

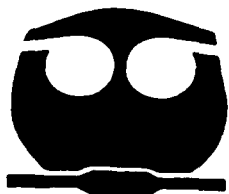


**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**

**"CONDICIONES QUE AFECTAN LA SINTESIS ENZIMATICA DE HEPTIL GLUCOSIDO A 90°C EN MEDIO ORGANICO"**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**QUIMICA DE ALIMENTOS**  
P R E S E N T A :  
**MARCELA GARCIA ANTUÑANO**



MEXICO, D. F.



2002

**EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**|| Jurado asignado:**

**Presidente**

Prof. Agustín López-Munguía Canales

**Vocal**

Prof. Eduardo Bárzana García

**Secretario**

Prof. Raúl Aguilar Caballero

**1er. Suplente**

Prof. Francisco Ruíz Terán


**2do. Suplente**

Prof. Maricarmen Quirasco Baruch

**Sitio donde se desarrolló el tema:** Lab. 314, Conjunto E. Facultad de Química. UNAM

**Asesor**

Dr. Eduardo Bárzana García:

Handwritten signature of E. Bárzana in black ink, written over a horizontal line.

**Sustentante**

Marcela García Antuñano:

Handwritten signature of Marcela García Antuñano in black ink, written over a horizontal line.

## **Agradecimientos**

***Dedico este trabajo a Pilo porque estoy segura que donde quiera que se encuentre está orgulloso de mí. Te extrañamos***

***Tropecé con piedras en el camino que gracias a ustedes pude vencer, a mis maestros, a mis amigos, guardo en mi mente y en el saber.***

### ***A mi mamá***

Por ser mi mamá y mi amiga; porque siempre has estado conmigo cuando más te he necesitado, porque siempre tienes el consejo y las palabras adecuadas en el momento justo, por apoyarme, impulsarme y consolarme. Gracias por reír con mis alegrías y llorar con mis tristezas. Gracias porque todo lo que soy te lo debo a ti. Comparto este logro contigo porque más que mío es tuyo. te quiero mucho.

### ***A mis hermanos y familia***

A Ivonne, Nelson; Ivette, Rosa Nelly y Pilo, gracias por confiar en que lo lograría a pesar de todo. Gracias por cuidarme y preocuparse por mí siempre. Espero nunca defraudarlos. Gracias a mis sobrinos por existir y también por confiar en que la tía Ela finalmente se titularía. También gracias a mis tíos, primos y cuñados porque de una forma u otra siempre han estado siempre dispuestos a ayudarme.

### ***A Marisela***

Porque has sido más que una amiga, una hermana además de mi confidente. Gracias, Pera por haber compartido conmigo todos estos años haciéndolos mucho más fáciles y divertidos (no en balde estas arrugas que ahora tengo). Todas esas horas de clases y de laboratorio, así como congresos, viajes, tesis y hasta una huelga no hubiesen sido lo mismo si no hubiéramos estado juntas. Gracias también por compartir conmigo el espíritu PUMA y el gran sentimiento de pertenencia que tenemos por la UNAM y que tanto hemos

defendido. Ten por seguro que haré cuanto me sea posible por conservar esta amistad pase lo que pase.

### ***A La Familia López Vargas***

Por haberme adoptado un sin número de veces. Gracias por sus sabios consejos y por haberme abierto las puertas de su casa y de su familia. Gracias a Luis Alberto por ser de mis mejores amigos.

### ***A mis amigos de la Facultad***

A Lalo, Marisela, Iván, Leonardo, Sofía, Francisco y especialmente a Carlos Belloc, gracias por ser mis amigos, por estar conmigo durante toda la carrera y por haber defendido juntos a la facultad antes, durante y después del paro.

### ***A Deber Universitario***

Gracias a todos y cada uno de los integrantes de deber porque de todos aprendí mucho.

### ***A la Familia***

Marisela, Luis Alberto, Juan Carlos, Chavarri, Emmanuel, Moisés, Ana, Tomás, Nayelli, Karla, Bush, Arturo y los no muy constantes Miguel Ramos y Luis Torregrosa, Les estoy agradecida por compartir conmigo un ideal que nos llevó a una gran amistad y porque de ustedes aprendí a luchar por la UNAM sin esperar nada a cambio.

### ***A mis amigas***

Lisbeth, Brenda Calderón y Brenda Cervantes. Gracias por ser mis amigas en las buenas y en las malas, y por el apoyo moral que siempre me han dado.

### ***A mis compañeros del laboratorio***

Por el apoyo que me dieron para realizar esta tesis. En especial gracias a Sandra por toda la ayuda y conocimiento que hicieron posible este trabajo.

### ***A mis maestros***

Muchas gracias a todos los maestros que tuve durante la carrera en especial a Rebeca Ugalde, José Pedraza, Guillermo Molina, Lucía Cornejo y Francisco Rojo porque sin lugar a dudas fueron muchas las cosas que me enseñaron tanto en lo académico como en lo personal.

### ***A los que no fueron mis maestros***

Gracias a Raúl Garza, León Coronado, Eduardo Marambio, Eduardo Rojo y de Regil, Mayo Martínez, José Luis Mateos, Carlos Amador, Fernando Barragán, Guillermo González, Jorge Vázquez y Santiago Capella, por la confianza, la amistad y por haberme permitido colaborar con ustedes por el bien de la facultad. Gracias también a Bety, Maribel, Lucy, Margarita, Sr. Pedro y Pily (senden) por el aprecio que me tienen y que es correspondido.

### ***A los miembros del jurado***

Gracias a Agustín López-Munguía, Raúl Aguilar, y Eduardo Bárzana por aceptar ser parte del jurado y por su valiosa contribución en este trabajo.

### ***Al Sistema Nacional de Investigadores***

Por el apoyo económico que recibí durante la realización de esta tesis.

### ***A Eduardo Bárzana***

Por la oportunidad que me diste para hacer la tesis contigo. Gracias también por la amistad, consejos, y por preocuparte por lo que me depara el futuro. Guiaste mis pasos hacia la ciencia y en momentos difíciles me tuviste mucha paciencia. Tendrás mi gratitud eternamente.

### ***A Federico Galdeano***

Fuiste mi maestro un día, recuerdo tu enseñanza y sabiduría, admiré tu sencillez, tu gentileza difícil de olvidar.

### ***A Enrique Bazúa***

Momentos difíciles pasamos cuando no reinaba la paz en nuestra facultad, luchamos juntos, siempre unidos, sabios consejos siempre me dio: Me tendió la mano y escuchó mis quejas para salvar a nuestra facultad.

### ***A Alejandro Iñiguez***

Por tu nobleza y alegría creció nuestra amistad. Tienes el don, enseñando siempre a escalar para llegar a la cima y en todo triunfar.

### ***A José Narro y Roberto Zozaya***

Son apóstoles que me enseñaron el orgullo de la UNAM y lo sagrado del deber.

### ***A Eduardo Cortés***

Gracias por todo el cariño que hasta ahora me has dado.

### ***A la UNAM***

Es grandiosa tu misión de enseñar al que no sabe, guías bien su corazón como un alto personaje. Encaminas siempre su causa con tu grandiosa misión, fuiste mi hogar y mi casa. A Dios le doy las gracias por haberme permitido hacer toda mi carrera en el templo del saber.

**ÍNDICE**

|  | <b>página</b> |
|--|---------------|
| <b>Resumen</b>                                       | <b>1</b>      |
| <b>I. Introducción</b>                               | <b>3</b>      |
| <b>II. Objetivos</b>                                 | <b>5</b>      |
| <b>II.1 Objetivo General</b>                         | <b>5</b>      |
| <b>II.2 Objetivos Particulares</b>                   | <b>5</b>      |
| <b>III. Antecedentes</b>                             | <b>6</b>      |
| <b>III.1 Biocatálisis en medio orgánico</b>          | <b>6</b>      |
| <b>III.2 Síntesis enzimática de Aquil glicósidos</b> | <b>8</b>      |
| <b>III.3 Papel del agua</b>                          | <b>12</b>     |
| <b>III.4 Uso de cosolventes</b>                      | <b>14</b>     |
| <b>III.5 Microorganismos Extremófilos</b>            | <b>15</b>     |
| <b>III.6 <math>\beta</math>-Glicosidasa</b>          | <b>17</b>     |
| <b>IV. Materiales y Métodos</b>                      | <b>19</b>     |
| <b>IV.1 Materiales</b>                               | <b>19</b>     |
| <b>IV.1.1 Enzima</b>                                 | <b>19</b>     |
| <b>IV.1.2 Solventes y otros</b>                      | <b>19</b>     |
| <b>IV.2 Equipo</b>                                   | <b>20</b>     |



---

|                                    |    |
|------------------------------------|----|
| IV.3 Métodos                       | 20 |
| IV.3.1 Contenido de agua           | 20 |
| IV.3.2 Sistemas de reacción        | 22 |
| IV.3.3 Análisis por HPLC           | 24 |
| V. Resultados y Discusión          | 26 |
| V.1 Contenido de agua              | 26 |
| V.2 Estudios cinéticos             | 36 |
| V.3 Observaciones adicionales      | 40 |
| VI. Conclusiones y Recomendaciones | 43 |
| VI.1 Conclusiones                  | 43 |
| VI.2 Recomendaciones               | 45 |
| VI.3 Bibliografía                  | 47 |

**ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS**

|  | <b>página</b> |
|--|---------------|
| <b>Figura 1</b> <i>Esquema de las reacciones de glicósidos</i>   | 9             |
| <b>Tabla 1</b> <i>Condiciones para la síntesis de aquil glicósidos mediante glicosidasas de diversas fuentes</i>   | 10            |
| <b>Figura 2</b> <i>Ejemplo de cromatograma del perfil de elusión de los glicósidos</i>   | 25            |
| <b>Figura 3</b> <i>Curva de solubilidad del agua en heptanol a 90 °C con diferentes concentraciones iniciales de agua sin solvente y sin cosolvente. Metodología A</i> | 27            |
| <b>Figura 4</b> <i>Curva de solubilidad del agua en heptanol a 90 °C con diferentes concentraciones iniciales de agua sin y sin cosolvente. Metodología B</i>          | 28            |
| <b>Figura 5</b> <i>Efecto del cosolvente en la solubilidad del agua en heptanol a 90 °C. Metodología A</i>   | 31            |
| <b>Figura 6</b> <i>Efecto del cosolvente en la solubilidad del agua en heptanol a 90 °C. Metodología B</i>   | 32            |
| <b>Figura 7</b> <i>Efecto del cosolvente en la solubilidad del agua en heptanol a 90 °C. Acetato de Etilo</i>  | 34            |
| <b>Figura 8</b> <i>Efecto del cosolvente en la solubilidad del agua en heptanol a 90 °C. Acetato de Butilo</i>   | 35            |
| <b>Figura 9</b> <i>Efecto del cosolvente en la solubilidad del agua en heptanol a 90°C. Reacción Enzimática</i>  | 36            |
| <b>Figura 10</b> <i>Actividad específica de la <math>\beta</math>-Glicosidasa Hipertermófila</i>   | 37            |
| <b>Figura 11</b> <i>Caracterización cinética de la <math>\beta</math>-Glicosidasa Hipertermófila</i>   | 38            |
| <b>Figura 12</b> <i>Medición de la absorbancia en el sistema de reacción en base al obscurecimiento observado</i>  | 41            |
| <b>Figura 13</b> <i>Determinación de proteína en base al obscurecimiento observado en el sistema de reacción</i>   | 42            |

## RESUMEN

En los últimos años se ha estudiado la síntesis de alquil glicósidos por métodos enzimáticos, tanto en medio acuoso como orgánico, utilizando la enzima  $\beta$ -glucosidasa hipertermofílica, se obtienen bajos rendimientos debido a una fuerte inhibición por producto. De igual manera, la reacción se retrasa por la baja solubilidad del sustrato carbohidrato en medio orgánico.

