



00551

35

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

29444.0

**ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE ALQUIL
GLUCOSIDOS POR HIDRÓLISIS INVERSA
CON UNA β -GLICOSIDASA HT, USANDO
COMO MODELO AL HEPTIL GLUCOSIDO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Maestría en Ciencias Bioquímicas

P R E S E N T A:

MARÍA DEL CONSUELO VÁZQUEZ LIMÓN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Los estudios de maestría fueron posibles gracias al apoyo económico otorgado por El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través de la beca crédito 138498, así como la beca de alimentación y hospedaje por parte del Instituto de Biotecnología.

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Tecnología Enzimática del Instituto de Biotecnología de la UNAM, bajo la asesoría del Dr. Agustín López Munguía Canales.

Jurado asignado:

Presidente	Dr. Eduardo Bárzana García
Secretario	Dr. Agustín López Munguía Canales
Vocal	Dr. José Mariano García Caribay
Suplente	Dra. Brenda Valderrama Blanco
Suplente	Dra. Rosana Sánchez López

Agradecimientos.

Al Dr. Agustín López Munguía por asesorar este trabajo, por darme la oportunidad de colaborar en su equipo, por sus enseñanzas, paciencia y amabilidad.

A los miembros del comité tutorial: Dr. Rafael Vázquez Duhalt y Dr. Leobardo Serrano por sus aportaciones durante el desarrollo de este trabajo.

A los miembros del jurado por su valiosa contribución para la adecuada presentación de este trabajo.

Al Dr. Edmundo Castillo por sus valiosas discusiones.

Al TLC. Fernando González por el apoyo técnico.

A mis padres Jaime y Consuelo por todo su amor.

A mis hermanos, cuñados y sobrinos -- a quienes no nombro por economía de espacio -- porque de todos y cada uno obtengo esa inexplicable energía que me impulsa y me alienta.

A todo el equipo del laboratorio, los que están y los que se han ido, porque siempre me echaron una mano, pero sobre todo porque la mano siempre estuvo acompañada de una gran sonrisa.

Dedico este trabajo a mis cuates Edgar, Juan, Pablo y muy especialmente a Víctor porque este logro es fruto del esfuerzo de los dos y porque un logro compartido eleva su sabor y sustancia.

Para mí solo recorrer los caminos con corazón, cualquier camino con corazón. Por ahí yo recorro, y la única prueba que vale es atravesar todo su largo. Y por ahí yo recorro mirando, mirando, sin aliento.

Don Juan

CONTENIDO

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCION	2
III. HIPOTESIS	6
IV. OBJETIVOS	6
V. GENERALIDADES	6
V.1 Surfactantes.	6
V.2 Alquil glicósidos.	8
V.3 Uso de enzimas en la producción de alquil glicósidos.	9
V.4 Microorganismos extremófilos	11
V.5 β -glicosidasas.	12
V.6 β -glicosidasas de microorganismos extremófilos.	14
V.7 β -glicosidasas termoestables.	15
VI. MATERIALES Y METODOS	17
VI.1 Caracterización cinética y fisicoquímica de la β -gli HT	17
VI.2 Síntesis de heptil glucósido catalizada por la β -gli HT.	22
VI.3 Recuperación del producto por adsorción	26
VI.4 Cálculo de las constantes de equilibrio	26
VII. RESULTADOS Y DISCUSION	28
VII.1 Caracterización cinética y fisicoquímica	28
VII.2 Síntesis de heptil-glucósido con la β -gli HT.	38
VII.3 Uso de cosolventes	48
VII.4 Recuperación del producto por adsorción en diferentes soportes	51
VIII. CONCLUSIONES	52
IX. PERSPECTIVAS	53
X. BIBLIOGRAFIA	54

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de un surfactante y como ejemplo la estructura del heptil glucósido.	7
Figura 2. Representación esquemática de las reacciones de alcoholólisis e hidrólisis inversa	9
Figura 3. Mecanismo de inversión (A) y retención (B) de la configuración del carbono anomérico propuesto para las glucosidasas.	14
Figura 4. Ejemplo de un cromatograma con la columna C18 Supelcosil	24
Figura 5. Ejemplo de un cromatograma con la columna aminada	25
Figura 6. Efecto del pH en la actividad β -gli HT a 90°C.....	29
Figura 7. PAGE nativo, 7.5% acrilamida.	31
Figura 8. SDS-PAGE, 10% acrilamida.....	32
Figura 9. SDS-UREA-PAGE, urea 3M, 10% acrilamida.	32
Figura 10. Cinética de hidrólisis de ONPGal por la enzima β -gli HT, en presencia de hexil-glucósido, pH 5.5, 90°C.....	35
Figura 11. Cinética de hidrólisis de ONPGal por la enzima β -gli HT en presencia de heptil-glucósido, pH 5.5, 90°C.....	35
Figura 12. Cinética de hidrólisis de lactosa por la enzima β -galactosidasa de <i>E. coli</i> , usando como inhibidor al heptil-glucósido, pH 7.0, 37°C	36
Figura 13. Producción de heptil glucósido en dos fases (1:1) por alcoholólisis e hidrólisis inversa (heptil glucósido medido en la fase orgánica)	40
Figura 14. Efecto del pH en el equilibrio de la reacción de hidrólisis inversa	41
Figura 15. Efecto de la temperatura en el equilibrio de la reacción de hidrólisis inversa	41
Figura 16. Producción de heptil glucósido en dos fases por hidrólisis inversa con distintas proporciones de fases orgánica y acuosa. A: 1/1. B: 3/1. C: 9/1.....	42
Figura 17. Cinéticas de producción de heptil glucósido por hidrólisis inversa, sistema bifásico 9:1, usando concentraciones altas de glucosa	45
Figura 18. Velocidades iniciales de las reacciones de síntesis de heptil glucósido, sistema bifásico 9:1, usando concentraciones altas de glucosa.....	46

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ejemplos de las principales enzimas empleadas en la síntesis de alquil glucósidos en publicaciones recientes.....	10
Tabla 2. Uso de β -glucosidasas mesofílicas en la producción de alquil glucósidos.	11
Tabla 3. Estabilidad térmica de la β -gli HT a 90°C	28
Tabla 4. Parámetros cinéticos de la β -gli HT a 90°C, pH 5.5, actuando sobre diferentes sustratos. Peso molecular aproximado de la enzima: 120 kDa.....	30
Tabla 5. Efecto de la adición de proteasas en la pendiente de la cinética de hidrólisis de ONPGal por la β -gli HT.....	37
Tabla 6. Cálculo de las velocidades iniciales para la reacción de hidrólisis inversa con diferentes proporciones de fases orgánica y acuosa.	43
Tabla 7. Concentraciones finales y conversiones de la síntesis de heptil glucósido en dos fases por hidrólisis inversa con distintas proporciones de fases orgánica y acuosa	43
Tabla 8. Actividad residual de la β -gli HT en un sistema bifásico: inactivación interfacial....	44
Tabla 9. Rendimiento y productividad de las reacciones de síntesis de heptil glucósido, sistema bifásico 9:1, a concentraciones altas de glucosa	47
Tabla 10. Cálculo de las constantes de equilibrio para las reacciones de síntesis de heptil glucósido a altas concentraciones de glucosa.	47
Tabla 11. Actividad de la enzima β -gli HT en medio acuoso con ONPGlu 2mM como sustrato, después de incubar con DMF	48
Tabla 12. Inactivación de la enzima β -gli HT en el medio de reacción.	50

I. RESUMEN

El uso de enzimas hipertermofílicas para la síntesis de alquil-glucósidos en medio acuoso y en solventes orgánicos tiene evidentes ventajas ya que a altas temperaturas hay efectos favorables sobre la velocidad de reacción y la solubilidad del sustrato. En el presente trabajo se aplicó una enzima β -glucosidasa hipertermofílica comercial (Diversa Corp.) para la síntesis de alquil glucósidos en un sistema bifásico, a partir de glucosa y heptanol en reacción de hidrólisis inversa. Inicialmente se caracterizó la enzima en medio acuoso, determinando temperatura y pH óptimos, así como estabilidad a 90°C. Se evaluó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida la pureza de la preparación comercial, comprobándose en geles de proteína y de actividad que se trata de una sola proteína que posee actividad tanto de β -glucosidasa como de β -galactosidasa. Se obtuvieron los parámetros cinéticos a 90°C, pH 5.5, para la hidrólisis de diversos sustratos sobre los que la enzima puede actuar: celobiosa, lactosa, O-nitrofenil glucopiranosido, O-nitrofenil galactopiranosido, heptil glucopiranosido y hexil glucopiranosido. Se encontró que los alquil-glucósidos afectan la actividad de la enzima comportándose como inhibidores competitivos.

Se estudiaron diversas alternativas para la obtención de heptil-glucósidos por síntesis enzimática catalizada por la β -glucosidasa hipertermofílica, encontrando que la mayor productividad se obtiene cuando se lleva a cabo la reacción de condensación de glucosa con heptanol en un sistema bifásico en el que se disminuye la actividad de agua elevando la concentración de glucosa en la fase acuosa. En estas condiciones se logra obtener 5.26 g/l de heptil glucósido, a partir de soluciones de glucosa de 1 a 3 M. A pesar de la elevada productividad, el sistema se ve limitado por el equilibrio de la reacción que impide obtener conversiones superiores al 12 %.

II. INTRODUCCION

Los alquil glicósidos o alquil poliglicósidos como son conocidos los productos manufacturados industrialmente, son un ejemplo clásico de productos que por mucho tiempo fueron únicamente de interés académico. El primer alquil glicósido fue sintetizado e identificado por Emil Fischer hace más de 100 años y la primer patente que describe el uso de alquil glicósidos en detergentes fue registrada en Alemania 40 años después. Pasaron otros 40 o 50 años para que los equipos de investigación de algunas compañías dirigieran su atención a los alquil glicósidos y desarrollaran procesos para la producción de alquil poliglicósidos. El trabajo inicial de Fischer, que involucra la reacción de la glucosa con alcoholes hidrofílicos como metanol, etanol, glicerol, etc., fue aplicado después para alcoholes de cadenas más largas desde C_8 hasta C_{16} . En los procesos industriales no se obtienen alquil monoglicósidos puros sino una mezcla de alquil mono-, di-, tri- y oligoglicósidos, debido a esto, los productos industriales se denominan alquil poliglicósidos y son caracterizados por el largo de la cadena alquilo y el número promedio de unidades de glucosa unidas o grado de polimerización (von Rybinsky y Hill, 1998).

En la década de los 70's Rohm-Haas (USA) fue la primera compañía en introducir al mercado un octil/decil ($C_{8/10}$) poliglicósido en cantidades comerciales, seguida por BASF (Alemania) y SEPPIC (Francia). Sin embargo, debido al bajo desempeño de este producto de cadena corta como surfactante y a la presencia de color, las aplicaciones fueron limitadas a unos cuantos segmentos del mercado, por ejemplo para la limpieza de botellas. La calidad de los alquil poliglicósidos ha sido mejorada en los últimos años y algunas compañías ofrecen octil/decil poliglicósidos de mayor pureza y calidad. Desde el inicio de la década de los 80's diversas compañías han desarrollado programas con el objeto de aumentar el largo de cadena de los alquil poliglicósidos ($C_{12/14}$) para su aplicación en las industrias de cosméticos y de detergentes, dada la relación directa entre el largo de la cadena alifática y su poder surfactante. (von Rybinsky y Hill, 1998).

En la síntesis de glicósidos, un azúcar polifuncional se combina con un nucleófilo tal como un alcohol, un carbohidrato o una proteína. Las reacciones de glicosilación requieren de métodos especiales de activación, el uso de grupos protectores dada la inespecificidad de la reacción química, o la aplicación de una enzima altamente selectiva. En principio, los procedimientos enzimáticos o microbianos para la producción de alquilglicósidos, en virtud de su selectividad, pueden reemplazar los procesos químicos que requieren de complicados pasos de protección y desprotección. Sin embargo el uso de enzimas en estas reacciones no ha sido aún ampliamente explotado y las aplicaciones hasta ahora están limitadas al laboratorio (von Rybinsky y Hill, 1998).

Desde el inicio de la década de los 80's, se ha mostrado claramente que las enzimas pueden ser usadas en solventes orgánicos con gran eficiencia, (Kirchner *et al.*, 1985) actualmente uno de los retos para los químicos orgánicos es el usar el poder catalítico y la especificidad de sustratos de las enzimas en solventes orgánicos con el propósito de sintetizar diversos compuestos (Vic *et al.*, 1997). El uso de solventes orgánicos en la síntesis enzimática ha sido estimulado por diversos factores. Principalmente que la mayoría de los compuestos orgánicos son altamente solubles en solventes no acuosos, por lo que las biotransformaciones se pueden llevar en estos medios a escala preparativa. Se distingue también que mediante el empleo de solventes orgánicos se adquiere la capacidad de modificar el equilibrio de una reacción naturalmente hidrolítica hacia la síntesis (Vic *et al.*, 1997). Actualmente diversos productos como ésteres o pequeños péptidos son obtenidos eficientemente usando lipasas o proteasas, respectivamente en medios orgánicos (Bloomer *et al.*, 1992, Ricca y Crout, 1989); por último, en medios orgánicos la termoestabilidad de la enzima se ve mejorada generalmente (Zaks y Klibanov, 1984) e incluso es posible modificar la especificidad enzimática (Rubio *et al.*, 1991). Mas aún, puesto que las enzimas no son solubles en solventes orgánicos, son fácilmente recuperadas y reutilizadas (Vic *et al.*, 1997).

Se han desarrollado diversos sistemas de reacción para utilizar enzimas en solventes orgánicos: los sistemas sólido-líquido en los que la enzima (libre o inmovilizada) se suspende en el solvente que puede ser anhidro o hidratado; los sistemas líquido-líquido, formados por una fase acuosa donde se disuelve la enzima y una fase insoluble en agua; y los sistemas de microemulsión donde la enzima se disuelve dentro de una micela invertida que a su vez se distribuye en el solvente no polar. La mayoría de las enzimas usadas en estos sistemas comprenden lipasas, proteasas u oxidasas; en comparación, para las glicosilhidrolasas el número de reportes es sensiblemente menor. (Vic *et al.*, 1997)

En los últimos años se han reportado diversos trabajos que tratan sobre la síntesis enzimática de alquil glicósidos, y se abordan diversas estrategias para el uso de glicosilhidrolasas en medios orgánicos, entre las que podemos mencionar el uso de cosolventes miscibles en agua, como ácidos organoborados para solubilizar los azúcares (Park y Lee 1992) o solventes de bajo peso molecular (Vic *et al.*, 1997), e incluso algunos éteres como mono y di-etilenglicol dimetil éter (Park *et al.*, 2000); el desarrollo en sistemas bifásicos, donde el solvente inmisible en agua es el mismo alcohol aceptor (Panintrarux *et al.*, 1995, Shinoyama *et al.*, 1991a,b); y medios monofásicos compuestos del solvente saturado con agua (García-Garibay *et al.*, 2000 a,b; Ismail *et al.*, 1999). Los objetivos de estos trabajos son muy diversos y solo en unos cuantos se interesan en desarrollar un método eficiente de producción de alquil glicósidos. Tales son los casos de Kobayashi *et al.* (2000) quien propone un proceso de extracción continua para la síntesis de hexil glucósido y de Park *et al.* (2000) donde se adiciona glucosa de manera escalonada para incrementar los rendimientos de la reacción de síntesis de alquil glucósidos (C8 a C12) en un medio monofásico heterogéneo.

Por otro lado, los aspectos que se abordan en el resto de los trabajos tienen que ver con la factibilidad de la reacción, por lo que evalúan el efecto del medio de reacción (uso de solventes orgánicos), el papel de las enzimas o bien el uso de diferentes sustratos y aceptores. En varios de ellos se analiza el efecto de los solventes y de la

actividad del agua sobre la estabilidad de la enzima y sobre el equilibrio entre la síntesis y la hidrólisis de alquil glucósidos (Chahid *et al.*, 1992; Ljunger *et al.*, 1994; Laroute y Willemot, 1992a, Vulfson *et al.*, 1990; Vic *et al.*, 1997).

