B. Mattiasson. 1994. Enzymatic synthesis of octyl- β -glucoside in octanol at controlled water activity. *Enzyme Microb. Technol.* 16:751-755.

Marshall J. J. 1978. Quantitative determination of α -amylase in glucoamylase preparations. *Anal. Biochem.* 85:541-549.

Matsubara S. 1961. Studies on taka-amylase A. Transmaltosidation by taka-amylase A. *J. Biochem.* 49(3):226-231.

Matsumura S., K. Imai, S. Yoshikawa, K. Kawada y T. Uchibori. 1990. Surface Activities, biodegradability and antimicrobial properties of n-alkyl glucosides, mannosides and galactosides. *JAOCS.* 67(12):996-1001.

McCarter J. D. y S. G. Withers. 1994. Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Current Opinion in Structural Biology.* 4:885-892.

Miller G. L. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry.* 31(3):426-428.

Nilsson K.G.I. 1988. Enzymatic synthesis of oligosaccharides. *TIBTECH.* 6:256-264.

Nishimura T., T. Kometani, H. Takii, Y. Terada y S. Okada. 1994. Purification and some properties of α -amylase from *Bacillus subtilis* X-23 that glucosylates phenolic compounds. *J. Ferm. Bioeng.* 78(1):31-36.

Oguntimein G. B., H. Erdmann y R. D. Schmid. 1993. Lipase catalysed synthesis of sugar ester in organic solvents. *Biotechnol. Let.* 15(2):175-180.

Ooi Y., T. Hashimoto, N. Mitsuo y T. Satoh. 1984. Enzymatic synthesis of chemically unstable cardiac glycosides by β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Tetrahedron Let.* 25(21):2241-2244.

Panintrarux C., S. Adachi, Y. Araki, Y. Kimura y R. Matsuno. 1995. Equilibrium yield of n-alkyl- β -glucoside through condensation of glucose and n-alcohol by β -glucosidase in a biphasic system. *Enzyme Microb. Technol.* 17:32-40.

Ramírez M. 1994. Ingeniería de proteínas para reacciones de alcoholólisis: mutagénesis combinatoria de alfa-amilasa. Tesis para Maestría en Biotecnología. Instituto de Biotecnología UNAM.

Rastall R. A., M. W. Adlard y C. Bucke. 1991. Synthesis of hetero-oligosaccharides by glucoamylase in reverse. *Biotechnol. Let.* 13(7):501-504.

Rodríguez M., A. Gómez, F. González, E. Bárzana y A. López-Munguía. 1996. Selectivity of methyl-fructoside synthesis with β -fructofuranosidase. *App. Biochem. Biotechnol.* 59:167-175.

Rodríguez M., A. Gómez, F. González, E. Bárzana y A. López-Munguía. 1997. Stability of invertase in alcohololysis reactions with methanol. *J. Mol. Catalysis B: Enzymatic* 2 :299-306.

Salgado L. 1997. Reacciones de alcoholólisis con β -galactosidasa de *Escherichia coli* en micelas invertidas Tesis para Maestría en Biotecnología. Instituto de Biotecnología UNAM.

Selisko B., R. Ulbrich y A. Schellenberger. 1990. Invertase-catalyzed reactions in alcoholic solutions. *Biotechnol. Bioeng.* 35:1006-1010.

Shinoyama H., Y. Kamiyama y T. Yasui. 1988. Enzymatic synthesis of alkyl β -xylosides from xylobiose by application of the transxylosyl reaction of *Aspergillus niger* β -xylosidase. *Agric. Biol. Chem.* 52(9):2197-2202.

Sierks M. R. y B. Svensson. 1996. Catalytic mechanism of glucoamylase probed by mutagenesis in conjunction with hydrolysis of α -D-glucopyranosyl fluoride and maltooligosaccharides. *Biochemistry.* 35:1865-1871.

Sinnott M. L. 1990. Catalytic mechanisms of enzymic glycosyl transfer. *Chem. Rev.* 90:1171-1202.