En el presente trabajo se realizó la síntesis enzimática de heptil glucósido por hidrólisis reversa en un sistema orgánico, a  $90^{\circ}\text{C}$  con una  $\beta$ -glucosidasa hipertermofílica, logrando obtener conversiones del 50% a las 24 horas partiendo de concentraciones iniciales de 20mM y 60mM de glucosa. Para esto, se determinó previamente la actividad específica de la  $\beta$ -glucosidasa. y los parámetros cinéticos  $k_{cat}$  y  $K_m$ .

Algunos autores han hecho referencia a la importancia del papel del agua durante la biocatálisis, específicamente, en la síntesis enzimática de alquil glicósidos, sin embargo, no hay reportes en donde se haya dado un seguimiento al contenido de agua durante la reacción. Uno de los aportes de esta tesis es el estudio del comportamiento del agua en el sistema de reacción y el efecto de cosolventes sobre la solubilidad de ésta en el heptanol. Para esto se llevaron a cabo diversos experimentos de estabilidad de fases en donde se encontró que el 7% (v/v) representa la concentración de agua a la cual se logra mantener el sistema en una fase. Asimismo, se

estudió el efecto de algunos cosolventes en un intervalo de  $\log P$ , bajo la hipótesis de que éstos tuvieran la capacidad de formar puentes de hidrógeno con el agua, manteniéndola incorporada al sistema. Sin embargo, con los cosolventes y concentraciones que se probaron no se logró el objetivo de retener una concentración mayor de agua en la fase orgánica y como consecuencia obtener una mayor solubilización del sustrato en dicha fase.

## **I. INTRODUCCIÓN**

Los agentes surfactantes son moléculas anfífilas. Esta característica estructural le confiere a la molécula ciertas habilidades como las siguientes: ubicarse en interfases para reducir la tensión superficial; dispersar y/o solubilizar sustancias insolubles; alterar propiedades espumantes de soluciones acuosas, etc. Los surfactantes son ampliamente utilizados en casi todos los sectores industriales y su producción en todo el mundo supera los 3 millones de toneladas al año (1). El 54% del consumo total de surfactantes es para uso casero y de lavandería y el 32% está destinado al uso industrial, mientras que entre el 6% y el 8% son utilizados en productos para cuidado personal (1). Resulta pues relevante que, ante la creciente preocupación por el cuidado del medio ambiente, se ha impulsado recientemente la búsqueda de técnicas biológicas para la producción de surfactantes biodegradables.

Como todas las especies con actividad surfactante, los biosurfactantes contienen una o varias porciones lipofílicas e hidrofílicas. En lo general, la porción lipofílica de los biosurfactantes puede ser una cadena hidrocarbonada o inclusive una proteína con una alta proporción de sitios hidrofóbicos. Por su parte, la porción hidrofílica está formada por grupos distintivos, neutros y cargados, como OH, fosfato, carboxilato o inclusive un carbohidrato (2).

Existen una amplia gama de compuestos con actividad surfactante biosintetizados por una impresionante variedad de organismos vivos. Es el caso de plantas (saponinas), microorganismos (glicolípidos), e inclusive en estructuras animales complejas que incluyen el cuerpo humano (ácidos biliares) (2).

El primer alquil glucósido sintético fue creado e identificado hace más de 100 años por Emil Fischer (4). La síntesis de alquil glucósidos que desarrolló Fisher, involucraba la reacción de glucosa con un alcohol hidrofílico como metanol, etanol o glicerol. Tiempo después, se emplearon alcoholes de cadena larga, de entre ocho y dieciséis carbonos, dando como resultado una mezcla de alquil mono-, di-, tri- y oligoglicósidos. Los productos de este proceso industrial son llamados alquil poliglicósidos (4).

Para obtener compuestos químicamente definidos se requieren pasos de protección-desprotección de grupos hidroxilo, lo que lleva al uso de reactivos costosos y condiciones de operación que encarecen su producción (5). En la última década se ha puesto mayor atención en la síntesis enzimática, utilizando glicosidasas como catalizadores, evitando así los antes mencionados pasos de protección y desprotección. Es por lo tanto necesario el profundizar en el conocimiento de esta síntesis enzimática con el objeto de incrementar sus posibilidades de implementación a nivel industrial.

## **II. OBJETIVOS**

### ***Objetivo General***

Identificar y conocer los factores más relevantes que limitan la reacción de síntesis enzimática de heptilglucósido en medio orgánico a 90°C empleando una enzima  $\beta$ -Glicosidasa hipertermofílica (HT) comercial.

### ***Objetivos Particulares***

- ✓ Estudiar las condiciones de equilibrio del agua presente en sistemas ricos en heptanol.
- ✓ Establecer el efecto de cosolventes de polaridad variada en la solubilidad del agua en heptanol, y su consecuente efecto en la actividad enzimática.
- ✓ Determinar los parámetros cinéticos de la  $\beta$ -Glicosidasa HT.

### **III. ANTECEDENTES**

#### **III.1 Biocatálisis en medio orgánico**

El medio acuoso es el medio natural y tradicional de la biocatálisis. Sin embargo, el potencial que las enzimas presentan en solventes orgánicos como catalizadores activos, ha recibido gran atención en las últimas dos décadas. En principio, la introducción de solventes orgánicos en el sistema de reacción puede presentar ventajas en condiciones específicas como las siguientes: (a) Los solventes orgánicos mejoran la solubilidad de los reactivos hidrofóbicos, aumentando la productividad de sistemas de reacción que dependen de este reactivo, (b) en reacciones donde el producto pueda sufrir hidrólisis, el equilibrio puede favorecer un desplazamiento hacia la síntesis de dicho producto, el cual, en caso de poder extraerse con facilidad, llevará a un rendimiento mejorado, y (c) otras reacciones laterales o secundarias no deseadas pueden eliminarse (6).

Una razón por la cual la enzimología no acuosa ha generado tanto interés, es debido a que las enzimas pueden cambiar favorablemente sus propiedades en solventes orgánicos. Por ejemplo, las enzimas pueden alcanzar una alta estabilidad en solventes orgánicos además de catalizar reacciones que no son posibles en medio acuoso (6'). La selectividad enzimática en solventes orgánicos, no solo es diferente con respecto a la correspondiente en medio acuoso, sino que además puede ser controlada por el solvente. La aplicación de este conocimiento ha llevado a las metodologías que



componen la Ingeniería de Solventes. Por otro lado, el uso de solventes orgánicos en la síntesis bioorgánica se ve seriamente limitada debido a que muchos solventes, sobre todo los altamente hidrófilos, pueden llevar a la inactivación enzimática.

Muchas transformaciones enzimáticas se han llevado a cabo en solventes orgánicos que contienen mínimas cantidades de agua. Así mismo, se ha reportado una alta termoestabilidad de algunas enzimas en solventes orgánicos, presuntamente porque estas son conformacionalmente menos flexibles en medios acuosos. En 1987, Brink y Tramper estudiaron la influencia de varios solventes orgánicos en la biocatálisis y en la epoxidación microbiana de propano y de 1-butano. Usaron el parámetro de solubilidad  $\delta$  como una medida de la polaridad del solvente, concluyendo que se pueden esperar altas velocidades biocatalíticas cuando la polaridad del solvente es menor  $\delta < 8$  y su peso molecular sea  $> 150$ . Con este mismo concepto, Laane y Boeren emplearon como criterio el hoy muy conocido parámetro  $\log P$ , y encontraron altas actividades biocatalíticas en solventes con  $\log P > 4$ . Con ello, determinaron que bajo esta condición el peso molecular del solvente es siempre superior a 150. Los resultados presentados por estos autores, son indicativo de la superioridad de  $\log P$  como una medida de la polaridad, por encima de otros parámetros, además de ser altamente sensible a diferencias de polaridad en un intervalo pequeño (7).

### **III.2 Síntesis enzimática de Alquil glicósidos**

En la última década, diversos métodos enzimáticos han sido aceptados como procedimientos complementarios en la síntesis de carbohidratos y sus derivados. En particular, la síntesis enzimática en medio orgánico o mezclas bifásicas con agua ha atraído mucho interés para la síntesis de glicosidos y ésteres diversos.

Muchas enzimas hidrolíticas han sido utilizadas para catalizar reacciones que son imposibles de llevar a cabo en medio acuoso, debido a las restricciones cinéticas y termodinámicas. Dentro de este grupo de enzimas se encuentran las glicosidasas, con amplio potencial de aplicación dominado por la síntesis de alquil-glicósidos. Asimismo, esto se puede lograr tanto por reacciones de hidrólisis reversa como por reacciones de transglicosidación que involucran la participación de un alcohol como aceptor del glicosilo. La diferencia entre estas dos vías de síntesis depende de la naturaleza del donador del grupo glicosilo. En la hidrólisis inversa, la reacción se realiza a partir de un monosacárido, mientras que en la transglicosidación un glicósido es usado como donador del grupo glicosilo. En principio, ambas reacciones, esquematizadas en la figura siguiente, pueden ser conducidas en sistemas tanto monofásicos como bifásicos (8).

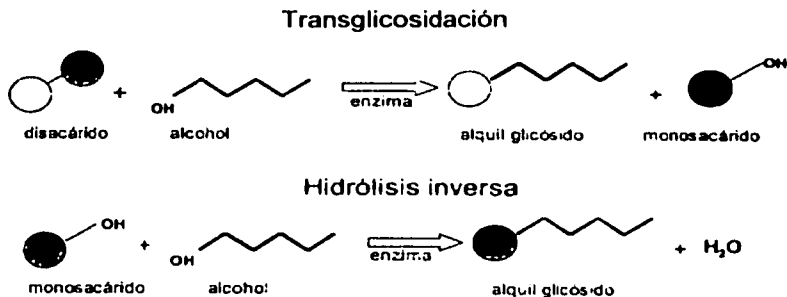


Figura 1. Esquema de las reacciones de síntesis de glicósidos (8).

