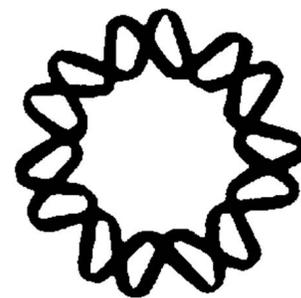




**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**Glicosilación enzimática de fenoles mediante el uso de fructosiltransferasas
bacterianas**

TESIS que para obtener el grado de:

Doctora en Ciencias

Presenta:

M. en C. Arlette Mena Arizmendi

Tutor: Dr. Edmundo Castillo Rosales

Cuernavaca, Mor. 2012



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.

Este trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología – UNAM, bajo la dirección del Dr. Edmundo Castillo Rosales en el Laboratorio de Tecnología Enzimática del Dr. Agustín López-Munguía Canales.

La realización de los estudios de doctorado fue posible gracias a la beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), No. becario 169648. El proyecto obtuvo financiamiento por parte de CONACyT CB-81637 y PAPIIT IN212311-3.

Dedico esta tesis a mis padres Soco y Ángel que me han dado todo y a quienes debo todo lo que soy.

A Wendy y Daniel que sin proponérselo han sido y seguirán siendo para mí un gran soporte.

A Allan, con quien soy tan feliz y que se ha convertido en un elemento esencial en mi vida.

Y a nuestra pequeña familia en proceso de crecimiento.

...con todo mi amor para todos ustedes.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Edmundo Castillo Rosales, por haber dirigido esta tesis, por todo el tiempo que invertimos en discusiones sobre el proyecto y haberse convertido en un buen amigo.

Al Dr. Agustín López-Munguía Canales, por admitirme como miembro de su grupo de trabajo, por toda la orientación que me dio durante la realización de este proyecto.

A los miembros del comité tutorial: Dra. Laura Patricia Álvarez Berber y Dr. Alfredo Martínez Jiménez por dar seguimiento a este proyecto y por sus comentarios y sugerencias.

A los miembros del comité sinodal: Dra. Marcela Ayala Aceves, Dra. Georgina Garza-Ramos Martínez, Dr. Enrique Rudiño Piñera, Dr. Jaime Escalante García y Dr. José Adelfo Escalante Lozada, por la revisión minuciosa de este documento.

A la I.Q. Victoria Labastida Galván y la Dra. Diana Gabriela Vargas Pineda, del CIQ-UAEM, por la realización de los análisis de FAB-MS y RMN, respectivamente. Así como al Dr. Alfonso Miranda Molina, por su ayuda en la interpretación de los espectros.

Al T.L. Fernando González Muñoz, por su apoyo en el desarrollo de los sistemas analíticos de HPLC, a la M. en C. María Elena Rodríguez, por el apoyo en el manejo del equipo de FPLC durante la purificación de los productos de síntesis y a la T.L. Aurelia Ocampo por el apoyo técnico brindado.

Al Dr. Sergio Águila por la realización de los cálculos teórico cuánticos de los valores de nucleofilia de moléculas de interés.

Al personal de la Planta Piloto, al T.L.I. Mario Alberto Caro y la Q.F.B. Myriam Ortiz por su apoyo para el uso adecuado de los equipos de ruptura celular, cuantificación de glucosa y liofilización.

Al Dr. Ignacio Regla, Dr. Jaime Priego, Dr. Alejandro Torres y la Dra. Ángela Ávila, por sus sugerencias durante el desarrollo de técnicas de purificación y/o análisis. Y al Lic. Allan Troncozo, por la revisión de escritura en el documento final.

Deseo agradecer también:

A todos los miembros del laboratorio López. Por supuesto a Agustín, por su interés siempre en mi crecimiento profesional pero además por su valiosa amistad y por el rock & roll de cada fin de año. A Edmundo, por su crítica constructiva, por darme ánimos, por los consejos a nivel personal, sobre todo cuando terminan con una buena dosis de risa, quien sabe por qué.

A mis grandes amigas del laboratorio, la bola de arpías: María, Chelo, Sandrita y Ángela, por la hermosa amistad que nos une, por las horas de risas dentro y fuera del laboratorio, por haberme dado tanto a nivel personal y profesional. A Fercito por la carrilla que no perdona, a mi amiga más rosita Pau, a Male por conversar. A mis dos vecinos favoritos, Alex y José Luis por las charlas a cada lado de la mesa. Y a todos los López, Clarita, Nancy, Ponchito, Aure, Judith, Sandra, Jaime... a todos por estar siempre dispuestos a ayudar y hacer del laboratorio un lugar tan agradable para trabajar.

Las chicas masters Lili, Karla, Ana, Luary; a Martha, Chío y chicas CCG; la bandita thriller Víctor, Ale, Brenda y Aldito por supuesto; los rumis Germán y Adri; a todos ellos por su compañía y tantos momentos que vivimos juntos, proyectos, fiestas, pelis, juegos, sushi, performances, presentaciones de danza, brincos e incluso los momentos menos gratos, gracias por todo lo que pudimos compartir.

A los Vázquez y sus cachirules por dar batalla en los encuentros deportivos Vázquez-López. Especialmente a la prima Lore, la comadre Chris y Abraham, por ser personas tan agradables y brindarme su amistad.

A las niñas ITZ que aun cuando están lejos siempre me dan su apoyo, en especial a Tat, Mich, Jey y Cats, las quiero mucho. Al profe Morales, a quien sigo recurriendo en busca de consejo.

A la Compañía de Danza Mexicana de la UAEM, con quienes tuve la fortuna de participar varios años. Una hermosa manera de liberar el estrés.

A Laura, Clau y Ari por su apoyo en la última fase y por los jalones de orejas a nivel personal. Y a todas las personas, amigos y familia que no menciono para no alargar más este texto, pero que en algún momento durante este periodo influyeron de forma positiva en mi vida, en mi manera de pensar, en mis decisiones...

Muchas gracias.

Tabla de contenido

1	RESUMEN.....	1
2	INTRODUCCIÓN	3
3	ANTECEDENTES	5
	3.1 Glicósidos en la naturaleza, generalidades	5
	3.1.1 Efecto de la glicosilación en la función biológica	9
	3.2 Métodos químicos de glicosilación.....	10
	3.3 Métodos enzimáticos de glicosilación.....	13
	3.3.1 Glicosidasas.....	14
	3.3.2 Glicosiltransferasas	18
	3.4 Aplicaciones específicas de enzimas en síntesis de glicósidos	24
	3.4.1 Los compuestos fenólicos, generalidades.	24
	3.4.2 Avances biotecnológicos en glicosilación enzimática de fenoles.....	26
	3.4.3 Fructosiltransferasas.....	30
	3.5 Reactores enzimáticos.....	33
4	HIPÓTESIS	35
5	OBJETIVO GENERAL	35
	5.1 Objetivos específicos	35
6	METODOLOGÍA.....	36
	6.1 Materiales.....	36
	6.2 Producción de Enzimas.....	36
	6.3 Actividad enzimática.....	38
	6.4 Análisis de las reacciones por TLC	38
	6.5 Análisis por HPLC de las reacciones de fructosilación	39
	6.6 Selección de la enzima.....	39
	6.7 Efecto de la concentración de sustrato en las reacciones de aceptor	40
	6.8 Estabilidad de BS-LVS durante el almacenamiento en presencia de hidroquinona	40
	6.9 Efecto de la concentración de enzima en la reacción de aceptor.....	40
	6.10 Ensayos de hidrólisis de Fru-Hq.....	41
	6.11 Reacción de aceptor en mezclas con disolvente orgánico.....	41
	6.12 Purificación de fructósidos	41
	6.13 Análisis estructural por RMN.....	42
	6.14 Elucidación de la estructura de los monofructósidos	42
	6.15 Cálculo de índice de nucleofilia	43
	6.16 Cálculos con COSMO-RS	43
	6.17 Reacción en lote alimentado	44
	6.18 Efecto de monosacáridos y Fru-Hq en la eficiencia de la reacción de aceptor.....	44
	6.19 Estudio de inhibición por glucosa.....	44

6.20	Evaluación de mutantes de BS-LVS en reacciones de aceptor.....	45
6.21	Otras moléculas evaluadas en reacciones de aceptor (aminas, aminoácidos, epicatequina)	45
7	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	46
7.1	Selección de la enzima.....	46
7.2	Efecto de la concentración de sustrato en la reacción de aceptor	47
7.3	Efecto de la concentración de enzima en la reacción de aceptor.....	49
7.4	Reacción de aceptor con Hidroquinona catalizada por BS-LVS en presencia de solvente orgánico	52
7.5	Reacciones de aceptor con sustratos hidrofóbicos.....	54
7.6	Influencia de la nucleofilia del aceptor en la reacción de fructosilación	57
7.7	Reacción de aceptor en lote alimentado.....	60
7.8	Efecto de monosacáridos y Fru-Hq en la eficiencia de la reacción de aceptor.....	62
7.9	Evaluación de mutantes de BS-LVS en reacciones de aceptor.....	67
7.10	Reacción de aceptor con Y429N en lote y en lote alimentado	69
7.11	Estudio de hidrólisis de Fru-Hq y de inhibición de Y429N por glucosa	70
7.12	Fructosilación de aminoácidos y flavonoides.....	72
8	CONCLUSIONES	74
9	PERSPECTIVAS	78
10	BIBLIOGRAFÍA	79
11	APÉNDICE.....	89

Contenido de figuras

Figura 1.	Estructura química de los glicósidos.	5
Figura 2.	Esquemas de la reacción de glicosilación por métodos químicos.	11
Figura 3.	Método de fructosilación desarrollado por Oscarson y Sehgelmeble.	12
Figura 4.	Esquema de reacción de fructosilación química según el método de Lian <i>et al</i>	13
Figura 5.	Mecanismos catalíticos de las glicosidasas.	15
Figura 6.	Mecanismo de transglicosilación catalizada por las glicosidasas que retienen la configuración.	17
Figura 7.	Esquema de las reacciones catalizadas por glucosiltransferasas y fructosiltransferasas.	22
Figura 8.	Compuestos fenólicos.	24
Figura 9.	Estructuras resonantes en el fenol.	25
Figura 10.	Estructura de la cadena principal de los polímeros de fructosa sintetizados por las fructosiltransferasas bacterianas.	31
Figura 11.	Mecanismo de reacción propuesto para la BS-LVS	32
Figura 12.	Actividad enzimática residual de las diferentes FTFs e Inv evaluadas en reacciones de aceptor	46
Figura 13.	Análisis por TLC de las reacciones de fructosilación catalizadas por FTFs e Inv usando Hq como aceptor.	47
Figura 14.	Producción de fructósido y conversión de sacarosa por BS-LVS después de 20 h de reacción en función de la concentración inicial de Hq.	48
Figura 15.	Estabilidad de BS-LVS al almacenamiento en Hq 500 mM.	49
Figura 16.	Efecto de la concentración de enzima en la producción de fructósido en función del tiempo.	50
Figura 17.	Progreso de la formación de Fru-Hq y consumo de sacarosa por BS-LVS en reacciones con 400 mM sacarosa, 500 mM Hq y 5 U mL ⁻¹ de enzima a 30 °C.	51
Figura 18.	Hidrólisis de Fru-Hq por BS-LVS.	51
Figura 19.	Resultados del análisis de la reacción de fructosilación de Hq con BS-LVS en mezclas con disolvente orgánico.	53
Figura 20.	Coefficiente de actividad termodinámica (γ) de Hq a dilución infinita en diferentes solventes orgánicos.	54
Figura 21.	Aceptores empleados en reacciones de aceptor con BS-LVS.	54
Figura 22.	Producción de fructósidos de diferentes sustratos en reacciones de aceptor con BS-LVS.	55
Figura 23.	Fructosilación de alcoholes aromáticos y primarios con BS-LVS.	56
Figura 24.	Evolución de la formación de productos de fructosilación de 4HB por BS-LVS.	57
Figura 25.	Fructósidos de fenoles sintetizados enzimáticamente por BS-LVS y reportados por primera vez.	59
Figura 26.	Reacción de aceptor con Hq catalizada por BS-LVS en lote y lote alimentado.	61
Figura 27.	Distribución de la sacarosa consumida entre los diferentes productos de la reacción con Hq en lote alimentado, catalizada por BS-LVS.	61

Figura 28.	Efecto de Fru-Hq en la actividad global de BS-LVS y la actividad de síntesis de Fru-Hq.	63
Figura 29.	Efecto de la fructosa en la síntesis de Fru-Hq y la actividad global de BS-LVS.	64
Figura 30.	Efecto de la glucosa en la actividad de síntesis de Fru-Hq y actividad global de BS-LVS.	64
Figura 31.	Inhibición de BS-LVS por glucosa.	65
Figura 32.	Proceso de formación de productos de la reacción en lote alimentado catalizada por BS-LVS.	66
Figura 33.	Evaluación de las mutantes de BS-LVS en reacciones de aceptor con Hq.	69
Figura 34.	Producción de Fru-Hq en reacción en lote y lote alimentado.	70
Figura 35.	Hidrólisis de Fru-Hq catalizada por Y429N.	71
Figura 36.	Derivados de tirosina evaluados en la reacción de aceptor con BS-LVS.	72
Figura 37.	Análisis de TLC de las reacciones de aceptor con derivados de tirosina a las 24 horas de reacción.	73
Figura 38.	Flavonoide L-epicatequina.	73

Contenido de tablas

Tabla 1.	Glicósidos naturales con actividad biológica de importancia para el ser humano.	7
Tabla 2.	Tipos de glicansacararas bacterianas de acuerdo con la estructura química del polímero, producto principal de la reacción.	23
Tabla 3.	Métodos reportados para la glicosilación de fenoles utilizando glicansacararas.	28
Tabla 4.	Composición del medio de cultivo para <i>B. subtilis</i> y <i>L. citreum</i>	37
Tabla 5.	Nucleofilia (ω -) y valores de pKa para los diferentes aceptores evaluados.	58
Tabla 6.	Parámetros cinéticos y estabilidad térmica de la levansacarasa de <i>B. subtilis</i> y las mutantes seleccionadas.	68

1 RESUMEN

En el presente proyecto se desarrolló un método enzimático para la síntesis de fructósidos de moléculas hidrofóbicas, compuestos que poseen aplicación potencial en la industria farmacéutica o cosmética. Para ello, se evaluaron tres diferentes fructosiltransferasas (FTFs) y una invertasa, entre las cuales se seleccionó a la enzima BS-LVS debido a su mayor estabilidad y eficiencia en la transferencia a aceptores tales como los fenoles y alcoholes primarios hidrofóbicos. Las condiciones de reacción se seleccionaron mediante el estudio del efecto de la concentración de aceptor, de la concentración de enzima y de la composición del medio de reacción. Se encontró que la mayor producción de fructósido se obtiene utilizando alta concentración de aceptor (500 mM) y con 5 U mL^{-1} de enzima; mientras que si se incrementa la cantidad de enzima, el producto se hidroliza rápidamente, indicando que la reacción está sujeta a un control cinético. La presencia de concentraciones crecientes de disolvente orgánico en el medio de reacción (hasta 50 % v/v), redujo significativamente la producción de fructósido debido a la disminución de la actividad termodinámica del aceptor en dicho sistema. Este hecho se confirmó mediante cálculos teóricos utilizando el modelo COSMO-RS.

Por otra parte, entre los aceptores evaluados, se encontró que BS-LVS glicosila los compuestos fenólicos con mayor eficiencia que los alcoholes primarios. De hecho, con difenoles como hidroquinona, catecol y resorcinol se obtuvo la máxima cantidad de fructósidos (19-35) mM, la más alta concentración reportada para fructosilación de fenoles usando FTFs. La mayor eficiencia de BS-LVS en la fructosilación de fenoles se confirmó mediante el estudio con el aceptor 4-hidroxibencil alcohol, encontrándose una velocidad de fructosilación en el alcohol fenólico diez veces mayor que en el alcohol primario. La preferencia en la fructosilación de fenoles resultó asociada a los diferentes valores de pKa de las moléculasceptoras.

La eficiencia de la fructosilación fue mejorada al implementar un sistema de reacción en lote alimentado. Utilizando hidroquinona como aceptor modelo para la reacción en lote alimentado se logró duplicar el rendimiento del fructósido respecto a la hidroquinona inicial.

Se identificó como una de las principales limitantes para la síntesis de fructósidos de **Hq**, la presencia de fructooligosacáridos (FOS) y polímero. Como una manera de inhibir la producción de FOS y polímero, se evaluaron diferentes mutantes de BS-LVS. Entre ellas destacó la mutante Y429N, la cual se evaluó en un sistema en lote alimentado, logrando obtener 18 % de rendimiento

de fructósido respecto a la hidroquinona, casi el triple de lo obtenido en una reacción sin alimentación de sacarosa. Estos resultados permitieron sugerir que la ausencia de polímero permite que la producción de fructósido sea más eficiente.

Finalmente, se evaluaron otros nucleófilos, tales como aminas y tioles en reacciones de aceptor. Las aminas primarias y aminoácidos evaluados no fueron sustrato para la enzima. Sin embargo fue posible obtener fructósidos de un éster de tirosina y otros derivados de la misma que poseen un grupo fenólico. También se obtuvieron fructósidos con el 2-mercaptoetanol y el flavonoide L-epicatequina, siendo éste último el compuesto de mayor peso molecular que se ha podido glicosilar utilizando BS-LVS.

2 INTRODUCCIÓN

El interés creciente por el desarrollo de estrategias más eficientes para la obtención de productos novedosos de interés industrial, sin la generación de residuos contaminantes, ha llevado al área de la Química Orgánica a proponer nuevos procesos de síntesis. En muchos de los casos, estos procesos han sido pensados, ya sea, para incrementar los volúmenes de producción de aquellos productos que se extraen de fuentes naturales o para mejorar sus propiedades funcionales.

En la actualidad, los compuestos glicosilados han cobrado un interés particular en la industria química debido a las propiedades únicas que les confiere la presencia de un residuo de azúcar en su estructura. Los glicósidos son compuestos formados por un carbohidrato y una molécula químicamente distinta unidas mediante un enlace covalente, el cual se denomina enlace glicosídico. Estos compuestos se pueden encontrar en fuentes naturales, principalmente como metabolitos secundarios de plantas. Algunos glicósidos naturales resultan de interés por su actividad biológica en el ser humano; así, es posible encontrar desde endulzantes mucho más potentes que la sacarosa, hasta glicósidos con propiedades farmacológicas. De hecho, la glicosilación puede considerarse una estrategia para la modificación de las propiedades fisicoquímicas de las moléculas, tales como volatilidad, solubilidad, o estabilidad (Schottelius *et al.*, 2002; Meulenbeld y Hartmans, 2000; van Rantwijk *et al.*, 1999) o resultar crucial en su actividad biológica (Kren, 2008).

Un grupo de compuestos naturales que ha despertado interés particular por sus propiedades farmacológicas y nutracéuticas son los compuestos fenólicos. De hecho, se ha reportado que un número considerable de glicósidos fenólicos poseen propiedades farmacológicas tan variadas tales como actividad antiinflamatoria, anticoagulante, antimicrobiana, anticancerígena, secuestradores de radicales libres o antioxidantes, entre otras (Dembitsky, 2005a). Desafortunadamente, el uso y aplicación industrial de estos compuestos se ha limitado en gran manera por su baja concentración en plantas.

Si bien la síntesis química de estos compuestos podría ser una alternativa para su obtención a gran escala, es importante señalar que la glicosilación es una de las reacciones que presentan grandes retos para el área de síntesis orgánica. En efecto, la baja selectividad de estos procesos y el gran número de grupos reactivos presentes en los azúcares implica un gran número de etapas de

protección y desprotección de sustratos y productos, dando como resultado bajos rendimientos en los procesos y la generación de subproductos tóxicos (Pavlov *et al.*, 2001; Borgia *et al.*, 2001).

En años recientes, diversas investigaciones se han dirigido al uso de la síntesis enzimática, buscando una alternativa a los métodos químicos tradicionales. El objetivo en este sentido ha sido aprovechar la especificidad que caracteriza a las enzimas para aplicarlas a procesos de síntesis. Estas estrategias han mostrado un potencial interesante en términos de reducir el número de etapas de proceso y evitar la generación de subproductos tóxicos.

En lo que se refiere a la síntesis de glicósidos, se ha recurrido por un lado al uso de glicosidasas, enzimas naturalmente hidrolíticas, capaces realizar la síntesis de glicósidos mediante hidrólisis inversa o transglicosilación (van Rantwijk *et al.*, 1999). Por otro lado, también se ha recurrido al uso de enzimas denominadas glicosiltransferasas, enzimas que de manera natural catalizan la síntesis de glicósidos.

No obstante el potencial que pudieran presentar las glicosidasas o las glicosiltransferasas en la glicosilación de fenoles, los rendimientos de producto reportados hasta ahora han sido muy bajos, en donde los principales inconvenientes son la inestabilidad de las enzimas en presencia de aceptores fenólicos, la poca solubilidad de dichos sustratos o la baja selectividad de la enzima por los mismos (Bertrand *et al.*, 2006; Moon *et al.*, 2006; Meulenbeld y Hartmans, 2000). Lo anterior hace evidente la necesidad de encontrar enzimas afines por sustratos fenólicos y altamente estables en presencia de altas concentraciones de los mismos.

Dentro de este contexto, el presente trabajo tuvo como objetivo desarrollar una estrategia eficiente para la glicosilación de compuestos de interés industrial mediante el uso de enzimas glicosilantes. Para efectos de la evaluación de la selectividad de las enzimas y al mismo tiempo mejorar la eficiencia de los procesos se utilizaron como moléculas modelo diferentes compuestos fenólicos. De manera particular se estudió la glicosilación del compuesto hidroquinona, cuyo producto de fructosilación es análogo del glucósido natural arbutina (4-hidroxifenil- β -D-glucopiranosido), utilizado en cosméticos para evitar el oscurecimiento de la piel (Wu *et al.*, 2006).

3 ANTECEDENTES

3.1 Glicósidos en la naturaleza, generalidades

Los glicósidos son compuestos formados por un carbohidrato unido mediante un enlace covalente a otra molécula de naturaleza química diferente, la cual se denomina aglicona. Estos compuestos son de relativamente bajo peso molecular y forman parte del metabolismo secundario de plantas y algunos microorganismos.

El enlace en los glicósidos involucra al carbono anomérico del carbohidrato y un átomo de O, N, S o C de la aglicona formando un enlace tipo éter, amino, tioéter o carbono-carbono, respectivamente, y pudiendo estar orientados en posiciones α o β respecto al carbono anomérico (Figura 1). En función del tipo de átomo que participa en el enlace se les conoce como O-glicósidos, N-glicósidos, tioglicósidos o C-glicósidos. Entre estos enlaces, el más común en sistemas biológicos es el enlace O-glicosídico (Dewick, 2002).

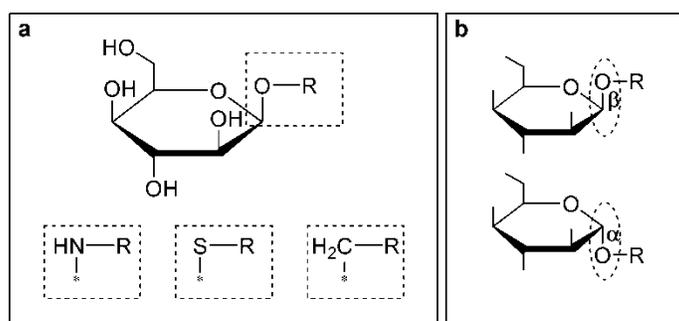


Figura 1. Estructura química de los glicósidos. (a) Estructura general de glicósidos ejemplificado con un residuo de glucosa. (b) Estereoisómeros de glicósidos, omitiendo los grupos OH del azúcar para mayor claridad.

En los glicósidos naturales, el residuo glicosilo más frecuente suele ser una glucosa, aunque se puede encontrar una gran diversidad de carbohidratos tales como la fructosa, la fucosa, o incluso desoxiazúcares o azúcares modificados con grupos amino o carboxilo.

En el caso de la aglicona, la diversidad química es muy grande, incluyendo alcoholes alifáticos, fenoles o estructuras más complejas como los mono-, di- o triterpenos, flavonoides, alcaloides, esteroides entre otros (Dembitsky, 2005b; Sturgeon, 2002).

Cabe aclarar que las macromoléculas que poseen enlaces glicosídicos, como las glicoproteínas y los ácidos nucleicos, cuyas funciones son primordiales dentro de los organismos, no se clasifican como glicósidos y no forman parte del presente estudio.

Los glicósidos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, principalmente como parte del metabolismo secundario de plantas en las cuales pueden desempeñar funciones muy variadas, tales como la protección contra el ataque de herbívoros o contra la radiación UV (Dembitsky, 2005b) por mencionar sólo algunas. Es importante señalar que estas funciones biológicas no sólo tienen relevancia dentro de las plantas, sino que también son de gran importancia para el ser humano, como lo han puesto de manifiesto numerosos reportes. De hecho, muchas clases de compuestos relevantes producidos por plantas o microorganismos, son glicósidos, entre los que se pueden encontrar edulcorantes, alcaloides, flavonoides, antibióticos, etc. (Dembitsky, 2005a; Kren y Martínková, 2001). Algunos ejemplos de glicósidos naturales y sus actividades biológicamente interesantes se muestran en la tabla 1.

Los recursos naturales, tanto en ambientes terrestres como marinos, son una fuente muy atractiva para la búsqueda de nuevos metabolitos de interés (Dembitsky, 2004); esto gracias al reciente desarrollo de métodos automatizados de detección y evaluación de compuestos bioactivos (Beutlerl, 2009). Así, se ha logrado identificar un gran número de glicósidos responsables de actividades terapéuticas en plantas utilizadas en medicina tradicional. Bajo esta perspectiva, el potencial terapéutico de los glicósidos los ha convertido en un blanco atractivo para el desarrollo de fármacos. Sin embargo, su obtención a gran escala se complica por la baja concentración en la que se encuentran en plantas, resultando en bajos rendimientos después de complejos procesos de extracción (Shaikh y Withers, 2008; Demchenko, 2003). Esta es una de las razones que motivan la búsqueda de métodos de obtención que faciliten la producción de compuestos de interés.