En un trabajo realizado recientemente por García-Garibay *et al.* (2000a) se empleó una enzima comercial hipertermofílica para sintetizar heptil glicósidos en un medio monofásico orgánico, abriendo la posibilidad de trabajar a altas temperaturas con las consecuentes ventajas al poder solubilizar mayores cantidades de azúcar. La limitante en este trabajo en particular, y de los sistemas hasta ahora reportados en lo general, es que las productividades alcanzadas son bajas debido a que o bien se manejan pequeñas concentraciones de azúcar dada su escasa solubilidad en el medio orgánico, o bien los tiempos de reacción son largos y las conversiones bajas. En el trabajo de García-Garibay *et al.* (2000a) se concluye también que la conversión está limitada por una fuerte inhibición por producto y la formación de oligosacáridos a concentraciones altas de sustrato.

III. HIPOTESIS

Dado que las enzimas termofilicas presentan ventajas sobre las enzimas mesofilicas en cuanto a estabilidad y eficiencia en solventes orgánicos, es posible diseñar un método para la producción de heptil glucósido basado en la condensación de glucosa y heptanol catalizada por la β -gli HT, con altas productividades.

IV. OBJETIVOS

General:

- ✓ Desarrollar un sistema eficiente para la obtención de heptil-glucósido por síntesis enzimática catalizada por la β -glucosidasa hipertermofílica CloneZyme 001-02 (Diversa, Corp.).

Particulares:

- ✓ Caracterizar cinética y fisicoquímicamente en medio acuoso la β -glucosidasa hipertermofílica (β -gli HT).
- ✓ Comparar las alternativas de diversos sistemas de reacción para la síntesis de heptil-glucósido.
- ✓ Proponer una estrategia de producción de heptil-glucósido basada en la condensación de glucosa con heptanol, catalizada por la β -gli HT.

V. GENERALIDADES

V.1 Surfactantes.

Los surfactantes son moléculas anfífilicas que tienden a distribuirse preferencialmente en la interfase de fluidos con diferente grado de polaridad o enlace de hidrógeno, tal como interfases aceite-agua o aire-agua. La formación en la interfase de dicha película molecular ordenada disminuye la energía interfacial (tensión interfacial) y es responsable de las propiedades que distinguen a las moléculas surfactantes. Además de disminuir la tensión interfacial, esta película molecular puede

también dominar el comportamiento reológico interfacial y la transferencia de masa (Lin, 1996).

En el año de 1995, la producción mundial de surfactantes se estimaba por encima de 3×10^6 toneladas al año, con un valor estimado en 4 billones de dólares, de los cuales el consumo como detergentes para limpieza era de 54% de la producción total, donde el 32% fue destinado para uso industrial. Los tensoactivos actualmente disponibles en el mercado se pueden clasificar como surfactantes aniónicos (66%), no iónicos (24%), catiónicos (9%) y anfotéricos (1%) (Sarney y Vulfson, 1995).

Considerando la estructura anfifílica de un surfactante típico con una cabeza hidrofílica y una cola hidrofóbica (figura 1), el reto ha sido, desde hace muchos años, el incorporar carbohidratos en la estructura de tensoactivos, dado que estas moléculas forman una cabeza hidrofílica perfecta al contener numerosos grupos hidroxilo. Sólo algunos azúcares cumplen con los criterios de precio, calidad y disponibilidad para ser aceptables como materia prima en un proceso industrial; tales azúcares son la sacarosa de remolacha o de caña de azúcar, la glucosa, derivada de almidones, y el sorbitol, un derivado hidrogenado de la glucosa. (Hill y Rhode; 1999)

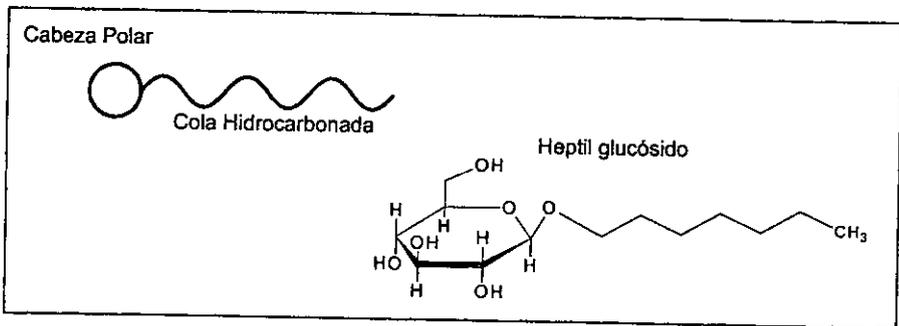


Figura 1. Representación esquemática de un surfactante y como ejemplo la estructura del heptil glucósido.

Los glico-surfactantes cuya estructura está basada en un azúcar, tales como ésteres de sorbitano, ésteres de sacarosa, alquil poliglucósidos y glucamidas de ácidos grasos, han cobrado mayor interés debido a sus ventajas en cuanto a desempeño, inocuidad y biodegradabilidad, en comparación con algunos de los surfactantes típicos. Los ésteres de sorbitano y sus derivados etoxilados son productos bien establecidos que se usan principalmente como emulsificantes para alimentos en un volumen de

aproximadamente 15000 ton/año. Los ésteres de sacarosa son productos relativamente hidrofóbicos, con un mercado actual estimado en cerca de 4000 ton/año y cuya principal aplicación es en alimentos y cosméticos (Hill y Rhode 1999).

Los alquil poliglicósidos y glucamidas de ácidos grasos revelan una perfecta estructura anfifílica, excelente capacidad surfactante y alta solubilidad, además de que su síntesis es altamente selectiva. Recientemente se han desarrollado procesos industriales para la síntesis química de alquil poliglicósidos con una capacidad total de 80 000 ton/año (Hill y Rhode 1999).

Estos surfactantes son usados principalmente en cosméticos, lavatrastes y como detergentes para muchas otras aplicaciones. Hoy en día, existe una compañía que usa de manera exclusiva glucamidas de ácidos grasos en detergentes líquidos y en polvo. La capacidad de producción estimada es de 40 000 ton/año. Estos dos productos son comparables en cuanto a su perfil de desempeño como cosurfactantes, y difieren entre sí básicamente por la materia prima con la que se elaboran: mientras que para las glucamidas de ácidos grasos se requiere incorporar metil amina, los alquil poliglicósidos se producen completamente a partir de fuentes renovables. Este factor, combinado con su buen desempeño y suavidad, podría ser la razón por la cual los alquil poliglicósidos son ahora los glico-surfactantes más exitosos (Hill y Rhode 1999).

V.2 Alquil glicósidos.

Tradicionalmente, los alquil glicósidos se obtienen por procesos químicos, lo que lleva a obtener una mezcla de productos. Para obtener compuestos químicamente definidos se requieren varios pasos de protección - desprotección de grupos hidroxilo reactivos así como la activación del carbono anomérico de los azúcares (Brown *et al.*, 1970).

Las primeras síntesis de alquil poliglucósidos se llevaron a cabo desde hace más de 100 años. Posteriormente se desarrollaron procesos basados en la reacción de la glucosa con alcohol donde se usaron alcoholes de cadenas largas, de entre C8 y C16; el resultado de esta reacción es una mezcla compleja de alquil mono, di, tri y oligoglucósidos en una mezcla de anómeros α y β , por lo tanto, los productos industriales son llamados alquil poliglucósidos y se caracterizan por el largo de la

cadena alquilo y el número promedio de glucosas sustituidas, es decir el grado de polimerización (Hill y Rhode; 1999).

Un método alternativo para la producción de alquil glicósidos es la síntesis enzimática, que es un método directo y puede realizarse bajo condiciones de reacción menos severas; además de que se puede obtener un producto de alta pureza enantiomérica. Se ha mostrado que la síntesis y propiedades de los alquil glicósidos dependen del largo de la cadena carbonada; de hecho, al disminuir el largo de la cadena del grupo alquilo, se incrementa el rendimiento de producción (Chahid *et al.*, 1994). Sin embargo, una disminución en el largo de la cadena va acompañado de un decremento en la solubilidad del producto en medio orgánico (Adelhorst *et al.*, 1990).

V.3 Uso de enzimas en la producción de alquil glicósidos.

La síntesis enzimática de alquil-glicósidos se puede llevar a cabo mediante dos mecanismos de reacción: transglicosidación o hidrólisis inversa, siendo la diferencia entre las dos estrategias la naturaleza del donador del grupo glicosilo (figura 2). En la transglicosidación (alcoholólisis) el aceptor del glicosilo es un alcohol y el donador puede ser un disacárido, un polisacárido o un azúcar activado (Ismail y Ghoul, 1996; Vic *et al.*, 1996), mientras que en la hidrólisis inversa la enzima cataliza la condensación directa de un azúcar (generalmente un monosacárido) con el alcohol sin formación de subproductos.

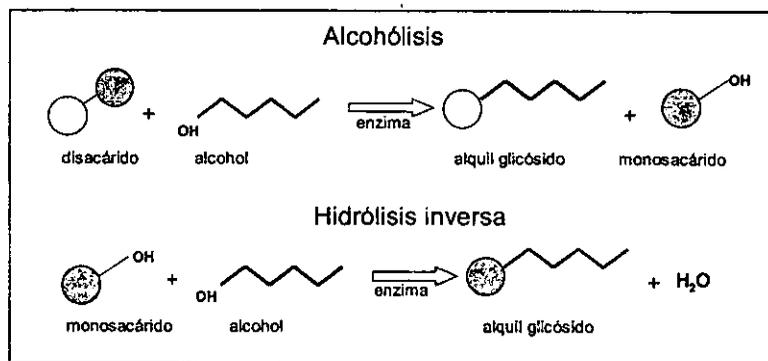


Figura 2. Representación esquemática de las reacciones de alcoholólisis e hidrólisis inversa

La alcoholólisis es un caso particular de reacciones de transglicosidación que en las reacciones comunes de las glicosidasas da lugar por lo general a la formación de oligosacáridos. La reacción de alcoholólisis catalizada por la β -galactosidasa se describió por primera vez en 1912 (Wallenfels y Malhotra, 1961). La β -galactosidasa es una enzima glicolítica que cataliza la hidrólisis de lactosa en medio acuoso, rindiendo glucosa y galactosa. Cuando se agrega un alcohol al medio éste puede sustituir al agua dando lugar a un alquil-galactósido.

La obtención de alquil glicósidos a partir de diversos sacáridos como xilobiosa, celobiosa, lactosa e incluso almidón, se ha llevado a cabo empleando una gran variedad de enzimas que catalizan la reacción ya sea de transglicosidación o condensación. Un panorama de esta situación se presenta en la tabla 1.

Tabla 1. Ejemplos de las principales enzimas empleadas en la síntesis de alquil glicósidos en publicaciones recientes

Enzima	Fuente	Sustrato	Referencia
β -xilosidasa	<i>A. niger</i>	Xilosa y xilobiosa	Shinoyama <i>et al.</i> , 1988, Drouet <i>et al.</i> , 1994
β -glucosidasa	Almendra	Celobiosa, glucosa	Laroute y Willemot, 1992 a,b; Ismail y Ghoul, 1996 Ver tabla 2.
β -galactosidasa	<i>K. lactis</i> , <i>A. oryzae</i>	Lactosa	Stevenson <i>et al.</i> , 1993, Ismail <i>et al.</i> , 1999.
Invertasa	<i>S. cerevisiae</i>	Sacarosa	Selisko <i>et al.</i> , 1990, Rodríguez <i>et al.</i> , 1997
α -amilasa	<i>A. niger</i>	Almidón	Santamaría <i>et al.</i> , 1999
Glucoamilasa	<i>Rhizopus sp</i>	Almidón	Shin <i>et al.</i> , 2000
α -manosidasa	Haba	Manosa	Dintinger <i>et al.</i> , 1994
β -manosidasa	<i>A. niger</i>	Manobiosa	Itoh y Kamiyama, 1995

La mayoría de los trabajos acerca de la síntesis enzimática de alquil-glicósidos por hidrólisis inversa o transglicosidación emplean β -glucosidasas. Las diversas estrategias empleadas tienen en común que el sistema de reacción posee baja actividad de agua, de manera que el equilibrio de la reacción de hidrólisis, que es la

reacción natural de las glicosidasas, se desplaza hacia la síntesis. Entre las β -glucosidasas reportadas a la fecha para la producción de alquil glucósidos se encuentra con mayor frecuencia la β -glucosidasa de almendra. Como se puede observar en la tabla 2, tanto las glicosidasas microbianas como la de almendra son enzimas mesófilas cuya principal limitación es la baja productividad debido a que la reacción de hidrólisis inversa es muy lenta. La mayor parte de los procesos desarrollados con glucosidasas usan glucosa como sustrato por lo que la reacción requiere varios días para alcanzar el equilibrio, lo que favorece la desnaturalización de la enzima.

Tabla 2. Uso de β -glucosidasas mesofílicas en la producción de alquil glucósidos.

Origen	Temp (°C)	Sustrato	Alcohol aceptor	% conversión	Productividad mol l ⁻¹ h ⁻¹	Autor
Almendra	50-60	Glucosa	C6 a C12	58% para C8 50mM en 25 días	8.33 x 10 ⁻⁵	Panintrarux <i>et al.</i> , 1995, 1996, 1997
<i>Trichoderma viride</i>	30	Celobiosa y glucosa	C1 a C8	6% para C7 3.6mM en 2 días	7.5 x 10 ⁻⁵	Shinoyama <i>et al.</i> , 1991a
Almendra	45	Glucosa	C8	8% 17mM en 6 días	1.16 x 10 ⁻⁴	Vic <i>et al.</i> , 1997
Almendra	40	Glucosa	C2 a C6	6% para C6 1mM en 3 días	1.4 x 10 ⁻⁵	Laroute y Willemot, 1992a
Harina de almendra	60	Glucosa	C3, C6 y C8	13% para C8 2.2mM en 2 días	4.58 x 10 ⁻⁵	Chahid <i>et al.</i> , 1992
Almendra	50	Glucosa	C8	10% aprox 30mM en 4 días	3.12 x 10 ⁻⁴	Ljunger <i>et al.</i> , 1994
Almendra	60	Glucosa	C4	44% 40mM en 5 días	3.38 x 10 ⁻⁴	Ismail y Ghoul, 1996

V.4 Microorganismos extremófilos

Los organismos extremófilos habitan ambientes extremos como manantiales de agua muy caliente (los denominados geysers), aguas árticas, manantiales geotérmicos ricos en azufre, aguas calientes salinas, o hábitats extremadamente ácidos o alcalinos, o con alta fuerza iónica, metales pesados o altas presiones. Estos microorganismos son

capaces de tener un crecimiento óptimo en uno o más de los extremos citados, de hecho, condiciones moderadas pueden ser fatales para algunos de estos microorganismos (Kelly y Adams, 1994).

Los microorganismos hipertermófilos tienen su temperatura óptima de crecimiento entre 80 y 110°C (Stetter, *et al.*, 1990). Dichos microorganismos fueron descubiertos en la década de los ochenta logrando aislar una cantidad significativa de especies que se agrupan en alrededor de 20 géneros (Adams, 1993; Halio *et al.*, 1996). Con algunas excepciones, todos los microorganismos hipertermófilos pertenecen al dominio Archaea (Woese, *et al.*, 1990) que incluye 17 géneros de termófilos y extremo termófilos (Halio *et al.*, 1996; Herbert, 1992). Los archaea crecen en altas concentraciones de sal, la mayoría son anaerobios estrictos, proteolíticos y dependen de la reducción de azufre elemental para crecer (Kengen *et al.*, 1993; Kelly y Adams, 1994). Estos microorganismos son una buena fuente de enzimas de interés industrial por su alta estabilidad en condiciones extremas de pH, temperatura, fuerza iónica, etc., y por su reducido riesgo de contaminación (Aguilar, 1996).

Las enzimas de los microorganismos extremófilos se conocen con el nombre de extremozimas. Las hay que pueden funcionar a temperaturas cercanas al punto de fusión del agua; otras resisten temperaturas de hasta 140°C en medio acuoso, o trabajan en soluciones saturadas de sal, a altas presiones, e incluso en presencia de determinados solventes que enzimas convencionales difícilmente resistirían (Adams *et al.* 1995).

Las ventajas del uso de extremozimas en aplicaciones industriales son su gran estabilidad, los reducidos riesgos de contaminación bacteriana, mayor solubilidad del sustrato al poder operar a altas temperaturas o en solventes orgánicos, y mayores tiempos de vida media a temperaturas normales de almacenamiento (Querol *et al.*, 1996).