Se ha reportado que es posible sintetizar alquil glicósidos utilizando glucosidasas como biocatalizador en medio orgánico y en presencia de una fase acuosa, mediante la alquilación de carbohidratos por un alcohol. Bajo estas condiciones ocurre una inversión del equilibrio de la reacción química catalizada por la enzima, o una supresión cinética de la hidrólisis del producto (5).

En general, la síntesis de alquil glicósidos se ha llevado a cabo a temperaturas moderadas y los tiempos de reacción reportados para el máximo rendimiento han sido desde 3 hasta 14 días (5).

En la siguiente tabla se muestran condiciones reportadas para la síntesis de alquil glicósidos empleando  $\beta$ -glucosidasas mesofílicas (19).

Tabla 1. Condiciones para la síntesis de alquil glicosidos mediante glicosidas de diversas fuentes

(19)

| Origen                    | Temp. (°C) | Sustrato            | Alcohol aceptor | Conversión %                   | Productividad mol / L h | Autor |
|---------------------------|------------|---------------------|-----------------|--------------------------------|-------------------------|-------|
| Almendra                  | 50-60      | Glucosa             | C6 a C12        | 58% para C8<br>50mM en 25 días | $8.33 \times 10^{-5}$   | (9)   |
| <i>Trichoderma viride</i> | 30         | Celobiosa y glucosa | C1 a C8         | 6% para C7 3.6 mM en 2 días    | $7.5 \times 10^{-5}$    | (10)  |
| Almendra                  | 45         | Glucosa             | C8              | 8% para C6<br>1mM en 3 días    | $1.16 \times 10^{-4}$   | (11)  |
| Almendra                  | 40         | Glucosa             | C2 a C6         | 8% 17mM en 6 días              | $1.4 \times 10^{-5}$    | (12)  |
| Harina de almendra        | 60         | Glucosa             | C3, C6 y C8     | 13% para C8 2.2 mm en 2 días   | $4.58 \times 10^{-5}$   | (13)  |
| Almendra                  | 50         | Glucosa             | C8              | 10% aprox<br>30mM en 4 días    | $3.12 \times 10^{-4}$   | (14)  |
| Almendra                  | 60         | Glucosa             | C4              | 44% 40mM en 5 días             | $3.38 \times 10^{-4}$   | (8)   |

A la luz de los resultados presentados en la Tabla 1, se puede suponer que el empleo de enzimas hipertermófilas en reacciones similares conducidas a mayor temperatura, deberían de disminuir el tiempo de reacción significativamente con respecto a los valores mostrados en la Tabla 1. Además, se debería de poder utilizar cantidades mayores de sustrato, reactivo limitante de la reacción en la reacciones con enzimas mesofilicas, debido al incremento en solubilidad en función del aumento en la temperatura. De hecho, se ha reconocido que una de las restricciones principales en el uso de las glicosidas en fase orgánica es la baja solubilidad de los carbohidratos en los disolventes que son apropiados para su catálisis enzimática (5).

Recientemente se demostró la validez de los planteamientos anteriores cuando García-Garibay y colaboradores (15) lograron llevar a cabo reacciones enzimáticas de alcoholisis e hidrólisis inversa en sistemas de una fase con heptanol/agua (la necesaria para saturar el heptanol y promover que la enzima funcione apropiadamente, sin alcanzar una segunda fase distinguible). Como sustratos, fueron utilizados lactosa y glucosa para producir heptil- $\beta$  glicósido. La enzima fue una  $\beta$ -glicosidasa proveniente de *Escherichia coli*. Como resultado la velocidad inicial de reacción fue de 14nmol / mL min y el factor limitante fue la baja estabilidad térmica de la enzima. Por lo mismo, emplearon también una  $\beta$ -glicosidasa hipertermofílica a 90°C llegando a las siguientes conclusiones:

1. Cuando la enzima  $\beta$ -glicosidasa hipertermofílica se utilizó a 90°C, la velocidad inicial de reacción, comparada con la enzima mesofílica, fue 3.14 veces mayor. En este caso la enzima se vio favorecida por una mayor concentración de lactosa soluble en el sistema heptanol / agua, junto con la alta temperatura.
2. Ambas reacciones (alcoholisis e hidrólisis inversa) siguen la cinética de Michaelis-Menten.
3. Ni la lactosa ni los heptil glicósidos fueron hidrolizados por la enzima a las condiciones empleadas.
4. La conversión fue limitada por una fuerte inhibición por el producto y por la formación de oligosacáridos como reacción secundaria indeseable.

### III.3 Papel del Agua

El agua es un componente esencial para la catálisis enzimática, aún si se encuentra en cantidades pequeñas, ya que permite a la enzima mantener la movilidad indispensable para que exprese su actividad. Recientemente se demostró que las enzimas pueden requerir muy poca agua para mantener su actividad catalítica, ya que logran ser activas a temperaturas cercanas a 200°C (16). De esta forma, su termoestabilidad decrece a medida que aumenta la cantidad de agua, efecto que se ve compensado por un aumento proporcional de la actividad enzimática. Esto también ha sido demostrado, si bien a temperaturas mesofílicas, para el caso de  $\beta$ -glucosidasa de *E. Coli* (15').

Existe una notable relación entre el nivel de hidratación de una enzima, su movilidad y su actividad enzimática. El nivel de hidratación de una enzima depende de la composición de la proteína en términos de la polaridad de las cadenas laterales de los aminoácidos. También depende para la hidratación de la polaridad del solvente que rodea la enzima ya que este tiene una determinada capacidad de abstraer agua de la misma (17 y 18). Por otro lado, las enzimas tienen la capacidad de ligar fuertemente una cierta cantidad de agua, la cual puede no es removida por los solventes, ni es intercambiable con el agua menos ligada o el agua libre, y es el agua que mantiene la conformación catalítica de la enzima. Por lo tanto, el grado de hidratación de una enzima, su movilidad y su actividad no dependen del agua total en el sistema, sino de la cantidad de agua ligada a la

enzima. Por ello la mejor forma de establecer el nivel de hidratación de una enzima es a través del parámetro termodinámico actividad de agua ( $A_w$ ). Recientemente se estudió el efecto del  $A_w$  en la síntesis enzimática de palmitato de fructosa a partir de ácido palmítico y utilizando la enzima *C. Antarctica* inmovilizada como catalizador. Como resultado se reporta un decremento en la producción de palmitato de fructosa, mientras se va incrementando la actividad acuosa inicial del sistema de reacción (18'). Este comportamiento es debido al papel de sustrato que juega el agua durante la síntesis. El agua reemplaza el grupo hidroxil de la fructosa como un aceptor acilo. Por lo tanto a elevados valores de  $A_w$  (0.7 – 0.8) El equilibrio de la reacción se desplaza hacia la hidrólisis permitiendo la disminución de la concentración del éster (18'). Por definición, la  $A_w$  determina el equilibrio de la distribución de agua entre los componentes del sistema. La relación entre la  $A_w$  y el nivel de hidratación se puede establecer para una proteína en particular mediante su isoterma de adsorción.

Recientemente se estudió la producción de butil-glucósido por hidrólisis reversa, donde los resultados muestran que el grado de conversión del sustrato depende de la cantidad de agua del sistema (8). Sin agua no se observó reacción de síntesis, mientras que la cantidad de butil-glucósido se incrementó con la cantidad de agua hasta un máximo, donde posteriores aumentos en agua llevaron a una caída en la concentración máxima de producto. Algunos autores han reportado que para lograr un alto rendimiento de alquilglucósidos, el

contenido de agua debe ser entre 4% y 20% (v/v) dependiendo del catalizador y del alcohol utilizados ( 8).

### **III.4 Uso de Cosolventes**

Ante los problemas de solubilidad que presentan los compuestos polares en medios orgánicos hidrofóbicos, una opción para aumentar dicha solubilidad son los cosolventes. Existen pocos reportes acerca del empleo de cosolventes en la síntesis de alquilglucósidos. Los que han sido reportados tienen como objetivo el disminuir la actividad acuosa en el sistema más que solubilizar compuestos, e incluyen dimetilformamida, dimetilsulfóxido, y 2-metil-2-butanol. Sin embargo, la presencia de cosolventes ha llevado a obtener bajos rendimientos e inclusive, en algunos casos, se observó un efecto desfavorable en la actividad enzimática (19).

En otro estudio se llevó a cabo la síntesis de glucósidos utilizando como cosolvente una alta concentración de acetonitrilo y terbutanol, obteniendo concentraciones que van de 1 g/L a 5 g/L. En este estudio el método de hidrólisis reversa, en comparación con la transglucosilación resultó en los mejores rendimientos; asimismo, la enzima resultó muy estable en ter-butanol y en acetonitrilo (20).



### III.5 Microorganismos Extremófilos

Los extremófilos son microorganismos adaptados a vivir bajo condiciones adversas como son las altas temperaturas en géiseres (113°C), a bajas temperaturas en regiones de frío polar (-50°C), a alta presión en el fondo del océano (120MPa), a bajos y altos valores de pH (pH 0-3 ó pH 10-12), y a altas concentraciones de sal (5% - 30%). Los organismos con las más altas temperaturas de crecimiento pertenecen a los géneros *Pyrobaculum*, *Pyrodictium*, *Pyrococcus* y *Methanopyrus*. La gran mayoría de los microorganismos termófilos e hipertermófilos son del dominio *Archaea* que incluye 17 géneros. Estas especies pueden ser anaeróbicas y aeróbicas, quimolitoautótrofas y heterótrofas (21).