Tabla 1. Glicósidos naturales con actividad biológica de importancia para el ser humano

Tipo de glicósido (aglicona)	Ejemplos	Actividad biológica	Fuente natural	Referencia
Saponinas (sapogeninas, ya sea esteroideas o triterpenoides)	Glicirricina	Endulzante (50 a 150 veces más potente que la sacarosa), actividad antiinflamatoria y mineralocorticoide.	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	(Cheeke, 2001)
	Dioscina	Reducción de niveles de colesterol en sangre. Antiprotozoarios, inmunoestimulante y anticáncerígenos	<i>Yucca schidigera</i> , <i>Quillaja saponaria</i> , soya, ginseng	(Dewick, 2002)
Glicósidos cardiacos (esteroides)	Digoxina, digitoxina	Causantes de contracción del miocardio. Utilidad en medicamentos para tratamientos del corazón.	<i>Digitalis purpurea</i> , <i>Digitalis lanata</i>	(Dewick, 2002; Kren y Martínková, 2001; Ortega, 1998)
Glicósidos de monoterpenoides (hemiterpenoides, monoterpenoides acíclicos, mono y bicíclicos e iridoides)	Kudingosido A	Agentes antioxidantes	<i>Ligustrum pedunculare</i>	(Dembitsky, 2005b)
	Swerósido Gentiopicrosido	Antimicrobianos	<i>Lavandula angustifolia</i> <i>Centaureum erythraea</i>	
Glicósidos de alcaloides (alcaloides)	Dauricósido	Actividad inhibitoria de agregación de plaquetas	<i>Menispermum dauricum</i>	(Dembitsky, 2005b)
	Estrictosamida	Antitumorales	<i>Nauclea orientalis</i> , <i>Sarcocephalus latifolius</i>	
Antraciclina (antraciclina)	Daunomicina, doxorubicina	Tratamiento de algunos tipos de cáncer como leucemia o tumores sólidos.	<i>Streptomyces peucetius</i>	(Laatsch y Fotso, 2008; Arcamone, 2007)

Tipo de glicósido (aglicona)		Ejemplos	Actividad biológica	Fuente natural	Referencia
Glicósidos antraquinónicos (antraquinonas)		Aloína	Laxante, purgante	<i>Aloe vera</i>	(Dewick, 2002)
		Kwanzoquinona D	Actividad contra el tremátodo patógeno humano del género <i>Schistosoma</i> .	<i>Hemerocallis spp</i>	(Dembitsky, 2004)
Anguciclinas (anguciclinona, sistema benzo[a]antraceno)		Agreticina, kerriamicina B y C.	Inhibidores de agregación de plaquetas	Microorganismos del género <i>Streptomyces</i>	(Olano <i>et al.</i> , 2009; Weymouth-Wilson, 1997; Rohr y Thiericke, 1992)
		Landomicina A	Antitumorales		
Glucosinolatos (isotiocianatos, nitrilos, tiocianatos o similares)		Glucobrasicina, glucorafanina	Efecto protector contra cáncer y reducción de niveles de colesterol en sangre.	Familia Brassicaceae	(Cheeke, 2001)
Glicósidos aromáticos simples (fenoles, catecoles, etc.)		Gastrodina	Propiedades anticoagulantes y anticonvulsivas.	<i>Gastrodia elata</i>	(Liu <i>et al.</i> , 2006; An <i>et al.</i> , 2003)
		β -arbutina	Inhibidor tirosinasa, utilizado en productos para aclarado de la piel.	<i>Uvae ursi</i>	(Wu <i>et al.</i> , 2006; Sugimoto <i>et al.</i> , 2005; Funayama <i>et al.</i> , 1995)
		Salicina	Anticoagulante, profármaco antipirético	Especies de <i>Salix</i> y <i>Populus</i>	(Seo <i>et al.</i> , 2005; Dembitsky, 2005a; Yoon <i>et al.</i> , 2004)
		Lambertianósido	Actividad anti-VIH	<i>Eugenia lambertiana</i>	
Glicósidos de flavonoides (polifenoles)		Rutina y glicósido de crisoeriol	Útiles contra enfermedades inflamatorias del intestino y antioxidantes	<i>Coronopus didymus</i>	(Kim <i>et al.</i> , 2005; Mishra <i>et al.</i> , 2003)

3.1.1 Efecto de la glicosilación en la función biológica

Gracias a la gran diversidad de actividades biológicas que se han encontrado en glicósidos naturales, muchos estudios se han dirigido a descubrir qué papel juega el residuo azúcar en la actividad. Se sabe que este residuo puede participar modificando la solubilidad de la aglicona o ser un componente crucial para la actividad (Kren, 2008). Por ejemplo las anguciclinas actúan como antitumorales (tabla 1), pero la aglicona (anguciclinona) no presenta por sí misma ninguna actividad biológica (Weymouth-Wilson, 1997).

En otros casos, el residuo azúcar juega un papel en la afinidad por el tejido o molécula a que se dirige. Tal es el caso de los glicósidos cardiacos, en donde la aglicona tiene por sí misma una cierta afinidad para generar la unión al músculo del corazón, pero el residuo azúcar modifica considerablemente su actividad al incrementar su solubilidad y favorecer la unión al tejido cardiaco (Dewick, 2002).

No obstante, es prácticamente imposible definir un patrón general de actividades biológicas para los glicósidos comparados con sus agliconas respectivas (Kren, 2008). De hecho, no existe una regla universal respecto al efecto que pueden tener diferentes tipos de azúcares, o diferente tipo de enlace, o el número de residuos glicosilo en la actividad biológica; sin embargo, cambios en estas variables pueden modular la actividad de la aglicona.

Por ejemplo, en las antraciclinas, parte del mecanismo de acción anticáncer se atribuye al residuo desoxiazúcar gracias a una interacción con el DNA, y se ha encontrado que el cambio tan sólo en el tipo de enlace β por un enlace α entre dos residuos glicosilo en derivados de daunorubicina, resultó en el incremento de 35 veces la actividad anticáncer (Kren y Rezanka, 2008). En este caso, el efecto de estas modificaciones se debe a que el residuo azúcar juega un papel primordial en el mecanismo de acción. Por otro lado, los tratamientos con antraciclinas tienen muchos efectos colaterales (alopecia, desórdenes gastrointestinales, etc.); sin embargo, se ha visto que derivados con mayor número de residuos glicosilo tienen menos efectos adversos (Kren y Martínková, 2001; Weymouth-Wilson, 1997).

Probablemente el cambio más evidente que podría esperarse de la unión del residuo azúcar a la aglicona, es la solubilidad del compuesto. En efecto, de manera general, los glicósidos son más solubles en agua que sus agliconas respectivas (Kren y Martínková, 2001). En el caso de glicósidos con actividad farmacológica, el cambio en la solubilidad puede influenciar sus propiedades

farmacocinéticas como son la absorción, distribución, metabolismo y/o eliminación (Kren y Martínková, 2001; Thorson *et al.*, 2001). En este sentido, una mayor absorción puede reducir las dosis requeridas y provocar menos efectos colaterales (Seo *et al.*, 2005). Asimismo, la glicosilación puede reducir la volatilidad de la aglicona (Meulenbeld y Hartmans, 2000) o puede ser una estrategia de protección para compuestos inestables bajo ciertas condiciones (p. ej. oxidación) (van Rantwijk *et al.*, 1999).

Ante este panorama, la glicosilación tiene un gran potencial tecnológico, por la posibilidad de mejorar las propiedades de la aglicona, tales como solubilidad, volatilidad y estabilidad (Schottelius *et al.*, 2002; Meulenbeld y Hartmans, 2000; van Rantwijk *et al.*, 1999), para aumentar su potencial en diversas industrias como la farmacéutica, alimentaria o de cosméticos. Para lograrlo, es fundamental el desarrollo de metodologías eficientes y, eventualmente, susceptibles de aplicarse en la producción de glicósidos a gran escala.

3.2 Métodos químicos de glicosilación

Desde hace más de un siglo, los químicos orgánicos se han interesado por el desarrollo de metodologías para la síntesis de glicósidos, la cual representa un gran reto debido a que los numerosos grupos hidroxilo en el azúcar deben ser diferenciados para conseguir el enlace glicosídico deseado, manteniendo además la orientación requerida, ya sea isómeros alfa o beta; es decir, la reacción debe ser regioselectiva y estereoselectiva (Blixt y Razi, 2008).

Los primeros métodos de glicosilación química fueron reportados por Michael en 1879 y Fischer en 1893. La reacción de Michael para la síntesis de O-glicósidos procedía por desplazamiento nucleofílico de un grupo saliente en el carbono anomérico (cloro en la Figura 2a) con el resto de los grupos OH protegidos. El inconveniente era la necesidad de convertir el aceptor glicosilo (nucleófilo) en su respectiva sal de potasio (Mydock y Demchenko, 2010; Michael, 1879).

En 1893 Emil Fischer, en contraste con el protocolo previo, percibió el monosacárido desprotegido como un hemiacetal. La reacción se llevaba a cabo en fuertes condiciones ácidas, en un exceso de la aglicona deseada (aceptor del glicosilo), comúnmente alcoholes de bajo peso (Figura 2b). Conceptualmente esta es la forma más simple de obtener glicósidos; sin embargo, el método de Fischer conduce a un equilibrio de especies que se convierten entre sí, además del producto (Mydock y Demchenko, 2010; Fischer, 1893).

En 1901, Koenigs y Knorr (y de manera independiente Fischer y Armstrong) realizaron una glicosilación química mediante la reacción de glicosil-halogenuros con alcoholes convencionales como aceptores en presencia de sales de metales pesados, como Ag_2CO_3 o Ag_2O (Figura 2c), las cuales asisten en la liberación del grupo saliente, según se demostró en 1930. Este método es muy selectivo en el sentido de que se obtiene una inversión de la configuración anomérica (Mydock y Demchenko, 2010).

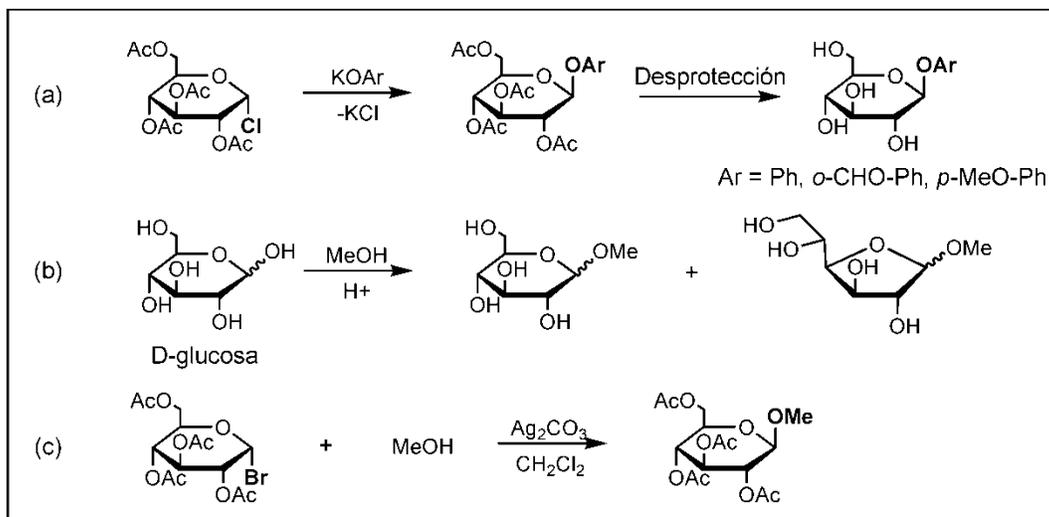


Figura 2. Esquemas de la reacción de glicosilación por métodos químicos. (a) Método de Michael, (b) Fischer y (c) Koenigs-Knorr (Mydock y Demchenko, 2010).

Desde estos trabajos pioneros en la síntesis de O-glicósidos han surgido modificaciones para mejorar los procesos de síntesis, en los cuales es posible distinguir algunas características mecanísticas indispensables. Esto es, que el enlace glicosídico se forma por desplazamiento nucleofílico de un grupo saliente unido al carbono anomérico del residuo azúcar por el grupo OH del nucleófilo. Generalmente, el compuesto que contiene al grupo saliente se denomina “donador de glicosilo” y el compuesto que lleva a cabo el ataque nucleofílico se le conoce como “aceptor de glicosilo”. La reacción generalmente se realiza en presencia de un activador denominado “promotor” cuyo papel es asistir la salida del grupo saliente (Carmona *et al.*, 2008).

Y no sólo han habido desarrollos para los enlaces O-glicosídicos, sino también N-, S- y C-glicosídicos (Oscarson, 2008; Nishikawa *et al.*, 2008; Tanaka *et al.*, 2005); de hecho, los tioglicósidos son muy utilizados como donadores de glicosilo para la síntesis de O-glicósidos o de

otro tipo de intermediarios donadores de glicosilo (Zhu y Schmidt, 2009; Oscarson, 2000). Sin embargo, no es el objetivo de este documento hacer una discusión exhaustiva de estos métodos.

Lo que resulta más importante señalar, es que cuando se aborda la síntesis de glicósidos de cualquier tipo el control de la regio- y la estereoselectividad del proceso, es primordial y es la razón por la cual el uso de grupos protectores se vuelve indispensable. En este mismo sentido, en los últimos años, una gran parte de las modificaciones que han sufrido las metodologías como la de Koenigs-Knorr, se han dirigido al desarrollo de nuevos promotores, así como de nuevos grupos salientes adecuados para inducir o mantener la estereoselectividad requerida (Demchenko, 2003). Otros factores que se han tomado en consideración son el efecto del disolvente, el patrón de grupos protectores tanto en el donador de glicosilo como en el aceptor, impedimento estérico, etc. (Demchenko, 2003).

Los mayores esfuerzos en el desarrollo de métodos de glicosilación se han dirigido a la adición de glucosa. Pero un reto particular es la utilización de fructosa, tomando en cuenta que se trata del segundo azúcar más abundante en la naturaleza (después de la glucosa). Sin embargo, los estudios relacionados con la síntesis química de fructósidos reportan bajos rendimientos y poca estereoselectividad de los procesos (Lian *et al.*, 2008). Uno de los pocos métodos de fructosilación química exitosos, se basa en el bloqueo del grupo CH_2OH del carbono anomérico al lado α mediante un puente interno con el hidroxilo en el carbono 4 (Figura 3a) y la fructosilación requiere de dimetil(tiometil)sulfonio triflato (DMTST) como promotor (Oscarson y Sehgelmeble, 2000). El método es β -estereoselectivo, sin embargo, la preparación del donador es costosa (Figura 3b), lo que limita su aplicación (Lian *et al.*, 2008).

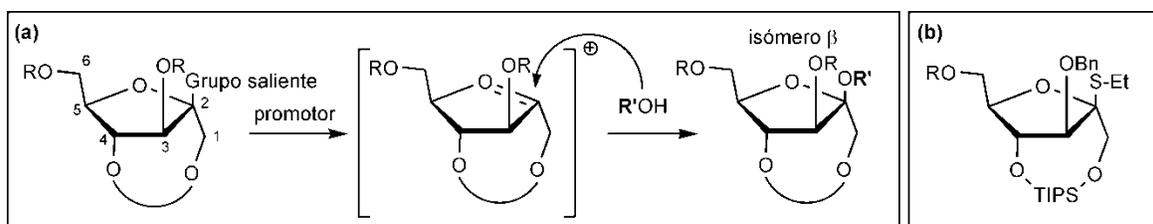


Figura 3. Método químico de fructosilación desarrollado por Oscarson y Sehgelmeble, 2000. (a) Esquema general de reacción de fructosilación. (b) Estructura del donador del residuo fructosilo, tioglicósido de fructosa con un puente acetal interno 1,4-O-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil) (TIPS), R en el donador es TBDPS (*tert*-butildifenilsilil).

Otro método es el desarrollado por Lian *et al* (2008) (Figura 4) que permite obtener de moderados a altos rendimientos en la fructosilación, pero generando principalmente α -fructósidos.

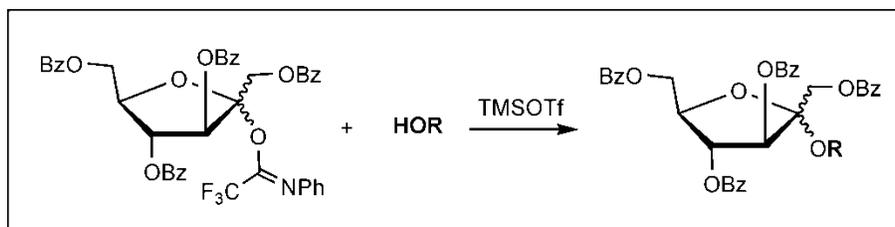


Figura 4. Esquema de reacción de fructosilación química según el método de Lian *et al.* (2008). TMSOTf, trimetilsilil trifluorometanosulfonato, como promotor.

A pesar del gran progreso en técnicas contemporáneas de síntesis química, la necesidad del control regio- y estereoselectivo de la formación del enlace glicosídico, hace que se recurra necesariamente a múltiples esquemas de protección y desprotección de los sustratos y productos, lo cual representa una seria desventaja por el gran número de pasos en el proceso y en consecuencia, el mayor costo. Asimismo, el uso de metales pesados como promotores no es aceptable para productos con uso potencial en el área farmacéutica debido a su toxicidad (Thimm y Thiem, 2008). Estos hechos motivan la constante búsqueda de métodos alternativos para la síntesis de este tipo de compuestos (Shaikh y Withers, 2008; Demchenko, 2003).

3.3 Métodos enzimáticos de glicosilación

Actualmente existe una tendencia al uso de alternativas más limpias y ambientalmente más amigables que la síntesis orgánica tradicional. El objetivo es el desarrollo de metodologías sustentables para la manufactura de químicos finos. En este contexto, la biocatálisis, que emplea enzimas o células completas como catalizadores para síntesis orgánica, tiene muchos beneficios potenciales, como son: condiciones más suaves de reacción (pH y temperaturas fisiológicas), un catalizador y disolvente (a menudo agua) medioambientalmente atractivos, y alta quimio- regio- y estereoselectividad. Además, el uso de enzimas generalmente permite la obtención de moléculas muy complejas sin la necesidad de activación de grupos funcionales y evitando los pasos de protección y desprotección que se requerirían en síntesis orgánica tradicional (Sheldon y van Rantwijk, 2004). Esto permite diseñar rutas sintéticas más cortas y en consecuencia reducir el tiempo de ocupación de los reactores, lo que es un factor importante en la economía del proceso

en producción farmacéutica y química (Rasor y Voss, 2001); asimismo se generan menos residuos, siendo así un proceso más amigable con el medio ambiente (Sheldon y van Rantwijk, 2004; Rasor y Voss, 2001).

En el área de la glicosilación, la síntesis enzimática representa una buena alternativa a los métodos de síntesis química, gracias a la posibilidad de formar enlaces glicosídicos específicos en función del tipo de átomo aceptor del enlace y en función de la posición y de la orientación de los grupos funcionales reactivos presentes en diferentes azúcares (Shaikh y Withers, 2008). Las enzimas con potencial utilización en síntesis de glicósidos se pueden agrupar en dos grupos principales: glicosidasas (E.C. 3.2.1.X) y glicosiltransferasas (E.C. 2.4.X.X). Las glicosidasas son enzimas hidrolíticas por naturaleza, pero bajo condiciones muy particulares pueden catalizar la síntesis de glicósidos. Por otro lado, el grupo de las glicosiltransferasas incluye a las enzimas que en los seres vivos son las responsables de catalizar la reacción de transferencia de residuos glicosilo.

3.3.1 Glicosidasas

Las glicosidasas son enzimas que hidrolizan enlaces glicosídicos en oligo- y polisacáridos con un alto grado de estereoespecificidad (Plou *et al.*, 2007; Demchenko, 2003). No obstante su naturaleza hidrolítica, estas enzimas son también capaces de formar enlaces glicosídicos mediante reacciones de hidrólisis inversa o de transglicosilación (Shaikh y Withers, 2008; Demchenko, 2003) que se describen más adelante en el texto. Debido a su alta especificidad, amplia disponibilidad y estabilidad en presencia de disolventes orgánicos, ha habido un gran interés en estos catalizadores para el desarrollo de procesos de síntesis. Es por ello que se ha estudiado ampliamente su mecanismo de acción y la relación que guarda éste con las características estructurales de la enzima.

Las glicosidasas realizan su actividad hidrolítica mediante dos mecanismos principales, uno que conduce a la inversión de la configuración del carbono anomérico y el otro que lleva a la retención de esta configuración, siendo estas últimas las más utilizadas en síntesis (Plou *et al.*, 2007).

En las glicosidasas que invierten la configuración, el residuo catalítico ácido cede un protón al grupo saliente O-R (Figura 5a), mientras que la base catalítica sustrae un protón de una molécula de agua, con lo cual incrementa su nucleofilia y facilita el ataque al carbono anomérico. Como resultado, la configuración anomérica se invierte (Vuong y Wilson, 2010).

En las glicosidasas que retienen la configuración anomérica, la reacción se lleva a cabo mediante un mecanismo de doble inversión, en la que un residuo ácido/base general actúa primero como ácido y después como base en dos pasos (Figura 5b). En el primero, facilita la liberación del grupo saliente donando un protón al átomo de oxígeno del enlace, mientras que el residuo nucleófilo forma un intermediario covalente con la enzima. En el segundo paso, el residuo desprotonado ácido/base actúa como una base general para activar una molécula de agua que lleva a cabo un ataque nucleofílico sobre el intermediario glicosil-enzima. El resultado son dos inversiones de la configuración que conllevan a la retención de la estereoquímica en el centro anomérico (Vuong y Wilson, 2010) (Figura 5b).

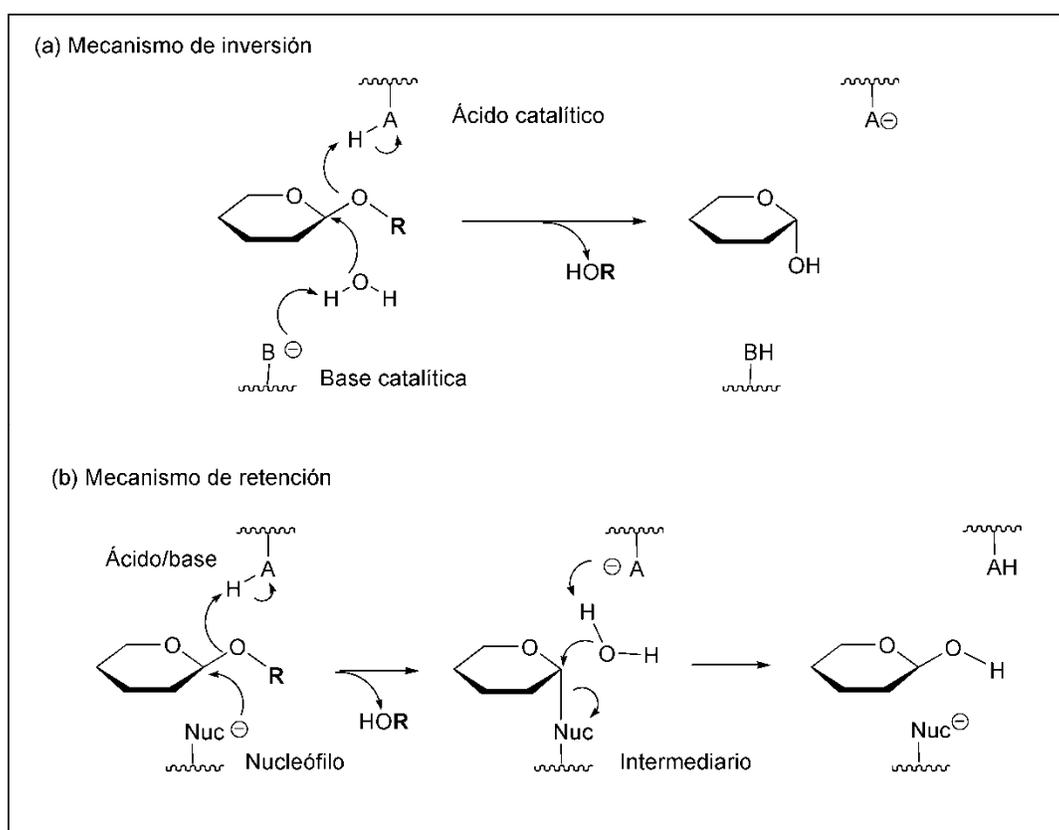


Figura 5. Mecanismos catalíticos de las glicosidasas. (a) con inversión de la configuración anomérica y (b) con retención de la configuración (Vuong y Wilson, 2010; Heightman y Vasella, 1999). Se han omitido los grupos OH para mayor claridad.

Hidrólisis inversa (control termodinámico)

La manera más simple de llevar a cabo la síntesis de glicósidos utilizando glicosidasas es realizarla bajo condiciones en las cuales la reacción de hidrólisis se vea desfavorecida a la vez que se favorece la reacción de síntesis (Demchenko, 2003) de acuerdo con el esquema de reacción (Figura 6), de manera que la reacción procede hasta que se alcanza un equilibrio entre la síntesis y la hidrólisis del producto. Esto se logra mediante un control de la actividad termodinámica de los sustratos y productos en el medio de reacción. La actividad termodinámica es una medida de la disponibilidad para reaccionar que una especie posee en determinado medio, lo cual se expresa mediante la Ecuación 1.

$$a_i = \gamma_i x_i \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde a_i es la actividad termodinámica, γ_i el coeficiente de actividad termodinámica y x_i la fracción molar o término de concentración. El coeficiente de actividad γ_i en mezclas soluto-disolvente es dependiente de las interacciones que forma el soluto con el disolvente utilizado.



De acuerdo con el esquema de la reacción de glicosilación (Ec. 2), para lograr la síntesis del glicósido se debe disminuir la actividad termodinámica del agua (a_w) y la del glicósido, así como aumentar significativamente las actividades termodinámicas del donador y aceptor de glicosilo (sustratos para la reacción de hidrólisis inversa). La estrategia más utilizada para favorecer la síntesis es disminuir a_w mediante la adición de disolventes orgánicos miscibles con el agua e incrementar la concentración de los sustratos (Plou *et al.*, 2007; van Rantwijk *et al.*, 1999).

Si bien en estos sistemas es deseable una baja a_w para favorecer el rendimiento de producto al equilibrio, usualmente se mantiene una cantidad de agua suficiente para evitar la inactivación de las glicosidasas y para favorecer la solubilidad del donador de glicosilo (van Rantwijk *et al.*, 1999). Por tal motivo, con frecuencia los rendimientos obtenidos en reacciones de hidrólisis inversa son bajos ($\leq 20\%$) (Plou *et al.*, 2007). Asimismo, aunque este sistema es atractivo por su simplicidad, resulta poco eficiente debido a la incompatibilidad de una gran parte de los donadores de glicosilo y las glicosidasas con la baja actividad de agua en medio orgánico.