V.5 β -glicosidasas.

Las glicosil hidrolasas son un grupo de enzimas ampliamente distribuido que hidrolizan varias conformaciones estereoquímicas de enlaces glicosídicos en carbohidratos. Estas enzimas se encuentran en casi todos los organismos y tienen

diferentes funciones biológicas, que van desde el procesamiento esencial de glucósidos en el cerebro de mamíferos hasta el rompimiento de la celobiosa, un producto de degradación de la celulosa. Las glicosil hidrolasas y enzimas relacionadas han sido clasificadas en más de 60 familias con base en la similitud de su secuencia de aminoácidos y de su estructura más que en la selectividad de sustrato. En la familia I de las glicosil hidrolasas se tienen identificadas las siguientes actividades: β -glucosidasa (EC 3.2.1.21); β -galactosidasa (EC 3.2.1.23); 6-phospho- β -galactosidasa (EC 3.2.1.85); 6-phospho- β -glucosidasa (EC 3.2.1.86); lactasa-florizina hidrolasa (EC 3.2.1.62), (EC 3.2.1.108); β -manosidasa (EC 3.2.1.25); y mirosinasa (EC 3.2.3.1) (Henrissat y Bairoch 1993).

De acuerdo al mecanismo con el que actúan, las glicosil hidrolasas y glicosil transferasas se dividen en dos clases: aquellas que hidrolizan el enlace glicosídico con retención de la configuración anomérica y aquellas que lo hacen invirtiendo la configuración (figura 3). La familia I de las glicosil hidrolasas posee el mecanismo de retención de la configuración. En el mecanismo de retención, el oxígeno del enlace glicosídico es protonado por el ácido catalítico, con asistencia nucleofílica por la base del segundo carboxilo catalítico, para la salida del primer producto de hidrólisis. Se forma así el intermediario glicosil-enzima invirtiéndose la configuración. Sobre este intermediario actúa una molécula de agua en un segundo ataque nucleofílico en el carbono anomérico, llevando a cabo una segunda inversión de la configuración, y generando así el producto con la misma estereoquímica del sustrato. En el mecanismo de inversión de la configuración, la protonación del oxígeno glucosídico y el ataque de la molécula de agua que es activada por el residuo del ácido catalítico que actúa como base son simultáneos. De esta manera, libera simultáneamente los productos de la hidrólisis, dando lugar a un producto con estereoquímica opuesta a la del sustrato (McCarter y Withers, 1994; Davies y Henrissat, 1995).

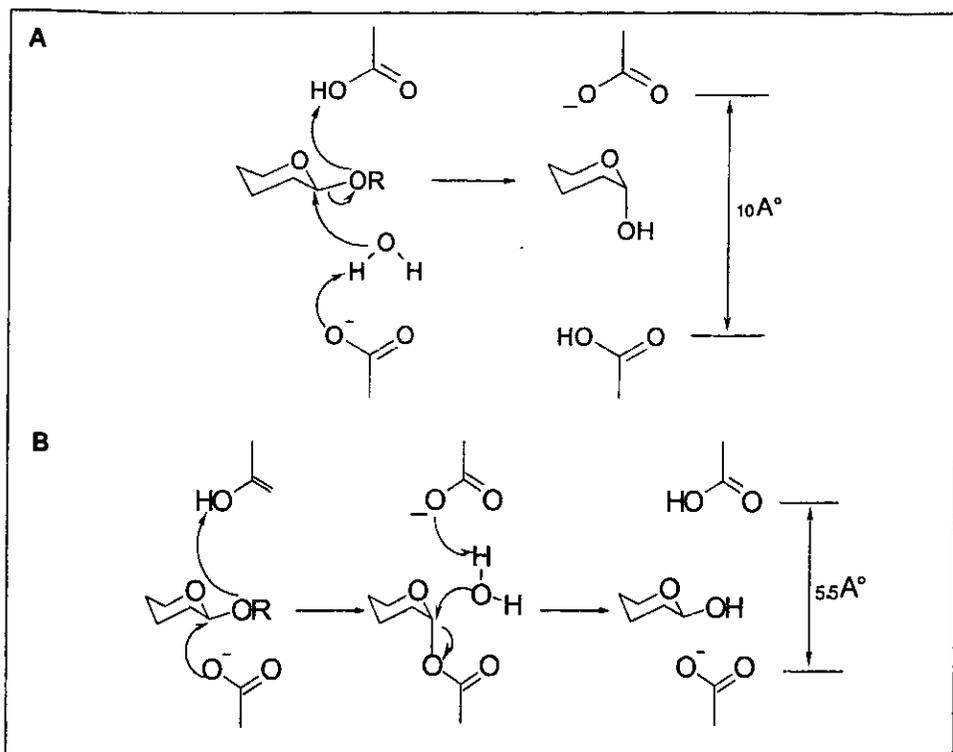


Figura 3. Mecanismo de inversión (A) y retención (B) de la configuración del carbono anomérico propuesto para las glucosidasas. McCarter *et al.*, 1994.

V.6 β-glicosidasas de microorganismos extremófilos.

Existen a la fecha varios reportes que conjuntan información acerca de las propiedades de las enzimas extremófilas. A continuación se detallan algunos trabajos de caracterización de glicosidasas termoestables obtenidas de diversos microorganismos hipertermofílicos, que proponen una interpretación de las bases moleculares que les confieren a tales enzimas las propiedades de termoestabilidad y actividad que las caracterizan.

La β-glicosidasa obtenida de *Thermosphaera aggregans*, un microorganismo aislado del Parque Nacional de Yellowstone, pertenece a la familia I de las glicosil hidrolasas (Chi *et al.* 1999). La estructura cristalina revela que es un homotetrámero con estructura muy similar a la de la β-glicosidasa de *Sulfolobus solfataricus*. La

comparación de la estructura con contrapartes mesofílicas sugiere que la termoestabilidad es alcanzada por diferencias estructurales que radican en la molécula entera sin grandes cambios en el plegamiento global de la cadena polipeptídica. Estos factores incluyen incrementos en el número de puentes de hidrógeno, en el número de pares iónicos, en las interacciones entre las subunidades así como sustituciones de residuos hidrofóbicos y una reducción del área superficial por el acortamiento de los rizos que conectan y/o por un decremento en el número de cavidades. Esta enzima tiene especificidad por diversos sustratos como β -D-fucósidos β -D-glucósidos y β -D-galactósidos (Chi *et al.* 1999).

La β -glicosidasa de *Pyrococcus furiosus* (familia I de las glicosil hidrolasas) es también un homotetrámero de 230 ± 2 kDa, con subunidades de 58 ± 2 kDa; la especificidad de esta enzima es amplia, y entre sus sustratos se encuentran los β -D-glucósidos, β -D-galactósidos, β -D-xilósidos y β -D-manósidos. Presenta también similitud con la β -glicosidasa de *Sulfolobus solfataricus* (Kengen *et al.* 1993).

El estudio de Aguilar *et al.* (1997) con la β -glicosidasa de *Sulfolobus solfataricus* (aislado del cráter del Solfatara en Nápoles) revela que esta enzima también es un homotetrámero de peso molecular entre 220 y 240 kDa. Aguilar *et al.* (1997) proponen que las diferencias de las enzimas termófilas con su contraparte mesófila se deben a: 1) Una gran proporción de pares iónicos en la superficie involucrados en redes que entrecruzan secuencialmente estructuras separadas de la superficie de la proteína. 2) Un gran número de moléculas de solvente atrapadas en las cavidades hidrofílicas entre estructuras separadas secuencialmente. Esto lleva a generalizar que la estabilidad de enzimas termofílicas, comparada con sus contrapartes mesofílicas, es proporcionada por una resiliencia (resistencia al choque o no fragilidad) en la estructura en vez de rigidez (Aguilar, *et al.* 1997).

V.7 β -glicosidasas termoestables.

Las proteínas termoestables son usualmente más resistentes a solventes orgánicos que sus contrapartes mesofílicas (Chi *et al.*, 1999). Actualmente como resultado de técnicas de manipulación genética la compañía Diversa Corp. (San Diego, CA) produce entre otras, glicosidasas termorresistentes para su uso en la hidrólisis de

sacáridos, en la caracterización de proteínas y glicosilación de lípidos. Cuentan con una biblioteca de glicosidasas (Glycosidase CloneZyme) que incluye diferentes enzimas con gran variedad de actividades y que son potencialmente aplicables en un amplio espectro de reacciones de hidrólisis y síntesis de moléculas que contienen azúcar. La enzima usada en este trabajo pertenece a dicha colección (CloneZyme GLY-001-02) y fue escogida debido a su amplia especificidad de sustrato, según se señala en la ficha técnica, esta enzima actúa sobre los enlaces β de varios azúcares, incluyendo β -D-celobiosa, β -D-galactosido, β -D-glucosido, β -D-fucosido, β -D-xilosido, α -L-arabinopiranosido, β -D-lactosa, y en menor grado, β -D-manosa.

VI. MATERIALES Y METODOS

VI.1 Caracterización cinética y fisicoquímica de la β -gli HT

VI.1.1 Preparación de la enzima.

Cada vial de 10 mg de enzima β -gli HT (CloneZyme Gly-001-02, Diversa Corp.) se rehidrató en 5 ml de regulador de acetatos 0.1M, pH 5.5.

VI.1.2 Determinación de proteína

Se determinó la concentración de proteína total siguiendo el método de Lowry, usando albúmina bovina como patrón (490 mg proteína/l).

VI.1.3 Determinación de pH óptimo.

Se midió la actividad hidrolítica de la β -gli HT a 90°C a 10 valores diferentes de pH entre 3.5 y 8; el sustrato empleado fue celobiosa. Para pH de 3.5 a 5.5 se empleó regulador de acetatos 0.1 M, mientras que para pH de 6 a 8 se empleó regulador de fosfatos 0.1 M. Se midió la velocidad inicial de la reacción de hidrólisis de celobiosa (25 g/l Sigma) a 90°C. La reacción se inició al agregar la enzima (0.0245 mg de proteína/ml) y se midió la glucosa liberada a diferentes tiempos de reacción en un analizador bioquímico YSI (Yellow Springs Instrument Co., Inc., Ohio, USA). La actividad se reporta en unidades por ml, siendo una unidad de actividad enzimática la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de glucosa por minuto. En el caso de la celobiosa, se liberan 2 moles de glucosa por cada mol de celobiosa hidrolizada, por lo que la concentración de glucosa medida se divide entre 2.

Para todos los ensayos realizados a pH 5.5 se utilizó una solución reguladora de acetatos 0.1 M, por lo que en lo sucesivo se refiere a ella como regulador pH 5.5.

VI.1.4 Estabilidad térmica.

Se incubó la β -gli HT a 90°C por 24 horas tomando muestras a diferentes tiempos y midiendo la actividad hidrolítica usando ONPGal (O-nitrofenil β -D-galactopiranosido) 2 mM como sustrato. El 100% de actividad corresponde a la actividad inicial (3.5 U/ml).

VI.1.5 Determinación de parámetros cinéticos.

Se determinaron los parámetros cinéticos de la β -gli HT para la hidrólisis a 90°C, pH 5.5, de varios glicósidos, todos ellos de la marca Sigma Chemical Co.: celobiosa (β -D-glucopiranosil (1-4) glucopiranosido), lactosa (β -D-galactopiranosil (1-4) glucopiranosido), ONPGlu (O-nitrofenil β -D-glucopiranosido), ONPGal (O-nitrofenil β -D-galactopiranosido), heptil-glucósido (n-heptil β -D glucopiranosido), hexil-glucósido (n-hexil β -D glucopiranosido).

Se midió la velocidad inicial de la reacción de hidrólisis para diferentes concentraciones de cada sustrato, usando dos concentraciones de enzima. La velocidad se calculó midiendo la glucosa liberada como se describe anteriormente, excepto en el caso del ONPGlu y ONPGal para los cuales la actividad se determinó espectrofotométricamente.

En un ensayo típico, se colocaron en un tubo de ensayo 0.9 ml de una solución del sustrato a la concentración correspondiente, en regulador pH 5.5, se incubó a 90°C en baño maría por 3 min y se inició la reacción agregando 0.1 ml de una preparación enzimática a la dilución adecuada. Las muestras de 0.02 ml se colocaron inmediatamente en hielo para medir posteriormente glucosa en el analizador bioquímico YSI.

Al hidrolizar una molécula de ONPGlu se obtiene una molécula glucosa y una de o-nitrofenol (ONP), siendo este último un compuesto que en solución alcalina es objeto de cambios tautoméricos que originan una coloración amarilla que puede ser cuantificada colorimétricamente y cuyo cambio con el tiempo puede relacionarse con la actividad enzimática. La absorbancia máxima del ONP se da a una longitud de onda de 420 nm.

En un ensayo típico usando ONPGlu u ONPGal como sustrato, se colocaron en una celda de cuarzo 0.9 ml de una solución a determinada concentración y se incubó dentro del espectrofotómetro (DU650 Beckman) a 90°C por 3 min, se inició la reacción agregando 0.1 ml de una preparación enzimática a la dilución correspondiente, se siguió la cinética en el espectrofotómetro, midiendo absorbancia a 420 nm cada 15 seg durante 3 min, obteniéndose la pendiente en la zona de velocidad inicial. El coeficiente

de extinción molar del ONP (0.3438 Abs/mM ONP) se calculó a partir de una curva patrón de ONP (0 – 0.2 μ mol/ml).

De acuerdo a la definición de actividad enzimática, se calcularon las velocidades iniciales a partir de las pendientes y su relación con la concentración molar de ONP liberado que es equivalente a la concentración molar de glucosa.

$$V_i = \left(\frac{m}{\epsilon_{420}} \right) = \frac{\mu\text{moles ONP}}{\text{ml} \cdot \text{min}} = \frac{\text{Unidades}}{\text{ml}}$$

V_i = velocidad inicial

m = pendiente de la recta

ϵ_{420} = coeficiente de extinción molar del ONP

Con los valores obtenidos de velocidades iniciales a diferentes concentraciones de sustrato, se obtuvieron los parámetros cinéticos V_{max} y K_m usando el método linealizado de Lineweaver - Burk.

VI.1.6 Determinación de pureza por electroforesis.

La evaluación del grado de pureza y peso molecular de la β -gli HT, se llevó a cabo mediante un análisis electroforético. Con el fin de identificar las bandas que corresponden a la enzima, se desarrolló una técnica para la detección de la actividad en gel. De igual forma se llevó a cabo un análisis electroforético en condiciones desnaturalizantes con el objeto de determinar si la enzima se compone de subunidades y si éstas poseen actividad. En estos ensayos se emplearon como agentes desnaturalizantes o reductores al β -mercaptoetanol, SDS (dodecil sulfato de sodio) y urea.

Todos los reactivos empleados para la electroforesis, si no se especifica de otra manera, fueron de la marca Bio-Rad.

Para revelar las bandas de proteína se usó una solución de azul de Coomassie R-250 (0.1% azul de Coomassie, 50% metanol, 0.1% ácido acético) en la que se incubó el gel durante 3 horas y posteriormente se colocó en una solución desteñidora (10% metanol, 10% ácido acético) hasta distinguir las bandas de proteína.

VI.1.6.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE)

La electroforesis en condiciones desnaturalizantes fue realizada de acuerdo al método Laemmli (1970) usando SDS al 0.1%. Se utilizó una cámara Mighty Small II, con geles de 1.5 mm de espesor. Las muestras fueron mezcladas con un volumen de amortiguador de muestra 2X que contenía Tris-HCl 0.125 M, pH 6.8, SDS 4%, β -mercaptoetanol 10% y azul de bromofenol 0.05%.

La concentración de acrilamida para los geles de separación y de concentración fue de 10% y 3% respectivamente. El peso molecular de la enzima se determinó tomando como referencia los pesos moleculares conocidos de un patrón de referencia que se corre junto con las muestras.

VI.1.6.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE-UREA)

Debido a la resistencia a la desnaturalización por calor que presenta la enzima por ser termoestable, se usaron condiciones de desnaturalización más drásticas, empleando urea como agente caotrópico. Para la preparación de los geles se siguió el mismo método que SDS-PAGE, adicionando además urea 3M. La solución amortiguadora de corrida se preparó agregando urea a una concentración final de 8M, y la muestra se preparó a una concentración final de urea de 7M.