Algunos ejemplos de estos microorganismos, son los termófilos anaerobios, los cuales obtienen energía de la reducción del azufre y son también capaces de degradar polímeros como almidón, proteína y sacáridos. Además, son huéspedes de enzimas con diferente grado de termofilicidad (22). Como regla general, los microorganismos hipertermófilos crecen más rápido, entre 80 y 110°C. En contraste con los termófilos, este tipo de microorganismos no pueden crecer a temperaturas por debajo de los 60°C. Los hipertermófilos, han sido extraídos casi exclusivamente de ambientes con temperaturas entre 80 y 115°C.(22)

Las enzimas que han sido extraídas de microorganismos extremófilos se denominan extremoenzimas, las cuales muestran características únicas y requieren condiciones muy específicas para mantener su actividad y estabilidad. Además son resistentes a la proteólisis y al efecto desnaturizante de químicos como detergentes y solventes orgánicos.(22). Como consecuencia de las condiciones a las que crecen los hipertermófilos, sus enzimas muestran también estabilidad a altas temperaturas. Esta característica las ha hecho atractivas para nuevas aplicaciones biotecnológicas. La gran mayoría de las enzimas hipertermófilas han sido extraídas de *Thermotoga maritima*, *Pyrococcus furiosus* y especies relacionadas. Dentro de estas enzimas, se encuentran las a) extracelulares: como amilasas, proteasas, xilanasas o pululanasas y b) intracelulares: como deshidrogenasas, oxidoreductasas y DNAPolimerasas. Algunas de ellas no muestran una pérdida significativa de actividad después de varias horas a 100°C y son activas aún a temperaturas que exceden la temperatura máxima de crecimiento del organismo de donde fueron extraídas (22)

Una de las enzimas que posee una marcada estabilidad a las altas temperaturas es la  $\alpha$ -amilasa, proveniente de *Pyrococcus furiosus*, con una vida media de 2 h en buffer a 120°C y completamente inactiva después de una hora a 130°C (23). Un gran número de genes provenientes de termófilos que han sido clonados y expresados en huéspedes mesofílicos pueden mantener la termoestabilidad. Además, no son hidrolizados por las proteasas del

huésped y pueden ser purificados utilizando una termodesnaturalización de las proteínas del huésped mesofílico. El grado de pureza de la enzima es generalmente adecuado para muchas aplicaciones industriales (21).

La utilización de enzimas termófilas e hipertermófilas en medio orgánico, así como la producción a gran escala de hidrógeno proveniente de biomasa, son dos de las aplicaciones de mayor interés para la biotecnología (23). En consecuencia, llevar a cabo procesos biotecnológicos a temperaturas elevadas (arriba de los 60°C) tiene muchas ventajas, como la disminución del riesgo de contaminación, incremento en la biodisponibilidad y solubilidad de compuestos orgánicos, decremento en la viscosidad del sistema, e incremento en el coeficiente de difusión de compuestos orgánicos (21).

### III.6 $\beta$ -Glicosidasa

Dentro de las enzimas  $\beta$ -Glicosidasas se encuentra la  $\beta$ -Glucosidasa, también llamada celobiasa, la cual pertenece a las glicosil hidrolasas. Este grupo de 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 celobiasa, 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 (19).

Estas enzimas pertenecen a la familia III de las glicosil hidrolasas y poseen una gran especificidad por los  $\beta$ -D-glucósidos, también tienen la capacidad de hidrolizar  $\beta$ -D-galactosidos,  $\beta$ -D-xilosidos,  $\beta$ -D-fucosidos y  $\beta$ -L-arabinosa. Muchas  $\beta$ -glicosidasas han sido detectadas en *Archae*. De hecho, *Archae*  $\beta$ -glicosidasas han sido encontradas en *Sulfolobus solfataricus* MT4, *Sulfolobus acidocaldarius*, y *Sulfolobus shibatae*. La enzima proveniente de este último microorganismo es muy estable y muestra su actividad óptima entre 102 y 105°C, tiene una vida media de 3.5 días a 100°C y 13 horas a 110°C. La enzima  $\beta$ -glicosidasa proveniente de *S. solfataricus* MT4 también ha sido purificada y caracterizada. Esta enzima es un homotetrámero (56kDa/subunidad) y ha sido clonada y expresada en *E. Coli*. Además, es resistente a varios desnaturizantes con actividad por arriba de los 85°C (21).

## **IV Materiales y Métodos**

### **IV.1 Materiales**

#### **IV.1.1 Enzima**

La enzima  $\beta$ - glicosidasa hipertermofílica fue adquirida de la compañía Diversa (San Diego, Cal.). Su clave comercial es GLY001-02, y las características reportadas por el proveedor son las siguientes:

- a) pH óptimo de 5.0 para la hidrólisis del  $\beta$ -D-glucósido.
- b) Temperatura óptima de 90°C para la hidrólisis del  $\beta$ -D-glucósido.
- c) La actividad remanente después de 145 horas a 90°C es del 92%.

#### **IV.1.2 Solventes y otros**

- Heptilglucósido, pureza 98%, marca Sigma
- Octilglucósido, pureza 98%, marca Sigma
- Heptanol, grado reactivo analítico, marca Sigma
- $\beta$ -D (+) glucosa, pureza 97%, marca Sigma
- Acetato de etilo, grado HPLC
- Acetato de butilo, grado reactivo analítico
- Acetona, grado HPLC
- Metanol, grado HPLC
- Agua, grado HPLC
- Reactivos para Karl Fischer libres de piridina:

- a) Solución generadora (metoxietanol, iodo, dióxido de azufre)
- b) Solución del vaso ( metanol, cloroformo, dióxido de azufre, iodo.
  - Reactivos para la determinación de proteína por el método de lowry:
- a) Solución CTC (carbonato de sodio, tartrato de potasio, sulfato de cobre penta-hidratado)
- b) Solución de hidróxido de sodio 0.8N
- c) Solución de SDS al 10%
- d) Reactivo de Folin, marca Sigma

#### **IV.2 Equipo**

- Karl Fischer, aquatest 8, Mod. Photovolt
- Cromatógrafo HPLC marca Hewlett Packard serie 1100
- Espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 2 UV/ Vis
- Potenciómetro Corning modelo pH meter 320
- Balanza analítica OHAUS con 5 decimales modelo AP2105
- Baño metabólico controlado HETU, modelo CB13/ 25L
- Parrilla multiposiciones, modelo IKAMAG EOA 5 electronic
- Bomba de vacío, modelo SUE 300, marca Heto.

#### **IV.3 Métodos**

##### **IV.3.1 Contenido de agua**

El análisis del contenido de agua se llevó a cabo en dos partes. En la primera, el objetivo fue determinar la máxima cantidad de agua que es posible solubilizar en el heptanol, manteniendo el sistema en

una fase. También fue de interés en este estudio el conocer el efecto de algunos cosolventes como acetato de etilo, acetato de butilo y acetona sobre la solubilidad del agua en el sistema. La segunda parte del estudio sobre el agua consistió en analizar el comportamiento de ésta durante la síntesis de heptilglucósido, ya que hay formación de agua durante la reacción de hidrólisis inversa.

En el método general se colocaron reactores enchaquetados de 50mL en una parrilla multiposiciones con agitación magnética, conectados a un baño de agua a 90°C (la composición del contenido de cada reactor dependió del experimento del que se tratara). A partir de esto, se siguieron dos diferentes metodologías.

#### **Metodología A**

- Una vez alcanzada la temperatura, iniciar la agitación y mantenerla por 15 minutos.
- Detener la agitación.
- Mantener en reposo el sistema y tomar muestras en intervalos de tiempo hasta alcanzar el equilibrio
- Tomar 15 mL de muestra de la fase orgánica de cada reactor e inyectar en el aparato Karl Fischer.

#### **Metodología B**

- Una vez alcanzada la temperatura, iniciar la agitación y mantenerla por 15 minutos.
- Detener la agitación.

- Mantener el sistema en reposo por 30 minutos.
- Tomar 15  $\mu\text{L}$  de muestra de la fase orgánica de cada reactor e inyectar en el aparato Karl Fischer
- Reiniciar la agitación por 15 min y repetir los pasos desde la agitación hasta la toma de muestra.

Para determinar el contenido de agua durante la reacción de síntesis se tomaron, a diferentes intervalos de tiempo, 15  $\mu\text{L}$  de muestra y se inyectaron al aparato Karl Fischer

#### **IV.3.2 Sistemas de Reacción**

Para preparar la enzima antes de la reacción, se adicionaron 5 mL de una solución buffer de fosfatos ( 0.1 M pH 5) a 85 mg de la enzima cruda. La concentración de proteína de la solución enzimática, se determinó por el método de Lowry modificado. Se empleó albúmina bovina como patrón. (0.49 g de proteína / mL ). Para la determinación de la actividad específica, en un volumen final de 40 mL se adicionaron diferentes cantidades de proteína que iban desde 0.208 mg hasta 4.99 mg; 40mM de glucosa; 7% w/v de agua y heptanol.



La composición de cada reactor fue la siguiente:

|                      | Reactor               |                        |                       |                        |                        |                        |                        |                       |
|----------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|
|                      | 1                     | 2                      | 3                     | 4                      | 5                      | 6                      | 7                      | 8                     |
| <b>glucosa (g)</b>   | 0.291                 | 0.2911                 | 0.2911                | 0.2912                 | 0.2913                 | 0.2912                 | 0.2911                 | 0.2913                |
| <b>heptanol (mL)</b> | 37.2                  | 37.2                   | 37.2                  | 37.2                   | 37.2                   | 37.2                   | 37.2                   | 37.2                  |
| <b>agua (mL)</b>     | 2.775                 | 2.75                   | 2.725                 | 2.7                    | 2.6                    | 2.45                   | 2.3                    | 2.2                   |
| <b>proteína (mg)</b> | 0.208<br>(25 $\mu$ L) | 0.4161<br>(50 $\mu$ L) | 0.624<br>(75 $\mu$ L) | 0.832<br>(100 $\mu$ L) | 1.664<br>(200 $\mu$ L) | 2.913<br>(350 $\mu$ L) | 4.161<br>(500 $\mu$ L) | 4.99<br>(600 $\mu$ L) |

Una vez alcanzada la temperatura predeterminada, se inició la agitación y se tomaron muestras de 1 mL de cada reactor en intervalos de tiempo, para su posterior análisis por HPLC.

Una vez conocida la cantidad de enzima a la que se observa una mayor producción de heptilglucósido, se procedió a determinar la concentración óptima de sustrato. Con este fin, se probaron concentraciones de glucosa desde 1 mM hasta 80 mM. La reacción se llevó a cabo bajo las mismas condiciones en las que se desarrolló la determinación de la actividad específica. La composición de los reactores fue la siguiente:

En un volúmen final de 40 mL:

|          |             |
|----------|-------------|
| Heptanol | 37.20 mL    |
| Agua     | 2.30 mL     |
| Enzima   | 500 $\mu$ L |

Las concentraciones de glucosa fueron las siguientes: 1, 2, 3, 5, 7, 10, 20, 40, 60 y 80 mM. Los estudios cinéticos de la síntesis de heptilglucósido se llevaron a cabo a partir de la composición siguiente y tomando 1 mL de muestra en intervalos de tiempo hasta las 26h para fines de análisis.

|          |                                   |
|----------|-----------------------------------|
| Glucosa  | 60mM (0.4368g/40 mL)              |
| Heptanol | 37.20 mL                          |
| Agua     | 2.30 mL                           |
| Enzima   | 500 $\mu$ L (4.16 mg de proteína) |

### IV.3.3 Análisis por HPLC

La reacción se monitoreó mediante HPLC. Para ello, se prepararon soluciones con diferentes concentraciones de octilglucósido (estándar interno). Las muestras se inyectaron en el HPLC con un flujo de 0.8 mL/min empleando un detector de dispersión de luz. Para esto se construyó la curva patrón. De la misma forma se construyó una curva patrón de glucosa con concentraciones desde 1mM hasta 30mM.