Transglucosilación (control cinético)

De manera general, la reacción de transglucosilación con glicosidasas se asocia a un control cinético del proceso. Esta estrategia es válida para las enzimas que retienen la configuración del carbono anomérico y en la Figura 6 se muestra el mecanismo de reacción con las dos vías posibles. La distribución del intermediario glicosil-enzima entre las dos vías, ya sea productos de hidrólisis o de transferencia, está determinada por la relación de sus respectivas velocidades $k_2 \cdot [H_2O]$ / $k_3 \cdot [Aceptor]$ (Figura 6). De manera que la reacción que predomine será aquella que en condiciones puntuales del proceso tenga la mayor velocidad. Por lo tanto la relación hidrolasa/transferasa depende de la concentración del aceptor, así como de la afinidad para unir al azúcar aceptor (u otro aceptor) y excluir al agua, que son propiedades intrínsecas de la enzima (Plou *et al.*, 2007). Además el producto de transferencia puede servir como sustrato para la enzima e hidrolizarlo con una constante de velocidad k_{-3} .

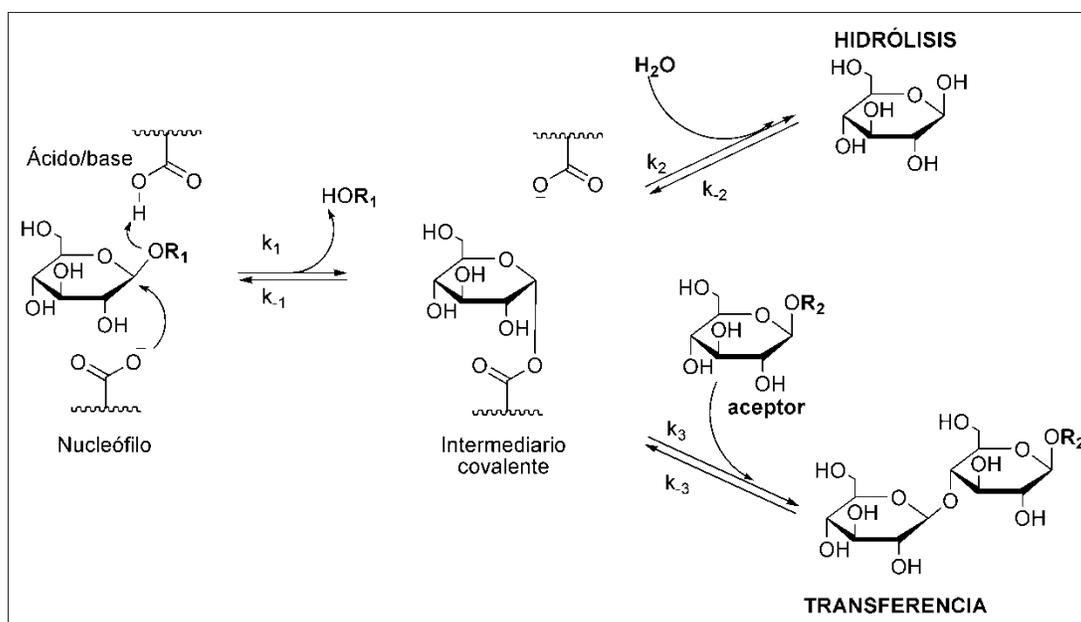


Figura 6. Mecanismo de transglucosilación catalizada por las glicosidasas que retienen la configuración. Se esquematizan los residuos carboxílicos del sitio activo, uno de ellos actuando como nucleófilo y el otro como catalizador ácido/base.

Por lo tanto, conforme se consume el sustrato aceptor, la concentración de producto incrementa hasta que la velocidad de síntesis del producto iguala su velocidad de hidrólisis. En este punto la

concentración de producto es la máxima y la reacción se debe detener antes de que la hidrólisis de producto se convierta en el proceso principal (Plou *et al.*, 2007).

Debido a que la estrategia de síntesis de glicósidos por control cinético establece una competencia continua entre las velocidades de síntesis e hidrólisis, en la mayoría de los casos los rendimientos obtenidos no rebasan el 40 %, pero es mejor en comparación con el 20 % que típicamente se obtiene en procesos controlados termodinámicamente (Plou *et al.*, 2007).

Es evidente que, ya sea utilizando una estrategia de control cinético o termodinámico, los rendimientos obtenidos usando hidrolasas son limitados debido al efecto desfavorable que genera en estas reacciones la presencia de agua. Como alternativa, algunas estrategias buscan incrementar los rendimientos mediante la remoción de los productos de la mezcla de reacción, mediante extracción o adsorción, o por una subsecuente biotransformación mediante una o más enzimas adecuadas (Scheckermann *et al.*, 1997).

Recientemente se desarrolló una nueva clase de enzimas denominadas glicosintasas, las cuales son mutantes de glicosidasas en el residuo nucleófilo del sitio catalítico (carecen de él), de tal manera que pueden realizar la reacción de transglicosilación con la ventaja de que no realizan hidrólisis (Shaikh y Withers, 2008; Stick, 2001). Sin embargo, puesto que la enzima es incapaz de generar el intermediario glicosil-enzima, requieren el uso donadores glicosilo activados (p.ej. fluoruro de glicosilo) que con frecuencia son químicamente inestables (Goedl *et al.*, 2008a).

3.3.2 Glicosiltransferasas

Otra alternativa enzimática para la síntesis de glicósidos es el uso de las glicosiltransferasas (EC 2.4.X.X), que catalizan la transferencia de un residuo glicosilo a partir de una molécula donadora hacia otra que actúa como aceptora generando un nuevo enlace glicosídico. Las glicosiltransferasas son las responsables de la formación *in vivo* de estos enlaces. El donador generalmente es un glicósido, disacárido, polisacárido, glicosilfosfato o glicosil difosfonucleósido (Stick, 2001). Considerando la naturaleza del donador del residuo glicosilo, estas enzimas se pueden clasificar en glicosiltransferasas Leloir y glicosiltransferasas no-Leloir (Weijers *et al.*, 2009; Demchenko, 2003).

3.3.2.1 Glicosiltransferasas Leloir

Las glicosiltransferasas Leloir (GT-Leloir) (EC 2.4.1.X, 2.4.2.X ó 2.4.99.X) son las encargadas de la síntesis de glicósidos y polisacáridos de pared celular en plantas, hongos y bacterias, así como de glicoconjugados (proteínas y lípidos poliglicosilados) en mamíferos (Weijers *et al.*, 2009; Demchenko, 2003).

La formación de un nuevo enlace glicosídico requiere de energía, es por eso que las GT-Leloir utilizan azúcares nucleotídicos como donadores de alta energía (Wilson, 2008; Robyt, 2008) (p.ej. UDP-glucosa, cuya energía libre de hidrólisis es de -32 kJ/mol) (Henry y Darbyshire, 1980) para transferirlos hacia un hidroxilo específico en el aceptor (Shaikh y Withers, 2008; Demchenko, 2003). Debido a la dependencia de donadores nucleotídicos, estas enzimas reciben el nombre de glicosiltransferasas Leloir en honor a quien descubrió el primer azúcar nucleotídico, Luis F. Leloir, hecho que le hizo merecedor del premio Nobel en química en 1970 por su contribución al conocimiento sobre biosíntesis de glicósidos (Lairson *et al.*, 2008). Casi todas las GT-Leloir utilizan moléculas donadoras que contienen grupos salientes difosfato (p. ej. uridin difosfato glucosa, UDP-Glc; uridin difosfato galactosa, UDP-Gal; guanosin difosfato fucosa, GDP-Fuc; o guanosin difosfato manosa GDP-Man), siendo los grupos UDP los más comunes (Weijers *et al.*, 2009).

Las GT-Leloir realizan la transferencia del glicosilo con una alta regio- y estereoselectividad (Plou *et al.*, 2007). De hecho, son altamente específicas por su sustrato, razón por la cual es ampliamente aceptado el concepto de “una enzima-un enlace”; no obstante, pueden tolerar algunas modificaciones menores al aceptor o al donador, ampliando la aplicabilidad de una enzima en particular (Demchenko, 2003).

Pese a que el potencial de estas enzimas ha ido mejorando con el desarrollo de nuevas variantes y la aplicación de evolución dirigida y mutagénesis sitio-dirigida para un mejor desempeño (Plou *et al.*, 2007; Daines *et al.*, 2004), su uso en aplicaciones tecnológicas sigue siendo limitado, debido a la dificultad de acceder a las enzimas relevantes debido a problemas de expresión, al alto costo de los donadores de azúcares requeridos y el efecto inhibitorio de los nucleótidos fosfato liberados (Shaikh y Withers, 2008; Seibel *et al.*, 2006).

3.3.2.2 Glicosiltransferasas No-Leloir

A diferencia de las GT-Leloir, las glicosiltransferasas no-Leloir (GT-NL), son aquellas enzimas que no utilizan azúcares nucleotídicos como donadores, los cuales son muy costosos, y esta es una de las razones por las que las GT-NL tienen un gran potencial biotecnológico (Weijers *et al.*, 2009).

Entre la GT-NL podemos encontrar en un primer grupo a las fosforilasas (Weijers *et al.*, 2009; Plou *et al.*, 2007). Las fosforilasas (EC 2.4.1.X) catalizan la transferencia de un residuo glicosilo a partir de sacáridos hacia fosfato. Los sacáridos donadores pueden ser glicógeno, maltosa, sacarosa y celobiosa, generando azúcar fosfato como producto (Kino *et al.*, 2008; Goedl *et al.*, 2008b). De acuerdo con propiedades estructurales y mecánicas, las fosforilasas que invierten la configuración anomérica se han clasificado en un grupo principal que pertenece a la familia de las glicósido hidrolasas y otro pequeño grupo, perteneciente a las glicosiltransferasas (Goedl *et al.*, 2008b).

La reacción de fosforólisis es reversible, por lo que pueden emplearse en síntesis utilizando azúcares fosfato como sustrato donador y un aceptor apropiado (Kino *et al.*, 2008). Otra vía es la que se utiliza con la sacarosa fosforilasa, por ejemplo, la cual lleva a cabo un mecanismo de doble inversión (con retención de la configuración) (Goedl *et al.*, 2008b) y en ausencia de fosfato como aceptor, puede transferir el residuo de glucosa hacia otros aceptores (Goedl *et al.*, 2008b).

Hay pocas fosforilasas reportadas y son muy específicas por su sustrato donador, pero son mucho menos específicas hacia los sustratos aceptores (Weijers *et al.*, 2009), lo que puede resultar una ventaja en reacciones de síntesis de glicósidos.

Otro grupo de GT-NL lo conforman las denominadas ciclodextrin glicosiltransferasas (EC 2.4.1.19) (CGTasas). La actividad natural de estas enzimas es romper los enlaces α 1-4 del almidón o dextrinas y unir el extremo reductor con el no-reductor, dando lugar a la formación de oligoglucósidos cíclicos con enlaces α 1-4 de seis, siete u ocho residuos (α , β o γ ciclodextrinas) (Weijers *et al.*, 2009)). Debido a que las CGTasas comparten homología estructural, maquinaria catalítica y estrategias mecánicas con diversas glicosidasas éstas se clasifican dentro de la familia 13 de las glicosil hidrolasas (GH 13) (Lairson y Withers, 2004).

Las CGTasas se han utilizado en síntesis de glicósidos gracias a que pueden realizar la transferencia de un residuo glicosilo mediante transglicosilación, a partir de almidón hacia un aceptor adecuado (Torres *et al.*, 2011).

Un tercer grupo dentro de las GT-NL lo conforman las enzimas que utilizan a la sacarosa como donador del residuo glicosilo para la formación de oligosacáridos y polisacáridos (Weijers *et al.*, 2009; Seibel *et al.*, 2006). Algunos autores utilizan el término glicosiltransferasas No-Leloir para referirse específicamente a las enzimas que utilizan sacarosa como sustrato donador del residuo glicosilo (Seibel *et al.*, 2006); sin embargo, este término puede causar confusión dado que también las fosforilasas y CGTasas son glicosiltransferasas No-Leloir. Otros se refieren a ellas como transglicosidasas (Plou *et al.*, 2007) o glicansacararas (Plou *et al.*, 2002; Monsan *et al.*, 2001). Aunque es muy común referirse a estas enzimas simplemente como glicosiltransferasas, en este trabajo se les denominará glicansacararas (Gli-S) para indicar el uso de sacarosa como sustrato.

La diferencia principal de las Gli-S con las glicosiltransferasas Leloir y las fosforilasas, es que estas enzimas tienen también actividad hidrolítica, debido a que pueden transferir el residuo glicosilo a una molécula de agua que actúa como aceptor (Plou *et al.*, 2007).

Dado que estas enzimas utilizan sacarosa como sustrato, están limitadas a transferir sólo glucosa y fructosa, pero la sacarosa ofrece la ventaja de una alta energía del enlace glicosídico (-29 kJ/mol), similar a la de los azúcares nucleotídicos (Seibel *et al.*, 2006; Bülter y Elling, 1999; Henry y Darbyshire, 1980). Además, la sacarosa se obtiene en grandes cantidades en estado puro a partir de la caña de azúcar y remolacha azucarera (Robyt, 2008; Eggleston, 2008). Gracias a esta alta disponibilidad, el uso de la sacarosa como sustrato donador representa un menor costo que el de los azúcares nucleotídicos. Esta es una de las razones por las que, en años recientes, el estudio de las Gli-S como una alternativa para la glicosilación de diversos aceptores ha ganado gran interés para aplicaciones biotecnológicas.

3.3.2.3 Particularidades de las glicansacararas (Gli-S)

Las glicansacararas pueden encontrarse en plantas, en hongos de especies tales como *Penicillium* y *Aspergillus* o en bacterias de especies como *Streptococcus*, *Bacillus* y *Leuconostoc* (Ritsema y Smeekens, 2003) (www.brenda-enzymes.org). Las glicansacararas bacterianas son de particular interés gracias a su mayor disponibilidad, considerando la facilidad y rapidez con que se cultivan este tipo de microorganismos.

Las Gli-S poseen un mecanismo de reacción equivalente al de las glicosidasas que retienen la configuración del carbono anomérico (Figura 5b). Y de hecho, aunque las Gli-S están clasificadas como transferasas (EC 2.4.1.X), de acuerdo con la clasificación de Henrissat las glicansacararas son ubicadas en la familia de las glicosil hidrolasas (familia GH), clasificación que se basa en el análisis comparativo de la secuencia de aminoácidos y el mecanismo de reacción de más de 2500 enzimas (Plou *et al.*, 2007).

Las Gli-S bacterianas se dividen en dos grupos dependiendo del residuo glicosilo que transfieren a partir de la sacarosa, siendo glucosiltransferasas (GTFs) las que transfieren el residuo de glucosa y fructosiltransferasas (FTFs) las que transfieren fructosa. En ambos casos, las enzimas catalizan tres tipos de reacciones con la sacarosa: 1) polimerización, por la transferencia del residuo glicosilo (glucosa o fructosa) a una cadena de polímero en crecimiento (glucano o fructano); 2) hidrólisis, en donde el aceptor del residuo glicosilo es una molécula de agua; y 3) reacciones de aceptor, por la transferencia del glicosilo a otro compuesto agregado al medio de reacción. En la figura 7 se muestran esquemáticamente estos tres tipos de reacciones.

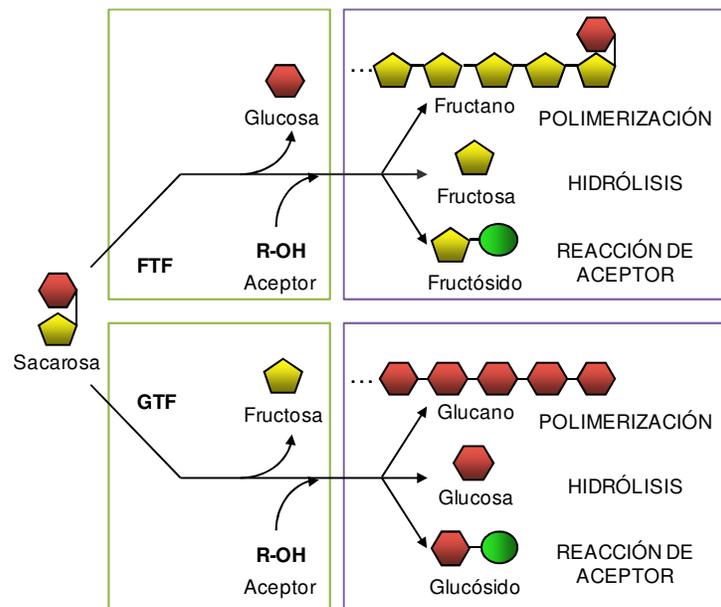


Figura 7. Esquema de las reacciones catalizadas por glucosiltransferasas y fructosiltransferasas.

Además, las FTFs y GTFs se pueden clasificar de acuerdo con el tipo de enlace que generan en el polímero sintetizado (Tabla 2).

Tabla 2. Tipos de glicansacarasa bacterianas de acuerdo con la estructura química del polímero, producto principal de la reacción.

Glicosiltransferasas	E.C.	Enlace	Microorganismo productor (géneros)	Referencia
Fructosiltransferasas				
Inulosacarasa	2.4.1.9	β (2-1), con ramificaciones en β (2-6)	<i>Streptococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Leuconostoc</i>	(Ortiz-Soto <i>et al.</i> , 2004; van Hijum <i>et al.</i> , 2003; Monsan <i>et al.</i> , 2001)
Levansacarasa	2.4.1.10	β -(2-6)	<i>Bacillus</i> , <i>Acetobacter</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Zymomonas</i> , <i>Lactobacillus</i>	(Olvera <i>et al.</i> , 2007; Ozimek <i>et al.</i> , 2006b; Canedo <i>et al.</i> , 1999; Hernández <i>et al.</i> , 1999; Hettwer <i>et al.</i> , 1995; Lyness y Doelle, 1983)
Glucosiltransferasas				
Dextransacarasa	2.4.1.5	α (1-6), con ramificaciones en α (1-2) y α (1-3)	<i>Leuconostoc</i> , <i>Streptococcus</i> ,	(Olivares-Illana <i>et al.</i> , 2003; Monsan <i>et al.</i> , 2001; Meulenbeld y Hartmans, 2000)
Mutansacarasa	2.4.1.5	α (1-3), con ramificaciones en α (1-6)	<i>Streptococcus</i>	(Plou <i>et al.</i> , 2002; Mukasa <i>et al.</i> , 2000)
Amilosacarasa	2.4.1.4	α (1-4)	<i>Neisseria</i> , <i>Deinococcus</i>	(Jung <i>et al.</i> , 2009; Jensen <i>et al.</i> , 2004; de Montalk <i>et al.</i> , 2000)
Alternansacarasa	2.4.1.140	Enlaces alternados α (1-3) y α (1-6), ramificaciones en α (1-3)	<i>Leuconostoc</i>	(Cote <i>et al.</i> , 2005; Richard <i>et al.</i> , 2003)

Es importante señalar que buena parte del potencial tecnológico de las Gli-S radica en el aprovechamiento de su capacidad para llevar a cabo reacciones de aceptor. En efecto, su capacidad para transferir residuos glicosilo a un amplio espectro de compuestos de importancia industrial ha generado un significativo número de estudios enfocados al aprovechamiento de las Gli-S en reacciones de síntesis de glicósidos.

3.4 Aplicaciones específicas de enzimas en síntesis de glicósidos

A la fecha se han sumado numerosos desarrollos en cuanto a métodos enzimáticos de glicosilación. Las enzimas más estudiadas han sido las glicosidasas, gracias a la alta disponibilidad de las mismas y el bajo costo del sustrato donador de glicosilo (sección 3.3.1). Algunos desarrollos incluyen glicosilaciones de compuestos diferentes a azúcares como alcoholes alifáticos y bencílicos (Dudíková *et al.*, 2007; Bridiau *et al.*, 2006; van Rantwijk *et al.*, 1999).

Un grupo de compuestos para el que existe menor número de reportes de métodos de glicosilación, son los compuestos fenólicos. Estas moléculas representan una oportunidad de nuevos desarrollos, particularmente por sus propiedades antioxidantes. Razón por la cual, el presente proyecto estuvo enfocado al estudio de los mismos.

3.4.1 Los compuestos fenólicos, generalidades.

Los fenoles o alcoholes aromáticos, son compuestos con uno o más grupos hidroxilo unidos directamente al carbono de un anillo de benceno, siendo el fenol el más simple de ellos (figura 8a).

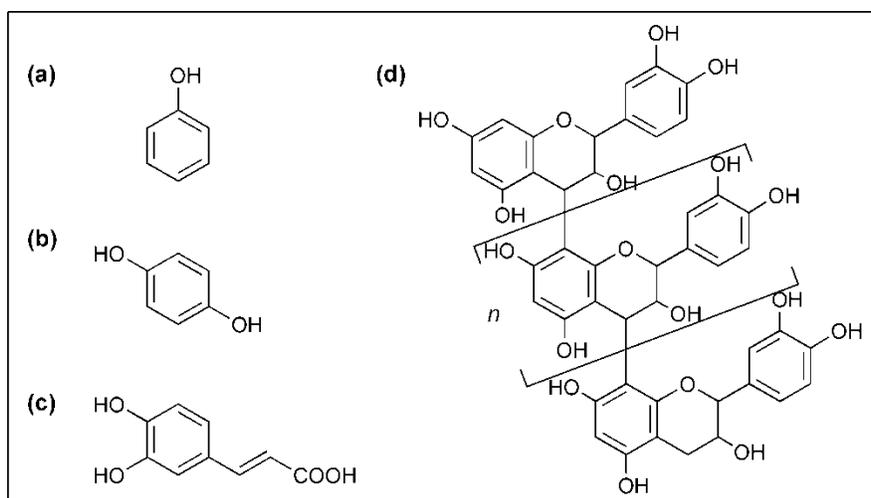


Figura 8. Compuestos fenólicos. (a) Fenol, (b) hidroquinona, (c) ácido caféico y (d) tanino.

Una diferencia importante de los alcoholes aromáticos o fenoles respecto a los alcoholes alifáticos radica en la mayor acidez del protón del grupo hidroxilo fenólico; es decir, el hidroxilo puede perder su protón con mucha mayor facilidad que un alcohol alifático. Esto ocurre gracias a que el

grupo hidroxilo es un electrodonador y puede ceder electrones hacia el interior del anillo bencénico, generando estructuras resonantes (Figura 9).

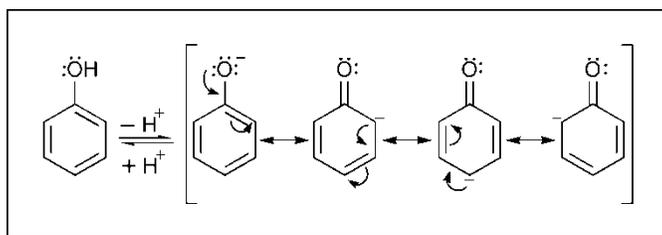


Figura 9. Estructuras resonantes en el fenol.

Debido a la deslocalización de la carga, los fenoles tienen la propiedad de estabilizar radicales libres, impidiendo que se desaten reacciones en cadena. Esto es relevante si tomamos en cuenta que los seres vivos estamos expuestos a la formación de radicales libres por los procesos oxidativos propios de la respiración aerobia y por la exposición a la radiación UV-B, lo cual puede ocasionar daño al ADN, ARN, y proteínas. En este sentido, los compuestos fenólicos pueden proteger del daño celular gracias a sus propiedades antioxidantes, evitando la propagación de los radicales libres. Es por ello que han recibido una atención considerable en cuanto a la participación que pueden tener en la mejoría o prevención de enfermedades crónicas, como cáncer y aterosclerosis (Haslam, 2002). No obstante, una limitante en el aprovechamiento de su actividad antioxidante en productos de consumo humano, es su baja solubilidad en agua y su inestabilidad (Shin *et al.*, 2009), por lo cual resulta indispensable el desarrollo de estrategias dirigidas a mejorar dichas propiedades.

Los fenoles forman parte de un grupo importante de metabolitos secundarios de plantas, las cuales los sintetizan como una adaptación a condiciones de estrés, como daño mecánico, infecciones, condiciones de luz, etc. (Materska y Perucka, 2005). Sus estructuras químicas son muy diversas y pueden ir desde fenoles simples como la hidroquinona, hasta los polifenoles más complejos, tales como los taninos (Figura 8) (Haslam, 2002).

Dicha diversidad también se origina en las modificaciones que pueden presentar, incluyendo conjugaciones usualmente como ésteres y glicósidos (Haslam, 2002). De hecho, los grupos OH fenólicos generalmente son buenos blancos para la glicosilación biológica y muchos de los compuestos fenólicos naturales prácticamente sólo se encuentran en su forma glicosilada (Kren, 2008).

Muchos glicósidos de fenoles naturales poseen importantes actividades biológicas, tales como anticáncer, antiinflamatoria, citostática, citotóxica, antimetabólica, neurotóxica, antiplaquetaria, antibacteriana, antifúngica o agregacional, así como actividad antioxidante, antiradical o cardioprotectora (Dembitsky, 2005a; Dembitsky, 2005b; Kren y Martínková, 2001; Thorson *et al.*, 2001). Por esta razón, existe actualmente un gran interés por la síntesis de glicósidos de fenoles, y no sólo de los glicósidos naturales, sino de nuevos derivados que pudieran tener mayor solubilidad en agua y mayor estabilidad o incluso, un incremento en la actividad biológica con respecto al producto natural.

Por ejemplo, la β -arbutina es un β -glucósido de hidroquinona que posee actividad inhibitoria de tirosinasa, la enzima que desencadena el oscurecimiento de la piel. Gracias a esta propiedad, la β -arbutina se utiliza en productos cosméticos. Pero se ha demostrado que sus análogos β -fructósidos poseen también esta actividad; más aún, un cambio en la orientación del enlace para formar un α -glucósido resulta ser más potente que el producto natural (Wu *et al.*, 2006; Sugimoto *et al.*, 2005; Funayama *et al.*, 1995). De esta manera, se ha demostrado que los glicósidos de compuestos fenólicos tienen un gran potencial en el desarrollo de productos de interés en la industria cosmética o farmacéutica y, además, la generación de diversidad puede abrir nuevas posibilidades en el desarrollo de productos con mejores propiedades.