VI.1.6.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturalizante o nativa (PAGE)

La preparación de los geles y soluciones amortiguadoras fue igual que para las condiciones desnaturalizantes, pero en este caso no se empleó ningún agente desnaturalizante (SDS, β -mercaptoetanol ni urea); la concentración de acrilamida en el gel de separación fue de 7.5%, y de 3% en el gel de concentración.

VI.1.6.4 Determinación de actividad de β -galactosidasa en geles de electroforesis

Para identificar la actividad β -galactosidasa en los geles de electroforesis bajo condiciones tanto desnaturalizantes como no desnaturalizantes, se realizó un ensayo de actividad usando X-gal como sustrato (5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-galactopiranosido de Sigma). Después del corrimiento de las muestras se asperjó el gel con 0.2 ml de X-gal (20 g/l disuelto en dimetilformamida) y se colocó en regulador pH 5.5. Los geles desnaturalizantes se lavaron previamente en el mismo regulador con Tritón X-100 0.5% (Kodak) y después de 0.5 horas se cambió el regulador. Se incubaron los geles en baño maría por aproximadamente 0.5 horas a 75°C, que es la

temperatura máxima a la que se pudo operar el equipo, y fue suficiente para observar actividad.

VI.1.7 Comparación con otras β -glicosidasas.

Se ensayó la actividad hidrolítica β -galactosidasa de *E. coli* (Sigma) a 37°C, pH 7.0 con lactosa 10 mM y celobiosa 5 mM como sustratos. De igual forma se ensayó la celulasa Multifect Cellulase (Genencor International, Inc.), que posee actividad celobiasa midiendo la velocidad de hidrólisis a 55°C, pH 4.0, usando lactosa 10 mM y celobiosa 5 mM como sustratos. La cuantificación para estos ensayos se realizó mediante la medición de glucosa liberada como se detalló previamente.

VI.1.8 Efecto de los alquil glucósidos en la actividad enzimática.

El efecto inhibitorio de los alquil glucósidos sobre la β -gli HT, se evaluó al comparar las cinéticas de hidrólisis del ONPGal (5 a 50 mM) en presencia de diferentes concentraciones de alquil glucósido y calculando los parámetros cinéticos mediante el procedimiento anteriormente citado.

VI.1.9 Evaluación de la degradación proteolítica.

Para determinar si la β -gli HT además de presentar termorresistencia, también es resistente a la degradación proteolítica, se probó la acción sobre la enzima de 7 diferentes proteasas. Las proteasas empleadas fueron: a) Papaína (Ultrapapaína S.A. de C.V.), b) Tripsina (Difco Lab.), c) Pronase (CalBiochem-Behring Co.), d) Proteasa PZT (Amano International Enzyme Co. Inc.), e) Proteinase K (Worthington Biochemical Co.), f) Protease 2A (Amano International Enzyme Co. Inc.) y g) Neutrasa (Novo Nordisk). El método que se siguió fue la evaluación de la actividad hidrolítica sobre ONPGal 2mM a pH 5.5, 50°C en presencia de cada proteasa. Para llevar a cabo la evaluación del efecto se permitió que la reacción de hidrólisis ocurriera en condiciones normales, siguiendo el cambio de absorbancia (420 nm), durante 20 minutos, transcurridos los cuales se agregó 1% p/v o v/v de la proteasa correspondiente y se continuó midiendo absorbancia. La inactivación de la enzima por efecto de la proteólisis se determinó por el cambio de pendiente en la cinética de hidrólisis de ONPGal.

VI.2 Síntesis de heptil glucósido catalizada por la β -gli HT.

VI.2.1 Determinación del coeficiente de partición del heptil glucósido.

El coeficiente de partición del heptil glucósido entre heptanol y agua, se determinó pesando diferentes cantidades de heptil glucósido (2, 4 y 7 mg) que se colocaron en tubos con 0.5 ml de agua y 0.5 ml de heptanol. Se incubaron los tubos con agitación magnética a 90°C durante 30 min, transcurrido el tiempo se detuvo la agitación y una vez separadas las fases, se tomaron muestras de 0.05 ml de cada fase y se analizó el contenido de glucósido por HPLC. El coeficiente de partición (K_{PI}) se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$K_{PI} = \frac{[i]_{org}}{[i]_{aq}}$$

donde

$[i]_{org}$ = concentración del componente i en la fase orgánica

$[i]_{aq}$ = concentración del componente i en la fase acuosa

VI.2.2 Reacciones monofásicas en medio acuoso

La síntesis de heptil glucósido vía la condensación de glucosa y heptanol en medio acuoso se llevó a cabo en viales con rosca a los que se adiciona regulador pH 5.5 saturado con heptanol (solubilidad del heptanol en agua a 100°C: 0.285% p/v). Se usaron 2 concentraciones de glucosa, 50 y 100 mM (en regulador pH 5.5, saturado de heptanol), la reacción se llevó a 90°C con agitación y se inició adicionando 0.1 ml de la preparación original de enzima por cada 10 ml de medio de reacción, tomando muestras a diferentes tiempos y midiendo aparición del producto por HPLC.

Se evaluó el comportamiento de la enzima en una solución concentrada de glucosa (1.5 M) libre de heptanol. La solución de glucosa se preparó en 20 ml regulador pH 5.5, se agregaron 0.1 ml de la preparación enzimática y se incubó a 90°C con agitación durante 5 horas, se tomaron muestras a diferentes tiempos y se midió la aparición del producto por HPLC.

VI.2.3 Reacciones monofásicas en medio orgánico

Se probaron las reacciones de alcoholólisis e hidrólisis inversa en medio monofásico compuesto de heptanol saturado con regulador pH 5.5, se reporta que la solubilidad del agua en heptanol a 90°C es de 7.8% (García-Garibay *et al.*, 2000a). Para la reacción de hidrólisis inversa se agregaron 78.9 y 180 mg de glucosa (43.86 y 100 mM respectivamente) en 10 ml de heptanol saturado de regulador pH 5.5; para la reacción de alcoholólisis se agregaron 10.26 y 20.52 mg de celobiosa (3 y 6 mM respectivamente). La reacción se llevó a 90°C con agitación y se inició agregando 0.1 ml de la preparación enzimática, se tomaron muestras a los 0, 10, 20, 30, 60 y 120 minutos, cuantificando el producto obtenido por HPLC.

VI.2.4 Reacciones en dos fases

Se sintetizó heptil glucósido por las reacciones de alcoholólisis e hidrólisis inversa en un sistema bifásico heptanol – agua (regulador pH 5.5); los sustratos empleados fueron celobiosa y glucosa.

Se probaron varias concentraciones de los sustratos, así como diferentes proporciones de fases. Las reacciones se realizaron a 90°C con agitación, se agregaron 0.05 ml de la preparación enzimática por cada 10 ml de volumen total de la mezcla de reacción. De manera típica, el muestreo se realizó dejando separar las fases, aproximadamente 1 min antes de cumplido el tiempo respectivo, tomando según el caso muestra de la fase acuosa u orgánica y se cuantificó la aparición del producto por HPLC.

VI.2.5 Inactivación interfacial.

Se incubaron 0.01 ml de la preparación enzimática a 90°C en un medio bifásico heptanol – agua (regulador pH 5.5) a dos proporciones de fases (1:1 y 9:1) y en fase acuosa como control (regulador pH 5.5). El volumen total fue de 2 ml. Se tomó una muestra de 0.01 ml la fase acuosa al tiempo cero y a las 2 h, después de diluir la muestra en regulador pH 5.5 a la proporción adecuada, se cuantificó actividad usando ONPGal 20mM, siguiendo el método antes descrito.

VI.2.6 Análisis cuantitativo por HPLC.

Para la cuantificación por HPLC de los reactivos y productos de las reacciones, el primer paso fue la eliminación del solvente original de las muestras para resuspenderlas en la fase móvil, esto se logró mediante evaporación al vacío. En el caso de las muestras en heptanol (punto de ebullición: 175.8°C), el proceso se realizó a 70°C, lo que hizo necesario inactivar la enzima presente en la muestra para evitar que continuara la reacción durante la eliminación del solvente. Las muestras se inactivaron con ácido clorhídrico 0.2 N, que desnaturaliza irreversiblemente la enzima, y se evapora como una mezcla azeotrópica con el agua.

Las muestras se analizaron en un equipo de HPLC (Waters) usando una bomba (Waters 600E) y un detector IR (Waters IR410), ocasionalmente se usó un inyector automático (Waters717). Para cuantificar azúcares se usó una columna aminada (Waters, columna de sílica amorfa para carbohidratos) con fase móvil acetonitrilo/agua 67/33, flujo 1.4 ml/min. Para cuantificar alquil glucósidos se usó una columna C18 (Supelcosil, 5µm) a 33°C, de acuerdo al método reportado por Bousquet *et al.* (1998), con fase móvil acetonitrilo/agua 50/50 a un flujo de 1.0 ml/min. En las figuras 4 y 5 se muestra el perfil de elución de los compuestos en cada columna.

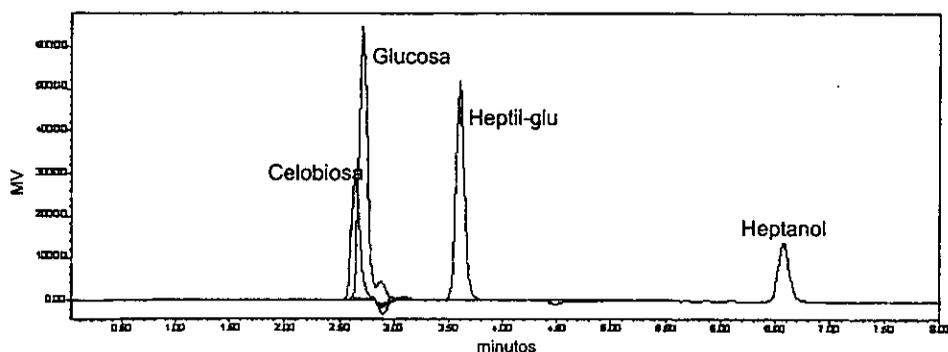


Figura 4. Ejemplo de un cromatograma con la columna C18 Supelcosil con fase móvil acetonitrilo/agua 50/50. 1.0 ml/min

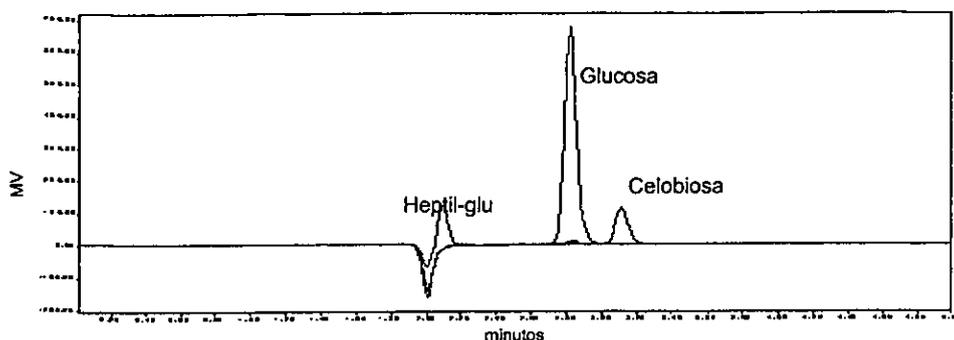


Figura 5. Ejemplo de un cromatograma con la columna aminada con fase móvil acetonitrilo/agua 67/33. 1.4 ml/min

La concentración de las muestras se calculó interpolando en una curva patrón (concentración vs respuesta del detector IR en mV) que se construyó inyectando concentraciones conocidas de los diferentes compuestos puros que componen la mezcla de reacción, tanto sustratos como productos (glucosa, celobiossa, heptanol, heptil-glucósido).

VI.2.7 Uso de cosolventes

VI.2.7.1 Evaluación de la desnaturalización por efecto del cosolvente.

Se incubó la enzima (0.01 ml de enzima por cada ml de mezcla de reacción) en solución acuosa con diferentes proporciones del cosolvente a 90°C. Se tomaron muestras a varios tiempos y se midió actividad hidrolítica remanente (usando ONPGlu 2mM como sustrato). La inactivación de la enzima se evaluó por la disminución de la actividad, tomando como 100% la actividad al tiempo cero.

VI.2.7.2 Reacciones de síntesis en sistemas homogéneos.

Usando cosolventes miscibles en agua como dimetil formamida (DMF), dimetil sulfóxido (DMSO) o 2-metil 2-butanol (2M2B), se obtuvo un sistema homogéneo al agregar regulador pH 5.5 en baja proporción y heptanol. En estos sistemas se llevaron a cabo reacciones de síntesis de heptil glucósido a partir de glucosa (18 g/l), variando las proporciones de regulador-heptanol-cosolvente.

VI.2.7.3 Evaluación de la partición del producto.

Para un cosolvente miscible en heptanol, como el octano, se determinó el coeficiente de partición de heptil glucósido entre octano-heptanol y agua, colocando una cantidad conocida de heptil glucósido entre dos fases, donde la fase orgánica estuvo compuesta de una mezcla octano:heptanol 1:1 y la fase acuosa fue agua pura. El coeficiente de partición se calculó según la descripción anterior.

VI.3 Recuperación del producto por adsorción

Para recuperar al heptil glucósido presente en la fase orgánica por adsorción se usaron 3 diferentes soportes: sílica gel, carbón activado y alúmina.

Se empacó en una pipeta pasteur la cantidad correspondiente de soporte y se hizo pasar por ella una cantidad conocida de heptil glucósido disuelto en heptanol. Se tomaron muestras a la salida de la columna y se analizaron por HPLC; se muestreó hasta que se detectó producto a la salida y se calculó la capacidad de adsorción del soporte (gramos de producto retenido por gramo del soporte).

El producto adsorbido en la columna se eluyó con diferentes disolventes de bajo peso molecular como metanol, etanol y acetonitrilo.

VI.4 Cálculo de las constantes de equilibrio

El método UNIFAC de contribución de grupos es un método rápido y confiable para predecir coeficientes de actividad en fase líquida para mezclas no-electrolíticas, no-poliméricas a bajas o moderadas presiones y temperaturas de entre 300 y 425 K. El método UNIFAC se basa en el concepto de que una mezcla líquida debe considerarse como una solución de unidades estructurales a partir de las cuales se han formado las moléculas, más que una solución de las propias moléculas; estas unidades estructurales reciben el nombre de subgrupos. Cuando es posible construir una molécula a partir de más de un conjunto de subgrupos, el conjunto que contiene menor número de subgrupos diferentes es el correcto. La gran ventaja que tiene el método UNIFAC es que un número de subgrupos relativamente pequeño se combina para formar un número muy grande de moléculas. Los coeficientes de actividad dependen no sólo de los subgrupos sino también de las interacciones entre ellos.

Una vez obtenidos los coeficientes de actividad mediante un programa basado en el método UNIFAC, fue posible calcular las constantes de equilibrio de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$K_{eq} = \frac{a_{(hep - glu)} a_{(agua)}}{a_{(glucosa)} a_{(heptanol)}}$$

donde:

$a = x \gamma$ (actividad termodinámica)

γ = coeficiente de actividad (calculado por el método UNIFAC)

x = fracción mol del componente

VII. RESULTADOS Y DISCUSION

VII.1 Caracterización cinética y fisicoquímica

VII.1.1 Estabilidad térmica

Se determinó la estabilidad de la β -gli HT a 90°C en medio acuoso puesto que es la mayor temperatura que se puede manejar en las condiciones de trabajo del laboratorio; aunque está reportado que la actividad óptima se presenta a 110°C (García-Garibay, comunicación personal), a una temperatura de 90°C la enzima aún es muy activa.

Como se observa en la tabla 3 la enzima fue estable a 90°C por más de 20 horas, conservando 95% de su actividad a las 21 horas. El proveedor reporta que a 90°C, la enzima conserva 92% de su actividad después de 145 horas de incubación.