En la preparación de las muestras, a cada una de 1 mL se le adicionó 1 mL de solución de estándar interno (1.5 mM, 3.5 mM, 7 mM

dependiendo de la muestra). Se evaporó hasta sequedad en un sistema de destilación a presión reducida. Posteriormente se redisolvió en 1 mL de fase móvil (75:25, metanol: agua). Finalmente se virtió en un vial y se inyectó al HPLC . A manera de ejemplo, el siguiente cromatograma muestra el perfil de elución de los compuestos y los tiempos de retención.

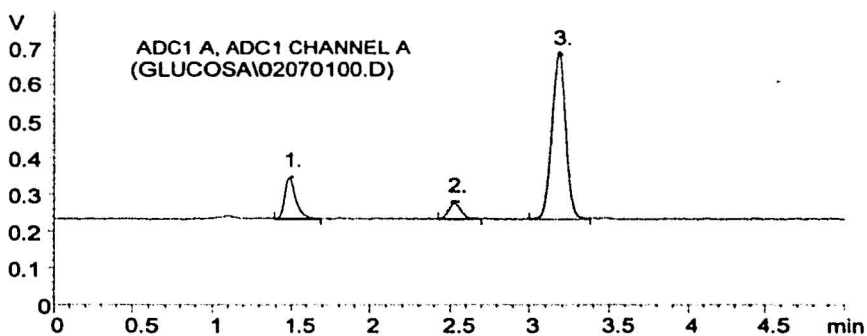


Figura 2. Ejemplo de cromatograma del perfil de elución de los alquil glicósidos.

**Glucosa  $t_r= 1.487$**

**Heptil glucósido  $t_r= 2.525$**

**Octil glucósido  $t_r= 3.181$**

La determinación de proteína en el sistema de reacción se llevó a cabo por el método de Lowry, tomando muestra tanto de la fase orgánica y de la acuosa. Dicha determinación se llevó a cabo a las 24h de reacción a 90°C. Las muestras se prepararon por extracción y por evaporación, para finalmente leer en espectrofotómetro a 750 nm.

## **V Resultados y Discusión**

### **V.1 Contenido de Agua**

Teniendo como antecedente que el porcentaje de agua necesario para saturar al heptanol a 90°C es de (7.8% v/v) (García-Garibay., 2000), los primeros experimentos se realizaron bajo esta condición. Sin embargo, se observó que al poco tiempo (del orden de 10 minutos) de incorporada el agua, el sistema presentaba evidencia visual de turbidez. Existía la posibilidad de que los equilibrios previamente supuestos tuvieran condiciones de estabilidad difíciles de mantener o tiempos de duración muy cortos. Se decidió entonces estudiar con mayor detalle el estado de dispersión que presentaba el agua en contacto con heptanol y a lo largo del tiempo.

Primeramente se llevaron a cabo experimentos de estabilidad de fases siguiendo la metodología denominada como A en la sección de Materiales y Métodos. Para lo anterior, se probando varios porcentajes totales (i.e. iniciales de agua) en el sistema compuesto exclusivamente por heptanol y agua.

Los resultados obtenidos para mezclas con 3 concentraciones de agua y en experimentos con duración de 25 horas se presentan en la Figura 3.

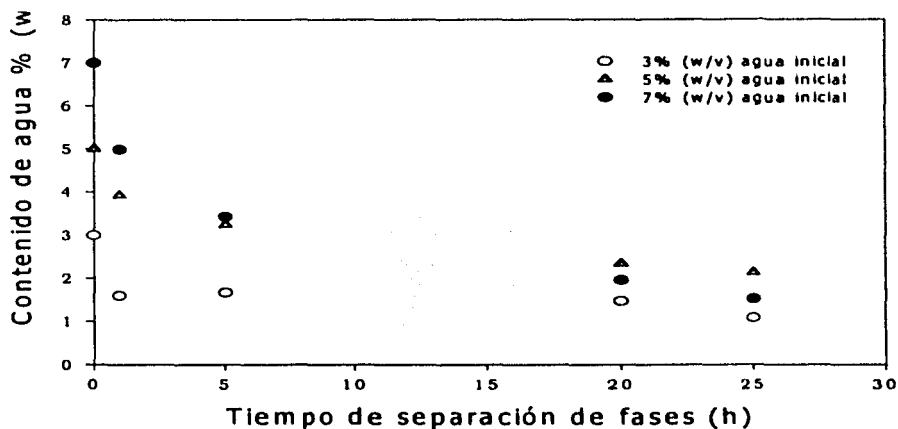


Figura 3: Curva de solubilidad del agua en heptanol a 90 °C  
Metodología A

En esta gráfica se puede observar una rápida caída en el contenido de agua durante los primeros 2-3 minutos. Posteriormente y conforme pasa el tiempo el contenido de agua disperso en la fase continua cae más lentamente hasta llegar a una separación evidente de fases. Eventualmente, alrededor de las 20-25 horas se alcanza un equilibrio más estable que corresponde a un contenido de agua entre 1.5 y 2% (w/v).

Los resultados anteriores demuestran que, a falta de un agente emulsificante (como podría ser el caso del alquil glicósido generado en la reacción) y con el sistema en reposo absoluto, las micro-gotas de agua coalescen lentamente. Sin embargo, resultaba probable que la agitación constante mantuviera a dichas partículas de agua suficientemente separadas y por lo tanto en una verdadera dispersión.

Esto explicaría los reportes de García Garibay et al (2000<sup>a</sup>, 2000b) que mencionan la existencia de una sola fase aún en concentraciones de agua superiores al 7% (v/v). Se decidió entonces estudiar al sistema bajo condiciones de agitación similares a las que ocurren durante la reacción. Se montaron experimentos en los cuales se monitorearon las variaciones en el agua dispersa en el heptanol estando el sistema en agitación. Esto implica el seguimiento de la metodología B reportada en Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 4 presentada a continuación.

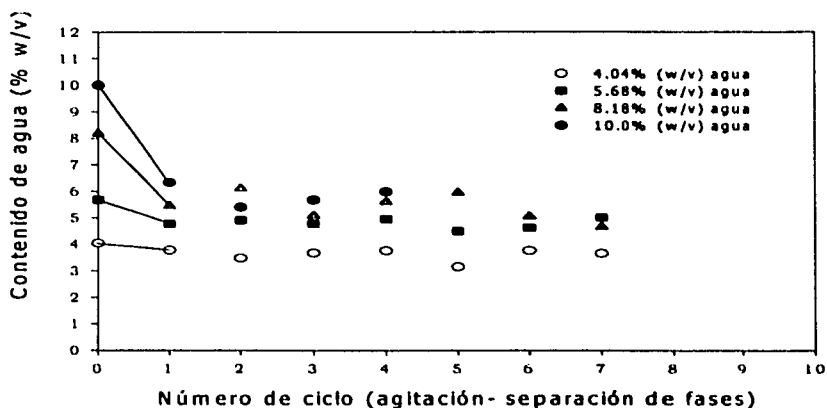


Figura 4: Curva de solubilidad del agua en heptanol a 90°C  
Metodología B

En la gráfica anterior se observa, contra lo esperado, la misma caída rápida en el contenido de agua dispersa durante los primeros minutos observada en el sistema estático y a pesar de que en este caso el sistema se encontraba en agitación. Es probable que el déficit de agua se hubiera ubicado en el espacio de cabeza del reactor, ya

que como el sistema estaba a 90°C había una constante evaporación y condensación del agua, o bien en el fondo del matraz como un paquete no visible a simple vista. Ciertamente, esta última hipótesis indica que el tipo de agitación empleado no cuenta con la suficiente energía para reincorporar el agua a la fase alcohólica. Por otro lado, resultó evidente que únicamente el reactor con 10% (v/v) de agua mostraba una clara turbidez, por lo que se decidió que un 7% (v/v) representaba un contenido de agua adecuado para llevar a cabo la reacción de síntesis puesto que era fácilmente dispersable con la agitación magnética empleada en este estudio.

El manejo de reacciones enzimáticas en medios orgánicos monofásicos está claro hoy en día que la reacción tiende a aumentar conforme se incrementa el contenido de agua. Obviamente, lo anterior no aplica para casos en los que el agua actúa, además de activador enzimático, como un cosustrato en competencia con la reacción principal, como en el caso de reacciones adversas de hidrólisis. Bajo este principio, la idea de incrementar el contenido de agua dispersa en el sistema heptanol-agua resulta de interés. Considerando que el medio mecánico estudiado (v.gr. agitación) había llegado a su límite en términos de capacidad de dispersión, se planteó como hipótesis la incorporación de cosolventes miscibles en el heptanol y con capacidad de formar puentes de hidrógeno con el agua para así retener a ésta en la fase orgánica, por lo menos durante un mayor tiempo. Los cosolventes probados fueron acetona, acetato de etilo y acetato de butilo a concentraciones de 2.5 y 5.0% v/v. Para este experimento se

**siguieron las metodologías A y B descritas en Materiales y Métodos, los resultados obtenidos se presentan en las Figura 5 y 6.**