3.4.2 Avances biotecnológicos en glicosilación enzimática de fenoles

La naturaleza sintetiza los glicósidos de fenoles de manera muy eficiente utilizando GT-Leloir, dependientes de azúcares nucleotídicos. Sin embargo, para procesos biotecnológicos se requiere de estrategias sustentables, utilizando sustratos y enzimas de menor costo, requisitos que aún no pueden cubrirse utilizando enzimas GT-Leloir. En cambio, muchos estudios se han dirigido a mejorar los sistemas catalizados por glicosidasas que utilizan sustratos más baratos como oligosacáridos o almidón, sistemas que son económicamente más viables.

Pese a esto, los métodos reportados para la glicosilación de fenoles utilizando glicosidasas son pocos, comparados con los numerosos reportes de glicosilación de alcoholes alifáticos. Entre los escasos ejemplos de glicosilación de compuestos fenólicos utilizando glicosidasas podemos mencionar la síntesis de glucósido de hidroquinona usando una α -glucosidasa de levadura y maltosa como donador (por transglicosilación), alcanzando un rendimiento 4.6 % respecto al aceptor, equivalente a una producción de tan sólo 2.3 mM de glucósido (Prodanovic *et al.*, 2005).

Otro ejemplo es la glicosilación de guayacol y curcumina usando amiloglucosidasa de *Rhizopus* sp. en presencia de disolvente orgánico, logrando un 52 % de rendimiento respecto a glucosa, equivalente a 2.86 mM de glucósido (Vijayakumar y Divakar, 2005). Claramente, la productividad de estas enzimas en la síntesis de glicósidos de fenoles es muy baja (van Rantwijk *et al.*, 1999).

En muchos casos, la limitante para la glicosilación de fenoles se debe a que la mayoría de glicosidasas presenta baja reactividad hacia este tipo de sustratos.

A este respecto, De Roode *et al.* (2000) realizaron un estudio mediante cálculos cuánticos para explicar la baja reactividad de ciertas β -glucosidasas por los fenoles, y correlacionaron la capacidad de las glicosidasas para glicosilar grupos $-OH$ con el valor de nucleofilia del aceptor, el cual se da en el orden siguiente: alcohol primario > alcohol secundario > fenoles. Por lo tanto, según los autores, la dificultad para glicosilar fenoles con glucosidasas se debe a la baja nucleofilia de estos aceptores.

Bajo este panorama, es evidente la necesidad de buscar nuevas alternativas enzimáticas altamente disponibles, que conserven las bondades de las glicosidasas (tales como alta disponibilidad y sustratos de bajo costo) pero que tengan mayor afinidad por los sustratos fenólicos. Dicha alternativa podrían ser las Gli-S, enzimas que en años recientes se han reportado en reacciones de transferencia a sustratos fenólicos con la ventaja de utilizar sacarosa como sustrato donador.

3.4.2.1 Glicosilación de fenoles con GTFs y FTFs

Los primeros estudios sobre las reacciones de aceptor utilizando Gli-S se realizaron utilizando otros azúcares como xilosa, maltosa o lactosa como aceptores, pero la gama de sustratos ha ido incrementando conforme aumenta el conocimiento sobre estas enzimas. A la fecha, existen varios reportes sobre la glicosilación de fenoles y polifenoles con GTFs y FTFs (Tabla 3). Flavonoides como la quercetina o la catequina han sido utilizados como aceptores en reacciones catalizadas por GTFs, en algunos casos con muy altos rendimientos (hasta 90 %) (Bertrand *et al.*, 2006; Meulenbeld *et al.*, 1999; Nakahara *et al.*, 1995); no obstante, con una muy baja producción de fructósido (máximo 9 mM), como consecuencia de la baja solubilidad de los sustratos en el medio de reacción.

Tabla 3. Métodos reportados para la glicosilación de fenoles utilizando glicansacararas.

Enzima	Origen	Sustrato aceptor	Rendimiento % ^a (producto mM)	Referencia
Glucansacarasa	<i>L. mesenteroides</i> NRRL B512F o <i>L.</i> <i>mesenteroides</i> NRRL B-23192	Luteolina, Quercetina y Miricetina	Hasta 49 % (4.4 mM)	(Bertrand <i>et al.</i> , 2006)
Glucansacarasa	<i>L. mesenteroides</i> B- 1299CB	Galato de epigalocatequina	NR	(Moon <i>et al.</i> , 2006)
Glucosiltransferasa	<i>S. sobrinus</i> 6715	Catequina	13.7 % (0.47 mM)	(Nakahara <i>et al.</i> , 1995)
Glucosiltransferasa	Mezcla de 4 GTFs recombinantes de <i>S.</i> <i>sobrinus</i> y <i>S. mutans</i>	Catequina	90 % (9 mM)	(Meulenbeld <i>et al.</i> , 1999)
Glucosiltransferasa	<i>S. mutans</i> GS-5	Dihidroxifenoles: Catecol	65 % (26 mM)	(Meulenbeld y Hartmans, 2000)
		4-metilcatecol	50 % (20 mM)	
		3-metoxicatecol	75 % (30 mM)	
Levansacarasa	<i>L. mesenteroides</i>	Hidroquinona	1.14 % (4 mM)	(Kang <i>et al.</i> , 2009)
Glucansacararas	Varias cepas de <i>L.</i> <i>mesenteroides</i>	L-DOPA	NR	(Yoon <i>et al.</i> , 2010)

NR, no reportado. ^a Rendimiento respecto a la concentración inicial de aceptor.

Por otro lado, se han reportado reacciones de glicosilación más eficientes utilizando fenoles más simples como aceptores. Este es el caso de la reacción de glicosilación de catecol (1,2-dihidroxibenceno), y algunos derivados del mismo catalizada por la glucosiltransferasa-D (GTF-D) de *S. mutans*. Los autores reportaron rendimientos máximos del 65 al 75 %, que corresponden a una producción de 26 a 30 mM de glicósido (Meulenbeld y Hartmans, 2000). Asimismo, los autores encontraron que mayores concentraciones de aceptor conducían a la inactivación de la enzima. Por lo tanto, la producción de glicósidos estuvo limitada por la incompatibilidad de la enzima con los sustratos fenólicos.

En términos de selectividad, ninguno de los compuestos monohidroxi-aromáticos, como el fenol, ni con otros dihidroxi-aromáticos, como el resorcinol (1,3-dihidroxi benceno) fueron aceptores para la enzima; de manera que los autores argumentaron que esta enzima requiere a los grupos hidroxilo adyacentes (como en el catecol) para llevar a cabo la reacción. Esto coincide con otros reportes de glicosilación de flavonoides usando GTFs, donde se ha visto una preferencia por la glicosilación en hidroxilos con esta característica (Bertrand *et al.*, 2006; Nakahara *et al.*, 1995).

Como puede notarse, la mayor parte de los trabajos se ha realizado con GTFs. No obstante, la actividad de las FTFs en reacciones de aceptor con fenoles también ha sido demostrada. Tal es el caso de la fructosilación de hidroquinona utilizando una levansacarasa de *L. mesenteroides*; aunque con una producción de tan sólo 4 mM de producto (1.14 % de rendimiento) (Kang *et al.*, 2009). Es importante mencionar que, a diferencia de los trabajos de Meulenbeld *et al.* (2000) (Meulenbeld y Hartmans, 2000), la fructosilación de hidroquinona se llevó a cabo en una alta concentración de aceptor (350 mM), lo cual indica una alta compatibilidad de esta levansacarasa con el sustrato fenólico. De manera que la baja cantidad de producto pudo deberse a una muy baja especificidad de la enzima para transferir a este aceptor.

De lo anterior podemos concluir que es importante la búsqueda de nuevos sistemas enzimáticos que cubran dos principales requisitos: en primer lugar, que tengan afinidad por la fructosilación de aceptores fenólicos y, en segundo lugar, que sean estables en presencia de alta concentración de los mismos, de manera que la producción no esté limitada por la baja disponibilidad del aceptor.

A este respecto, se ha reportado que la levansacarasa de *Bacillus subtilis* (BS-LVS) es una enzima muy robusta, dada su alta estabilidad, la simplicidad para producirla, así como su actividad en presencia de disolventes orgánicos (Castillo y Lopez-Munguía, 2004). Esta última característica implica una buena compatibilidad de BS-LVS con sistemas orgánicos, haciéndola una buena candidata para el estudio de reacciones de aceptor con compuestos hidrofóbicos. Además, tratándose de una fructosiltransferasa, el uso de esta enzima puede permitir el desarrollo de compuestos novedosos y funcionales, creando mayor variabilidad de glicósidos con potencial aplicación en los mercados de fármacos o cosméticos. Así, el presente proyecto se orientó a la búsqueda de un método enzimático de glicosilación de fenoles basado en el uso de fructosiltransferasas.

3.4.3 Fructosiltransferasas

Las fructosiltransferasas pueden encontrarse en una gran variedad de organismos, incluyendo plantas, bacterias y hongos. En las plantas la presencia de las FTFs se da como una necesidad de generar las fructanas y oligofructósidos que la planta utiliza como almacenamiento, de manera análoga a lo que otras plantas realizan con el almidón y la sacarosa. En plantas, estas fructanas pueden tener una longitud de entre diez y unos cuantos cientos de unidades de fructosa, mientras que las fructanas sintetizadas por FTFs bacterianas son mucho más grandes, llegando a exceder los cientos de miles de unidades de fructosa (Ritsema y Smeekens, 2003). Una diferencia entre las fructosiltransferasas de plantas con las bacterianas, es que para la síntesis de fructanas éstas requieren la acción concertada de varias enzimas. Por el contrario, la síntesis de los polímeros de fructosa en bacterias se lleva a cabo mediante la acción de una sola enzima (Ritsema y Smeekens, 2003).

De acuerdo con la base de datos “*Carbohydrate-active enzymes*” (CAZY, <http://www.cazy.org/>) (Cantarel *et al.*, 2009) las fructosiltransferasas bacterianas se agrupan en la familia 68 de las glicosil hidrolasas (GH 68) familia a la que pertenecen las invertasas y que hidrolizan naturalmente enlaces de fructosa (Ozimek *et al.*, 2004; Meng y Fütterer, 2003).

Las fructosiltransferasas (FTFs) se clasifican en dos tipos con base en el enlace formado entre las unidades de fructosa: 1) la inulosacarasa (EC 2.4.1.9) forma un polímero llamado inulina que posee enlaces β -(2-1) con ramificaciones en β -(2-6). 2) La levansacarasa (EC 2.4.1.10) sintetiza el polímero levana con enlaces β -(2-6) y ramificaciones en β -(2-1) (van Hijum *et al.*, 2003) (Tabla 2 y Figura 10).

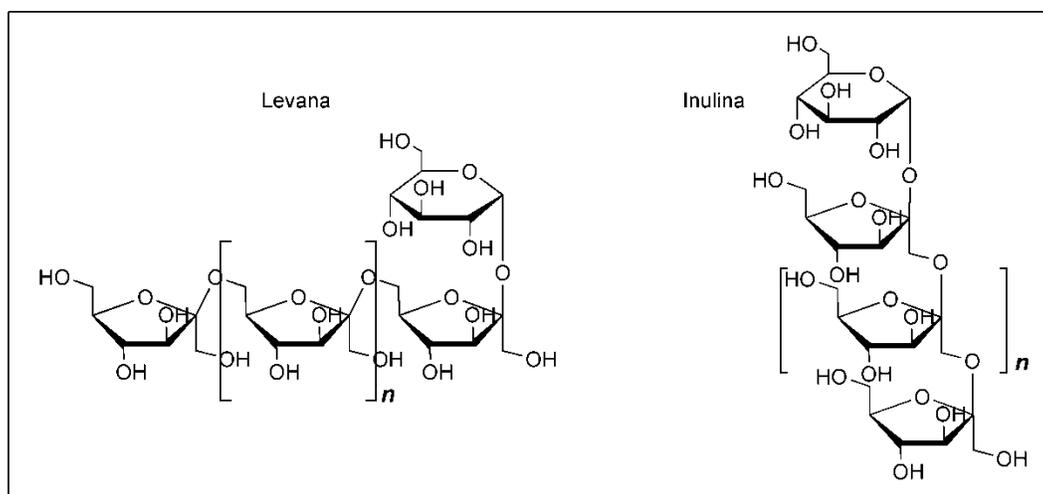


Figura 10. Estructura de la cadena principal de los polímeros de fructosa sintetizados por las fructosiltransferasas bacterianas.

Además de la sacarosa, las FTFs pueden utilizar rafinosa como donador de fructosilo, pero no se ha reportado ningún otro sustrato donador. En cambio son capaces de utilizar una serie de sacáridos como aceptores, por ejemplo maltosa, maltotriosa, rafinosa, arabinosa, xilosa y sacarosa en las reacciones de transglucosilación (Ozimek *et al.*, 2006b).

Una de las fructosiltransferasas que resulta particularmente interesante es la levansacarasa de *B. subtilis* (BS-LVS), por su alta estabilidad y actividad en presencia de disolventes orgánicos, medio en el cual se favorece la reacción de transferencia (polimerización) sobre la de hidrólisis de la sacarosa (Castillo y Lopez-Munguía, 2004). Esto le da mayor versatilidad a la enzima debido a la posibilidad de emplearla en medios de reacción no convencionales en caso de que el sistema así lo requiera, por ejemplo, para aumentar la solubilidad de aceptores hidrofóbicos con el fin de obtener sus correspondientes derivados glicosilados o utilizar altas concentraciones de sustratos hidrofóbicos.

En un trabajo previo, se encontró que compuestos aromáticos dihidroxilados tales como el catecol, el resorcinol y la hidroquinona (*orto*, *meta* y *para*-dihidroxibenceno respectivamente) actúan como aceptores de fructosa cuando se emplea la BS-LVS y, de manera cualitativa, se observaba un producto de reacción incluso en altas concentraciones de aceptores (Mena, 2007) lo cual habla de la alta estabilidad de la fructosiltransferasa en presencia de este tipo de sustratos.

3.4.3.1 Mecanismo de reacción de BS-LVS

En 2003 se elucidó la estructura tridimensional de la levansacarasa de *B. subtilis* con la molécula de sacarosa unida al sitio activo (Meng y Fütterer, 2003). De los datos cristalográficos y mutaciones puntuales se pudo concluir que los residuos Asp86 y Glu342 están en la posición adecuada para actuar como el nucleófilo y el ácido/base general, respectivamente. Además se identificó al residuo Asp247 como un estabilizador del estado de transición, con base en la observación de que forma enlaces de hidrógeno fuertes con los hidroxilos de C3 y C4 en el residuo fructosilo, pero está muy alejado como para estar involucrado directamente en la catálisis.

De acuerdo con el mecanismo de reacción ácido/base propuesto para la BS-LVS (Meng y Fütterer, 2003; Chambert *et al.*, 1974) en una primera etapa el residuo Glu342 cede un protón al oxígeno del residuo de la glucosa saliente, mientras que el residuo Asp86 forma un intermediario fructosil-enzima en el carbono C2 de la fructosa. En una segunda etapa el Glu342 desprotonado actúa como una base para desprotonar (activar) a la molécula aceptora, permitiendo que ésta ataque al C2 de la fructosa y genere el nuevo enlace glicosídico (Figura 11).

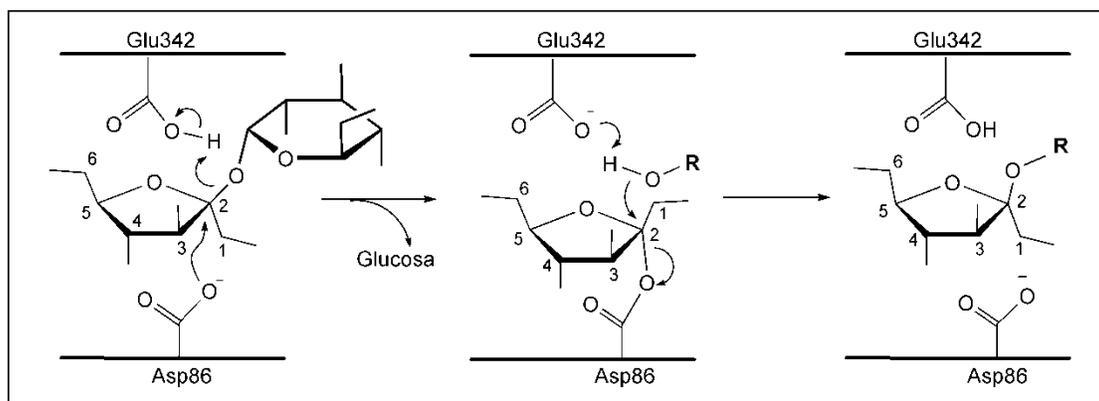


Figura 11. Mecanismo de reacción propuesto para la BS-LVS (Chambert *et al.*, 1974). Donde el aceptor R-OH puede ser sacarosa (o fructana), agua u otra molécula añadida al sistema. Se muestra la numeración de los átomos del residuo fructosilo y los residuos catalíticos. Se omitieron los hidroxilos de los azúcares para mayor claridad.

A la fecha se ha reportado la estructura cristalográfica de dos levansacarosas nativas, la de *B. subtilis* (SacB) y una de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (LsdA) (Ozimek *et al.*, 2006a), en las cuales se observó un plegamiento tipo β -propela de cinco hojas con una cavidad central profunda en forma de embudo, cargada negativamente, que se abre hacia la superficie. Este plegamiento es el mismo que se ha encontrado en otras enzimas como la invertasa de *Thermotoga maritima*, la fructan 1-exohidrolasa de *Cichorium intybus* y la exoinulinasa de *Aspergillus awamori* (Ozimek *et*

al., 2006a; Verhaest *et al.*, 2005; Alberto *et al.*, 2004; Nagem *et al.*, 2004). El gran número de cargas en la cavidad del sitio activo permiten una interacción favorable con el polímero en crecimiento. En contraparte, es de esperarse que no exista una interacción fuerte con aceptores hidrofóbicos, lo cual deberá considerarse al momento de evaluar reacciones de aceptor con este tipo de sustratos. Por lo tanto, no debe perderse de vista que el éxito de la reacción dependerá de diversos factores, incluyendo la propia selectividad de la enzima por los aceptores.

El presente proyecto tuvo como objetivo el estudio de fructosiltransferasas bacterianas en la fructosilación de fenoles, tomando como principal modelo de estudio la levansacarasa de *B. subtilis* BS-LVS. Asimismo, se buscó estudiar la selectividad de la enzima por diferentes aceptores, con el fin de elucidar la influencia de las características químicas de los mismos en el éxito de la reacción.

3.5 Reactores enzimáticos

Uno de los principales objetivos en una síntesis enzimática es que el proceso sea eficiente. Para ello, es primordial la optimización de los parámetros tales como concentración de sustratos, concentración de enzima o la configuración del reactor.

A este respecto, se pueden considerar tres principales configuraciones de reactores: lote, lote alimentado y continuo.

En una reacción en lote la operación es discontinua. El reactor se llena con el medio de reacción con los sustratos, se ajustan las condiciones de operación; entonces se añade la enzima y se deja transcurrir la reacción hasta que se alcance la conversión deseada. La manera tradicional de utilizar las enzimas es disueltas en el medio de reacción (cuando es acuoso). Después, la enzima soluble se inactiva y se recupera el medio de reacción con el producto de interés para continuar con los procesos de purificación que apliquen (Illanes y Altamirano, 2008).

En muchos casos se utiliza la enzima inmovilizada con el fin de mejorar su estabilidad y para poder recuperarla al final de la reacción y reutilizarla. En estos casos se vuelve factible un proceso continuo.

En una operación en continuo, puede utilizarse un reactor de lecho empacado, en el cual se inmoviliza la enzima. En este caso el medio de reacción es alimentado con un flujo constante al reactor. El reactor puede alcanzar un estado estacionario después de tres a cinco tiempos de

residencia, por lo tanto, se puede considerar que la mayor parte del tiempo el sistema opera en estado estacionario, siempre y cuando no exista inactivación de la enzima (Illanes y Altamirano, 2008).

Una desventaja de la operación en continuo es la propia inmovilización de la enzima, lo cual requiere una optimización de las condiciones de inmovilización e implica mayor tiempo para el desarrollo del biocatalizador; asimismo, el soporte inerte para la inmovilización incrementa el costo inicial de producción del biocatalizador.

Otra alternativa para aumentar el aprovechamiento de la enzima, sin necesidad de inmovilizarla, es lograr que exista mayor formación de producto por cada unidad de enzima. En una reacción en lote, la cantidad de producto estará limitada por la concentración de sustrato inicial, en donde al final de la conversión de sustrato se habrá llegado al término de la vida útil de la enzima. Con base en esto, en la situación ideal podría incrementarse la concentración de sustratos para aumentar el producto utilizando la misma cantidad de enzima. No obstante, en ocasiones esto no es posible, ya sea porque el sustrato es poco soluble en el medio de reacción o porque causa toxicidad o inhibición de la enzima u otro problema que limita la reacción (Kim *et al.*, 2007) y es en estos casos que resulta útil un sistema de alimentación del sustrato.

Una de las ventajas de una reacción en lote alimentado es que la posibilidad de adicionar los sustratos durante una reacción, permite mantener dichos sustratos en altos niveles consiguiendo así velocidades altas de reacción por un periodo de tiempo mayor (Fernandes y Rodrigues, 2007).

4 HIPÓTESIS

Las fructosiltransferasas bacterianas compatibles con altas concentraciones de solventes orgánicos podrían ser una herramienta útil para la síntesis de glicósidos de moléculas hidrofóbicas, en particular de fenoles. Asimismo la eficiencia de la reacción de aceptor con fructosiltransferasas, particularmente la BS-LVS, está influenciada por la nucleofilia y/o propiedades fisicoquímicas de los aceptores, así como por la naturaleza y el origen de la FTF.

5 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un método enzimático eficiente que permita la síntesis de fructósidos de fenoles con potencial interés industrial, empleando fructosiltransferasas bacterianas. Y determinar la influencia de la estructura química de diferentes sustratos así como de las características propias de las enzimas FTFs bacterianas en las reacciones de aceptor.

5.1 Objetivos específicos

- Evaluar diferentes enzimas de la familia de las FTFs bacterianas en reacciones de aceptor con sustratos modelo.
- Evaluar un conjunto de sustratos hidroxilados en las reacciones de aceptor con la enzima BS-LVS y determinar la manera en que se ve influenciada esta reacción por la estructura química de cada sustrato.
- Optimizar la reacción de aceptor de un sustrato modelo con la BS-LVS para posteriormente evaluar mutantes de la enzima en la reacción de aceptor con dicho sustrato.
- Extender la metodología aquí desarrollada a la fructosilación de otro tipo de sustratos como aminoácidos o tioles.

6 METODOLOGÍA

6.1 Materiales

Los reactivos hidroquinona, alcohol bencílico, alcohol 4-hidroxibencílico, 4-metoxifenol, sacarosa, fructosa, glucosa, arbutina y derivados y polietilenglicol 5000, así como la enzima β -D-fructofuranosidasa (EC 3.2.1.26) de *Saccharomyces cerevisiae* (Inv), se obtuvieron de Sigma-Aldrich Inc. (MO, USA). El fenol se obtuvo de Merck (Edo. de México, México). Los compuestos catecol y resorcinol se adquirieron de Fluka (Buchs, Suiza). Los disolventes butanol, 2-metil-2-propanol, éter diisopropílico y metil *tert*-butil éter se adquirieron de J.T. Baker (Edo. de México, México). Todas las sustancias fueron de alta pureza (≥ 98 %). Los disolventes acetonitrilo y acetona fueron de grado HPLC y se obtuvieron de Burdick & Jackson (MI, USA). La sílica gel 0.04-0.063 mm se adquirió de Macherey-Nagel (Düren, Alemania); los soportes Sephadex™ G10 y Lipophylic Sephadex™ LH20 se adquirieron de Sigma-Aldrich, Inc. (MO, USA).

6.2 Producción de Enzimas

La levansacarasa (E.C. 2.4.1.10) de *Bacillus subtilis* (BS-LVS) se produjo por fermentación a partir de una cepa derivada de *Bacillus subtilis* Marburg 168 como se ha reportado previamente (Castillo y Lopez-Munguía, 2004). Esta cepa está diseñada con el fenotipo Δnpr , $\Delta aprE$, *degU32* (Hy), resistente a cloramfenicol (Cm^R) como marcador de selección, siendo capaz de sobreexpresar el gen *sacB*, que codifica para BS-LVS. Esto se debe a que la mutación *degU32* (Hy) induce efectos pleiotrópicos en *B. subtilis* entre los cuales se encuentran: 1) la sobreproducción de la proteasa alcalina y otras enzimas tales como la levansacarasa, la proteasa neutra, la β -glucanasa y la serin-proteasa intracelular; 2) defectos en la síntesis de flagelo y del desarrollo de competencia; y 3) alteraciones en la represión catabólica normal de la esporulación por glucosa (Martínez, 1997). Asimismo, para reprimir la producción de las proteasas, se eliminaron los genes *aprE* y *npr* que codifican para la proteasa alcalina y la proteasa neutra, respectivamente.

La enzima BS-LVS se produjo por fermentación en matraz fernbach de 2.8 L con 950 mL de medio de fermentación, según la composición que se especifica en la tabla 4. Después de la fermentación, las células se separaron por centrifugación (8600 x *g*, 10 min) a 4°C. La enzima extracelular se precipitó usando polietilenglicol 5000 (PEG 5000) al 25 % (p/v) y se separó por centrifugación (22100 x *g*, 25 min). El precipitado se recuperó en solución amortiguadora de fosfatos 50 mM, pH 6.0 y se almacenó en alícuotas a -20 °C para su uso posterior.

Tabla 4. Composición del medio de cultivo para *B. subtilis* y *L. citreum*

Componente	Concentración (g/L)
Sacarosa	20
Extracto de levadura	20
K ₂ HPO ₄	20
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0.2
MnSO ₄ · 7 H ₂ O	0.01
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0.01
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0.05
NaCl	0.1

La inulosacarasa (E.C. 2.4.1.9) de *L. citreum* (IsIA) se utilizó en su forma asociada a células. El microorganismo se creció en un medio compuesto según la tabla 4 (Olivares-Illana *et al.*, 2002), posteriormente el cultivo se centrifugó (15300 x *g*, 10 min), las células con la actividad IsIA se lavaron y recuperaron en solución amortiguadora de fosfatos 50 mM, pH 6.0. Ésta suspensión celular se utilizó para las reacciones.