Tabla 3. Estabilidad térmica de la β -gli HT a 90°C

Tiempo de incubación (h)	% Actividad
0	100
2	100
4	100
21	94.8

La posibilidad de usar glicosidasas a altas temperaturas representa una ventaja en comparación con los trabajos existentes para la producción de alquil glicósidos que emplean enzimas mesófilas (específicamente la β -glucosidasa de almendra), puesto que la síntesis se realiza en medios orgánicos donde los azúcares son muy poco solubles. Además del aumento en la solubilidad de los sustratos, el tener enzimas estables a altas temperaturas permite incorporarlas en los procesos industriales a gran escala sin tener riesgos de contaminación bacteriana.

VII.1.2 pH óptimo

Al hacer un barrido de actividad en soluciones con pH de entre 3.5 y 8, se encontró que el pH óptimo para la actividad hidrolítica de la β -gli HT es de 5.5 a 90°C, como puede observarse en la figura 6. Este valor se encuentra dentro del rango de pH reportado para algunas glucosidasas bacterianas y la de almendra. (Shinoyama y Yasui 1988).

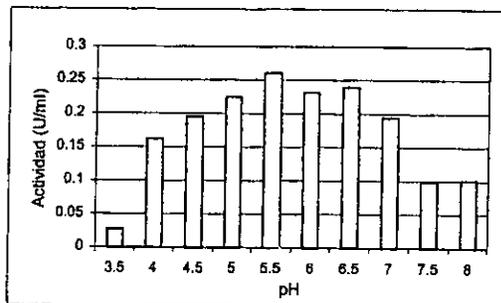


Figura 6. Efecto del pH en la actividad β -gli HT a 90°C, evaluado en la hidrólisis de celobiosa

VII.1.3 Parámetros cinéticos para la hidrólisis de glucósidos.

Se determinaron los parámetros cinéticos para la hidrólisis de diversos sustratos, a 90°C, pH 5.5. Los resultados se reportan en la tabla 4, donde se puede observar que la enzima muestra amplia especificidad de sustrato puesto que tiene tanto actividad glicosidasa (hidrólisis de celobiosa, ONPGlu, heptil y hexil glucósidos) así como actividad galactosidasa (ONPGal, lactosa).

De acuerdo a los valores de K_m obtenidos puede observarse que la enzima tiene mayor afinidad por los glucósidos que por los galactósidos, comparando moléculas equivalentes, es decir lactosa vs celobiosa y ONPGal vs ONPGlu. Este resultado es acorde con lo reportado para la β -glucosidasa de *Agrobacterium sp* que tiene mayor afinidad por el glucósido (4-nitrofenil-D-glucósido) con un K_m de 0.078, que por el galactósido con un K_m de 5.0 (Trimbur *et al.* 1993).

Tabla 4. Parámetros cinéticos de la β -gli HT a 90°C, pH 5.5, actuando sobre diferentes sustratos. Peso molecular aproximado de la enzima: 120 kDa (ver adelante)

Sustrato	Km [mM]	Actividad específica [U/ μ g proteína]	Kcat [min ⁻¹]	Kcat/Km [mM ⁻¹ min ⁻¹]
Celobiosa	10.00	2.60	313 000	31 300
Lactosa	125.00	5.28	633 400	5 060
ONPGlu	0.26	5.56	667 300	2 570 000
ONPGal	12.00	6.92	830 000	69 200
Heptil-glucósido	0.25	0.237	28 400	112 400
Hexil-glucósido	1.53	0.406	48 600	31 800

En la misma tabla 4 se observa también que aunque la afinidad por los alquil glucósidos es alta, la velocidad de hidrólisis es menor, comparada con la de los otros sustratos probados.

Al comparar la eficiencia catalítica de la β -gli HT con la catalasa, una de las enzimas más eficientes y con la fumarasa que tiene una baja eficiencia, para las que se reportan valores de Kcat de 6×10^8 min⁻¹ (para H₂O₂) y de 4.8×10^3 min⁻¹ (para fumarato), respectivamente (Voet y Voet 1995), observamos en la tabla 4 que la enzima de estudio tiene números de recambio de valor intermedio. Con relación a otras enzimas termofílicas, es interesante también la comparación con la β -glucosidasa de *Thermoascus aurantiacus* que tiene un Kcat de 17 052 min⁻¹ para celobiosa y β -trealosa (Parry *et al.*, 2001). Para las β -glucosidasas aisladas de los microorganismos hipertermofílicos *Pyrococcus furiosus* y *Sulfolobus solfataricus*, se reporta un valor de Kcat/Km de 774 000 mM⁻¹ min⁻¹ y 795 000 mM⁻¹ min⁻¹ respectivamente, medidos para la reacción de hidrólisis de ONPGlu (Pouwels *et al.*, 2000), por lo que en comparación con estas últimas enzimas, la β -gli HT objeto de este estudio, tiene una eficiencia catalítica un orden de magnitud superior .

VII.1.4 Determinación de pureza por electroforesis

Para determinar la pureza de la preparación enzimática se prepararon geles de poliacrilamida bajo las siguientes condiciones:

- Nativo (PAGE)
- Desnaturalizante (SDS-PAGE)
- Desnaturalizante con urea (SDS-UREA-PAGE)

Para cada experimento se corrieron por duplicado las muestras en el mismo gel y se dividió en dos partes, una de las partes se tiñó con azul de Coomassie para observar las bandas de proteína, y en la otra parte se ensayó la actividad glicosidasa usando como sustrato X-gal ó X-glu

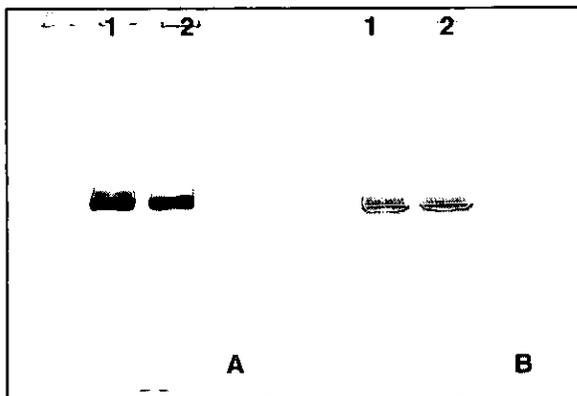


Figura 7. PAGE nativo, 7.5% acrilamida. A. Proteína (tinción azul de Coomassie) B. Actividad a 90°C con X-gal. Carril 2 misma muestra que 1, a ebullición por 15 min

En la figura 7A que corresponde a la electroforesis nativa, se observan dos bandas de proteína con mayor intensidad, mismas que mostraron actividad galactosidasa, como se ilustra en la figura 7B. Aunque se observa una tenue banda de proteína en la parte inferior del gel, ésta no muestra actividad y podría corresponder a proteínas contaminantes de bajo peso molecular, por lo tanto podemos concluir que para los fines del proyecto la preparación enzimática tiene una pureza adecuada

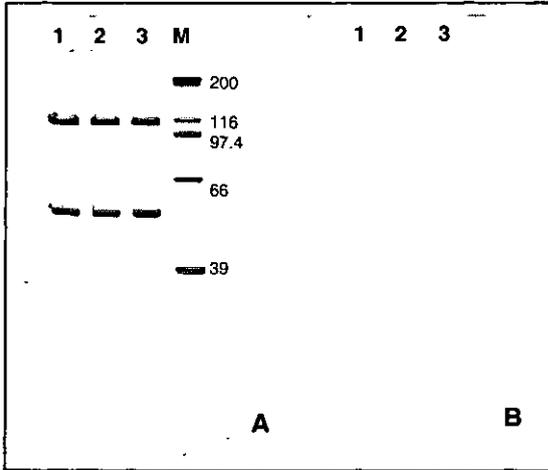


Figura 8. SDS-PAGE, 10% acrilamida. A. Proteína (tinción Coomassie) B. Actividad 90°C con X-gal. Carriles 1, 2 y 3 muestra calentada a ebullición por 20, 30 y 40 min respectivamente. M: marcadores de peso molecular.

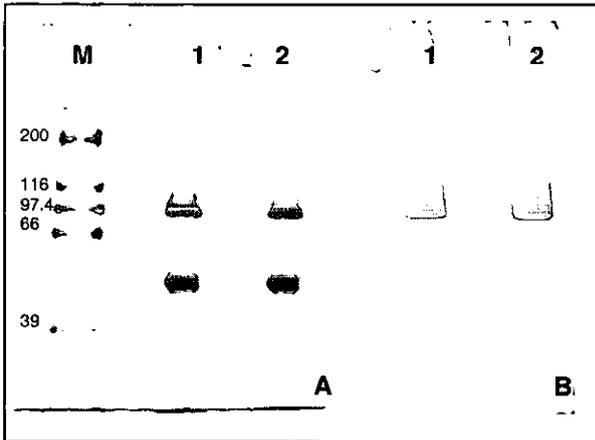


Figura 9. SDS-UREA-PAGE, urea 3M, 10% acrilamida. A. Proteína (tinción Coomassie) B. Actividad 90°C con X-gal. Carriles 1 y 2 misma muestra. M: marcadores de peso molecular.

En condiciones desnaturalizantes, figuras 8 y 9, se aprecian un par de bandas con mayor intensidad, que relacionadas con los marcadores de peso molecular, se calcula que corresponden aproximadamente a 54 y 120 kDa respectivamente. La banda

de 54 kDa no presenta actividad glicosidasa, mientras que la banda de 120 kDa sí tiene tal actividad (figuras 8A y 9A), por lo que esta última banda podría corresponder a un dímero activo, y la banda de 54 kDa sería el monómero inactivo. La oligomerización es una característica común de la familia I de las β -glicosidasas de microorganismos hipertermófilos y aquellos del dominio Archaea. Las enzimas provenientes de *Sulfolobus solfataricus* y *Pyrococcus furiosus* han sido reportadas como homotetrámeros de peso molecular aproximado de 200 kDa (Chi *et al.*, 1999; Kengen *et al.*, 1993), y la β -glicosidasa aislada de la bacteria hipertermófila *Thermotoga maritima* se reporta como un homodímero (Gabelsberger *et al.* 1993).

Aun cuando se distinguen con mayor claridad las bandas ya mencionadas tanto en condiciones no desnaturizantes (figura 7) como desnaturizantes (figuras 8 y 9), también se puede observar un barrido en la parte superior de los geles tanto de proteína como de actividad. Este efecto se observa incluso al usar un agente desnaturizante más fuerte, como lo es la urea (figura 9). Puesto que el patrón de actividad es el mismo al usar X-gal o X-glu, se sugiere que no se trata de una proteína contaminante y que tal barrido se debe a otros factores, como pudieran ser: la concentración de la muestra, el campo eléctrico ejercido durante la electroforesis, o bien pudiera tratarse de agregados inherentes al proceso de liofilización.

De este estudio se concluye que la preparación es bastante pura y que no existen dos enzimas, sino que se trata de una sola enzima con actividad β -galactosidasa y β -glucosidasa.

VII.1.5 Comparación de especificidad de sustrato con otras β -glicosidasas

La capacidad de hidrolizar una extensa gama de sustratos no es una característica común en las enzimas mesófilas estudiadas a la fecha, como es el caso de la β -glucosidasa de almendra (ampliamente usada para la producción de alquil glicósidos) o la β -galactosidasa de *E. coli*. Para corroborar este hecho, se retaron dos enzimas: la β -galactosidasa de *E. coli* y la enzima "Multifect Cellulase", que posee actividad β -glucosidasa, usando celobiosa y lactosa como sustrato respectivamente, además de sus sustratos naturales.

La β -galactosidasa de *E. coli* presentó actividad con lactosa como sustrato (37°C, pH 7.0), sin embargo no fue capaz de hidrolizar celobiosa a largo plazo, por lo que se concluye que la β -galactosidasa de *E. coli*, reconoce específicamente β 1-4 galactósidos como es el caso de la lactosa o el ONPGal.

La celulasa "Multifect Cellulase" además de hidrolizar celulosa también mostró una actividad exo que le permite degradar la celobiosa hasta glucosa (55°C, pH 4.0). De manera análoga al caso anterior, al usar lactosa que es un sustrato sobre el cual la enzima no actúa en la naturaleza, no se observó actividad hidrolítica a lo largo del tiempo de la prueba.

Se observa entonces que la capacidad de la β -gli HT para hidrolizar diferentes sustratos no es de manera alguna una propiedad extendida entre las β -glicosidasas, aunque existen otras termofílicas para las que se ha reportado esta propiedad. Tal es el caso de la β -glicosidasa de *Thermosphaera aggregans*, que presenta actividad hacia β -D-fucósidos, β -D-glucósidos y β -D-galactósidos (Chi *et al.*, 1999); la β -glicosidasa de *Pyrococcus furiosus* actúa también sobre diferentes sustratos con enlaces β que incluyen β -D-glucósidos como la celobiosa, salicilina (2-hidroximetil-fenil- β -D-glucopiranosido), arbutina (4-hidroxifenil- β -D-glucopiranosido), laminarina (polímero β -(1-3) glucosa); β -D-galactósidos como lactosa y fucosa; y β -D-xilósidos (Kengen *et al.*, 1993).

VII.1.6 Efecto de alquil glucósidos en la actividad de la enzima.

Debido a que el producto de interés es un alquil glucósido que también puede ser hidrolizado por la enzima, se evaluó el efecto de agregar cantidades conocidas de dos diferentes alquil glucósidos en la reacción de hidrólisis de ONPG por la enzima β -gli HT.

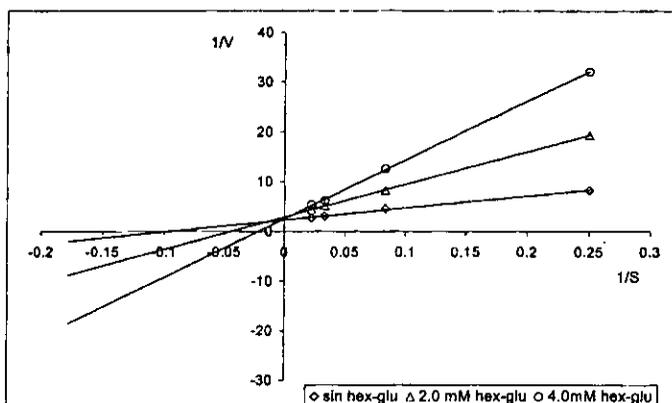


Figura 10. Cinética de hidrólisis de ONPGal por la enzima β -gli HT, en presencia de hexil-glucósido, pH 5.5, 90°C

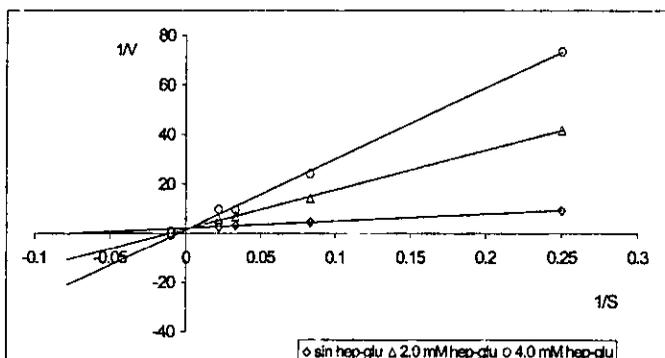


Figura 11. Cinética de hidrólisis de ONPGal por la enzima β -gli HT en presencia de heptil-glucósido, pH 5.5, 90°C

En las figuras 10 y 11 se puede observar que los alquil-glucósidos se comportan como inhibidores competitivos para la reacción de hidrólisis de ONPG catalizada por la β -gli HT. Los valores de las constantes de inhibición (K_i) calculadas a partir de las pendientes, resultaron ser:

$$K_i (\text{hexil glucósido}) = 1.1435 \text{ mM}$$

$$K_i (\text{heptil glucósido}) = 0.2627 \text{ mM}$$

Como podría suponerse, estos valores corresponden al K_m previamente calculado y reportado en la tabla 4, ($K_m \text{ hex-glu} = 1.53$ y $K_m \text{ hep-glu} = 0.25$). Esto se debe a que siendo ambos sustratos de la enzima, uno actúa como inhibidor competitivo

del otro. Estos valores son acordes con el K_i reportado para el heptil glucósido de 0.54 mM para la misma enzima (García-Garibay *et al.*, 2000a).

El mismo análisis se llevó a cabo para la β -galactosidasa de *E. coli*. Los resultados se muestran en la figura 12, donde se ilustra que también existe una inhibición pero ésta es mucho menor y del tipo no competitiva, con un K_i de 1.54 mM. Es conveniente señalar que el heptil glucósido no es sustrato de esta enzima.