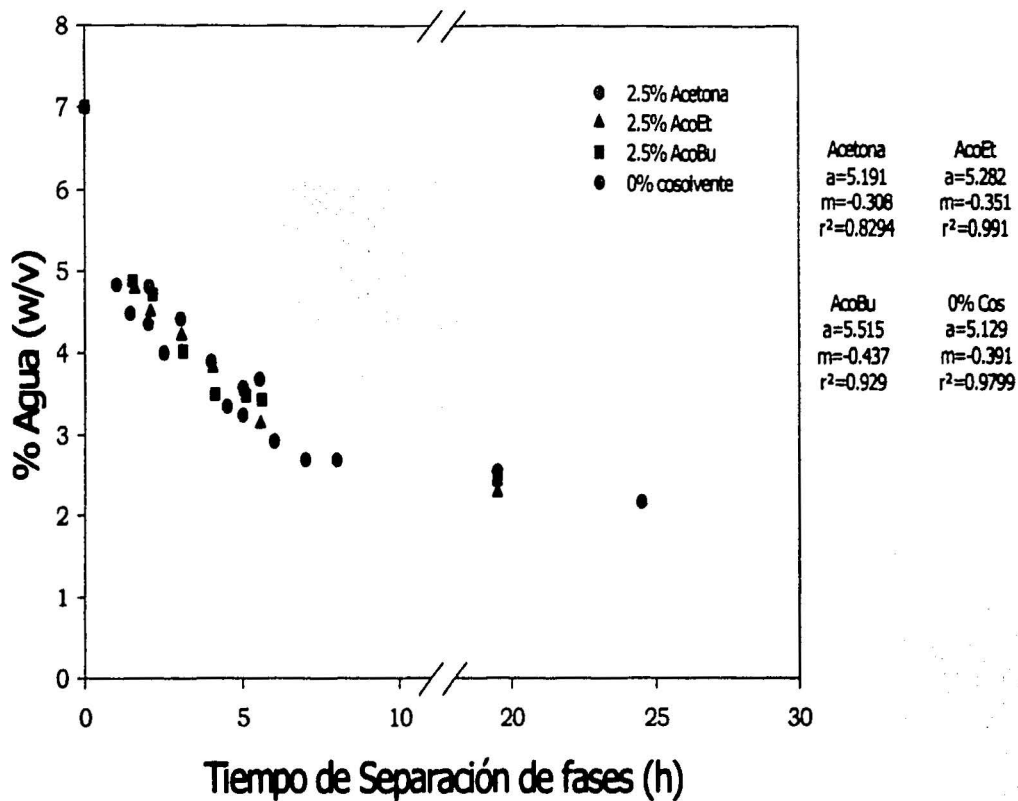
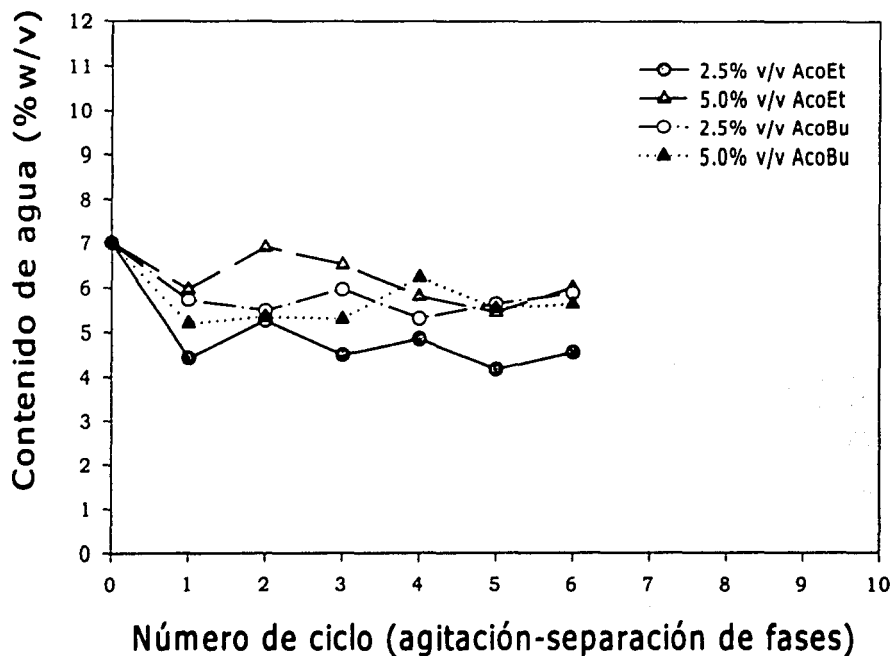


Figura 5 Efecto del cosolvente en la solubilidad del agua en heptanol a 90°C  
Metodología A



Agitación magnética 15min,  
reposito 30min,  
90°C, 15µL muestra  
Agua inicial 7% w/v

Figura 6: Efecto de cosolventes en la solubilidad de agua en heptanol a 90 °C  
Metodología B

El primer experimento que se realizó utilizando cosolventes, fue con el objetivo de observar si los cosolventes al 2.5% (v/v) pudieran retener una mayor concentración de agua en el heptanol mientras el sistema estuviera en reposo. Sin embargo, en la Figura 5 se observa la misma caída para los tres cosolventes y si se compara con la curva del blanco (0% de cosolvente) no se observa una diferencia significativa en el contenido de agua.

En las gráficas anteriores observamos que los cosolventes, a las concentraciones probadas, no tienen un efecto significativo que favorezca una mayor solubilización del agua en heptanol a 90°C. En la gráfica de la Figura 6 parecería que el acetato de etilo al 5.0% v/v, retiene un poco más de agua en la fase orgánica. Sin embargo, esta diferencia puede ser debida al error normal en la determinación de contenido de agua del aparato Karl Fischer, pues experimentos posteriores no confirmaron esta diferencia.

Se procedió entonces a probar concentraciones de cosolventes aún más altas, y los resultados se presentan en las Figuras 7 y 8. Se puede observar que ninguna de las concentraciones utilizadas ni los cosolventes empleados tienen el efecto esperado. Todo parece indicar que los cosolventes, lejos de retener agua en la fase orgánica por la formación de puentes de hidrógeno, son arrastrados por el agua durante su separación alejando a estos de la fase orgánica.

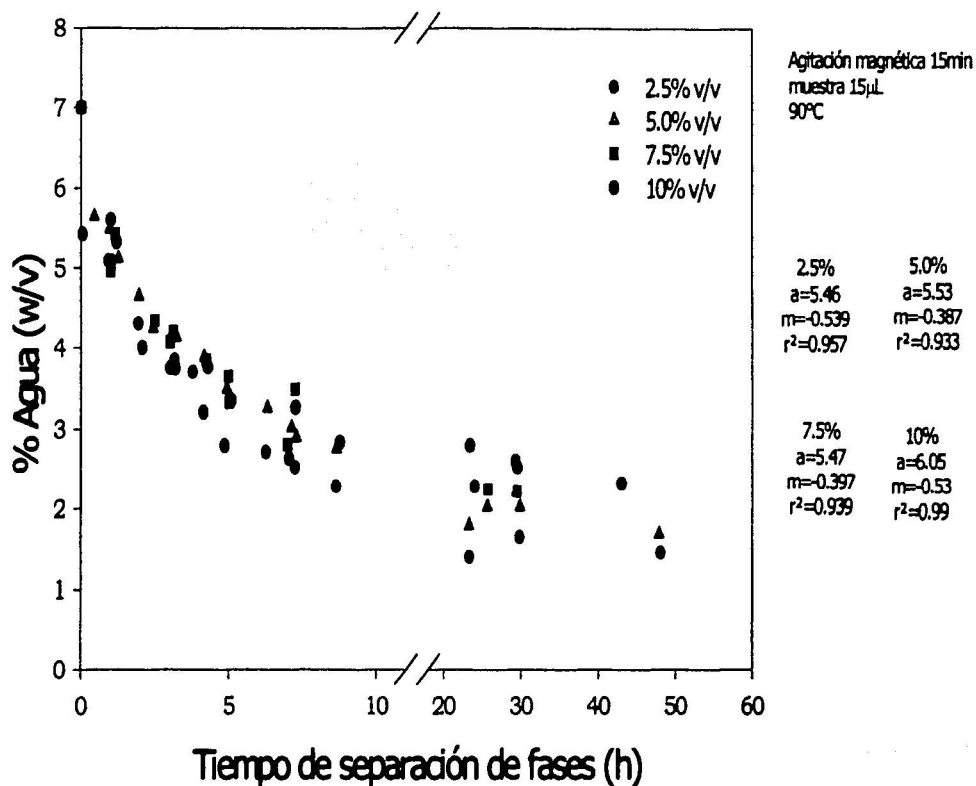


Figura 7 Efecto del cosolvente en la solubilidad del agua en heptanol a 90 °C  
-Acetato de Etilo-

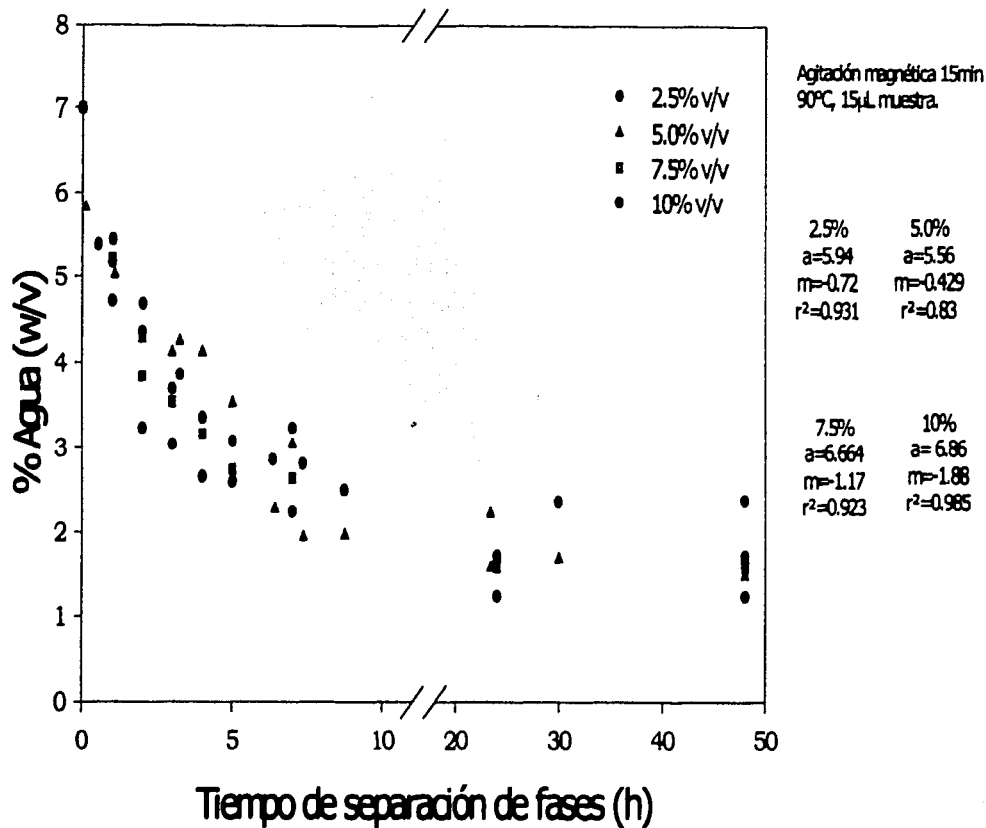


Figura 8: Efecto del cosolvente en la solubilidad del agua en heptanol a 90 °C  
-Acetato de Butilo-

Para concluir el estudio de los cosolventes se monitoreo el contenido de agua a lo largo de una reacción de síntesis y en presencia de enzima. La Figura 9 presenta el resultado obtenido. Se observa que el contenido de agua es invariante al cosolvente empleado.