Para la producción de la levansacarasa de *Leuconostoc* (LevC) se utilizó la cepa de *L. mesenteroides* spp *mesenteroides* ATCC 8293, expresando el gen que la codifica en *E. coli* TOP 10 bajo las condiciones reportadas por Olvera *et al* (2007). Después de la fermentación, el cultivo se centrifugó (8630 x *g*, 10 min), y las células se recuperaron en solución amortiguadora de fosfatos 50 mM, pH 6.0. Posteriormente, se realizó la ruptura de las células usando una prensa de French (1125 psi) y los restos celulares se separaron por centrifugación (22100 x *g*, 10 min). El sobrenadante con la actividad levansacarasa se utilizó directamente para las reacciones.

En el caso de la utilización de la enzima invertasa, se adquirió una β-D-fructofuranosidasa (EC 3.2.1.26) comercial, proveniente de *Saccharomyces cerevisiae* (Inv).

Para la producción de las variantes de BS-LVS utilizadas en este proyecto, se utilizaron las células transformadas *E. coli* BL21 correspondientes a cada mutante. Las células se crecieron en medio Luria-Bertani de acuerdo con el protocolo descrito por Ortiz-Soto *et al* (2008). Después de la fermentación, el cultivo se centrifugó (8630 x *g*, 10 min), y las células se recuperaron en solución amortiguadora de fosfatos 50 mM, pH 6.0. Posteriormente, se realizó la ruptura de las células usando una prensa de French (1125 psi) y los restos celulares se separaron por centrifugación (22100 x *g*, 10 min). El sobrenadante resultante se utilizó directamente en las reacciones.

6.3 Actividad enzimática

La medición de la actividad enzimática de las preparaciones enzimáticas, se determinó mediante el establecimiento de la velocidad inicial de liberación de azúcares reductores (fructosa y glucosa) usando el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) y glucosa como estándar (Summer y Howell, 1935). Las reacciones se llevaron a cabo a partir de una solución 292 mM de sacarosa en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 6.0 para las FTFs, o en amortiguador de acetatos 50 mM pH 4.5 para la β -D-fructofuranosidasa. Una unidad de actividad (U) se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar el equivalente a 1 μ mol de azúcares reductores por minuto (μ mol min^{-1}). Esta actividad es definida como actividad global ya que se determina a partir de los azúcares reductores producidos de las tres reacciones que pueden catalizar estas enzimas: hidrólisis, polimerización o reacción de aceptor.

La actividad enzimática global en reacciones en presencia fenoles como aceptores, se evaluó como la velocidad inicial de consumo de sacarosa mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, High-Performance Liquid Chromatography). Este método alternativo para medición de la actividad enzimática global se estableció como consecuencia de la interferencia que generan los fenoles con el método del DNS, considerando además que el consumo de sacarosa también es una medida global de las tres reacciones que pueden catalizar estas enzimas. Las muestras de estas reacciones se inactivaron en agua a ebullición durante 10 min y se analizaron en HPLC. Los rendimientos de fructósido se calcularon respecto a la sacarosa convertida (Y_s) determinada por HPLC, o respecto al aceptor inicial (Y_{aceptor}) según se indique en el texto. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y se incluyen barras de error en las gráficas.

6.4 Análisis de las reacciones por TLC

El análisis por cromatografía de placa fina (TLC, Thin Layer Chromatography) se realizó sobre placas HPTLC de sílica gel 60 (Merck, Darmstadt, Alemania) y utilizando una solución 85:15 acetonitrilo/agua (v/v) como fase móvil. Las placas se eluyeron dos veces y los sustratos aromáticos se visualizaron con vapor de yodo. Posteriormente, los azúcares y productos de reacción se revelaron por aspersion de una solución de α -naftol (2.4 % α -naftol en una mezcla etanol/agua/ H_2SO_4 83:7:11) y calentamiento a 100°C durante 1 min.

6.5 Análisis por HPLC de las reacciones de fructosilación

Todas las muestras utilizadas en los análisis de HPLC fueron inactivadas en baño de agua a ebullición durante 10 minutos y almacenadas a -20 °C hasta el momento de su análisis.

La cuantificación de los azúcares presentes en las reacciones se realizó por HPLC en un sistema Waters (Waters Corp., MA, USA) equipado con un sistema de control 600E (flujo de 1 mL min⁻¹) y una columna Alltech Prevail Carbohydrate ES (5 µm, 250×4.6 mm) (Alltech Associates, Inc., IL, USA) a 32°C. La composición de la fase móvil fue de 68:32 acetonitrilo/agua (v/v) y los azúcares se identificaron mediante un detector de índice de refracción (IR) Waters 410 (Waters Corp., MA, USA).

Para cuantificar los sustratos hidroquinona y resorcinol como aceptores, así como los fructósidos obtenidos en las reacciones con dichos compuestos, se utilizó una fase móvil 75:25 acetonitrilo/agua (v/v) y un detector Waters 996 de arreglo de diodos (Waters Corp., MA, USA) a 280 nm. Los análisis de los fructósidos obtenidos en las reacciones de aceptor con butanol, alcohol bencílico, 4-metoxifenol, catecol, 4-hidroxibencil alcohol y fenol se realizaron en una columna C18 Waters Spherisorb ODS-2 (5 µm, 250×4.6 mm, Waters Corp. MA, USA). Las reacciones que involucraron 4-metoxifenol y fenol como aceptores, se analizaron con una fase móvil compuesta por 90:10 agua/acetonitrilo (v/v) y 0.1 % TFA (1 mL min⁻¹); las reacciones con butanol, alcohol bencílico y catecol se analizaron con 95:5 agua/acetonitrilo (v/v) 0.1 % TFA como fase móvil, y para las reacciones con 4-hidroxibencil alcohol se utilizó una mezcla 92:8 agua/acetonitrilo (v/v). La detección de todos los aceptores y sus fructósidos se realizó mediante un detector Waters 996 de arreglo de diodos a 280 nm (o 223 nm para 4-hidroxibencil alcohol), excepto para la reacción con butanol, con el que se empleó detección por IR. Los productos de fructosilación se cuantificaron utilizando como estándares los fructósidos puros correspondientes.

6.6 Selección de la enzima

Las tres enzimas FTFs y la fructofuranosidasa fueron evaluadas con el fin de seleccionar la enzima más activa y más eficiente en las reacciones de aceptor. Las enzimas se evaluaron en reacciones con diferente concentración de tres distintos aceptores: hidroquinona, alcohol bencílico o butanol. Las reacciones con 0 a 400 mM de aceptor, sacarosa 292 mM y 1 U mL⁻¹ de enzima en una solución amortiguadora apropiada, se incubaron a 30°C usando un termoblock Eppendorf Thermomixer comfort (Hamburgo, Alemania). En todos los casos, se llevaron a cabo reacciones control en

ausencia del aceptor. El desempeño de las enzimas se evaluó cuantitativamente en términos de su actividad enzimática, como se describió en la sección 4.3. Por otro lado, los sustratos y productos se identificaron cualitativamente mediante TLC.

6.7 Efecto de la concentración de sustrato en las reacciones de aceptor

Para la selección de las mejores condiciones para las reacciones de aceptor, se utilizó al aceptor hidroquinona como sustrato modelo. Se llevaron a cabo reacciones en presencia de 400 mM de sacarosa, 100-500 mM de hidroquinona, 1 U mL⁻¹ de BS-LVS, en solución amortiguadora de fosfatos 50 mM y pH 6.0. Las reacciones se incubaron durante 20 h a 30°C. Se tomaron muestras a diferentes intervalos de tiempo que fueron inactivadas en un baño de agua a ebullición y diluidas posteriormente para cuantificación de fructósido y azúcares mediante análisis en HPLC.

6.8 Estabilidad de BS-LVS durante el almacenamiento en presencia de hidroquinona

La estabilidad de BS-LVS durante su almacenamiento en hidroquinona se evaluó mediante incubación de la enzima en una solución de 500 mM de hidroquinona en solución amortiguadora de fosfatos 50 mM, pH 6.0. Se tomaron alícuotas de dicha solución desde 0-24 h, y se les determinó la actividad enzimática global como se describió en la sección 4.3. El tamaño de las muestras de la solución de incubación se calculó de manera que el contenido de hidroquinona, al realizar la determinación de actividad, fuera menor a 25 mM. Esta concentración de hidroquinona resultó adecuada para no afectar la actividad enzimática durante el ensayo. Como control se consideró una reacción utilizando la enzima sin tener contacto previo con hidroquinona. La actividad enzimática residual se determinó a partir de la velocidad inicial de conversión de sacarosa mediante HPLC durante 45 min de reacción.

6.9 Efecto de la concentración de enzima en la reacción de aceptor

El efecto de la concentración de enzima en la producción de fructósido se evaluó en reacciones con 400 mM sacarosa y 500 mM hidroquinona en solución amortiguadora de fosfatos 50 mM, pH 6.0, usando 1-20 U mL⁻¹ BS-LVS. Las reacciones se incubaron durante 20 h a 30°C. Se tomaron muestras a diferentes intervalos de tiempo que fueron inactivadas en un baño de agua a ebullición. Las muestras diluidas se analizaron por HPLC para cuantificación de fructósido y azúcares.

6.10 Ensayos de hidrólisis de Fru-Hq

La actividad hidrolítica de BS-LVS sobre el fructósido **Fru-Hq** se evaluó en reacciones con 30 mM de **Fru-Hq** y 5 U mL⁻¹ de enzima en solución amortiguadora de fosfatos 50 mM, pH 6.0. La concentración de **Fru-Hq** en la reacción se monitoreó durante 8 h mediante HPLC. De manera paralela se estudió la hidrólisis de **Fru-Hq** en las mismas condiciones pero en presencia de 400 mM de sacarosa.

6.11 Reacción de aceptor en mezclas con disolvente orgánico

El efecto de la presencia de un co-disolvente orgánico en la reacción de aceptor se evaluó utilizando 2-metil-2-propanol (2M2P) en diferentes proporciones. Se prepararon reacciones en mezclas con 0 a 50 % (v/v) de 2M2P, 400 mM sacarosa, 500 mM hidroquinona y 5 U mL⁻¹ BS-LVS en solución amortiguadora de fosfatos 50 mM, pH 6.0, a 30 °C y se cuantificó la producción de **Fru-Hq** y conversión de sacarosa mediante HPLC.

6.12 Purificación de fructósidos

Los fructósidos para purificación fueron producidos mediante BS-LVS (5 U mL⁻¹) en reacciones con 400 mM de sacarosa y 500 mM de aceptor (850 mM para butanol y 200 mM para 4-hidroxibencil alcohol y fenol). Los fructósidos de hidroquinona, catecol, resorcinol, 4-metoxifenol y alcohol bencílico se aislaron mediante cromatografía en gel. Para la purificación del fructósido de hidroquinona, se empleó una columna (2×45 cm) empacada con Sephadex™ G10. Para los fructósidos de catecol, resorcinol, 4-metoxifenol y alcohol bencílico, la columna se empacó con Lipophilic Sephadex® LH20; en ambos sistemas se utilizó agua como fase móvil. La elución se desarrolló en un sistema cromatográfico FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) equipado con un detector de UV (280 nm) ÄKTA *prime* (Amersham Pharmacia Biotech) a 1.5 mL min⁻¹. Se aplicaron cinco mililitros de muestra a la columna y se colectaron fracciones, seleccionando aquellas que contuvieron fructósidos para su posterior liofilización. Los fructósidos obtenidos se analizaron por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y HPLC. Para la purificación del fructósido de 4-metoxifenol, se realizó una extracción con éter di-isopropílico del aceptor que quedó sin reaccionar; la fase acuosa resultante se concentró parcialmente en rotavapor y se aplicó a la columna cromatográfica. La purificación del fructósido de alcohol bencílico se realizó adicionando a la mezcla de reacción tres volúmenes de etanol para precipitar el polímero. Después de centrifugar (18400 x g, 5 min), el sobrenadante se concentró en rotavapor y se obtuvo como

resultado una mezcla bifásica compuesta por una fase acuosa y otra de alcohol bencílico, permaneciendo el fructósido principalmente en ésta última. La fase de alcohol bencílico se diluyó con cloroformo y el fructósido se extrajo con agua. El extracto acuoso resultante se aplicó a la columna cromatográfica.

Para la purificación de los fructósidos de butanol y fenol se utilizó un sistema de cromatografía flash. El fructósido de butanol se extrajo del medio acuoso con *n*-butanol. El disolvente se concentró y se aplicó a una columna empacada con sílica gel 60 (0.04-0.063 mm) y se empleó acetona para la elución. Las fracciones que contenían el fructósido se evaporaron en rotavapor y se analizaron por RMN. El fructósido de fenol se obtuvo mediante el mismo protocolo, pero extrayendo previamente el fenol que no reaccionó con una mezcla 70:30 MTBE/*n*-hexano (v/v).

La purificación del fructósido de 4-hidroxibencil alcohol se realizó extrayendo parcialmente con MTBE el aceptor que no reaccionó. La fase acuosa resultante se utilizó para purificación en HPLC preparativa, usando una columna semi-preparativa Waters Spherisorb® S5 ODS2 (5 µm, 250×20 mm, Waters Corp. MA, USA) con agua/acetonitrilo 92:8 (v/v) como fase móvil (9.9 mL min⁻¹). Las fracciones ricas en cada uno de los fructósidos, fueron concentradas en rotavapor y liofilizadas para análisis RMN y cuantificación en HPLC.

6.13 Análisis estructural por RMN

Los espectros de RMN se adquirieron en un espectrómetro Varian operando a 400 MHz para ¹H y 100 MHz para ¹³C, o en un equipo Eclipse JEOL (E) operando a 300 MHz para ¹H y 75 MHz para ¹³C. Los desplazamientos químicos se reportan en partes por millón (ppm) relativos a la molécula de H₂O y fueron realizados con base en análisis de espectros de ¹H-¹H COSY, HMBC y HSQC según fue requerido. Los espectros de masas HRFABMS en una matriz de *m*-nitrobencil alcohol se registraron en un espectrómetro de masas JEOL JMX-AX 505 HA.

6.14 Elucidación de la estructura de los monofructósidos

La estructura de los productos purificados se elucidaron con base en los experimentos de RMN de 1D (¹H, ¹³C) y 2D (COSY, HSQC/HMBC). Todos los productos analizados correspondieron a monofructósidos. El 4-(hidroxi)-bencil-β-D-fructofuranósido (**Fru₁-4HB**) se utilizó como modelo para descripción estructural. El espectro de ¹H-NMR de **Fru₁-4HB** indicó la presencia de un conjunto de señales de un sistema aromático AB [(δ7.31 (2H, dd, *J* = 2.4 Hz, *J* = 8.4 Hz, H-2 y H-6);

6.91 (2H, dd, $J = 2.6$ Hz, $J = 8.4$ Hz, H-3 y H-5)] y dos protones CH₂-O no-equivalentes de un grupo bencilo [(δ 4.68 (1H, d, $J = 10.8$ Hz, H-7a); 4.53 (1H, d, $J = 10.8$ Hz, H-7b)] y confirmaron la presencia de un sustituyente hidroxibencilo (aglicona). Una vez asignadas las señales de ¹H de la aglicona, las resonancias restantes ¹H se asignaron al anillo de fructosa, y las conectividades se definieron a partir de los experimentos de ¹H-¹H COSY con la señal característica de H-3' a δ 4.21 (1H, d, $J = 8.4$ Hz) como el punto de partida. Las asignaciones de los carbonos se definieron a partir de un experimento de HSQC. Con base en las correlaciones de HMBC, el grupo hidroximetilo se asignó a la posición C-2' del anillo de fructofuranosa, lo cual fue confirmado por la correlación a tres enlaces de sus dos protones CH₂-O no-equivalentes [(δ 4.68 (1H, d, $J = 10.8$ Hz, H-7a); 4.53 (1H, d, $J = 10.8$ Hz, H-7b)] con el carbono C-2' (δ 104.10).

6.15 Cálculo de índice de nucleofilia

Los cálculos de nucleofilia se realizaron empleando el programa GAUSSIAN 09. La geometría de las especies neutras y aniónicas se optimizaron a nivel de B3LYP/6-311+G (d, p); se ha demostrado que la inclusión de las funciones difusas son importantes para especies aniónicas (Chandrasekhar *et al.*, 1981). El índice de nucleofilia (ω^-) se evaluó a partir de los valores de los orbitales moleculares de frontera, de acuerdo con Jaramillo *et al.* (2009; 2006) (Ec. 3):

$$\omega^- = \frac{1}{2} \frac{(\mu_a - \mu_b)^2}{(\eta_a + \eta_b)^2} \eta_a \quad (\text{Ec. 3})$$

Donde $\mu \approx (\epsilon_H + \epsilon_L)/2$ es el potencial químico electrónico; $\eta \approx (\epsilon_L - \epsilon_H)$ es la dureza; el subíndice a corresponde al nucleófilo, ya sea neutro o aniónico; y b el electrófilo (fructosa). ϵ_H y ϵ_L corresponden a las energías de HOMO y LUMO, respectivamente.

6.16 Cálculos con COSMO-RS

En este trabajo se utilizó el modelo COSMO-RS (CONductor-like Screening MODEL for Realistic Solvents) desarrollado por Klamt *et al.* (Klamt, 2005; Klamt y Eckert, 2000; Klamt, 1995). Se emplearon los programas Turbomole 5.9.1 y COSMOtherm versión C2.1-01.07 (COSMOlogic GmbH & Co. KG, Leverkusen, Alemania, 2007). Las estructuras tridimensionales de los compuestos y disolventes, así como la minimización de sus conformaciones moleculares, se implementaron con el programa Marvin Sketch 5.3.8 (v.2010 ChemAxon <http://www.chemaxon.com/>). Los conformeros estructurales no se calcularon debido a la simplicidad de los compuestos evaluados.

La generación de los archivos COSMO se realizó usando el paquete Turbomole 5.9.1 a nivel de teoría de funcionales de la densidad BP (B88-VWN-P86) con una función de base extendida valencia triple-z polarizada (TZVP). La estimación de los coeficientes de actividad a dilución infinita se realizó en modo no-iterativo, en COSMOtherm versión C2.1-01.07.

6.17 Reacción en lote alimentado

Las reacciones en lote alimentado se llevaron a cabo usando como condiciones iniciales 500 mM de hidroquinona, 400 mM de sacarosa y 5 U mL⁻¹ de BS-LVS en solución amortiguadora de fosfatos 50 mM, pH 6.0 a 30 °C. Las soluciones se prepararon en un volumen inicial de 25 mL en frascos de vidrio de 150 mL (protegidos de la luz) con agitación magnética. La reacción se alimentó durante 24 h con una solución de sacarosa al 60 % a un flujo constante, calculado con base en la velocidad inicial de consumo de sacarosa en una reacción de aceptor típica en lote (sin alimentación), para mantener constante la concentración de sacarosa a 400 mM. Estas mismas condiciones se utilizaron para la reacción en lote alimentado con la mutante Y429N. Se consideró como control la reacción sin alimentación de sacarosa con las mismas condiciones iniciales.

6.18 Efecto de monosacáridos y Fru-Hq en la eficiencia de la reacción de aceptor

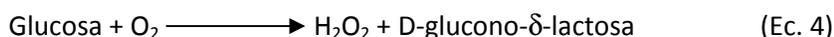
El efecto de los monosacáridos y de la concentración de fructósido acumulada durante su síntesis se estudiaron realizando reacciones de aceptor en presencia de diferentes concentraciones iniciales de glucosa, fructosa y **Fru-Hq** con 500 mM de **Hq**, 400 mM de sacarosa y 5 U mL⁻¹ de enzima.

Los monosacáridos se evaluaron en tres diferentes concentraciones iniciales: 200, 400 y 800 mM, siendo ésta última la máxima concentración de glucosa alcanzada en un lote alimentado. El efecto del **Fru-Hq** se evaluó en 35 mM inicial, cantidad cercana al máximo de producción observada en una reacción en lote. Las reacciones se analizaron después de 4 h de reacción mediante HPLC para cuantificación de concentración de **Fru-Hq** y azúcares (glucosa, fructosa y sacarosa).

6.19 Estudio de inhibición por glucosa

Se llevaron a cabo reacciones con 0.5 U mL⁻¹ BS-LVS y 5 a 200 mM de sacarosa inicial, determinando la velocidad inicial de liberación de glucosa en los primeros 20 minutos de reacción. La medición se llevó a cabo mediante un electrodo de glucosa implementado en el equipo YSI

2700 SELECT, que detecta glucosa indirectamente por la oxidación catalizada por una glucosa oxidasa con la reacción general:



El H_2O_2 generado se mide por oxidación electroquímica del mismo y puede detectar entre 0 y 20 g L^{-1} de glucosa.

6.20 Evaluación de mutantes de BS-LVS en reacciones de aceptor

Las mutantes de BS-LVS se evaluaron en reacciones de aceptor con 500 mM de **Hq**, 400 mM de sacarosa y 5 U mL^{-1} de enzima. Las mutantes de BS-LVS expresadas en *E. coli* se produjeron de acuerdo a lo reportado por Ortiz-Soto *et al* (2008) y se trabajó con extractos enzimáticos. En el estudio se incluyó como control la reacción con la enzima silvestre BS-LVS y la silvestre heteróloga (WT) para verificar que no existieran diferencias por el sistema de expresión. Las reacciones se dejaron transcurrir durante 12 horas y la producción final de fructósido y monosacáridos, así como el consumo de sacarosa, se cuantificaron por HPLC. Con la mutante Y429N se realizó el estudio de actividad hidrolítica sobre **Fru-Hq** y de inhibición por glucosa en las condiciones descritas previamente para la silvestre (secciones 2.10 y 2.19).

6.21 Otras moléculas evaluadas en reacciones de aceptor (aminas, aminoácidos, epicatequina)

La evaluación de otro tipo de aceptores para la reacción catalizada por BS-LVS se realizó en las siguientes condiciones: a 0.4 mmol de cada aceptor se adicionó 1 mL de una solución de sacarosa 400 mM en solución amortiguadora de fosfatos pH 6.0 y 1 U mL^{-1} de BS-LVS. Las reacciones se incubaron a 30°C y se analizaron por TLC.

En el estudio se incluyeron aminas primarias y secundarias, anilinas, aminoácidos y derivados de los mismos, tioles, tiofenoles y el flavonoide epicatequina. En el caso de las aminas primarias, secundarias y los aminoácidos Arg y Lys, a 400 mM se obtiene una solución con pH entre 9 y 11, por lo que el pH se ajustó a 6.0 con una solución concentrada de HCl.

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

SECCIÓN I. Fructosilación de alcoholes aromáticos y alifáticos por fructosiltransferasas: estudio de la reactividad de los aceptores

7.1 Selección de la enzima

La primera etapa del proyecto tuvo como objetivo el encontrar un biocatalizador eficiente para la síntesis de fructósidos de fenoles. En este sentido, se evaluaron tres FTFs de distinto origen en reacciones de aceptor: las levansacarasas de *B. subtilis* (BS-LVS) y *L. mesenteroides spp mesenteroides* (LevC) y la inulosacarasa de *L. citreum* CW28 (IsIA). En el estudio se incluyó también una invertasa comercial, la β -fructofuranosidasa de *S. cerevisiae* (Inv), ya que se ha reportado que este tipo de enzimas también pueden catalizar reacciones de transfructosilación sobre compuestos diferentes a los azúcares (Win *et al.*, 2004; Suzuki *et al.*, 2002; Pilgrim *et al.*, 2001). La evaluación de las enzimas se llevó a cabo en reacciones de fructosilación utilizando hidroquinona (Hq), alcohol bencílico (Bnz) y butanol (Bu) como sustratos aceptores y sacarosa como sustrato donador. En esta etapa, la eficiencia de las enzimas se evaluó midiendo el efecto de la concentración de los diferentes aceptores sobre la actividad enzimática global.

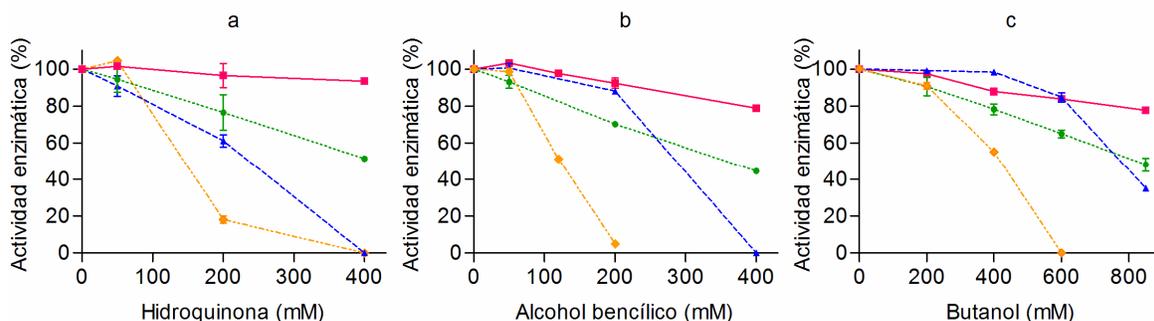


Figura 12. Actividad enzimática residual de las diferentes FTFs e Inv evaluadas en reacciones de aceptor con (a) hidroquinona, (b) alcohol bencílico y (c) butanol. (■) BS-LVS; (●) Inv; (▲) IsIA; (◆) LevC.

La actividad enzimática global se determinó midiendo la velocidad inicial de liberación de azúcares reductores. En las mismas reacciones, después de 20 horas de reacción, se determinó de manera cualitativa la formación de productos de fructosilación por TLC.

Entre las enzimas probadas, BS-LVS resultó ser la más activa aún en presencia de alta concentración de aceptor (hasta 400 mM de hidroquinona y alcohol bencílico, y 850 mM butanol), expresando en todos los casos más del 80 % de su actividad medida en ausencia de aceptor,

mientras que todas las demás FTFs mostraron una disminución drástica en su actividad a concentraciones por arriba de 200 mM (Figura 12). Considerando la capacidad para formar productos de fructosilación con **Hq** como aceptor, con todas las enzimas evaluadas se detectaron productos de fructosilación. Sin embargo, de acuerdo al análisis de TLC, se observa de manera cualitativa que BS-LVS presenta una mayor eficiencia para la síntesis de fructósido de **Hq** (Figura 13, carril 1a y 1b).