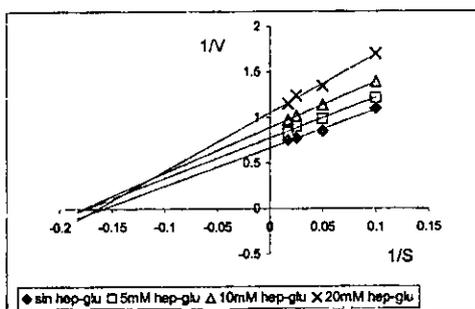


Figura. 12 Cinética de hidrólisis de lactosa por la enzima β -galactosidasa de *E. coli*, usando como inhibidor al heptil-glucósido, pH 7.0, 37°C

VII.1.7 Degradación proteolítica de la β -gli HT

Los análisis estructurales de las enzimas termorresistentes indican que el plegamiento de la cadena polipeptídica no presenta cambios de manera sistemática y que deben su estabilidad a una serie de interacciones en la estructura tridimensional (Chi *et al.* 1999, Aguilar, *et al.* 1997, Kengen *et al.* 1993).

En el presente trabajo se utilizaron algunas enzimas proteolíticas con el objeto de desarrollar una estrategia de muestreo para el análisis de las reacciones. Se esperaba que al aplicar la proteasa, ésta detuviera la reacción como consecuencia de la hidrólisis de la enzima y por tanto su inactivación. Sin embargo, se observó que a pesar de adicionar proteasas al medio, la reacción no se detenía, lo que sugiere que las mismas interacciones que le confieren estabilidad térmica a la enzima pudieran también proporcionar resistencia al ataque proteolítico.

Para probar lo anterior, se evaluó la degradación proteolítica de la enzima mediante la acción de siete proteasas; las enzimas ensayadas fueron: a) Papaína, b) Tripsina, c) Pronase, d) Proteasa PZT, e) Proteinase K, f) Protease 2A, g) Neutrassa. La degradación se evaluó de acuerdo a la disminución en la pendiente de una cinética de hidrólisis de ONPGal 10 mM pH 5.5, 50°C, con la enzima β -gli HT, adicionando cada proteasa de manera individual a la mezcla de reacción, a una concentración de 1% (p/v o v/v), después de 20 minutos de reacción.

Tabla 5. Efecto de la adición de proteasas en la pendiente de la cinética de hidrólisis de ONPGal por la β -gli HT

ENZIMA	Pendiente (Abs _{420 nm} /min)		Diferencia
	Inicial	Con proteasa	
Papaína	0.045	0.040	0.005
Pronase	0.045	0.041	0.004
Tripsina	0.041	0.040	0.001
Protease 2A	0.044	0.043	0.002
Proteinase K	0.037	0.031	0.006
Neutrassa	0.039	0.012	0.027
Proteasa PZT	0.046	0.037	0.009

En la tabla 5 puede observarse que solamente la Neutrassa originó un efecto inmediato sobre la actividad, ocasionando una disminución en la pendiente de la curva de reacción. Sin embargo, es importante señalar que la reacción no se detuvo completamente, concluyéndose que la β -gli HT es bastante resistente al ataque proteolítico bajo las condiciones de trabajo empleadas (50°C, pH 5.5). Aunque el ensayo no fue realizado a las condiciones óptimas para cada proteasa, está comprobado que a 50°C todas las proteasas empleadas son activas, siendo el pH el único parámetro que podría haber afectado la actividad proteolítica bajo las condiciones del experimento. Esto es particularmente válido para la Neutrassa, que trabaja a pH neutro o ácido. Sin embargo la alta dosis de enzima usada contrarrestaría la desventaja del cambio de pH.

Este resultado aunque no prueba tajantemente que exista resistencia a la degradación proteolítica, sí muestra que la β -gli HT tiene otro potencial para aplicaciones industriales, puesto que bajo las condiciones de trabajo óptimas de actividad de la enzima puede resistir la presencia de proteasas contaminantes en el medio de reacción.

VII.2 Síntesis de heptil-glucósido con la β -gli HT.

El desarrollo de métodos alternos a la síntesis química de alquil glicósidos, cobra gran importancia debido a que se ha demostrado que estos productos tienen gran potencial para ser usados en el ámbito industrial por su buen desempeño como surfactantes y la baja toxicidad que presentan, además de que pueden ser sintetizados a partir de recursos renovables.

La elección del sustrato debe estar ligada con su disponibilidad y precio, puesto que esto permite que el proceso sea rentable. En la actualidad los azúcares adecuados al proceso con mayor disponibilidad son la sacarosa (130,000,00 ton/año) y la glucosa (16,000,000 ton/año). Algunos sustratos también adecuados son lactosa y celobiosa, que aunque se encuentran ampliamente disponibles, tienen el inconveniente de ser más costosos.

VII.2.1 Reacciones monofásicas en medio acuoso

Las reacciones llevadas a cabo en un sistema compuesto de regulador saturado de heptanol al que se le adiciona glucosa, permitieron comprobar que el equilibrio de la reacción se encuentra totalmente desplazado hacia la hidrólisis, pues no se encontró formación de producto. Es importante señalar que la proporción de heptanol es muy baja debido a que su solubilidad en agua a 100°C es tan solo de 0.2%, lo que favorece la actividad hidrolítica de la enzima.



Una forma de desplazar el equilibrio de la reacción de manera que se favorezca la síntesis del heptil glucósido, consistió entonces en evitar la presencia de agua o

disminuir su actividad. Por lo tanto se siguieron varias estrategias, que se detallan a continuación.

VII.2.2 Reacciones monofásicas en medio orgánico

Una de las estrategias para evitar la hidrólisis del producto fue mantener la mínima cantidad posible de agua en el medio de reacción, lo que se pudo lograr empleando un medio orgánico saturado con regulador. En este trabajo se usó como medio orgánico al heptanol que al mismo tiempo es uno de los sustratos. Los azúcares empleados en este experimento fueron celobiosa y glucosa, con el fin de obtener un solo producto, ya que empleando lactosa, que también es sustrato de la enzima, se obtiene una mezcla de heptil - galactósido y heptil – glucósido.

Se emplearon concentraciones de celobiosa muy bajas debido a su escasa solubilidad en heptanol. Aunque no se cuenta con el dato preciso de saturación, al usar concentraciones tan bajas como 3 y 6 mM, los cristales no se disuelven totalmente en el sistema, causando su precipitación.

La solubilidad de la glucosa en el heptanol es mayor que la de la celobiosa por lo que se pudieron probar concentraciones de 43.89 mM hasta 100 mM de glucosa.

Los resultados preliminares en este sistema, ya demostrados anteriormente por García-Garibay *et al.* (2000a), mostraron que sí hay formación de heptil glucósido aunque en bajas concentraciones (<0.2 mM). Sin embargo, quedó claro que la productividad de este sistema se encuentra limitada, debido a la baja solubilidad de los azúcares en el medio orgánico.

VII.2.3 Reacciones en dos fases

Otra estrategia para favorecer la formación del alquil glucósido fue la extracción continua del mismo, lo cual se logró en un sistema bifásico. El sistema consistió de una fase acuosa en donde se solubilizó el azúcar, la enzima y la porción soluble de heptanol necesaria para que ocurriera la síntesis; y una fase orgánica, nuevamente formada por el heptanol que a su vez fue sustrato de la reacción. En la fase orgánica se extrajo el producto formado y de esta manera, fue posible desplazar el equilibrio de la reacción. Una condición para que esto sucediera es la partición favorable del producto hacia la fase orgánica. El coeficiente de partición (K_{Pi}) obtenido para el heptil glucósido entre

ambas fases, fue de 14, por lo que el heptanol resultó ser un solvente adecuado para la extracción.

En este sistema se ensayaron nuevamente celobiosa y glucosa como sustratos. Los resultados comparativos se muestran en la figura 13, donde se puede observar que la velocidad de formación de heptil glucósido vía la reacción de transglucosidación con celobiosa fue mayor que la velocidad de la reacción de hidrólisis inversa con glucosa. Sin embargo, en la reacción con celobiosa, el producto empezó a hidrolizarse al alcanzar cierto porcentaje de conversión sin sobrepasar el 10%, dado que, como se demostró anteriormente, la β -gli HT tiene mayor afinidad por el producto heptil-glucósido que por celobiosa.

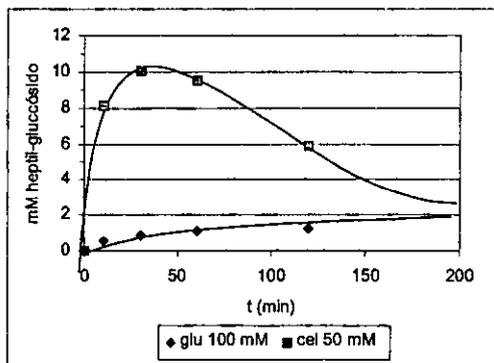


Figura 13. Producción de heptil glucósido en dos fases (1:1) por alcoholólisis e hidrólisis inversa (heptil glucósido medido en la fase orgánica)

Por otro lado, la cantidad de agua en este sistema estuvo en exceso. Por lo tanto al usar celobiosa, no era de esperarse, al menos en el tiempo analizado, que la enzima formara heptil glucósido vía la hidrólisis inversa, partiendo de las moléculas de glucosa que se liberaron en la reacción de transglucosidación. García-Garibay *et al.* (2000a) lograron buenas eficiencias de una reacción de transglucosilación seguida de una hidrólisis inversa, pero llevando a cabo la reacción en un sistema orgánico monofásico usando bajas concentraciones de lactosa como sustrato.

De la figura 13 también se puede observar que aún cuando ambas reacciones son diferentes, tienden a alcanzar la misma concentración de producto en el equilibrio,

confirmando que una estrategia para la síntesis puede ser el control a través del equilibrio de la reacción. Dado el costo y la solubilidad de los sustratos, se decidió continuar trabajando únicamente con glucosa como sustrato.

VII.2.4 Efecto del pH y la temperatura

Con el objetivo de explorar el efecto del pH y la temperatura en el equilibrio de la reacción de síntesis, se probaron condiciones diferentes a las óptimas de trabajo que se venían empleando en las reacciones de hidrólisis, esto es 90°C y pH 5.5.

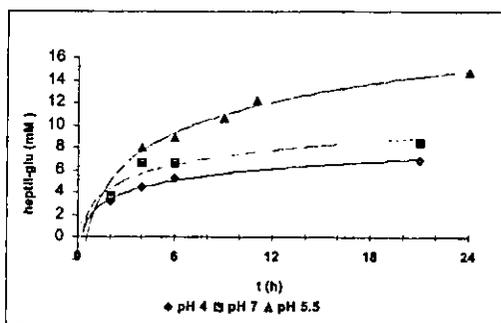


Figura 14. Efecto del pH en el equilibrio de la reacción de hidrólisis inversa en sistema bifásico con glucosa 1 M (heptil glucósido medido en la fase orgánica)

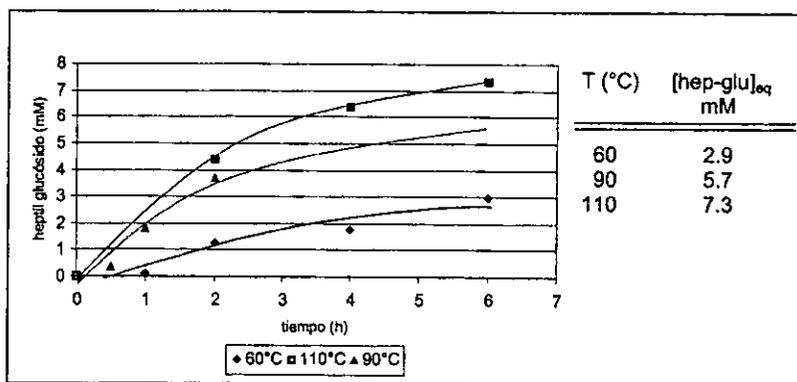


Figura 15. Efecto de la temperatura en el equilibrio de la reacción de hidrólisis inversa en sistema bifásico con glucosa 1 M (heptil glucósido medido en la fase orgánica)

En la figura 14 se puede observar que la concentración de heptil glucósido en el equilibrio disminuyó al realizar las reacciones a un pH mayor o menor del óptimo.

De igual forma, podemos observar en la figura 15, que cuanto mayor fue la temperatura de reacción, la velocidad inicial de síntesis aumentó, alcanzando un equilibrio más favorable a 110°C que a temperaturas más bajas. Sin embargo, dada la dificultad de operar a 110°C, se continuó trabajando bajo las condiciones iniciales de pH y temperatura (pH 5.5, 90°C).

VII.2.5 Efecto de la proporción fase acuosa : fase orgánica.

Con el fin de explorar el efecto de la extracción del producto sobre el rendimiento de la reacción, se probaron tres diferentes proporciones de fase orgánica: fase acuosa (1:1, 3:1, 9:1), a tres diferentes concentraciones de glucosa (0.2, 0.4 y 1M). Estos resultados se muestran en la figura 16.

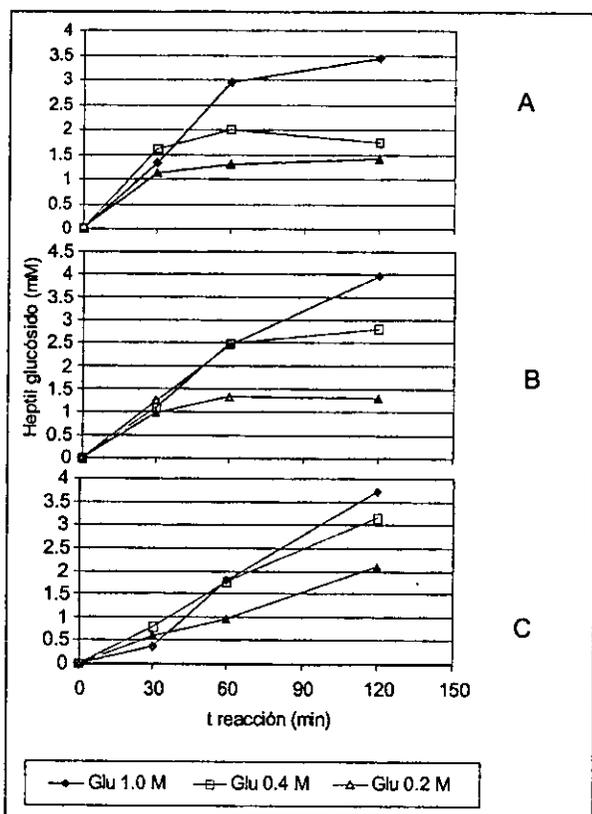


Figura 16. Producción de heptil glucósido en dos fases por hidrólisis inversa con distintas proporciones de fases orgánica y acuosa. A: 1/1. B: 3/1. C: 9/1.

Tabla 6. Cálculo de las velocidades iniciales para la reacción de hidrólisis inversa con diferentes proporciones de fases orgánica y acuosa.

Glu (M)	Velocidad inicial (μ moles/min ml)		
	1:1	3:1	9:1
0.2	0.0366	0.0326	0.0172
0.4	0.0333	0.0369	0.0265
1.0	0.0490	0.0411	0.0325

Como puede observarse en la tabla 6, la proporción de fases no afectó significativamente la velocidad de síntesis, sin embargo cuando se manejó la mayor proporción de fase orgánica (9:1), el efecto del solvente sobre la velocidad de reacción empezó a ser más evidente dado que ésta disminuyó, aunque las diferencias entre los valores se encuentran dentro del rango de error experimental.

Más aún, al observar las concentraciones finales obtenidas para cada experimento en la tabla 7, se puede inferir que la reacción puede ser desplazada hacia la síntesis del producto, como consecuencia de la extracción continua del heptil glucósido producido. La extracción ocurre debido a que existe una partición favorable del producto hacia la fase orgánica.