- Stevenson D. E., R. A. Stanley y R. H. Furneaux. 1993. Optimization of alkyl β -D-galactopyranoside synthesis from lactose using commercially available β -galactosidases. *Biotechnol. Bioeng.* 42:657-666.
- Straathof A. J. J., J. P. Vrijenhoef, E. Sprangers, H. van Bekkum y P. G. Kieboom. 1988. Enzymic formation of β -D-fructofuranosides from sucrose: activity and selectivity of invertase in mixtures of water and alcohol. *J. Carbohydr. Chem.* 7(1):223-238.
- Suganuma T., M. Ohnishi, K. Hiromi y T. Nagahama. 1996. Elucidation of the subsite structure of bacterial saccharifying alpha-amylase and its mode of degradation of maltose. *Carbohydr. Res.* 282:171-180.
- Torres E., R. Tinoco y R. Vázquez-Duhalt. 1996. Solvents hydrophobicity predicts biocatalytic behavior of lignin peroxidase and cytochrome *c* in aqueous solution of water-miscible organic solvents. *J. Biotechnol.* 49:59-67.
- Ulbrich-Hofmann R. y B. Selisko. 1993. Soluble and immobilized enzymes in water-miscible organic solvents: glucoamylase and invertase. *Enzyme Microb. Technol.* 15:33-41.
- Van Beynum G. M. A. y J. A. Roels. ¹⁹⁸⁵ The Multidimensionality of Starch Conversion Technology. En Starch Conversion Technology. G.M.A. Van Beymun y J.A. Roels ed. U.S.A. 11-13.
- Vázquez-Duhalt R., K. M. Semple, D. Westlake y P. M. Fedorak. 1993. Effect of water-miscible organic solvents on the catalytic activity of cytochrome *c*. *Enzyme Microb. Technol.* 15:936-942.
- Vic G. y D. Thomas. 1992. Enzyme-catalysed synthesis of alkyl β -D-glucosides in organic media. *Tetrahedron Let.* 33(32):4567-4570.
- Vihinen M. y P. Mäntsälä. 1989. Microbial amylolytic enzymes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. vol. 24. 329-363.
- Vihinen M. y P. Mäntsälä. 1990. Characterization of a thermostable *Bacillus stearothermophilus* α -Amylase. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 12:427-435.

Vulfson E., R. Patel, J. Beecher, A. Andrews y B. Law. 1990. Glycosidases in organic solvents: I. Alkyl- β -glucoside synthesis in a water-organic two-phase system. *Enzyme Microb. Technol.* 12:950-954.

Wescott C. R. y A. M. Klibanov. 1994. The solvent dependence of enzyme specificity. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1206:1-9.

Wong D. W. S. 1995. Amylolytic Enzymes. En Food Enzymes Structure and Mechanism. Chapman&Hall. U.S.A. 37-84.

XI. APENDICE

Operaciones realizadas para la cuantificación de la alcoholólisis después de añadir glucoamilasa al medio de reacción.

concentración de metil-glucósido en la reacción

$$\frac{R - b \times 1000}{m \times v} = a$$

donde R = respuesta obtenida por HPLC

m = pendiente de la gráfica de la concentración de metil-glucósido en relación al área obtenida en HPLC, en mg metil-glucósido/ μ Vxs

b = intersección en el eje de la ordenada obtenido de la gráfica de la concentración de metil-glucósido en relación al área obtenida en HPLC, en μ Vxs

v = volumen inyectado al HPLC, en μ l

a = concentración de metil-glucósido obtenido en la reacción, en mg/mL

concentración molar de metil-glucósido en la reacción

$$a \times \frac{1}{M_{MG}} = b$$

donde M_{MG} = peso molecular del metil-glucósido, 194 mg/mmol

b = concentración del metil-glucósido en la reacción, en moles/L

concentración molar de metanol en la reacción

$$c \times \delta_{\text{MOH}} \times \frac{1}{M_{\text{MOH}}} = d$$

donde c = concentración de metanol en la reacción, en mL/L

δ_{MOH} = densidad del metanol, 0.792 g/mL

M_{MOH} = peso molecular del metanol, 32.04 g/mol

d = concentración de metanol en la reacción, en moles/L

porcentaje de metanol utilizado para la formación del metil-glucósido

$$d - 100\%$$

$$b - x$$

$$x = \% \text{ metanol de alcoholisis} = \frac{d - 100}{d}$$

concentración molar de agua necesaria para la hidrólisis total

$$M_{\text{Sustrato}} + M_{\text{Glc}} = f$$

donde M_{Sustrato} = peso molecular del sustrato utilizado, en g/mol

M_{Glc} = peso molecular aproximado de una unidad de glucosa presente en el polímero, 162 g/mol

f = número de moléculas de glucosa en el polímero

g = número de moléculas de agua necesarias para la hidrólisis completa del polímero = $f - 1$



$$h \times \frac{1}{M_{\text{Sustrato}}} \times g \times M_{\text{agua}} = i \quad i + M_{\text{agua}} = j$$

donde h = concentración de sustrato utilizada, en g/L

M_{agua} = peso molecular del agua, 18 g/mol

M_{glucosa} = peso molecular de la glucosa, 180 g/mol

i = concentración de agua necesaria para hidrólisis total, en g/L

j = concentración de agua necesaria para hidrólisis total del sustrato, en moles/L

porcentaje de alcoholisis en relación al agua necesaria para hidrólisis total del sustrato

$$j - 100\%$$

$$b - z$$

$$z = \% \text{ alcoholisis en reacción} = (b - 100) / j$$