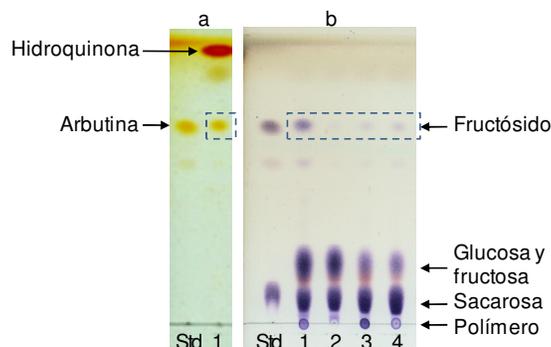


Figura 13. Análisis por TLC de las reacciones de fructosilación catalizadas por FTFs e Inv usando Hq como aceptor. (a) placa revelada con yodo (se muestran sólo dos carriles); (b) la misma placa revelada con α -naftol; (Std) estándares sacarosa y arbutina; (1) BS-LVS, (2) Inv, (3) IslA y (4) LevC.

La comparación de las enzimas fructosilantes evaluadas muestra, por un lado, que BS-LVS expresa el mayor porcentaje de actividad en presencia de altas concentraciones de los diferentes aceptores utilizados. Por otro lado, que la concentración más alta de producto de fructosilación se obtiene con esta enzima, al menos de manera cualitativa para esta etapa del trabajo. De esta manera, BS-LVS fue seleccionada para estudios posteriores de la reacción de fructosilación con alcoholes alifáticos y fenoles como sustratos aceptores.

7.2 Efecto de la concentración de sustrato en la reacción de aceptor

En reportes previos se ha demostrado que la eficiencia de las reacciones de aceptor con GTFs se ve influenciada por la naturaleza del sustrato y por su concentración (Seibel *et al.*, 2006; Gómez de Segura *et al.*, 2006). Con el fin de seleccionar las condiciones de reacción que favorezcan la fructosilación de alcoholes alifáticos y fenoles, se estudió el efecto de la concentración del aceptor sobre la acumulación de producto fructosilado. Para este fin se utilizó como aceptor modelo a la **Hq**, cuyo producto de fructosilación se ha reportado como inhibidor de tirosinasa (Kang *et al.*, 2009). La concentración del donador sacarosa se fijó en 400 mM, concentración que se consideró

lo suficientemente alta para favorecer la reacción de transferencia y disminuir la reacción de hidrólisis (Ortiz-Soto *et al.*, 2004; Canedo *et al.*, 1999). La concentración de **Hq** se varió desde 100 a 500 mM (cerca del límite de solubilidad de **Hq** en medio acuoso) y después de 20 horas de reacción se analizaron los productos por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

En todas las concentraciones evaluadas, se detectó un sólo producto de fructosilación que correspondió a un fructósido de **Hq** (**Fru-Hq**) y que fue identificado como 4-hidroxifenil- β -D-fructofuranósido, lo cual se confirmó posteriormente por RMN. Tal como se esperaba, a medida que se incrementó la concentración inicial de aceptor, la producción de fructósido fue mayor (Figura 14). Sin embargo, se encontró también que en la concentración más alta de **Hq** (500 mM) sólo se alcanzó el 65 % de la conversión de sacarosa, comparada con el 90 % obtenido en la reacción sin aceptor. Si bien este efecto negativo sobre la BS-LVS no se observa de manera drástica cuando se miden las velocidades iniciales de reacción a diferentes concentraciones de sustrato aceptor (Figura 12a), a tiempos de reacción largos, la disminución en la conversión global del donador sacarosa podría deberse a un efecto inactivador o desnaturizante del aceptor.

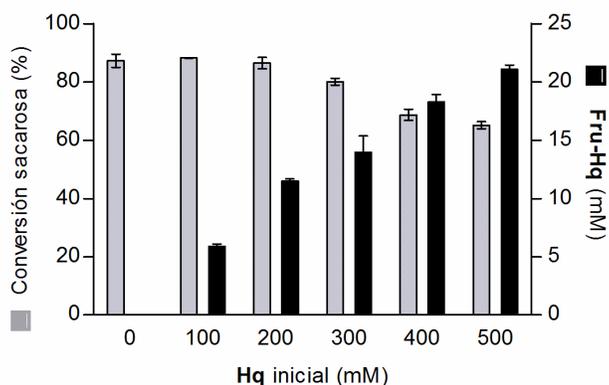


Figura 14. Producción de fructósido y conversión de sacarosa por BS-LVS después de 20 h de reacción en función de la concentración inicial de **Hq**. Las barras negras corresponden a **Fru-Hq**; Las barras grises corresponden a la conversión de sacarosa. Reacciones con 400 mM de sacarosa 1 U mL⁻¹ de enzima a 30 °C.

Para estudiar de manera detallada el efecto de la **Hq** cuando ésta se encuentra en contacto con la enzima durante tiempos prolongados, se evaluó el cambio en la velocidad inicial de BS-LVS después de un tiempo de almacenamiento en **Hq** 500 mM. Diferentes alícuotas de esta solución de almacenamiento fueron evaluadas para establecer el perfil (24 horas) de velocidad inicial de transformación de la sacarosa (292 mM) utilizando 1 U mL⁻¹ de enzima. Los resultados de la

evaluación mostraron que la enzima perdió la mitad de su actividad en las primeras dos horas de almacenamiento y a las 24 horas se había inactivado completamente (Figura 15).

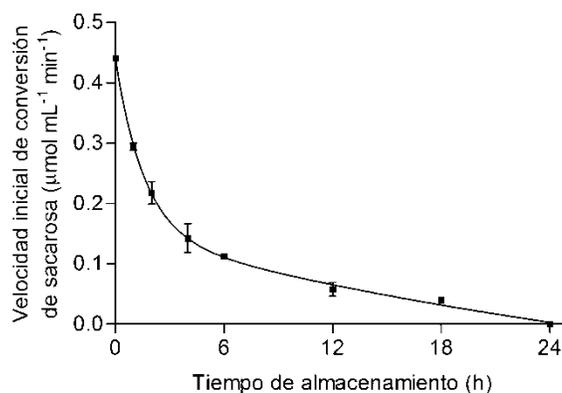


Figura 15. Estabilidad de BS-LVS al almacenamiento en Hq 500 mM. Actividad medida en solución de sacarosa 292 mM en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.0 a 30 °C.

Es importante señalar que este efecto de **Hq** sobre la actividad de BS-LVS no fue reversible, puesto que la determinación de la actividad en cada una de las alícuotas después del almacenamiento se realizó prácticamente en ausencia de **Hq**. Por lo tanto, concluimos que el efecto de **Hq** sobre BS-LVS se debe a un proceso de inactivación. No obstante es importante resaltar que en condiciones operacionales, es decir, en presencia de sustrato sacarosa, ésta puede ejercer un efecto estabilizador sobre la enzima (Madlová *et al.*, 2000). De hecho, la conversión relativamente alta de sacarosa (hasta 65 %) y la alta producción de **Fru-Hq** (hasta 22 mM) observadas en las reacciones de fructosilación a concentraciones de 500 mM de **Hq** (Figura 14), muestran que la enzima se mantiene estable en presencia de sacarosa a pesar del efecto inactivador propio de la **Hq**. A este respecto, una manera de compensar la pérdida de actividad para conseguir la conversión total de sacarosa y, en consecuencia, permitir que la producción de fructósido continúe, sería incrementar la concentración de enzima. Este incremento debe estar sujeto a las condiciones que favorezcan la síntesis de **Fru-Hq** sin caer en un exceso de enzima.

7.3 Efecto de la concentración de enzima en la reacción de aceptor

Como una estrategia para contender con la reducción de la eficiencia de la reacción debida al efecto inactivador de **Hq**, se estudió el efecto de aumentar la concentración de enzima sobre la capacidad de BS-LVS para producir el **Fru-Hq**. Las reacciones se llevaron a cabo utilizando 400 mM de sacarosa y 500 mM de **Hq**. Los resultados de este ensayo mostraron que al incrementar la

concentración de enzima, se favoreció la producción de fructósido, alcanzándose la mayor producción después de 20 horas de reacción con una concentración de 5 U mL^{-1} (Figura 16).

Si bien a concentraciones de enzima de 10 y 20 U mL^{-1} se observó que durante la primera hora de reacción las velocidades de síntesis de fructósido fueron las más altas, este comportamiento fue seguido de una disminución de la concentración de **Fru-Hq**.

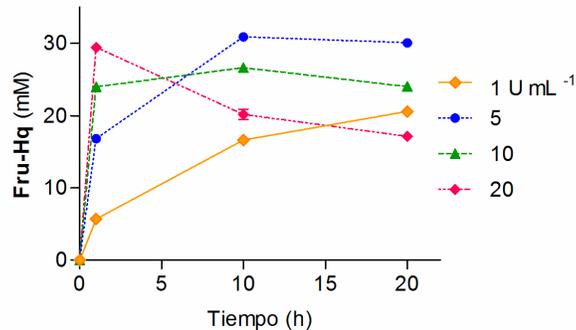


Figura 16. Efecto de la concentración de enzima en la producción de fructósido en función del tiempo. Reacciones 400 mM sacarosa y 500 mM **Hq** a 30°C .

Este hecho sugirió que la reacción está sujeta a un control cinético, en donde al alcanzarse una concentración específica de producto éste mismo podría servir de sustrato de hidrólisis para la enzima. Si se considera que la selección de la concentración de enzima es un factor importante para aumentar la productividad del proceso, la observación de que a mayor concentración de enzima, mayor velocidad de síntesis de fructósido pero también mayor la velocidad a la que se consume, debe ser un criterio determinante para establecer la concentración adecuada de enzima. Para fines de este estudio los resultados nos sugieren que la condición más adecuada sería con 5 U mL^{-1} . En estas condiciones se logra un buen compromiso entre una concentración baja de enzima, que permite trabajar a una alta velocidad de síntesis de fructósido y, al mismo tiempo, permite una acumulación de producto al final del proceso.

Un perfil cinético detallado de una reacción efectuada bajo estas condiciones, mostró que se logra alcanzar una concentración máxima de 30 mM de fructósido entre las 4 y 5 h de reacción, con una conversión casi total de sacarosa después de 10 h (Figura 17).

Es importante resaltar que en presencia de 5 U mL^{-1} de enzima (Figuras 16 y 17) el inicio de la desaparición de **Fru-Hq** coincide con el momento en que la sacarosa se ha convertido casi en su

totalidad. Este comportamiento sugiere que la enzima podría estar utilizando al fructósido como sustrato para hidrólisis.

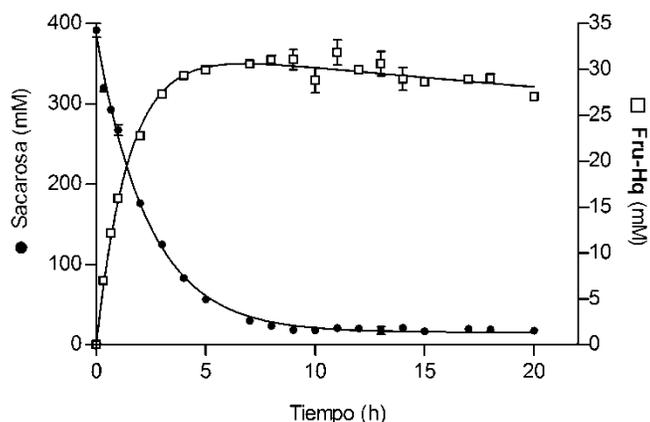


Figura 17. Progreso de la formación de **Fru-Hq** y consumo de sacarosa por BS-LVS en reacciones con 400 mM sacarosa, 500 mM Hq y 5 U mL⁻¹ de enzima a 30 °C. (●) Sacarosa, (□) **Fru-Hq**.

Para comprobar esta hipótesis se compararon dos reacciones en las que se enfrentó al **Fru-Hq** con la **BS-LVS**, una de ellas en presencia de sacarosa y en la otra sólo el fructósido en solución. Los resultados de este ensayo mostraron que la enzima hidrolizó rápidamente al **Fru-Hq** cuando éste se encontraba en solución, mientras que en presencia de sacarosa la hidrólisis fue significativamente menor (Figura 18).

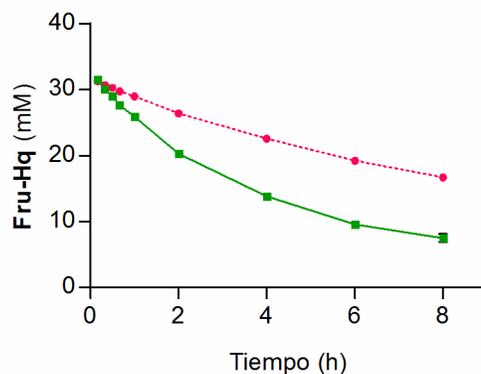


Figura 18. Hidrólisis de **Fru-Hq** por BS-LVS. (■) Reacción con **Fru-Hq** puro; (●) reacción con **Fru-Hq** en presencia de 400 mM de sacarosa. Condiciones: 5 U mL⁻¹ BS-LVS, pH 6.0 y 30 °C.

Lo anterior indica una mayor afinidad de la enzima por la sacarosa que por el **Fru-Hq**, lo cual nos lleva a establecer que la elección del momento adecuado para detener la reacción será crucial

para lograr la máxima producción del fructósido. En este caso, cuando la conversión de sacarosa haya alcanzado alrededor del 85 % de conversión, justo antes de que comience a observarse la hidrólisis del **Fru-Hq**. Finalmente, las condiciones de reacción seleccionadas para experimentos posteriores se establecieron en 500 mM de aceptor, 400 mM sacarosa y 5 U mL⁻¹ de BS-LVS.

7.4 Reacción de aceptor con Hidroquinona catalizada por BS-LVS en presencia de solvente orgánico

Una de las estrategias a las que se recurre habitualmente en síntesis enzimática cuando se utilizan sustratos no polares, es el uso de disolventes orgánicos. Principalmente en reacciones donde la presencia de agua limita la síntesis del compuesto de interés, ya sea por la baja solubilidad del sustrato en el medio acuoso o porque el agua misma actúa como sustrato de la reacción (hidrólisis). De esta manera, la presencia de un solvente orgánico en este tipo de sistemas tiene como función solubilizar el sustrato y abatir la actividad de agua en el sistema. En un estudio previo (Castillo y Lopez-Munguía, 2004) se demostró que la enzima BS-LVS, en presencia de concentraciones crecientes de 2-metil-2-propanol (2M2P) sintetiza polímero de fructosa en un alto porcentaje, mientras que la hidrólisis de la sacarosa se reduce considerablemente. Con el fin de evaluar esta estrategia en la reacción con **Hq** se llevaron a cabo reacciones en presencia de 500 mM de **Hq**, 400 mM sacarosa, 5 U mL⁻¹ de BS-LVS en soluciones de 0 a 50 % de 2M2P y los productos se analizaron por HPLC a las 4 horas de reacción.

Contrario a lo que se podría esperar, en la figura 19A se puede observar que la producción de fructósido (barras negras) disminuye a medida que la concentración de 2M2P se incrementa. Cabe mencionar que en todas las reacciones la conversión de sacarosa alcanzada fue mayor al 85 % (Figura 19B), lo que indica que la enzima no disminuyó su actividad por la presencia del solvente. Por otro lado, tal como se había reportado previamente, se observó que la hidrólisis de la sacarosa (vista como fructosa liberada) se redujo al aumentar el contenido de 2M2P mientras que la transferencia hacia polímero se incrementó significativamente (Castillo y Lopez-Munguía, 2004). Dado que estos resultados mostraban que ni la actividad de la BS-LVS ni la disponibilidad de la sacarosa para la reacción estaban siendo afectadas por la concentración creciente del solvente, el efecto negativo del 2M2P sobre la producción del **Fru-Hq** podría ser el resultado de una disminución en la disponibilidad y/o reactividad del nucleófilo aceptor **Hq**. Para explicar este comportamiento, se propuso determinar el coeficiente de actividad termodinámica (γ) de **Hq** en los sistemas con co-solvente 2M2P. En la medida que el parámetro γ es una medida de la

interacción de un soluto con el medio en el que se encuentra, la estimación de γ debería ser un indicativo de la magnitud de la disponibilidad de **Hq** para participar como nucleófilo en la reacción. El cálculo de γ se realizó mediante el método COSMO-RS, el cual se basa en la combinación de cálculos químico-cuánticos con termodinámica estadística para solutos y solventes. De manera específica, permite estimar las interacciones de superficie molecular entre solventes y solutos.

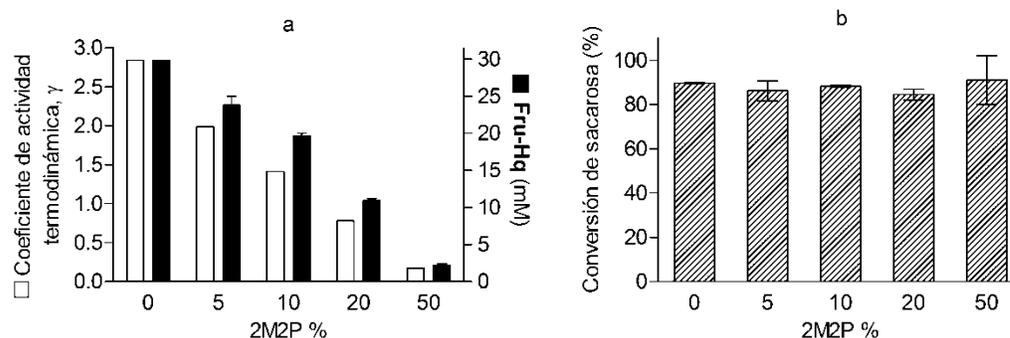


Figura 19. Resultados del análisis de la reacción de fructosilación de **Hq** con BS-LVS en mezclas con disolvente orgánico. (a) Las barras negras corresponden a la producción de **Fru-Hq** y las barras blancas al coeficiente de actividad termodinámica (γ) de **Hq**. (b) Conversión de sacarosa en las reacciones en mezclas con disolvente orgánico. Reacciones con 400 mM sacarosa, 500 mM **Hq** y 5 U mL⁻¹ de enzima en la mezcla apropiada con solvente orgánico. En todos los casos la conversión de sacarosa fue mayor al 85%.

En la figura 19A las barras blancas muestran cómo el valor γ de la **Hq** disminuye a medida que la concentración de 2M2P se incrementa. La reducción de la formación de **Fru-Hq** en las mezclas de amortiguador de fosfatos/2M2P asociada a la disminución en los valores correspondientes de γ para **Hq**, sugiere una interacción fuerte de **Hq** con el medio de reacción y en consecuencia una reducción en su disponibilidad para actuar como aceptor, interacción que se intensifica en la medida que la concentración de 2M2P incrementa. De manera comparativa, se calculó el valor de γ de **Hq** en otros solventes orgánicos miscibles con el agua y se observó que para todos los disolventes evaluados el valor de γ disminuye en más de dos órdenes de magnitud (Figura 20) respecto al sistema acuoso ($\gamma = 2.8$). Estos resultados confirman que el medio acuoso resultaría ser la mejor condición de reacción para favorecer la fructosilación de **Hq**.

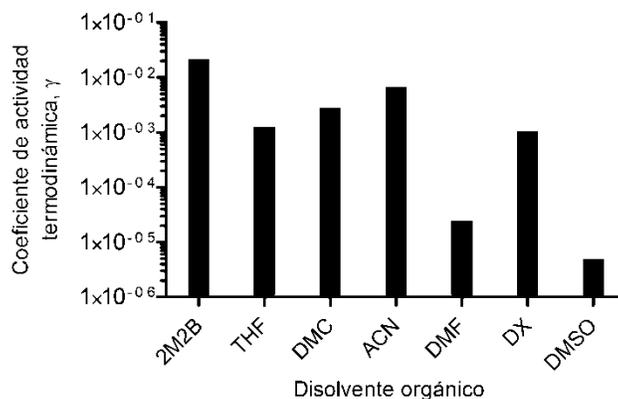


Figura 20. Coeficiente de actividad termodinámica (γ) de **Hq** a dilución infinita en diferentes solventes orgánicos: 2M2B, 2-metil-2-butanol ($\log P = 1$); THF, tetrahidrofurano ($\log P = 0.49$); DMC, acetona ($\log P = -0.23$); ACN, acetonitrilo ($\log P = -0.33$); DMF, *N,N*-dimetilformamida ($\log P = -1$); DX, dioxano ($\log P = -1.1$); DMSO, dimetilsulfóxido ($\log P = -1.3$). Cálculos de γ realizados utilizando COSMO-RS.

7.5 Reacciones de aceptor con sustratos hidrofóbicos

En esta etapa del proyecto se propuso estudiar la reacción de fructosilación con otros alcoholes aromáticos o alifáticos. El objetivo de este estudio fue el hacer extensiva la metodología desarrollada a otro tipo de moléculas hidroxiladas. Sin embargo, la selección de las moléculasceptoras se realizó además, considerando que este estudio pudiera arrojar información sobre la influencia de la estructura química del aceptor en la eficiencia de la reacción. Así, se seleccionaron moléculasceptoras conteniendo hidroxilos fenólicos en posiciones diferentes a las de la **Hq** (resorcinol, **Rsr** y catecol, **Cat**), hidroxilos fenólicos sustituidos (4-metoxifenol, **4mPh**), fenoles monofuncionales (fenol, **Ph**) e hidroxilos primarios (alcohol bencílico, **Bnz**) y butanol, **Bu**) (Figura 21).

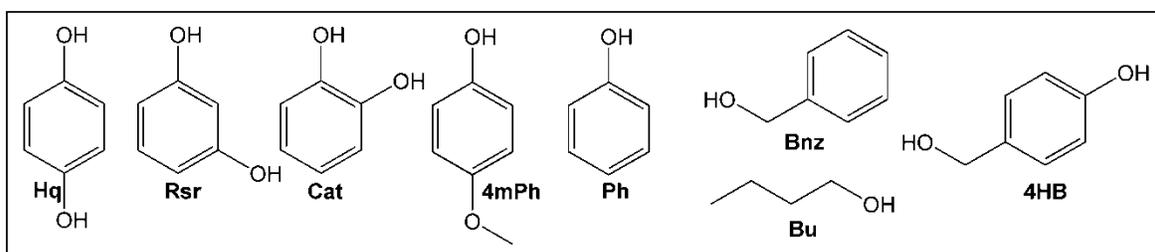


Figura 21. Aceptores empleados en reacciones de aceptor con BS-LVS: **Hq**, hidroquinona; **Rsr**, resorcinol; **Cat**, catecol; **4mPh**, 4-metoxifenol; **Ph**, fenol; **Bnz**, alcohol bencílico; **Bu**, butanol; y **4HB**, aceptor bifuncional 4-hidroxibencil alcohol.

En una primera etapa, con el fin de identificar el momento máximo de producción de los fructósidos se llevaron a cabo reacciones de fructosilación de algunos de los aceptores en las

condiciones previamente seleccionadas, *i.e.*, 400 mM sacarosa, 500 mM de aceptor y 5 U mL⁻¹ de enzima y se estudió la evolución de la reacción durante 7 horas. En estos experimentos se pudo observar que en la reacción con **Rsr** se tiene un máximo de producción de fructósido a las 4 horas, tiempo después del cual la concentración de fructósido decae, de manera semejante a lo que ocurre con **Hq** (Figura 22).

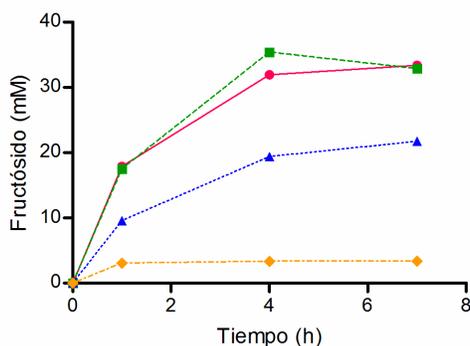


Figura 22. Producción de fructósidos de diferentes sustratos en reacciones de aceptor con BS-LVS. (●) **Hq**, (■) **Rsr**, (▲) **Cat** y (◆) **4mPh**. Condiciones de reacción: 400 mM de sacarosa, 500 mM de aceptor, 5U mL⁻¹ de BS-LVS.

Este comportamiento no se observó en presencia de los demás sustratos, sin embargo, el incremento en la cantidad de fructósido desde las 4 y hasta las 7 horas fue mínimo. Con el fin de establecer un punto de comparación entre las reacciones con diferentes aceptores, se tomó como referencia la producción de fructósido a las 4 h de reacción.

Para continuar con el estudio, los aceptores se evaluaron en reacciones con 400 y 500 mM de aceptor. Todos los sustratos fueron solubles hasta 500 mM, excepto **4mPh** y **Bnz** cuya máxima solubilidad en agua es 320 mM y 370 mM (a 25 °C), respectivamente. En el caso de **Bu**, su alta solubilidad en agua permitió evaluar la reacción en mayor concentración (850 mM).

La producción de fructósido se analizó a las 4 h de reacción en HPLC y se encontró en todos los casos una mayor producción en la concentración más alta de aceptor (500 mM para dihidroxibencenos u 850 mM **Bu**), confirmando el efecto positivo de una mayor concentración de aceptor para favorecer la fructosilación del mismo. En el caso de las reacciones con **4mPh** y **Bnz**, no se observó mayor producción en 500 mM de aceptor, puesto que no se tuvo un cambio real en la concentración debido a que se excedió el límite de solubilidad de los sustratos. Por otro lado, se determinó el efecto de los aceptores sobre la actividad global de la enzima, mediante la medición de la conversión de sacarosa durante la primera hora de reacción. Las mayores velocidades

iniciales de conversión de sacarosa se observaron con los dihidroxibencenos **Hq**, **Cat** y **Rsr** y los alcoholes primarios **Bu** y **Bnz** (Figura 23a).

Llama la atención que la mayor concentración de fructósido se encontró en las reacciones con dihidroxibencenos, que se han reportado como compuestos de baja nucleofilia; mientras que los alcoholes primarios, reportados como compuestos de mayor nucleofilia (de Roode *et al.*, 2000; Macomber, 1996), produjeron mucho menor cantidad de fructósido (Figura 23b). En estas condiciones no fue posible observar actividad en las reacciones de aceptor con fenol, sin embargo, la producción y purificación del fructósido de fenol sí fue posible a menor concentración de aceptor (200 mM) como se describe en la metodología (sección 4.12).