Tabla 7. Concentraciones finales y conversiones de la síntesis de heptil glucósido en dos fases por hidrólisis inversa con distintas proporciones de fases orgánica y acuosa

[glu] M	Conc. final heptil glucósido en fase org (mM)			Conversión (%)		
	1:1	3:1	9:1	1:1	3:1	9:1
0.2	1.41	1.31	2.09	0.75	2.00	9.48
0.4	1.73	2.79	3.16	0.46	2.14	7.16
1.0	3.42	3.94	3.72	0.36	1.21	3.37

Sin embargo, en todos los casos la velocidad de la reacción disminuyó rápidamente hasta valores muy pequeños, aún cuando quedaba suficiente sustrato en el medio. Dada la forma en que se llevó a cabo la reacción, ésta pudo detenerse por 3 causas principales:

a) Se saturó la fase orgánica con el producto (heptil glucósido), lo cual no fue el caso puesto que el heptil glucósido es bastante soluble en la fase orgánica. En el laboratorio se ha disuelto hasta 0.1 M de heptil glucósido en heptanol.

b) Se alcanzó el equilibrio termodinámico, en el cual

$$[\text{hep-glu}]_{f_{\text{org}}} / [\text{hep-glu}]_{f_{\text{aq}}} = 14 \quad \text{y}$$

$$([\text{hep-glu}]_{f_{\text{aq}}})_{\text{eq}} / ([\text{hepOH}]_{f_{\text{aq}}})_{\text{eq}} ([\text{glu}]_{f_{\text{aq}}})_{\text{eq}} = K_{\text{eq}}$$

c) La enzima se desactivó por inestabilidad térmica o por inactivación interfacial.

Si se cumpliera la condición descrita en el inciso b, a la misma concentración de glucosa se alcanzaría la misma concentración de producto (al llegar al equilibrio) sin importar la proporción de fases. Esto es debido a que el coeficiente de partición es una relación de concentraciones de una especie entre dos fases, que se mantiene constante. Dado que al aumentar la fase orgánica, se obtienen mayores concentraciones de producto (tabla 7), se decidió ensayar la inactivación de la enzima en la mezcla de reacción para observar si la estabilidad era la causa de las diferencias obtenidas, los resultados se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Actividad residual de la β -gli HT en un sistema bifásico: inactivación interfacial

Fases	Porcentaje de actividad	
	inicial	2 h
Acuosa	100	100
1:1	100	70.5
9:1	100	82.6

De acuerdo a estos resultados, se comprueba primeramente que la enzima es termoestable pues mantiene su actividad en medio acuoso. Sin embargo se observa una pérdida de actividad al incubar la enzima en medio bifásico. Este efecto es mayor cuando se tiene menor proporción de fase orgánica.

Aún cuando existen varios mecanismos posibles de inactivación enzimática en presencia de solventes orgánicos, en sistemas bifásicos predomina la inactivación interfacial. En este tipo de sistemas, las proteínas entran en contacto con un ambiente

hidrofóbico. Si permanecen expuestas por un período prolongado, tienden a desplegarse y exponer sus grupos hidrofóbicos tanto como es posible en la fase orgánica, mientras que mantienen sus grupos cargados en la fase acuosa. Esto puede causar cambios mayores en la estructura de la proteína y por lo tanto ser desnaturizada (Bell *et al.*, 1995; Eggers *et al.*, 1989). Por lo tanto, es posible que la producción de heptil glucósido se haya detenido al alcanzar un equilibrio termodinámico en ciertos casos. Mientras que las diferencias encontradas entre los sistemas probados a diferentes proporciones de fases pudieran deberse entonces a la inactivación interfacial de la enzima, que fue mayor al disminuir la proporción de fase orgánica.

VII.2.6 Reacciones en medios saturados con glucosa

Como una estrategia para disminuir la actividad de agua, y por lo tanto aumentar la productividad, se probó el mismo sistema bifásico, usando altas concentraciones de glucosa en la fase acuosa para disminuir la cantidad de agua en la fase y con ello su actividad termodinámica. Está reportado que la solubilidad máxima de la glucosa en agua a 100°C es de 60%, que corresponde a 3.3M (volumen molar de glucosa 0.119 l/mol, Panintrarux *et al.*, 1996). Se ensayaron varias concentraciones de glucosa cercanas a la saturación. Los resultados de estas cinéticas se muestran en la figura 17.

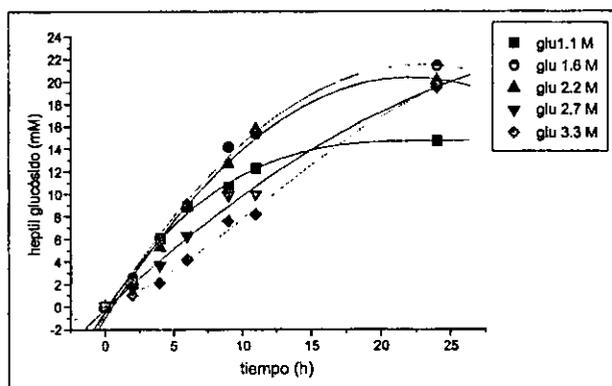


Figura 17. Cinéticas de producción de heptil glucósido por hidrólisis inversa, sistema bifásico 9:1, usando concentraciones altas de glucosa

Se observa que al aumentar la concentración de glucosa, la velocidad de formación del producto disminuyó, lo que pudo ser debido al efecto inhibitorio que causaron las altas concentraciones de glucosa sobre la enzima. Otra causa pudo ser el efecto de la disminución de la actividad termodinámica del agua sobre la actividad de la enzima como se ilustra en la figura 18, donde se graficaron las velocidades iniciales obtenidas de las reacciones a altas concentraciones de glucosa y las actividades de agua reportadas para las correspondientes soluciones de glucosa. (Chirife *et al.*, 1980). En esta misma figura se reportan los valores de actividad de agua calculados con el método de UNIFAC. Como puede observarse los valores de las actividades de agua calculados por el método UNIFAC no correlacionan adecuadamente con la solubilidad de la glucosa.

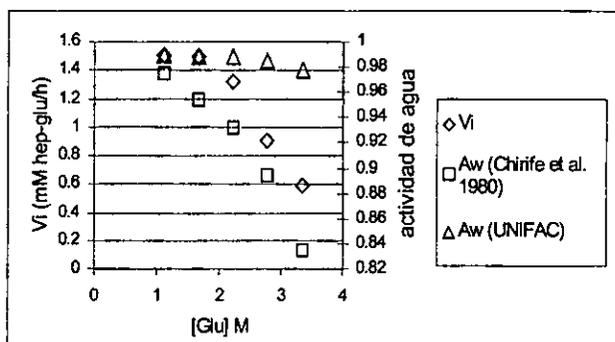


Figura 18. Velocidades iniciales de las reacciones de síntesis de heptil glucósido, sistema bifásico 9:1, usando concentraciones altas de glucosa.

En la tabla 9 se resumen los porcentajes de conversión y productividades calculados para las reacciones a altas concentraciones de glucosa, observándose que se alcanzaron mayores conversiones a menores concentraciones de glucosa. Esto se debe a que todas las reacciones tienden al equilibrio, como se demuestra para esta enzima en la figura 17. Por lo tanto al aumentar la concentración de azúcar en el medio, efectivamente se desplazó el equilibrio de la reacción hacia la síntesis. Sin embargo el aumento en la concentración de producto, no fue suficiente para compensar los efectos adversos de inhibición por exceso de sustrato y disminución de la velocidad de

reacción, obteniendo un rendimiento neto menor al quedar mayor cantidad de azúcar sin ser convertida.

Tabla 9. Rendimiento y productividad de las reacciones de síntesis de heptil glucósido, sistema bifásico 9:1, a concentraciones altas de glucosa

glucosa		heptil glucósido		% conversión	Productividad (mol l ⁻¹ h ⁻¹)
[M] _{f.ac}	mmoles totales	[M] _{f.org}	Mmoles totales		
1.11	0.222	0.0147	0.0265	11.95	5.5 x 10 ⁻³
1.66	0.332	0.0214	0.0386	11.65	8.0 x 10 ⁻³
2.22	0.444	0.0201	0.0362	8.15	7.54 x 10 ⁻³
2.77	0.554	0.0195	0.0351	6.32	7.29 x 10 ⁻³
3.33	0.666	0.0195	0.0351	5.25	7.29 x 10 ⁻³

A pesar de lo anterior, la productividad alcanzada en este sistema fue mayor a la reportada para otros trabajos con enzimas mesofílicas que se encuentran en valores del orden de 10⁻⁴- 10⁻⁵ (tabla 2). En el trabajo de Garcia-Garibay *et al.* (2000a) al usar glucosa como sustrato, la mayor productividad alcanzada fue de 1.75 x 10⁻³ mol l⁻¹ h⁻¹, por lo que los valores aquí reportados se encuentran dentro del mismo orden de magnitud aunque la conversión fue menor.

Tabla 10. Cálculo de las constantes de equilibrio para las reacciones de síntesis de heptil glucósido a altas concentraciones de glucosa.

[Glucosa] M	Proporción de fases	Keq
1.0	1:1	0.0246
0.4	1:1	0.0292
0.2	1:1	0.0437
1.0	3:1	0.0284
0.4	3:1	0.0452
0.2	3:1	0.0406
1.11	9:1	0.0652
1.66	9:1	0.0483
2.22	9:1	0.0244
2.77	9:1	0.0295
3.33	9:1	0.0202

De la tabla 10 se observa que los valores de las constantes de equilibrio calculadas con el método UNIFAC, para las reacciones a altas concentraciones de glucosa, tienen valores muy parecidos, que confirman el equilibrio desfavorable hacia la síntesis del heptil glucósido. Tomando los datos de García-Garibay *et al.* (2000a) para el medio monofásico con 43.86 mM de glucosa, se obtuvo un valor de $K_{eq} = 0.0195$, que coincide con los datos obtenidos. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, el método UNIFAC que toma en cuenta las interacciones de los grupos funcionales de las moléculas presentes en el medio, no correlaciona de manera adecuada con la solubilidad de la glucosa en agua (figura 18) por lo que estos resultados deben ser tomados con cautela.

VII.3 Uso de cosolventes

Otra estrategia para mantener baja la actividad de agua, sin tener el efecto desfavorable de la inhibición por exceso de sustrato, consistió en usar cosolventes miscibles en agua que disminuyen la actividad de agua. En esta parte del proyecto se probaron tres cosolventes (DMF, DMSO y 2M2B), además de un cosolvente miscible en la fase orgánica con el que se pudiera favorecer la partición del producto hacia la fase orgánica.

VII.3.1 Dimetil formamida:

Se probó la actividad de la enzima en medio acuoso, después de incubarla a 90°C en presencia de diferentes proporciones de DMF.

Tabla 11. Actividad de la enzima β -gli HT en medio acuoso con ONPGlu 2mM como sustrato, después de incubar con DMF

% DMF	tiempo (min)	Actividad remanente (%)
99%	10	2
50%	30	25
10%	90	73

Como se puede observar de la tabla 11, la enzima fue bastante sensible al DMF, a pesar de esto fue posible llevar a cabo la reacción a bajas proporciones de DMF puesto que la enzima aun conservaba actividad, por lo que se realizó una reacción de síntesis de heptil glucósido con DMF 5%, regulador 5%, heptanol 90% usando glucosa a una concentración de 9.5 g/l, en este medio de reacción se obtuvieron 1.21 mM de heptil-glucósido a las 2 horas. Al comparar este resultado con un sistema bajo condiciones semejantes pero sin uso de cosolventes (sistema bifásico 9:1), en el que se obtuvo al mismo tiempo de reacción 4 mM de heptil glucósido, se observó que la productividad es muy baja. Esto se debió probablemente a la escasa cantidad de agua en el medio por estar compuesto principalmente de heptanol.

VII.3.2 Dimetilsulfóxido:

Se probó la actividad de la enzima en medio acuoso, después de incubarla a 90°C con DMSO al 10%, encontrando que bajo estas condiciones no se observó inactivación de la enzima aún después de 2 horas de incubación.

Al no observar inactivación con DMSO al 10%, se realizó una reacción en un medio compuesto de DMSO 10%, heptanol 90% y glucosa 4.5 g/l, se usó esta concentración de glucosa, por su baja solubilidad en este sistema. Con esta estrategia no se observó producción de heptil glucósido. Al analizar el porcentaje de agua de la mezcla por Karl Fisher se encontró que tenía un valor de 0.65%, por lo que se infiere que la cantidad de agua disponible en el medio fue tan baja que afectó severamente la actividad de la enzima

Por lo tanto se realizó una segunda reacción de síntesis de heptil glucósido en el mismo medio adicionando regulador al 0.5%, el porcentaje de DMSO se ajustó a 9.5% y se pudo disolver una mayor cantidad de glucosa, a una concentración final de 18 g/l. El porcentaje de agua de esta mezcla medido por Karl Fisher fue de 3.87%. A los 180 minutos se obtuvo 0.8 mM de heptil-glucósido, este resultado muestra una productividad y velocidad de reacción muy bajas, similar a lo obtenido con DMF que sugiere nuevamente que la enzima no es estable en el medio, y puesto que las pruebas de inactivación se realizaron en un medio acuoso, en presencia de diferentes proporciones del cosolvente, se decidió probar la estabilidad de la enzima en el medio de reacción sin glucosa.

Los resultados de la prueba de inactivación de la enzima en la mezcla de reacción se muestran en la tabla 12, donde se puede observar que ciertamente la enzima no fue estable en el medio de reacción y se inactivó rápidamente.

Tabla 12. Inactivación de la enzima β -gli HT en el medio de reacción.

Heptanol / DMSO / regulador	Actividad remanente a las 2 h (%)
85 / 10 / 5	11
75 / 20 / 5	33

VII.3.32-metil-2-butanol

Para evaluar el desempeño de 2-metil 2-butanol como cosolvente, se realizaron tres reacciones con diferentes proporciones regulador-heptanol-2M2B

En el sistema A, compuesto de 2M2B 85%, heptanol 10%, regulador 5% y glucosa 9 g/l, se observó que prácticamente no se disolvió la glucosa y se obtuvo una cantidad mínima del glucósido, medido en 0.326 mM hep-glu a las 4 horas de reacción. Con el sistema B, compuesto de 2M2B 90%, heptanol 10% y glucosa 9 g/l se obtuvieron resultados parecidos al sistema A, obteniéndose 0.07 mM hep-glu a las 4 horas de reacción. El sistema C tiene la misma composición del sistema B, pero con mayor concentración de glucosa, ajustada a 18 g/l, nuevamente no se disolvió totalmente el azúcar y además no hubo producción de heptil-glucósido.

Con estos resultados se concluye que el uso de cosolventes miscibles en agua no es favorable para el control de la actividad del agua del sistema, puesto que la enzima es muy sensible a este tipo de sustancias.

VII.3.4 Octano.

Debido a que se comprobó que los cosolventes miscibles en agua no son favorables al proceso, se probó usar un cosolvente miscible en la fase orgánica, con lo que no se obtendría un sistema homogéneo sino un sistema de dos fases, donde la fase orgánica se forma con el solvente, que en este caso es el heptanol y el cosolvente miscible en él,. Al determinar el coeficiente de partición de heptil glucósido entre octano-heptanol y agua se encontró que éste tuvo un valor de 2.71, que es menor al obtenido

entre heptanol solo y agua ($P_i=14$), por lo que se concluye que el uso de octano no favorece la extracción del producto hacia la fase orgánica

VII.4 Recuperación del producto por adsorción en diferentes soportes

Se probaron varios soportes con el objetivo de recuperar el producto mediante un proceso de adsorción, y se obtuvieron los siguientes resultados:

- a. Sílica gel no adsorbió al heptil glucósido
- b. Carbón activado adsorbió 1.6 mg de heptil glucósido por gramo de carbón activado.
- c. Alúmina adsorbió 10 mg de heptil glucósido por gramo de alúmina.

De las pruebas de elución se obtuvo que es posible desorber el producto del soporte, tanto carbón activado como alúmina, usando metanol que posteriormente puede ser evaporado con facilidad.

La limitante para la aplicación de este proceso en continuo fue que la fase orgánica alcanza a disolver una cantidad significativa de agua (7% aproximadamente). Esto ocasionó pérdida de la enzima, que se distribuye mayoritariamente en la fase acuosa. Esto se comprobó al realizar la síntesis de heptil glucósido cambiando la fase orgánica cada media hora, observándose que la cantidad de producto obtenido cada vez fue menor, aún cuando el tiempo y condiciones de reacción fueron constantes. Para aplicar este método es necesario asegurar que la enzima no saiga del sistema, lo que podría lograrse al inmovilizarla en algún soporte.