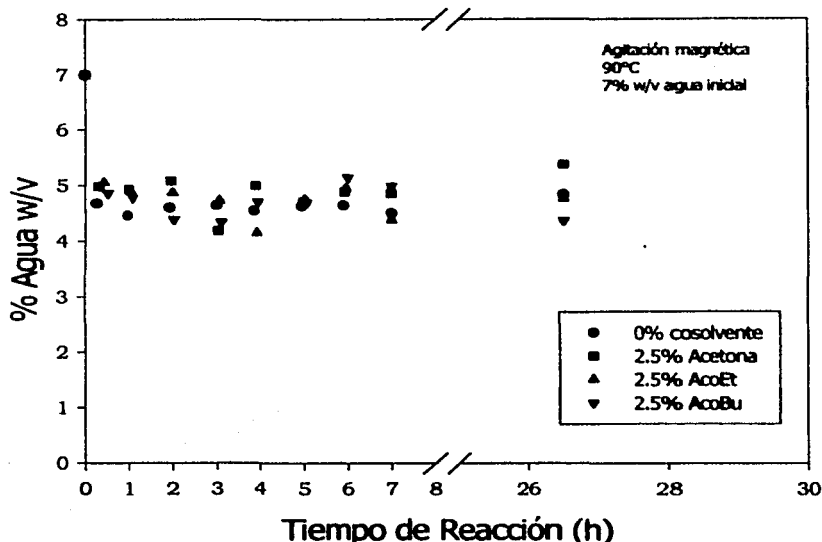


Figura 9: Efecto del cosolvente en la solubilidad del agua en heptanol a 90 °C  
Reacción enzimática

## V.2 Estudios Cinéticos

Primeramente se determinó la actividad específica de la enzima hipertermófila de acuerdo con el modelo de orden cero de Michaelis-Menten (i.e.  $S \gg K_m$ ), según se presenta en la Figura 10.

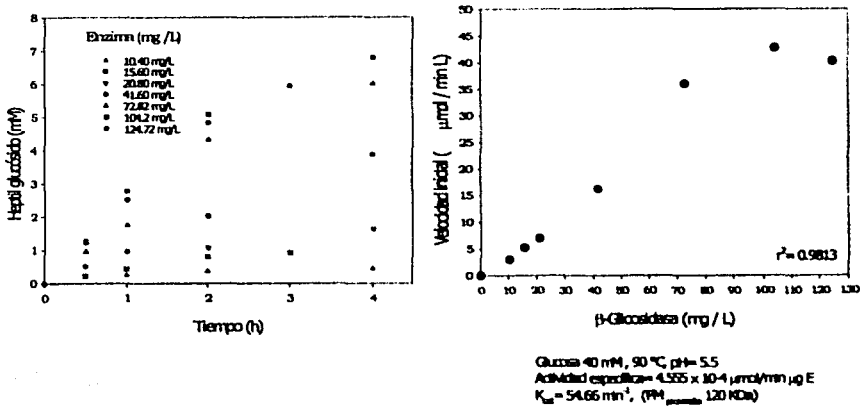


Figura 10: Actividad Específica de  $\beta$ -Glucosidasa Hipertermófila

No existen reportes en la literatura con relación a la actividad específica y la  $K_{cat}$  para la enzima  $\beta$ -glucosidasa hipertermofílica en la síntesis de heptil glucósido a partir de glucosa. La concentración de enzima que se encontró apropiada para obtener la máxima productividad fue de 104 mg/ L ya que la curva de producción a esta concentración presenta la mayor pendiente (figura 10 izquierda). A una concentración mayor se observa una meseta, es decir no hay un efecto positivo en el aumento de la producción de heptil glucósido.

Con el fin de determinar la cantidad adecuada de sustrato para la síntesis de heptil glucósido, se determinaron los parámetros cinéticos  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$  en términos volumétricos, según se plantea en las Figura 11 siguiente:

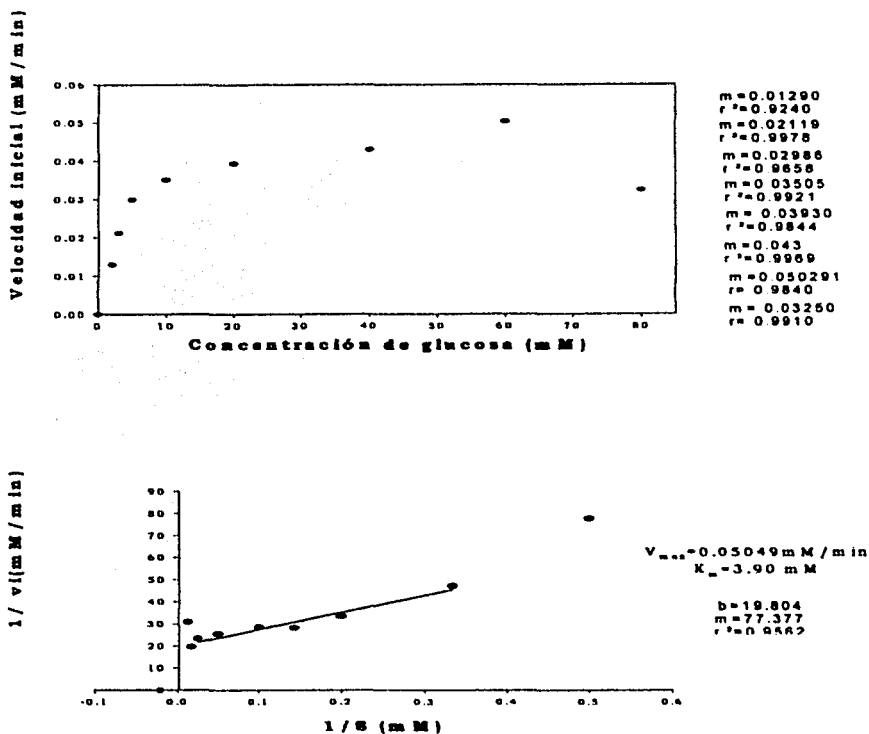


Figura 11: Caracterización cinética de la  $\beta$ -Glicosidasa Hipertérmofila

La reacción sigue el modelo de Michaelis- Menten. Se tiene como antecedente que al utilizar glucosa como sustrato el valor de  $K_m$  es de 4.19 mM y el de  $V_{m\acute{a}x}$  es de 0.048  $\mu\text{mol} / \text{mL min}$  (García-Garibay 2001). Estos valores son muy cercanos a los presentados en la gráfica anterior. La mínima concentración de glucosa a la cual se



alcanza la máxima velocidad de reacción es 40 mM. Sin embargo, se observa una caída en la producción de heptil glucósido a 80mM de glucosa, lo que sugiere la existencia del fenómeno de inhibición por exceso de sustrato.

Una vez determinadas las concentraciones de enzima y de sustrato adecuadas para la síntesis de heptil glucósido, se llevó a cabo una cinética de 26 horas donde se buscaba monitorear el tiempo en que la reacción ocurría de manera sostenida. Como se mencionó anteriormente, la concentración de glucosa ideal para obtener la velocidad máxima es de 40 mM, pero se puede observar que no existe una gran diferencia entre 20 mM y 40 mM. Por otra parte, a 60 mM se observa un ligero aumento en la velocidad de reacción, a causa del error experimental, para comprobar esto, se decidió utilizar concentraciones de 20 mM y 60 mM de sustrato, obteniendo un rendimiento del 50% a las 26 horas de reacción para 20 mM (10.54 mM de heptil glucósido) y 17.42% (10.45 mM) para 60 mM de sustrato. Como antecedente se tiene que el máximo rendimiento obtenido en un sistema bifásico es del 12% a partir de una concentración de glucosa de 1 a 3 M debido a que el sistema se ve limitado por el equilibrio (19). En este caso, dado que la reacción se lleva a cabo en un sistema orgánico no se presenta la reacción de hidrólisis y la máxima conversión como ya se mencionó fue del 50%.

## **V.5 Observaciones adicionales.**

Durante la síntesis de heptil glucósido se observó en los reactores un oscurecimiento, ligero en los primeros tiempos de reacción, e intenso, tipo caramelo oscuro, a partir de las 5 horas de reacción, observable como un depósito colorido en el fondo de los reactores. Inicialmente se propuso que la glucosa caramelizaba a la alta temperatura empleada. También se consideró como probable que ocurriera una reacción no enzimática del tipo Maillard entre el biocatalizador proteico y la glucosa en el medio, reacción nada despreciable a los 90 oC empleados. Asimismo, las curvas de reacción sugerían que la transformación enzimática se detenía al paralelo con la formación del color oscuro mencionado.

Se decidió entonces determinar la cantidad de proteína dispersa en la solución orgánica de heptanol mediante el método de Lowry tanto en la fase orgánica como en la fase acuosa (fondo del reactor). Los resultados de la fase acuosa muestran una cantidad considerable de proteína 0.69 mg de proteína/mL, sitio también donde se concentra el color oscuro. A estas muestras se les determinó tanto un barrido espectrofotométrico de absorbancia (Figura 12) como una curva de absorbancia a 367 nm (Figura 13). De esta última figura, se observa que la absorbancia se incrementa conforme aumenta la concentración de proteína en las muestras, lo que nos lleva a concluir que el color formado responde a la generación de productos de Maillard .

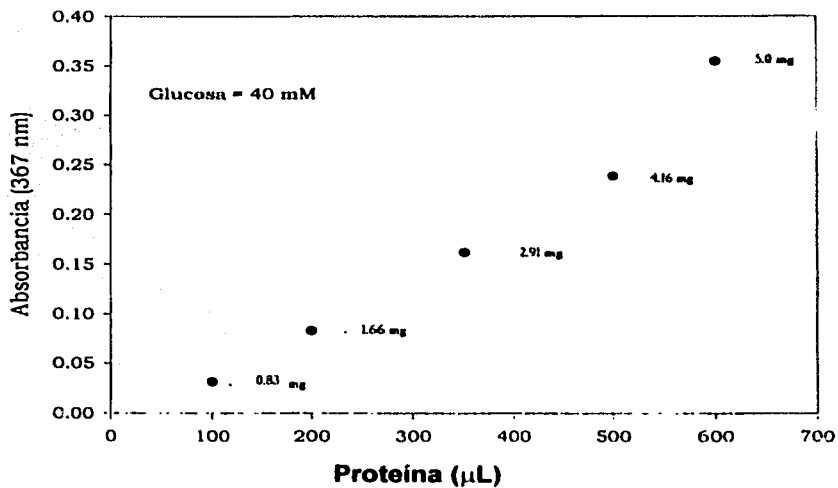


Figura 12. Medición de la absorbancia en el sistema de reacción en base al oscurecimiento observado.