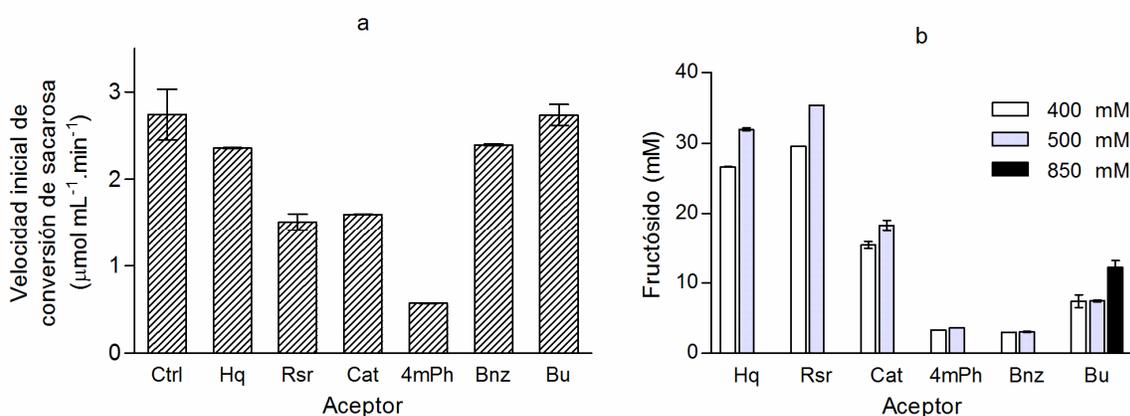


Figura 23. Fructosilación de alcoholes aromáticos y primarios con BS-LVS. (a) Velocidad inicial de conversión de sacarosa con 500 mM de aceptor. (b) producción total de fructósido a partir de 400 mM (barras blancas), 500 mM (barras grises) y 850 mM (barras negras) de aceptor inicial. Reacciones con 400 mM sacarosa y 5 U mL⁻¹ de enzima a 30 °C.

Es importante señalar que, a pesar de que con alcoholes primarios la velocidad inicial de transformación de la sacarosa fue similar que con dihidroxibencenos (Figura 23a), la concentración de fructósido fue considerablemente menor (Figura 23b). Esto sugiere, que aunque **Bu** y **Bnz** no parecen afectar la actividad de BS-LVS, estos alcoholes no son buenos aceptores y prácticamente toda la sacarosa se transfiere a polímero o se hidroliza.

En el caso de la reacción con **4mPh**, la actividad de BS-LVS se redujo considerablemente; no obstante al calcular el rendimiento de fructósido respecto a la sacarosa convertida, éste fue mayor que con **Bnz**. Lo anterior nos permite concluir que el **4mPh**, al igual que los otros fenoles es un mejor aceptor que los alcoholes primarios evaluados, como se muestra en la tabla 5 para 500 mM

de **4mPh**, pero que la naturaleza química de este sustrato induce una pérdida de actividad de la BS-LVS.

En conclusión, la levansacarasa BS-LVS permitió una producción de fructósidos (*i.e.*, 30 mM **Fru-Hq**) mayor a la que se ha reportado previamente para compuestos fenólicos (4 mM) con otras levansacarasas (Kang *et al.*, 2009), lo cual coloca a BS-LVS como un biocatalizador con aplicaciones muy interesantes.

7.6 Influencia de la nucleofilia del aceptor en la reacción de fructosilación

Con el fin de explicar la preferencia de BS-LVS para fructosilar fenoles con mayor facilidad que los alcoholes primarios, se realizó una reacción de aceptor con alcohol 4-hidroxibencílico (**4HB**) que contiene un hidroxilo aromático y uno alifático, permitiendo una comparación directa de la selectividad en función de la diferente naturaleza de los grupos hidroxilo. La reacción se llevó a cabo en un medio saturado de **4HB** 200 mM (su solubilidad en agua es de 54 mM a 20 °C) y el resto de las condiciones de reacción se mantuvieron sin cambio. Se encontraron dos diferentes productos de fructosilación **Fru₁-4HB** y **Fru₂-4HB** que corresponden a la fructosilación de **4HB** en el -OH primario y el aromático, respectivamente, como se confirmó por HPLC y RMN.

El análisis cinético de la reacción permitió determinar una velocidad inicial de síntesis de **Fru₂-4HB** diez veces superior ($50.64 \mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$) que la velocidad inicial para la formación de **Fru₁-4HB** ($5.03 \mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$). Lo anterior demuestra que el -OH fenólico es más susceptible de actuar como nucleófilo que el -OH primario (Figura 24).

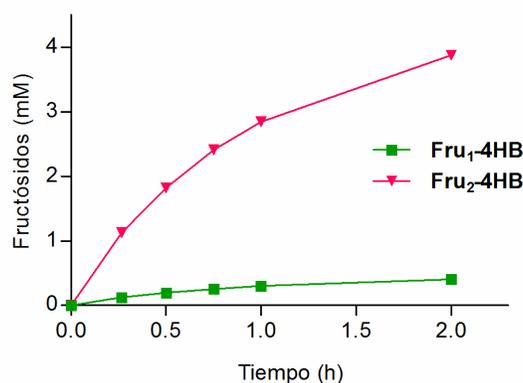


Figura 24. Evolución de la formación de productos de fructosilación de 4HB por BS-LVS. Condiciones de reacción: 400 mM sacarosa, 200 mM **4HB**, 5 U mL⁻¹ a 30 °C.

Es importante recordar que, de acuerdo con el mecanismo propuesto para BS-LVS (Meng y Fütterer, 2003; Chambert *et al.*, 1974) (Figura 11), en la segunda etapa de la reacción la molécula

aceptora cede un protón, formando un nucleófilo activado que realiza el ataque nucleofílico sobre el C2 de la fructosa, generando así el nuevo enlace glicosídico. Considerando que un hidroxilo desprotonado es mejor nucleófilo que su especie no-desprotonada correspondiente, la capacidad de la molécula aceptora para ceder su protón y, en consecuencia aumentar su nucleofilia, sería un paso crítico en el proceso. De manera general, esta capacidad de desprotonación de una molécula se asocia a su valor de pKa, en donde un valor bajo de pKa indica una mayor facilidad de la molécula para desprotonarse.

Para abundar en la explicación de la diferencia de reactividad de los alcoholes evaluados como aceptores, se calcularon sus valores de nucleofilia (ω^-) (Jaramillo *et al.*, 2009; Jaramillo *et al.*, 2006) y se relacionaron con sus valores de pKa reportados. En la tabla 5 puede observarse que los valores de ω^- de las especies desprotonadas son del mismo orden de magnitud tanto para alcoholes aromáticos como para alcoholes alifáticos. Sin embargo, se observó una relación inversa entre el rendimiento de fructosilación y el pKa del aceptor. Esta relación se confirmó con la fructosilación de **4HB** en el hidroxilo aromático (pKa = 9.48; ω^- = 0.0041), que ocurre 10 veces más rápido que en el hidroxilo primario (pKa = 15.21; ω^- = 0.009). Estos datos indicaron que si bien la nucleofilia de los alcoholes fenólicos y de los alcoholes primarios (en especies desprotonadas) fue similar, la facilidad con la que se forman estas especies desprotonadas no es la misma. Así, si la formación de las especies desprotonadas depende fuertemente de su valor de pKa, los hidroxilos fenólicos formarían especies desprotonadas más fácilmente que los hidroxilos primarios. De esta manera, la alta reactividad de los grupos fenólicos sería el resultado de la facilidad que tienen estas moléculas para ser desprotonados a nivel del sitio activo y, como consecuencia, su capacidad para activarse como nucleófilos sería superior.

Tabla 5. Nucleofilia (ω^-) y valores de pKa para los diferentes aceptores evaluados.

Aceptor	pKa	Nucleofilia (ω^-) ^a	Rendimiento en fructosilación (%) ^b
butanol	16.95	0.0194	1.91
alcohol bencílico	15.20	0.0102	0.81
4-metoxifenol	9.94	0.0065	6.25
hidroquinona	9.68	0.0104	9.51
catecol	9.34	0.0080	6.86
resorcinol	8.91	0.0066	11.70

^a Nucleofilia calculada para las especies desprotonadas.

^b Rendimiento relativo a la conversión de sacarosa, usando 500 mM aceptor y 400 mM sacarosa.

Estos resultados sugieren que en el mecanismo de BS-LVS, la mayor acidez de los compuestos fenólicos facilita la pérdida del protón del hidroxilo, particularmente en el microambiente básico del sitio catalítico de BS-LVS (cuando el Glu342 se encuentra desprotonado), convirtiendo a los compuestos fenólicos mejores aceptores y generando una mayor eficiencia en la fructosilación con BS-LVS.

Finalmente, es importante señalar que cinco de los nueve fructósidos sintetizados (Figura 25) no se habían reportado previamente, ni sintéticos ni de fuentes naturales (base de datos SciFinder).

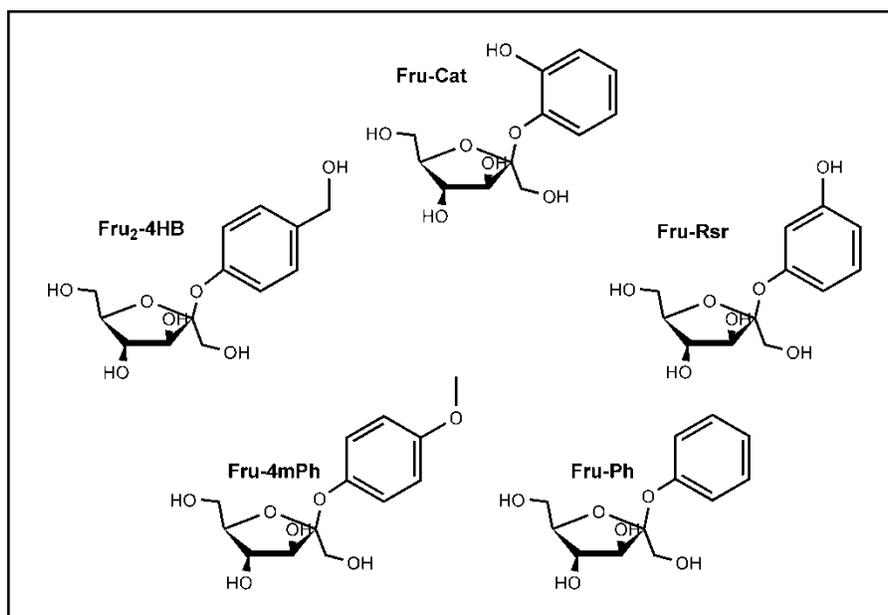


Figura 25. Fructósidos de fenoles sintetizados enzimáticamente por BS-LVS y reportados por primera vez (fuente: base de datos SciFinder).

A partir de los resultados de esta sección se publicó el artículo:

Mena-Arizmendi, A; Alderete, J; Águila, S; Marty, A; Miranda-Molina, A; López-Munguía, A y Castillo, E. (2011). "Enzymatic fructosylation of aromatic and aliphatic alcohols by *Bacillus subtilis* levansucrase: Reactivity of acceptors". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 70, 41-48. Ver Apéndice.

SECCIÓN II. Optimización de la reacción de fructosilación de hidroquinona

Uno de los principales objetivos del proyecto fue el desarrollar una herramienta eficiente de glicosilación de moléculas fenólicas. En este sentido y de acuerdo con la evolución de la producción del fructósido (Figura 17), se observó que la máxima velocidad de síntesis de fructósido se da al inicio de la reacción, cuando la concentración de sacarosa es máxima y no existen otros productos de reacción. En las condiciones de reacción correspondientes a la fructosilación de **Hq** con la enzima BS-LVS (500 mM Hq, 400 mM sacarosa y 5 U mL⁻¹), la concentración de **Fru-Hq** obtenida fue de 30-35 mM (aproximadamente un rendimiento de 7 % respecto a **Hq** inicial).

Es importante mencionar que, si bien en estas condiciones se logró la concentración más alta de fructósido de **Hq**, se observó que el fructósido producido puede ser hidrolizado, siendo esta hidrólisis mayor en ausencia de sacarosa (Figura 18). Tomando en cuenta estas observaciones, en una primera etapa se planteó el diseño de un sistema de reacción en donde se mantuviera la concentración de sacarosa constante (concentración suficientemente alta para disminuir hidrólisis de **Fru-Hq**) y evaluar el curso de la producción de fructósido en esas condiciones.

7.7 Reacción de aceptor en lote alimentado

El primer planteamiento del sistema de reacción consideró mantener una concentración constante de sacarosa de 400 mM (concentración inicial de sacarosa para una reacción en lote). Esto se logró mediante la alimentación continua de una solución de sacarosa al 60 % a un lote de reacción, durante 24 horas. El flujo de alimentación se determinó considerando la velocidad inicial de consumo de sacarosa observada en una reacción control en lote (con 400 mM de sacarosa y sin alimentación de la misma). Las concentraciones de **Hq** y de enzima iniciales fueron de 500 mM y 5U mL⁻¹, respectivamente. La reacción se realizó por duplicado y se monitoreó durante 24 horas. En todas las muestras de ambos lotes se cuantificó la acumulación total de **Fru-Hq**. De manera similar a los experimentos previamente reportados, el rendimiento se calculó en función de la cantidad de **Hq** convertido en **Fru-Hq**.

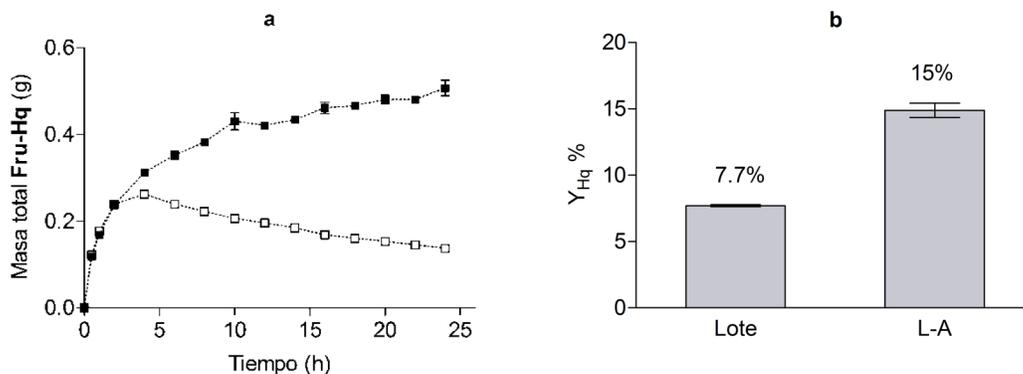


Figura 26. Reacción de aceptor con **Hq** catalizada por BS-LVS en lote y lote alimentado. (a) Producción total en masa de **Fru-Hq**. Reacción en lote (□) y Reacción en lote alimentado (■). (b) Rendimiento respecto a **Hq** inicial, (L-A) lote alimentado.

En la figura 26 se muestra gráficamente el proceso de formación de fructósido en ambos sistemas, donde se observa que la producción total de fructósido se duplicó en la reacción en lote alimentado, respecto al máximo obtenido en la reacción control en lote. Es evidente que el mantener la concentración de sacarosa lo suficientemente alta, favoreció notablemente la síntesis de fructósido. De estos resultados se puede sugerir que el aumento en la acumulación de **Fru-Hq** se debió en buena medida a que se mantuvo una disponibilidad alta del sustrato donador y además que esta concentración alta disminuyó la velocidad de hidrólisis del producto.

Al analizar de manera más detallada la distribución de productos en intervalos cortos de reacción en el lote alimentado (cada 2h), se observó una tendencia que favorece claramente la síntesis de polímero (Figura 27).

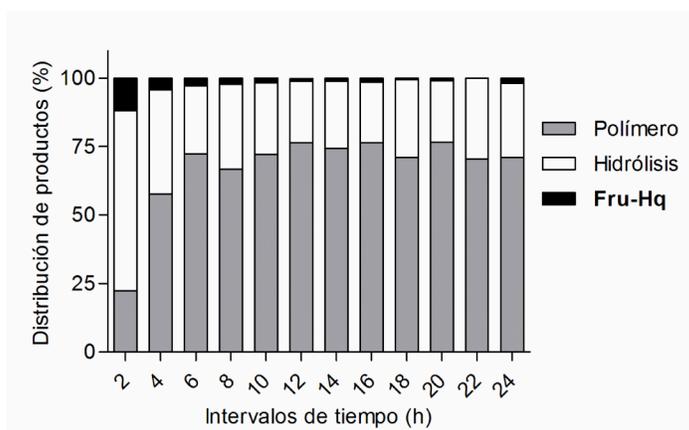


Figura 27. Distribución de la sacarosa consumida entre los diferentes productos de la reacción con **Hq** en lote alimentado, catalizada por BS-LVS. Porcentaje de transferencia a polímero (barras grises), al agua (barras blancas, hidrólisis) o al aceptor **Hq** (barras negras). El porcentaje de transferencia está calculado con base en la conversión de sacarosa en intervalos de 2 horas.

En los tiempos iniciales del proceso la mayor parte de la sacarosa se transfiere al agua (barras blancas) o a polímero (barras grises) y una fracción menor se transfiere al aceptor **Hq** (barras negras). Sin embargo, este porcentaje de transferencia al aceptor, aunque minoritario, alcanza su valor máximo al inicio de la reacción (2 h de reacción). A medida que transcurre el proceso, la proporción de sacarosa que se utiliza para transferir al aceptor disminuye, al igual que la transferencia al agua, mientras que la transferencia a polímero se vuelve más importante. Este comportamiento sugiere que el polímero o fructooligosacáridos recién sintetizados resultan tener mayor afinidad por la enzima para actuar como aceptores, comparados con la **Hq** e incluso con el agua. Reportes previos mencionan esta afinidad de la levansacarasa de *B. subtilis* C4 hacia el polímero, evaluada en reacciones utilizando únicamente sacarosa como sustrato (Euzenat *et al.*, 1997). Los autores reportan que a medida que transcurre la reacción, el porcentaje de transferencia al agua se reduce. Alternativamente, esto podría deberse a un mecanismo procesivo en el que una vez que empieza a sintetizarse la levana, ésta no se separa de la enzima hasta que ha alcanzado cierto tamaño (Ozimek *et al.*, 2006b).

Es importante señalar que a lo largo de la reacción también se acumulan otros productos, tales como la fructosa y glucosa libres o incluso el mismo fructósido, los cuales podrían tener un efecto en la reacción de aceptor. Bajo estas consideraciones se decidió estudiar el efecto de todos los productos de la reacción en la eficiencia de la reacción de fructosilación de **Hq**.

7.8 Efecto de monosacáridos y Fru-Hq en la eficiencia de la reacción de aceptor

Para evaluar el efecto de los monosacáridos y del **Fru-Hq** sobre la síntesis de éste último, se llevaron a cabo reacciones de aceptor con 500 mM de **Hq**, 400 mM de sacarosa y 5 U mL⁻¹ de enzima, en presencia de diferentes concentraciones iniciales de glucosa, fructosa y **Fru-Hq**.

Los monosacáridos se evaluaron en tres diferentes concentraciones iniciales: 200, 400 y 800 mM, siendo ésta última la máxima concentración de glucosa alcanzada en un lote alimentado. El efecto del **Fru-Hq** se evaluó en 35 mM inicial, cantidad cercana al máximo de producción observada en una reacción en lote. Las reacciones se analizaron a las 4 horas de reacción mediante HPLC. Todos los experimentos se compararon con reacciones control en ausencia de glucosa, fructosa y/o **Fru-Hq**.

En la reacción con 35 mM inicial de **Fru-Hq** únicamente se sintetizaron 14 mM más de fructósido, aproximadamente el 50 % respecto al obtenido en el control (Figura 28) y el nivel de sacarosa convertida fue el mismo que en el control, por lo tanto se concluyó que no tuvo un efecto sobre la actividad global de la enzima.

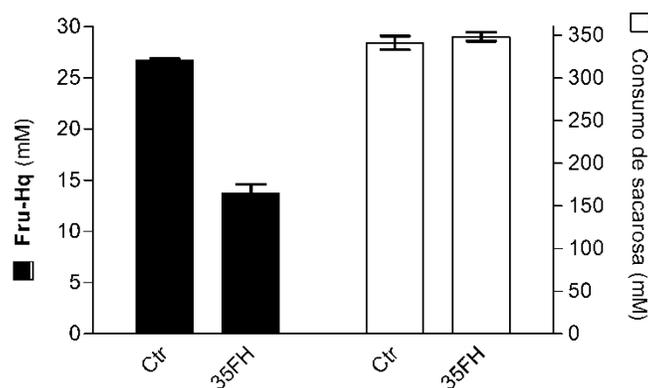


Figura 28. Efecto de **Fru-Hq** en la actividad global de BS-LVS y la actividad de síntesis de **Fru-Hq**. Barras negras corresponden a la producción de **Fru-Hq**, las barras blancas corresponden a la cantidad de sacarosa convertida. (Ctr) Reacción con 500 mM Hq, 400 mM sacarosa y 5 U mL⁻¹ BS-LVS; (35FH) reacción con 35 mM iniciales de **Fru-Hq**.

Cabe recordar que el fructósido es susceptible de hidrólisis catalizada por la enzima, por lo cual podemos suponer que la baja producción de **Fru-Hq** en estas condiciones podría deberse a un compromiso entre su síntesis y su hidrólisis. De manera que, la cantidad de fructósido que se puede obtener se ve limitada como consecuencia de este control cinético.

En el caso de las reacciones en presencia de concentraciones iniciales de fructosa, se observó una ligera reducción en la producción de **Fru-Hq** en reacciones con alta concentración de fructosa (Figura 29) sin afectar la conversión de sacarosa, indicando que la fructosa tampoco afecta de manera significativa la actividad global de la enzima. Probablemente, la presencia de una alta concentración de fructosa interfiere con la transferencia al aceptor debido a la gran cantidad de solutos en el sistema, reflejándose en una ligera disminución en la producción del fructósido; sin embargo este efecto sólo es visible en concentraciones muy altas de fructosa que son poco probables de encontrar en el medio de reacción.

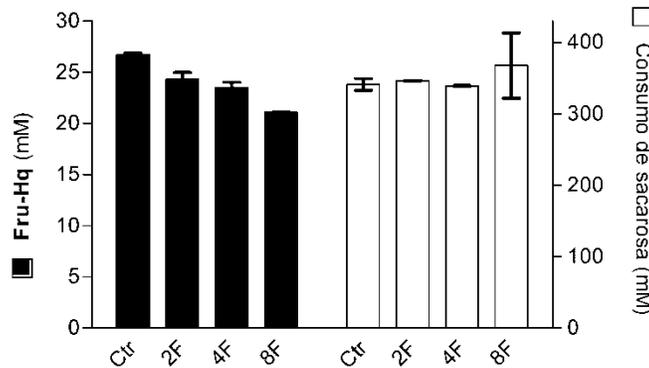


Figura 29. Efecto de la fructosa en la síntesis de **Fru-Hq** y la actividad global de BS-LVS. Las barras negras corresponden a la producción de **Fru-Hq**, las barras blancas corresponden a la sacarosa convertida. (Ctr) Reacción con 500 mM Hq, 400 mM sacarosa y 5 U mL⁻¹ BS-LVS; (2F, 4F y 8F) reacciones con 200, 400 y 800 mM iniciales de fructosa, respectivamente.

Finalmente, en las reacciones en presencia de glucosa la producción de **Fru-Hq** disminuyó hasta un 50 % respecto al control cuando se evaluaron altas concentraciones iniciales de glucosa. Contrario a los experimentos con **Fru-Hq** y fructosa en este caso se observó una reducción importante en la conversión de sacarosa (Figura 30). Estos resultados indicaron que la glucosa afecta no sólo la síntesis de fructósido, sino además la actividad global de la enzima.

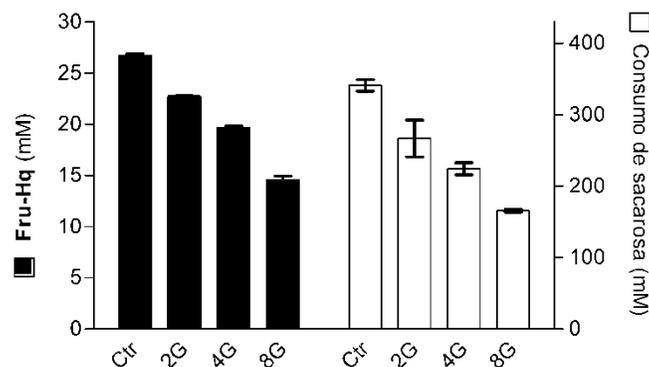


Figura 30. Efecto de la glucosa en la actividad de síntesis de **Fru-Hq** y actividad global de BS-LVS. Barras negras, producción de **Fru-Hq**; barras blancas, conversión de sacarosa. (Ctr) Reacción control con 500 mM Hq, 400 mM sacarosa y 5 U mL⁻¹ BS-LVS; (2G, 4G y 8G) reacciones con 200, 400 y 800 mM de glucosa inicial, respectivamente.

En diferentes fuentes de la literatura, se ha reportado que la glucosa actúa como inhibidor de levansacarosas de diferentes microorganismos, tales como *Zymomonas mobilis* (Lyness y Doelle, 1983), *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola (Hettwer *et al.*, 1995), *B. subtilis* C4 (Euzenat *et al.*, 1998) y *B. subtilis* DSM 347 (Szwengiel *et al.*, 2007). El tipo de inhibición ejercida por la glucosa no

está completamente definida ya que en algunos reportes se habla de una inhibición alostérica o no competitiva (Szwengiel *et al.*, 2007; Hettwer *et al.*, 1995), e incluso se dice que el efecto inhibitorio es generado por una reacción de intercambio (Euzenat *et al.*, 1997) descrita por la ecuación 5:



Donde G-F = sacarosa, G y G* = glucosa y F = fructosa.

Para corroborar el efecto inhibitorio de la glucosa, se realizó la caracterización cinética de BS-LVS midiendo la actividad enzimática en reacciones con 0.5 U mL^{-1} de enzima y desde 5 a 200 mM del sustrato sacarosa, en presencia de 0, 10, 25 y 35 mM de glucosa inicial para cada concentración de sacarosa. La velocidad inicial se determinó midiendo la liberación de glucosa en los primeros 20 minutos de reacción. La medición se llevó a cabo mediante un electrodo de glucosa implementado en el equipo YSI 2700 SELECT (ver sección 4.19).

En la Figura 31 se muestra el efecto de la glucosa sobre la velocidad de BS-LVS. Mediante un ajuste a diferentes modelos de inhibición utilizando el software GraphPad Prism versión 5.03, se encontró que el comportamiento se ajusta mejor al modelo de inhibición no competitiva. Mediante la representación de Lineweaver-Burk (que por sí misma puede generar más error) muestra que casi todas las rectas generadas cruzan a la izquierda del eje “y”, por arriba de la abscisa. El término inhibición no competitiva, suele restringirse a los casos en donde las rectas se cruzan en el eje “x”; en los casos en que ocurre esta variación con la intersección por arriba o por debajo de la abscisa se le denomina inhibición mixta, para hacer esta distinción (Morrison, 2001).