VIII. CONCLUSIONES

- ◆ Se caracterizó la β -glicosidasa hipertermofílica de Diversa Corp. (San Diego CA), determinando por electroforesis en gel de poliacrilamida que la preparación tiene una pureza adecuada y que se trata de un dímero de peso molecular de 120 kDa, además presenta una banda sin actividad a los 54 kDa correspondiente al monómero inactivo. Se determinaron los parámetros cinéticos para diversos sustratos, comprobando la amplia especificidad de sustrato que presenta la enzima así como la alta afinidad que tiene por los alquil glucósidos. Además se encontró que los alquil glucósidos actúan como inhibidores competitivos con un K_i que corresponde al valor de K_m de dichos glucósidos.
- ◆ Se comprobó la viabilidad de la síntesis de heptil glucósido en un sistema bifásico catalizada por la β -gli HT.
- ◆ Al tener una mayor proporción de fase orgánica (9:1) se obtiene mayor rendimiento y productividad con respecto al sistema donde la relación de fases es 1:1, debido a una mayor extracción del producto y probablemente a una menor inactivación interfacial.
- ◆ La reacción de síntesis de heptil glucósido se detiene por llegarse al equilibrio aunque en algunos casos no se descarta la desactivación interfacial, obteniendo la mejor conversión (12%) en un sistema bifásico en donde se controla la actividad de agua aumentando la concentración de glucosa en la fase orgánica.
- ◆ A pesar de que se alcanzaron productividades mayores a las reportadas en la literatura, el rendimiento es muy bajo. Esto se debe a que la enzima tiene mayor afinidad por el producto ($K_i= 0.26$), que por el sustrato ($K_m= 10$), por lo que se alcanza un equilibrio desfavorable para la producción de heptil glucósido.

IX. PERSPECTIVAS

- ◆ Para obtener mejores rendimientos en el sistema propuesto en este trabajo, la alternativa es desarrollar un sistema de extracción continua o semicontinua del producto. Para operar en 2 fases se requiere inmovilizar la enzima, de manera que sea posible retirar el producto de manera selectiva de la fase orgánica. Además es necesario encontrar un adsorbente adecuado que retenga preferencialmente al heptil glucósido, o bien, desarrollar otro sistema de extracción

- ◆ De las conclusiones de este proyecto se deriva que el mejor método para producir heptil glucósido es aquel controlado cinéticamente y no termodinámicamente; esto podría lograrse al acoplar la reacción de la β -gli HT con una celobiohidrolasa, partiendo de celulosa como sustrato.

X. BIBLIOGRAFIA

- Adams M.W. (1993). Enzymes and proteins from organisms that grow near and above 100°C. *Ann. Rev. Microbiol.* 47:627-658.
- Adams M.W., F.B. Perler, R.M. Kelly (1995). Extremozymes: expanding the limits of biocatalysis. *Biotechnology.* Jul,13-7: 662- 668.
- Adelhorst K., F. Björkling, S.E.Godtfredsen, O. Kirk (1990). Enzyme catalyzed preparation of 6-O-acylglucopyranoside. *Synthesis.* 112-115.
- Aguilar C.F., I. Sanderson, M. Moracci, M. Ciaramella, R. Nucci, M. Rossi, L.H. Pearl (1997). Crystal structure of the β -glycosidase from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*: Resilience as a key factor in thermostability. *J. Mol. Biol.* 271: 789- 802.
- Aguilar A. (1996). Extremophile research in the European Union; from fundamentals aspects to industrial expectations. *FEMS Microbiol. Rev.* 18:89-92.
- Bell G., P.J. Halling, B.D. Moore, J. Partridge; G. Rees (1995). Biocatalysis behaviour in low-water systems. *Trends Biotechnol.* 13: 468 – 473.
- Bousquet M.P, R.M. Willemot, P. Monsan (1998). Enzymatic synthesis of alkyl- α -glucoside catalysed by a thermostable α -transglucosidase in solvent-free organic medium. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 50: 167-173.
- Bloomer, S., P. Adlercreutz, B. Mattiason (1992). Facile synthesis of fatty acid esters in high yields. *Enzyme Microb. Technol.* 14: 546- 552.
- Brown G.M., P. Dubreuil, F.M. Ichhaporia, J.E. Desnoyers (1970). *Can. J. Chem.* 48, 2525-2531.
- Chahid Z., D.Montet, M.Pina, J.Graille (1992). Effect of water activity on enzymatic synthesis of alkylglycosides. *Biotechnol. Lett.* 14, 4:281-284.
- Chahid Z., D.Montet, M.Pina, F. Bonnot, J.Graille (1994). Biocatalyzed octylglycoside synthesis from a disaccharide. *Biotechnol. Lett.* 16, 795-800.

- Chi Y.I., L.A. Martínez-Cruz, J. Jancarik, R.V. Swanson, D.E. Robertson, S.H. Kim (1999). Crystal structure of the β -glycosidase from the hyperthermophile *Thermosphaera aggregans*: insights into its activity and thermostability. *FEBS Lett.* 445: 375- 383.
- Chirife J., C. Ferro-Fontan, E.A. Benmergui (1980). The prediction of water activity in aqueous solutions in connection with intermediate moisture foods. *J. Food Technol.* 15: 59- 70
- Davies G., B. Henrissat (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure.* 3: 853 – 859.
- Dintinger T., D. Dutheil-Bouédec, M. Bouchonneau, C. Tellier (1994). Synthesis of β -mercaptoethyl-glycosides by enzymatic reverse hydrolysis and trasglycosilation. *Biotechnol. Bioeng.* 16: 689-692.
- Drouet P., M. Zhang, M.D. Legoy (1994). Enzymatic synthesis of alkyl- β -D-xylosides by transxylosylation and reverse hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.* 43: 1075- 1080.
- Eggers D.K., H.W. Blanch, J.M. Praunsnitz (1989). Extractive catalysis: solvent effects on equilibria of enzymatic reactions in two phase systems. *Enzyme Microb. Technol.* 11: 84- 89.
- Gabelsberger J., W. Liebl, K.H. Schleifer (1993). Purification and properties of recombinant b-glucosidase of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40: 44-52.
- García-Garibay M., A. López-Munguía, E. Bárzana (2000a). Alcoholysis and reverse hydrolysis reactions in organic one-phase system with a hyperthermophilic β -glycosidase. *Biotechnol. Bioeng.* 69:627-632.
- García-Garibay M., A. López-Munguía, E. Bárzana (2000b). Effect of β -galactosidase hydration on alcoholysis reaction in organic one-phase liquid systems. *Biotechnol. Bioeng.* 70:647-653.
- Halio S.B., I.I. Blumental, S.A. Short, B.M. Merril, R.M. Kelly (1996). Sequence, expression in *E. coli*, and analysis of the gene encoding a novel intracellular protease

(PfpI) from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. J. Bacteriol. 178: 2605- 2612.

- Herbert R.A. (1992). A perspective on the biotechnological potential of extremophiles. Trends Biotechnol. 10: 395- 401.
- Henrissat B., Bairoch A. (1993). New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. Biochem. J. 293:781-788.
- Hill K., O. Rhode (1999). Sugar-based surfactants for consumer products and technical applications. Fett. Lipid. 101: 25- 33.
- Ismail A., M. Ghoul (1996). Enzymatic synthesis of butylglycosides by glycosidases. Biotechnol. Lett. 18: 1199-1204.
- Ismail A., M. Linder, M. Ghoul (1999). Optimization of butylgalactoside synthesis by β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. Enzyme Microb. Technol. 25: 208-213.
- Itoh H., Y. Kamiyama (1995). Synthesis of alkyl β -mannosides from mannoibiose by *Aspergillus niger* β -mannosidase. J. Ferm. Bioeng. 80: 510- 512.
- Kirchner G., M.P. Scollar, A.M. Klibanov (1985) Resolution of racemic mixtures via lipase catalyst in organic solvent. J. Am. Chem. Soc. 107: 7072-7076.
- Kelly R.M., M.W. Adams (1994). Metabolism in hyperthermophilic microorganisms. Antoine Van Leeuwenhoek. 66: 247- 270.
- Kengen W.M., E.J. Luesink, A.J.M. Stams, A.J.B. Zehnder (1993). Purification and characterization of an extremely thermostable β -glucosidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. Eur. J. Biochem. 213: 305-312.
- Kobayashi T., S. Adachi, K. Nakanishi, R. Matsuno (2000). Synthesis of alkyl glycosides through β -glucosidase-catalyzed condensation in an aqueous-organic biphasic system and estimation of the equilibrium constants for their formation. Biotechnol. Lett. 22: 1845-1848.
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685.
- Laroute V., R.M.Willemot (1992a). Glucoside synthesis by glucoamylase or β -glucosidase in organic solvents. Biotechnol. Lett. 14, 3:169-174.

- Laroute V., R.M.Willemot (1992b). Effect of organic solvents on stability of two glycosidases and on glucoamylase-catalysed oligosaccharide synthesis. *Enzyme Microb. Technol.*14: 528- 534.
- Lin S.C. (1996). Biosurfactants: Recent advances. *J. Chem.Tech. Biotechnol*; 66: 109-120.
- Ljunger G., P. Adlercreutz, B. Mattiasson (1994). Enzymatic synthesis of octyl- β -glucoside in octanol at controlled water activity. *Enzyme Microb. Technol.* 16: 751-755.
- Lowry O.H., N.J. Rosebrough, A. Farr, R.J. Randall (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265- 275.
- McCarter J.D., S.G. Withers (1994). Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 4: 885-892.
- Panintrarux C., S. Adachi, Y. Araki, Y. Kimura, R. Matsuno (1995). Equilibrium yield of n-alkyl- β -D-glucoside through condensation of glucose and n-alcohol by β -glucosidase in a biphasic system. *Enzyme Microb. Technol.* 17: 32- 40.
- Panintrarux C., S. Adachi, R. Matsuno (1996). n-Octyl β -D-glucoside synthesis through β -glucosidase catalysed condensation of glucose and n-octanol in a heterogeneous system with high glucose concentration. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 165-172
- Panintrarux C., S. Adachi, R. Matsuno (1997). β -Glucosidase-catalyzed condensation of glucose with 2-alcohols in buffer-saturated alcohols. *Biotechnol. Lett.*19, 9: 899- 902.
- Park D.W., H.S. Kim, J.K. Jung, S. Haam, W.S. Kim (2000). Enzymatic synthesis of alkylglucosides by amphiphilic phase enzyme reaction. *Biotechnol. Lett.* 22: 951-956.
- Park H., D.S. Lee (1992). Sugar solubilization agent for enzymatic condensation of glucose in organic solvents. *Biotechnol. Lett.* 14: 111- 116

- Parry N.J., D.E. Beever, E. Owen, I. Vandenberghe, J. Van Beeumen, M.K. Bhat (2001). Biochemical characterization and mechanism of action of a thermostable β -glucosidase purified from *Thermoascus aurantiacus*. *Biochem. J.* 353: 111- 127.
- Pouwels J., M. Moracci, B. Cobucci-Ponzano, G. Perugino, J. van der Oost, T. Kaper, J.H.G. Lebbink, W.M. de Vos, M. Ciaramella, M. Rossi (2000) Activity and stability of hyperthermophilic enzymes: a comparative study on two archeal β -glucosidases. *Extremophiles.* 4: 157- 164.
- Querol E., J. Perez-Pons, A. Mozo-Villarias (1996). Analysis of protein conformational characteristics related to thermostability. *Protein Eng.* 9: 265-271.
- Ricca J.M., D.H.G. Crout (1989). Peptides synthesis catalysed by chymotrypsin in organic solvent. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I:* 2126- 2127
- Rodríguez M., A. Gómez, F. González, E. Bárzana, A. López-Munguía (1997). Stability of invertase in alcoholysis reactions with methanol. *J. Mol. Catalysis B: Enzym.* 2: 299-306.
- Rubio E., A. Fernandez-Mayorales, A.M. Klibanov (1991). Effect of the solvent on enzyme regioselectivity. *J. Am. Chem. Soc.* 114: 1882- 1884.
- Santamaría R.I., G. Del Río, G. Saab, M.E. Rodríguez, X. Soberón, A. López-Munguía (1999) Introducing transglycosylation activity in a liquefying α -amylase. *FEBS Lett.* 452: 346- 350.
- Sarney D.B., E.N. Vulfson (1995). Application of enzymes to the synthesis of surfactants. *Trends Biotechnol.* 13: 164 – 172
- Selisko B., R. Ulbrich, A. Schellenberger, U. Müller (1990). Invertase-catalysed reaction in alcoholic solutions. *Biotechnol. Bioeng.* 35: 1006- 1010.
- Shin H.K., J.Y. Kong, J.D. Lee, T.H. Lee (2000). Synthesis of hydroxybenzyl- α -glucosides by amyloglucosidase-catalyzed transglycosylation. *Biotechnol. Lett.* 22: 321- 325.
- Shinoyama H., T. Yasui (1988). Superiority of *Aspergillus niger* β -xylosidase for the enzymatic synthesis of alkyl β -xylosides in the presence of a variety of alcohols. *Agric. Biol. Chem.* 52: 2375- 2377

- Shinoyama H., Y. Kamiyama, 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: 2197-2202.
- Shinoyama H., K. Takei, A. Ando, T. Fujii, M. Sasaki, Y. Doi, T. Yasui (1991a). Enzymatic synthesis of useful alkyl- β -glucosides. *Agric. Biol. Chem.* 55:1679- 1681.
- Shinoyama H., A. Ando, T. Fujii, T. Yasui (1991b). The possibility of enzymatic synthesis of a variety of β -xylosides using the transfer reaction of *Aspergillus niger* β -xylosidase. *Agric. Biol. Chem.* 55: 849- 850
- Stetter, K.O., G. Fiala, G. Huber, R. Huber, A. Seegerer (1990). Hyperthermophilic microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 75, 17-124.
- Stevenson D.E., R.A. Stanley, R.H. Furneaux (1993). Optimization of alkyl- β -D-galactopyranoside synthesis from lactose using commercially available β -D-galactosidases. *Biotechnol. Bioeng.* 42: 657- 666.
- Trimbur, D. R.A.J. Warren, S.G. Withers (1993) en " β -glucosidases, biochemistry and molecular biology" ed. Asin Eses. American Chemical Society. 42- 55.
- Vic G., J. Biton, D. LeBeller, J.M. Michel, D.Thomas (1995). Enzymatic glucosylation of hydrophobic alcohols in organic medium by the reverse hydrolysis reaction using almond β -D-glucosidase. *Biotechnol. Bioeng.* 46: 109-116.
- Vic G., J.J. Hastings, D.H.G. Crout, (1996). Glycosidase-catalysed synthesis of glycosides by an improved procedure for reverse hydrolysis: Application to the chemoenzymatic synthesis of galactopyranosyl (1-4)-O- α -galactopyranoside derivatives. *Tetrahedron Asymmetr.* 7; 1973-1984.
- Vic G., D. Thomas, D.H.G. Crout (1997). Solvent effect on enzyme-catalyzed synthesis of β -D-glucosides using the reverse hydrolysis method: Application to the preparative-scale synthesis of 2-hydroxybenzyl and octyl- β -D-glucopyranosides. *Enzyme Microb. Technol.* 20: 597- 603.
- Voet D., J. Voet (1995). *Biochemistry*, 2nd edition, John Wiley and Sons, pp. 353.
- vonRybinsky W., K. Hill (1998). Alkylpoliglycosides – Properties and applications of a new class of surfactants. *Angew. Chem. Int. Ed.* 37: 1328- 1345.

- Vulfson E.N., R. Patel, J.E. Beecher, A.T. Andrews, B.A. Law (1990). Glycosidase in organic solvents: I. Alkyl- β -glucoside synthesis in a water-organic two-phase system. *Enzyme Microb. Technol.* 12: 950- 954.
- Wallenfels, K., O. P. Malhotra (1961). Galactosidases. *Adv. Carbohydr. Chem*; 16; 239- 298.
- Woese C.R., O. Kandler, M.L. Wheelis (1990). Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 87: 3476-4579.
- Zaks A., A.M. Klivanov (1984). Enzymatic catalysis in organic media at 100°C. *Science*. 224: 1249- 1251.