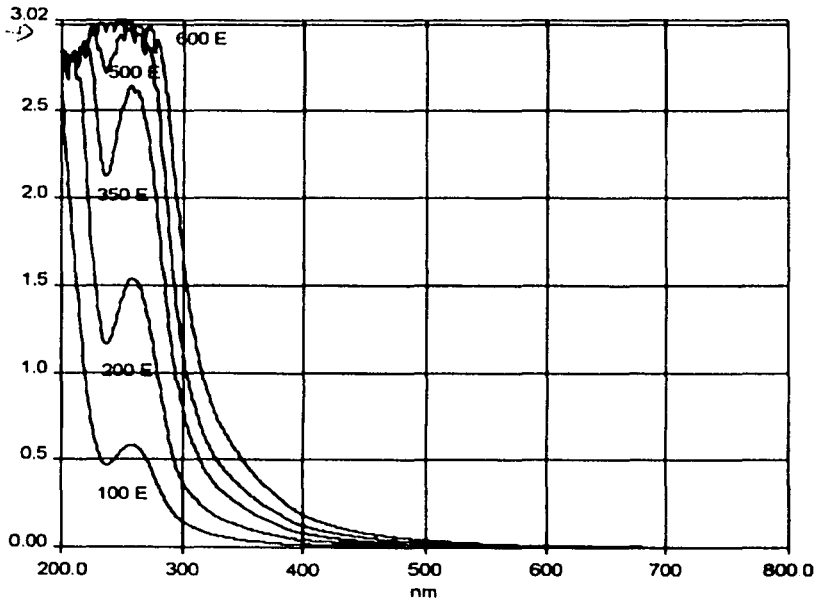


Figura 13 Determinación de proteína en base al oscurecimiento observado en el sistema de reacción

## **VI CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

### **VI.1 Conclusiones**

- El contenido de agua necesario para mantener el sistema heptanol-agua en una sola fase a 90° C no representa un valor fijo, ya que este va disminuyendo lentamente hasta alcanzar el equilibrio después de 24h de reposo al 2% (w/v) en la fase orgánica, mostrando una clara separación de fases independientemente del contenido de agua inicial.
- Cuando el sistema heptanol-agua se encuentra en agitación y a 90°C se mantiene el contenido de agua (después de una caída) en un rango de entre el 6.5 y el 4% (w/v) dependiendo del contenido inicial de agua. Por este motivo se puede concluir que el contenido de agua adecuado para llevar a cabo la reacción manteniendo al sistema en una fase es el 7% (w/v) de agua. A más de este porcentaje se observa turbidez desde un inicio.
- Cuando el sistema heptanol-agua y cosolvente (al 2.5 %(v/v)) se encuentra en reposo, se alcanza un equilibrio en agua del 2% (v/v) con los tres cosolventes probados. La caída en el contenido de agua no presenta diferencia en comparación con el sistema heptanol-agua. De la misma forma, cuando el sistema está en agitación el contenido de agua se mantiene en el mismo rango de 6.5 y 4% (w/v) de agua. Estos resultados llevan a concluir que que los cosolventes probados a las concentraciones tratadas no

son capaces de retener el agua en la fase orgánica; por el contrario son arrastrados por esta hacia la fase acuosa.

- Aún a concentraciones de hasta el 10% (v/v) de acetato de etilo y acetato de butilo no es posible retener una mayor cantidad de agua en la fase orgánica
- La concentración de glucosa con la que se alcanza la máxima velocidad de reacción es de 40 mM para, aunque para 20 mM y 60 mM se obtienen buenos rendimientos. A una concentración de 80 mM hay una caída en la productividad, probablemente debido a la inhibición por sustrato.
- El máximo rendimiento obtenido fue el 50% a partir de 20 y 40 mM de glucosa a las 26 horas de reacción.

## VI.2 Recomendaciones

- Para mantener una mayor concentración de agua dispersa en el sistema manteniendo a este en una fase visible, la agitación debe de mejorarse, ya que la agitación del sistema de reacción actual no permite la incorporación del agua que se separa del heptanol.
- Existen estudios en donde se reportan buenos rendimientos para la síntesis enzimática de alquil glicósidos con la utilización de terbutanol y acetonitrilo como medio de reacción (90% (v/v)). Por otra parte, la enzima  $\alpha$ -glucosidasa mesofílica presenta alta estabilidad en este medio.
- Si la reacción de síntesis se llevara a cabo con terbutanol, el cual no es sustrato para la enzima, y bajo las condiciones en las que se llevó a cabo el presente estudio se podría aumentar el rendimiento de la reacción, probablemente debido a que el terbutanol si tenga la capacidad de retener el agua o bien a que evita la inhibición por producto.
- Para evitar los problemas de inhibición por sustrato se podría ir aumentando la concentración del sustrato (inyectando solución de glucosa ) conforme se lleve a cabo la reacción, de esta forma se irá consumiendo la glucosa en el sistema y se

podría mantener una concentración fija mientras ocurre la síntesis.

- Para la inhibición por producto se requiere de un sistema en el cual se pueda extraer heptil glicósido al mismo tiempo en el que este se produce



### VI.3 Bibliografía

- (1) Sarney B.S. y Vulfson E. N. (1995). "Application of enzymes to the synthesis fo surfactants". Trends Biotechnol. 13: 164 – 172.
- (2) Bongolo G. (1998). "Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons". Colloids and Surfaces A: Physicochemicals and Engineering Aspects 152: 41-52.
- (3) Kobayashi T., Adachi S., Nakanishi k., Matsuno R. (2000). "Synthesis of alkyl glycosides through  $\beta$ -glucosidase-catalyzed condensation in an aqueous-organic biphasic system and estimation of the equilibrium constants for their formation". Journal of Molecular Catálisis B. Enzymatic 11. 13-21.
- (4) Rybinski W. Y Hill k. (1998). "Alkyl Polyglycosides-Propieties and Applications of a new Class of Surfactants". Angew. Chem. Int. 37: 1328- 1345.
- (5) Vulfson E.N., Patel R., Beecher J.E., Andrews A.T y Law B.A. (1990). "Glycosidases in organic solvents: I. Alkyl- $\beta$ -glucoside synthesis in a water-organic two-phase system". Enzyme microb. Technol., 12: 950-954.

- (6) Cabral J.M.S., Aires-barros M.R., Pinheiro H. y Prazeres D.M.F. (1997). "Biotransformation in organic media by enzymes and whole cells". *Journal of Biotechnology* 58: 133-143.
- (6') Dordick JS. (1991). Non- aqueous enzymology. *Curr Opinion Biotechnol* 2: 401-407
- (7) Laane C., Boeren S., vos K. Y Veeger C. (1987). "Rules for Optimization of Biocatalysis in Organic Solvents". *Biothec. And Bioeng.* Vol. XXX, 81-87.
- (8) Ismail A., Soutani S. y Ghoul M. (1999). "Enzymatic-catalyzed synthesis of alkylglycosides in monophasic and biphasic systems. II. The reverse hydrolysis reaction". *Journal of Biothecnol.* 69: 145-149.
- (9) Panintrarux C., Adachi S., Matsuno R. (1997). " $\beta$ -Glucosidase-catalyzed condensation of glucose with 2-alcohols in buffer-saturated alcohols". *Biotechnol. Lett.* 19, 9: 899- 902.
- (10) Shinoyama H., Takei K., Ando A., fujii T., Sasaki M., Doi Y., Yasui T. (1991\*). "Enzymatic synthesis of useful alkyl- $\beta$ -glucosides". *Agric. Biol. Chem.* 55: 1679- 1681.

- (11) Vic G., Hastings J.J., Crout D.H.G. (1996). "Glycosidase-catalysed synthesis of glycosides by an improved procedure for reverse hydrolysis: Application to the chemoenzymatic synthesis of galactopyranosyl (1-4)-O- $\alpha$ -galactopyranosides". *Enzyme Microb. Technol.* 20: 597- 603.
- (12) Laroute V., Willemont R.M. (1992b). "Effect of organic solvents on stability of two glycosidases and on glucoamylase-catalysed oligosaccharide synthesis". *Enzyme microb. Technol.* 14: 528- 534.
- (13) Chahid Z., montet D., pina M.,Bonnot F., Graille J. (1994). "Effect or water activity on enzymatic synthesis of alkylglycosides". *Biothechnol. Lett.* 14, 4: 281-284.
- (14) Ljunger G., Adlercreutz, Mattiasson B. 1994. "Enzymatic synthesis of octyl- $\beta$ - glucoside in octanol at controlled water activity". *Enzyme microb. Technol.* 16: 751-755.
- (15) García-Garibay M., López-Munguía A., Bárzana E. (2000<sup>a</sup>). "Alcoholysis and reverse hydrolysis reactions in organic one-phase system with a hyperthermophilic  $\beta$ -glycosidase". *Biotechnol. Bioeng.* 69: 627-632.
- (15') García-Garibay M., López-Munguía A., Bárzana E. (2000<sup>a</sup>). "Effect of  $\beta$ -Galactosidase hydration on

alcoholysis reaction in organic one-phase liquid systems". *Biotechnol. Bioeng.* 70: 647-653.

- (16) Turner N.A. y Vulfson E.N. (2000). "At what temperature can enzymes maintain their catalytic activity?". *Enzyme and Microbial Technology* 27: 108-113.
- (17) Bell G., Janssen A.E.M. y Halling P.J. (1997). "Water activity fails to predict critical hydration level for enzymes activity in polar organic solvents: Interconversion of water concentration and activities". *Enzyme and Microbial Technology* 20: 471-477.
- (18) Tuena de Gómez-Puyou M. y Gómez-Puyou A. (1998). "Enzymes in low water systems". *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 33: 53-89
- (18') Chamouleau F., Coulon D., Girardin M., Ghoul M. (2001). "Influence of water activity and water content on sugar esteres lipase- catalyzed synthesis in organic media". *Journal of molecular Catalysis B: Enzymatic* 11: 949-954
- (19) Vázquez Limón M. del C. (2001). "Estudio de la producción de alquil glucósidos por hidrólisis inversa con una  $\beta$ - glicosidasa HT, usando como modelo al heptil glucósido". Tesis para obtener el título de

**Maestría en Ciencias Bioquímicas. Instituto de Biotecnología, UNAM.**

- (20) Vic G. Y Thomas D. (1992). "Enzyme- Catalysed Synthesis of Alkyl  $\beta$ -D-Glucosides in Organica Media". *Tetrahedron Letters*, Vol. 55. 52, pp. 4567-4570.
- (21) Niehaus F., Bertoldo C., Kähler M., Antranikian G. (1991). "Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application". *Appl. Microbio. Biotechnol.* 51: 711-729.
- (22) Huber H. Y Stetter K.O. (1998). "Hyperthermophiles and their posible potencial in biotechnology". *Journal of Biotechnology* 64: 39-52.
- (23) Sellek G.A. y Chaudhuri J.B. (1999). "Biocatalysis in organic media using enzymes from extremophiles". *Enzyme and Microbial Technology* 25:471-482.