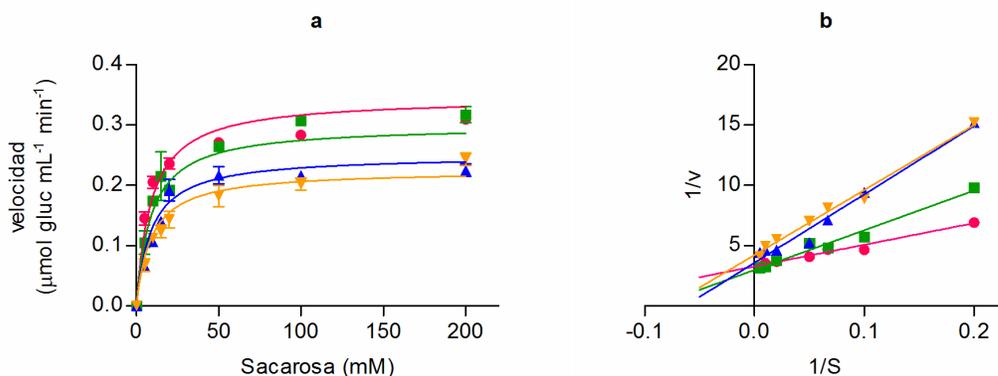


Figura 31. Inhibición de BS-LVS por glucosa. (a) Cambio de velocidad en función de la concentración de sustrato a diferentes concentraciones del inhibidor glucosa. (b) Representación Lineweaver-Burk. Concentraciones de glucosa inicial como inhibidor: (●) 0 mM, (■) 10 mM, (▲) 25 mM y (▼) 35 mM.

Este estudio cinético y la baja conversión de sacarosa observada en los experimentos en lote con glucosa inicial (Figura 30) confirman que, efectivamente, la glucosa ejerce un efecto inhibitorio sobre BS-LVS y que esta inhibición puede contribuir de manera importante a la reducción en la producción de **Fru-Hq**. De hecho, la inhibición por glucosa afectaría de manera global la actividad de BS-LVS, volviendo todo el proceso más lento. Bajo estos argumentos, sería deseable eliminar la glucosa generada en un lote alimentado de manera que su efecto negativo pudiera ser abatido y en consecuencia ayudar a que la eficiencia de la enzima sea máxima.

Resulta interesante señalar que, a pesar de la alta concentración de glucosa liberada en el lote alimentado, la velocidad de aparición de glucosa permanece prácticamente constante durante el curso de la reacción. Este comportamiento pudiera hacer pensar que bajo las condiciones de este proceso, el efecto inhibitorio de la glucosa sobre la capacidad catalítica de la enzima no existe (Figura 32).

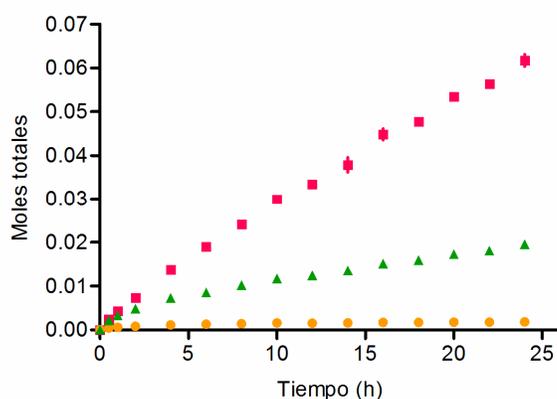


Figura 32. Proceso de formación de productos de la reacción en lote alimentado catalizada por BS-LVS. (■) Glucosa, (▲) fructosa y (●) **Fru-Hq**. Condiciones de reacción 500 mM **Hq**, 5 U mL⁻¹ BS-LVS manteniendo sacarosa constante en 400 mM. Cantidades expresadas en moles totales para eliminar el factor de la dilución.

Sin embargo, para explicar este comportamiento es pertinente hacer algunas precisiones. En primer lugar, se debe considerar que hacia el final del lote alimentado, el mayor porcentaje de sacarosa se dirigió a la producción de polímero (Figura 27), hecho que se confirma en la Figura 32 al observarse una proporción de glucosa liberada muy elevada con respecto a la concentración de fructosa libre y de **Fru-Hq**. En efecto, la mayor proporción de la fructosa proveniente de la sacarosa fue utilizada para la síntesis de polímero, esto coincidiendo con una acumulación proporcional de glucosa liberada, con una baja concentración de **Fru-Hq** y con un bajo porcentaje

de productos de hidrólisis (poca fructosa libre). Cabe mencionar que en el estudio cinético, el efecto inhibitorio se analizó en términos de la velocidad global de transformación de la sacarosa. En este estudio no se realizó la medición independiente de cada una de las velocidades de reacción presentes en el lote alimentado, esto es, formación de levana, síntesis de **Fru-Hq** e hidrólisis. De manera que, si bien al final del proceso en un lote alimentado podría existir una reducción de la velocidad global generada por la acumulación constante de glucosa, este efecto sólo es perceptible de manera clara en las reacciones de hidrólisis y de síntesis de **Fru-Hq**. La pregunta natural sería: ¿por qué no se observa también una marcada reducción sobre la síntesis de polímero? Es necesario recordar que a lo largo del proceso existe la acumulación constante de fructooligosacáridos y de levana, productos que se han reportado como aceptores de alta afinidad por la enzima (Euzenat *et al.*, 1997; Chambert *et al.*, 1974), por lo cual su presencia en la reacción podría estar generando un aumento en la capacidad catalítica de BS-LVS para la síntesis del polímero levana.

En resumen, la acumulación de glucosa así como la actividad de transferencia hacia el polímero podría ser la principal limitante en la fructosilación de **Hq**, por lo tanto, una estrategia para favorecer la síntesis de **Fru-Hq** sería evitar la formación de FOS y en consecuencia, de polímero.

7.9 Evaluación de mutantes de BS-LVS en reacciones de aceptor

Con el fin de explorar la posibilidad de mejorar la síntesis de **Fru-Hq** mediante la reducción de la síntesis de polímero, se estudió el comportamiento de algunas mutantes de BS-LVS generadas en nuestro laboratorio (Ortiz-Soto *et al.*, 2008) cuya especificidad hidrólisis/transferencia se ha visto modificada. Las mutantes de BS-LVS seleccionadas para el estudio en reacciones utilizando como sustrato aceptor a la **Hq** fueron R433A, H243L y Y429N las cuales resultaron con un porcentaje de transferencia de la fructosa hacia la síntesis de polímero (o FOS) del 22, 20 y 5 % respectivamente (Tabla 6). A manera de referencia, también se incluyeron en el estudio a la mutante I341V cuya especificidad hidrólisis/transferencia es prácticamente la misma que presenta la enzima silvestre y la mutante S164A, la cual transfiere más a polímero que la silvestre. De hecho, al presentar la mutante S164A un aumento más pronunciado de su actividad en presencia de levanas de bajo peso molecular (Ortiz-Soto *et al.*, 2008), se esperaría un efecto negativo en la fructosilación de **Hq**. Las mutantes se utilizaron en la forma de extractos enzimáticos y se evaluaron en reacciones de aceptor con 500 mM de **Hq**, 400 mM de sacarosa y 5 U mL⁻¹ de enzima. En el estudio se incluyó como control la reacción con la enzima silvestre heteróloga para verificar que no existiera

diferencia respecto a BS-LVS por el sistema de expresión. Las reacciones se dejaron transcurrir durante 12 horas y se cuantificaron por HPLC.

Tabla 6. Parámetros cinéticos y estabilidad térmica de la levansacarasa de *B. subtilis* y las mutantes seleccionadas. Datos tomados de Ortiz-Soto *et al.* (2008).

Enzima	Relación hidrólisis/ transferencia	K_M (mM sacarosa)	kcat (s^{-1})	kcat/ K_M ($s^{-1} mM^{-1}$)	$t_{1/2}$ (min)
Silvestre	55/45	8	164.6	20.3	52
S164A	40/60	2.5	6.4	2.5	628
I341V	54/46	7.4	166.3	22.6	31.4
R433A	80/20	29.3	87.5	2.98	16
H243L	78/22	10.5	141.5	13.5	7.9
Y429N	95/5	319.4	6.3	0.02	47.04

Al analizar el comportamiento de las mutantes, se encontró que todas las variantes de BS-LVS fueron capaces de fructosilar **Hq** (a), sin embargo, prácticamente todas mostraron una producción de **Fru-Hq** inferior a BS-LVS. De hecho, la única mutante que produjo un ligero incremento en la producción de **Fru-Hq** respecto a BS-LVS (y la silvestre heteróloga) fue Y429N, que es la mutante más hidrolítica (Tabla 6). Este resultado sugiere que la actividad de transferencia hacia el aceptor no se ve interferida por la actividad polimerasa que, de no existir la mutación, estaría destinada a la producción de polímero, comportamiento que puede representar una ventaja en la síntesis de **Fru-Hq**. En contraste, la mutante más transferasa S164A, que es más eficiente para producir polímero, produjo la menor cantidad de **Fru-Hq**. Con la mutante I341V no se observó una diferencia respecto al control, mientras que con las mutantes hidrolíticas R433A y R243L la producción fue ligeramente más baja. Sin embargo, con éstas dos últimas mutantes, la conversión de sacarosa fue menor al 70 % (Figura 33b), lo cual podría indicar una baja estabilidad en presencia de la alta concentración de **Hq** y que coincide con su baja estabilidad a la temperatura (tabla 6). Cabe señalar que si se calcula el rendimiento de **Fru-Hq** respecto a la sacarosa convertida encontramos que con las tres mutantes hidrolíticas o poco polimerasas (R433A, R243L y Y429N) se obtiene un rendimiento mayor que en las reacciones control. Este hecho, junto con el bajo rendimiento de **Fru-Hq** con la mutante más transferasa S164A, refuerzan la hipótesis de que la transferencia hacia polímero representa la principal limitante para la reacción de fructosilación de **Hq**.

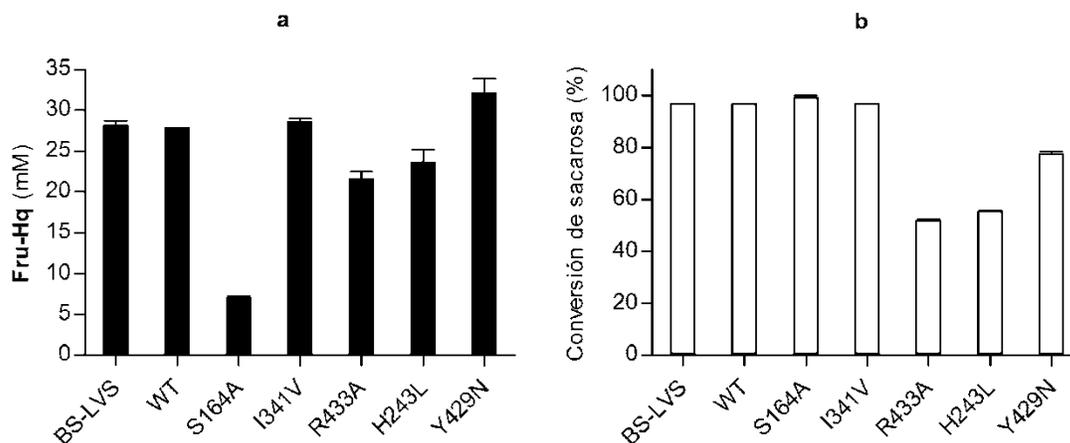


Figura 33. Evaluación de las mutantes de BS-LVS en reacciones de aceptor con Hq. (a) Producción de fructósido **Fru-Hq** (mM). (b) Conversión de sacarosa (%). Reacciones con 400 mM sacarosa, 500 mM **Hq**, 5 U mL⁻¹ por 12 h a 30 °C.

Bajo estos argumentos, se seleccionó a la mutante Y429N y para un estudio más detallado de la reacción de aceptor con **Hq**, dada su mayor estabilidad y rendimiento de **Fru-Hq** comparados con las otras mutantes hidrolíticas.

7.10 Reacción de aceptor con Y429N en lote y en lote alimentado

Dado que en secciones anteriores se puso en evidencia que la reacción en lote alimentado presentaba ventajas sobre la reacción en lote, la mutante Y429N se evaluó en la reacción de aceptor en lote alimentado. De cualquier manera se realizaron reacciones en lote utilizando a la mutante Y429N como referencia para estimar el potencial de la mutante. Las reacciones se llevaron a cabo en las mismas condiciones descritas en la sección 7.7 para la enzima silvestre BS-LVS.

Los resultados de la reacción en lote alimentado mostraron un incremento más del doble de **Fru-Hq** respecto a la reacción en lote (Figura 34a). Es importante subrayar que en el sistema en lote alimentado, la enzima Y429N fue más eficiente al producir 21 % más fructósido que la silvestre. Asimismo, al comparar los dos sistemas de reacción utilizando la mutante Y429N se observa que el rendimiento de **Fru-Hq**, con respecto a la hidroquinona inicial (Y_{Hq}) paso del 7 %, para la reacción en lote, al 18 % en la reacción en lote alimentado (Figura 34b).

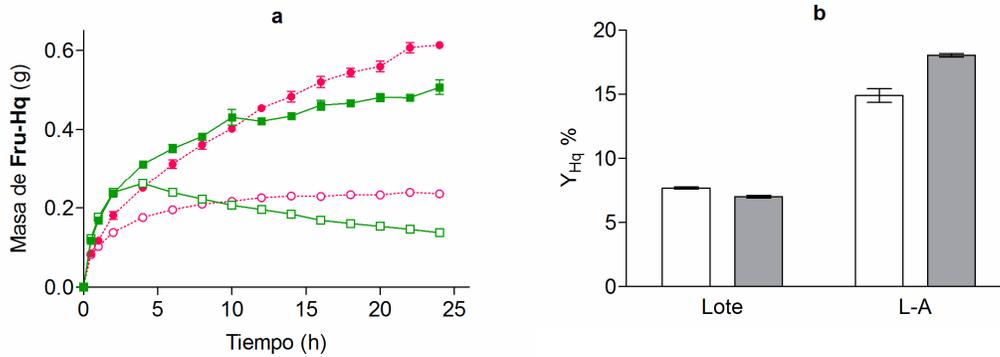


Figura 34. Producción de **Fru-Hq** en reacción en lote y lote alimentado (L-A). (a) Producción de **Fru-Hq** en los diferentes sistemas de reacción expresada en masa total: Reacciones en lote BS-LVS (\square) y Y429N (\circ); reacciones en lote alimentado con BS-LVS (\blacksquare) y Y429N (\bullet). (b) Rendimiento de **Fru-Hq** respecto a **Hq** inicial (Y_{Hq}). Barras blancas, reacciones con BS-LVS; barras grises, reacciones con la mutante Y429N. Condiciones iniciales 500 mM **Hq**, 400 mM sacarosa, 5 U mL⁻¹ de enzima.

Dos observaciones importantes cuando se compararon las reacciones en lote con la BS-LVS silvestre y la mutante Y429N fueron, por un lado, que la reacción con la mutante no presenta una caída en la concentración de **Fru-Hq** a lo largo de la reacción, sugiriendo que la mutante podría tener un efecto hidrolítico menor sobre el fructósido. Por otro lado, si bien el incremento en la producción de **Fru-Hq**, es claramente superior cuando se utiliza la mutante Y429N, su velocidad de síntesis (cambio en la pendiente de formación de **Fru-Hq** respecto al tiempo) disminuyó a lo largo del curso de la reacción, aunque en menor medida que como sucede con la BS-LVS silvestre. Buscando una explicación a este comportamiento, se caracterizó también a la mutante en cuanto a su capacidad para hidrolizar al fructósido, así como su susceptibilidad a inhibición por glucosa.

7.11 Estudio de hidrólisis de Fru-Hq y de inhibición de Y429N por glucosa

La mutante Y429N se caracterizó en cuanto a su capacidad para hidrolizar al fructósido en las condiciones empleadas para la silvestre. Se encontró que la mutante Y429N hidroliza también al fructósido y que en presencia de sacarosa la velocidad de hidrólisis de **Fru-Hq** no disminuyó, a diferencia de como sucede con la silvestre (Figura 35). Esto puede deberse a que la mutante tiene una afinidad por la sacarosa mucho menor que la silvestre (K_M de 319 y 8 mM respectivamente). No obstante, el empleo de la mutante Y429N podría representar una ventaja respecto a la BS-LVS silvestre ya que ésta última hidroliza **Fru-Hq** a una velocidad inicial 2.3 veces mayor.

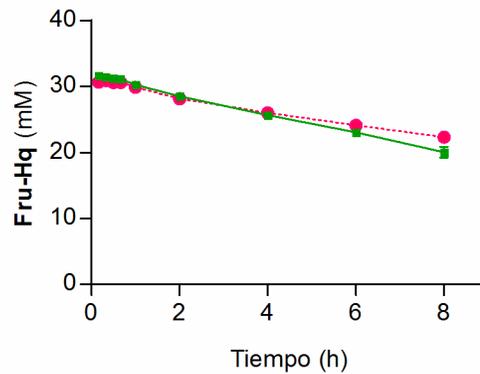


Figura 35. Hidrólisis de **Fru-Hq** catalizada por Y429N. (■) Reacción con **Fru-Hq** puro; (●) reacción con **Fru-Hq** y 400 mM de Sacarosa.

Estos datos coinciden con el hecho de que en una reacción en lote con la mutante Y429N a tiempos largos no se observa una caída de la concentración del fructósido producido, como se ha observado que ocurre con la silvestre (Figura 34a). Es importante señalar que la velocidad de hidrólisis de fructósido con BS-LVS en presencia de sacarosa es semejante a la velocidad de hidrólisis con Y429N en cualquier condición (con o sin sacarosa, figuras 18 y 35). En consecuencia, se esperaría que en una reacción en lote alimentado, la cantidad de **Fru-Hq** que pueda perderse por hidrólisis fuera aproximadamente la misma con ambas enzimas.

Por otro lado, la mutante Y429N también presentó un efecto inhibitorio por glucosa. Sin embargo, el efecto inhibitorio de la glucosa fue menor que con la enzima silvestre ($K_{i(\text{BS-LVS})} \approx 50 \text{ mM}$; $K_{i(\text{Y429N})} \approx 150 \text{ mM}$).

El conjunto de resultados presentados a lo largo de esta sección nos permitieron identificar los diversos factores que limitan la síntesis del fructósido. 1) Hidrólisis del fructósido, 2) inhibición por glucosa, 3) presencia de oligosacáridos en el sistema que compiten con **Hq** como aceptores y 4) mayor preferencia de la enzima para transferir al agua que a **Hq**. Si bien algunas estrategias para resolver estas limitaciones fueron presentadas, es claro que estas mismas pueden ser optimizadas y en consecuencia mejorar la eficiencia del proceso. Sin embargo, cabe resaltar que tanto con BS-LVS como con la mutante Y429N, las cantidades y rendimientos de **Fru-Hq** obtenidos están muy por arriba de otras levansacarosas reportadas (Kang *et al.*, 2009). En efecto, con el empleo de la mutante Y429N en un sistema en lote alimentado, se ha logrado mejorar el rendimiento hasta 18 %, gracias a la baja transferencia hacia polímero o FOS.

7.12 Fructosilación de aminoácidos y flavonoides

Como último objetivo del proyecto se planteó explorar la posibilidad de fructosilar otros compuestos diferentes a los azúcares, tales como aminas. Se puso un interés especial en los aminoácidos, y tioles, tomando en cuenta que estos grupos funcionales contienen un protón que podrían donar para participar en el mecanismo de BS-LVS (Figura 11). Para la selección de las moléculas se consideró que el pKa del aceptor juega un papel muy importante en la eficiencia de fructosilación con alcoholes aromáticos y alifáticos (Tabla 5). Dado el carácter básico de las aminas, al pH al cual se lleva a cabo la reacción (pH= 6.0) el grupo amino se encuentra protonado ($-\text{NH}_3^+$) reduciendo su nucleofilia. De hecho, se evaluaron diferentes aminas alifáticas y aminoácidos en reacciones de aceptor con la BS-LVS y no se encontró ningún producto de fructosilación. Por otro lado, las aminas aromáticas (anilinas) poseen valores de pKa muy bajos (alrededor de 5), sin embargo, estos compuestos son reactivos por sí mismos y en presencia de glucosa ocurre la formación de un enlace glicosídico de manera espontánea, que se conoce como reacción de Amadori (Glinskii, 1998).

Durante la evaluación de la reacción con aminoácidos, se incluyó a la tirosina, que posee un grupo fenólico en su cadena lateral. Sin embargo no se encontró ningún producto de fructosilación, probablemente debido a la baja solubilidad de la tirosina en agua (2.6 mM), de manera que la reacción podría estar limitada por la disponibilidad del sustrato. Por tal motivo, se evaluaron como aceptores un derivado de tirosina y compuestos de estructura similar a ésta, pero con mayor solubilidad en agua (Figura 36).

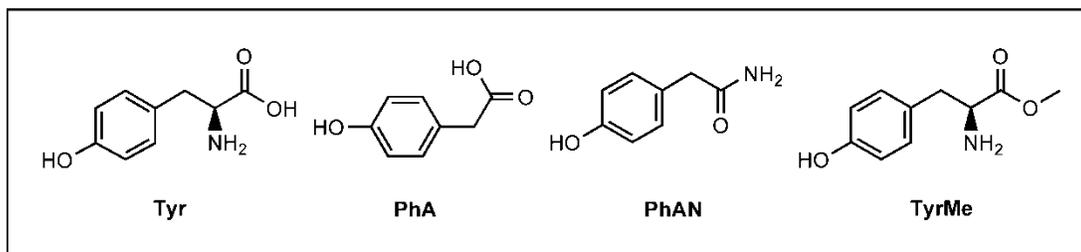


Figura 36. Derivados de tirosina evaluados en la reacción de aceptor con BS-LVS. L-tirosina (**Tyr**), ácido 4-hidroxifenilacético (**PhA**), 4-hidroxifenilacetamida (**PhAN**), L-tirosina metil éster (**TyrMe**)

En los tres casos se identificaron productos de fructosilación mediante análisis cualitativo en TLC (Figura 37). Aunque los productos no se purificaron y no se confirmó su estructura química, es de

suponer que la fructosilación se haya realizado sobre el hidroxilo fenólico, donde la BS-LVS ha demostrado ser eficiente.

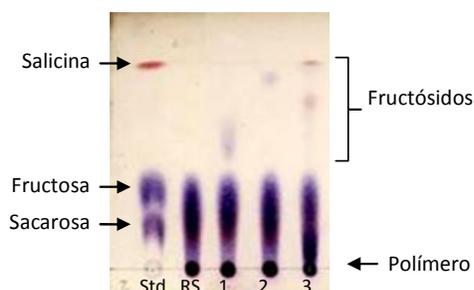


Figura 37. Análisis de TLC de las reacciones de aceptor con derivados de tirosina a las 24 horas de reacción. Std) Salicina, fructosa y sacarosa; RS) reacción control con sacarosa; (1) reacción con **PhA**, (2) con **PhAN** y (3) con **TyrMe**.

Entre otros compuestos que se evaluaron y que actúan como aceptores en la reacción catalizada por BS-LVS, se encuentran el mercaptoetanol y la L-epicatequina. Con el mercaptoetanol se identificaron cualitativamente por TLC dos productos de fructosilación, que probablemente correspondan a la fructosilación en el grupo $-OH$ o el $-SH$. Existen reportes sobre la fructosilación de tioles empleando una β -fructofuranosidasa (Nakano *et al.*, 2000) y una β -glucosidasa (Meulenbeld *et al.*, 2002), pero hasta el momento no tenemos conocimiento de ninguno con levansacarasa.

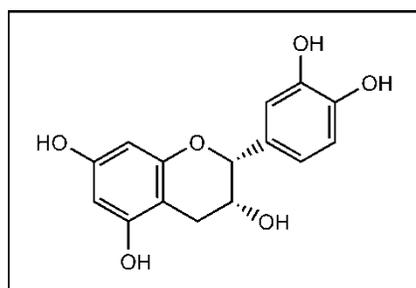


Figura 38. Flavonoide L-epicatequina

También con el aceptor L-epicatequina (Figura 38) se encontraron por TLC productos de fructosilación. Esto resulta interesante por la posibilidad de utilizar la glicosilación como estrategia de protección de moléculas sensibles a la oxidación, como lo son los antioxidantes. Hasta ahora, la epicatequina es el sustrato hidrofóbico de mayor peso molecular que se ha logrado glicosilar con esta enzima.

8 CONCLUSIONES

SECCIÓN I

Uno de los principales objetivos del proyecto fue seleccionar una fructosiltransferasa bacteriana, que fuera eficiente en reacciones de aceptor con moléculas hidrofóbicas. Entre las diferentes FTFs probadas, la enzima BS-LVS mostró el mejor desempeño, presentando la más alta actividad y eficiencia en las reacciones de fructosilación utilizando altas concentraciones de aceptores (500 mM). Considerando que una de las estrategias que usualmente se adoptan para favorecer la reacción de transferencia es el uso de altas concentraciones de aceptores, la alta estabilidad de la enzima BS-LVS en presencia de estas moléculas aumentan significativamente su potencial de aplicación

Es importante señalar que la enzima BS-LVS, almacenada en ausencia de sacarosa a concentraciones elevadas de aceptores (500 mM) sufre inactivación por **Hq**. Sin embargo, en las condiciones de operación, es decir en presencia de sacarosa, el efecto de inactivación se ve reducido considerablemente.

Se encontró además que la reacción de fructosilación catalizada por BS-LVS está sujeta a un control cinético, en donde la enzima es capaz de catalizar la hidrólisis del fructósido recién sintetizado. En reacciones de síntesis enzimática utilizando sustratos hidrofóbicos, una estrategia común para limitar las reacciones de hidrólisis y favorecer a la vez la solubilidad de este tipo de sustratos, es utilizar un co-disolvente orgánico. Esta estrategia, sin embargo, no resultó adecuada en el caso de la fructosilación de **Hq** catalizada por BS-LVS; pese a que la hidrólisis de sacarosa sí se redujo significativamente, el uso de 2M2P como co-disolvente disminuyó la formación del producto **Fru-Hq**. Este comportamiento resultó ser consecuencia de una reducción en la actividad termodinámica de **Hq** en el sistema con disolvente orgánico, tal y como fue establecido mediante cálculos teóricos utilizando COSMO-RS. Otros disolventes orgánicos miscibles con el agua reducen la actividad termodinámica de **Hq** en varios órdenes de magnitud respecto al sistema acuoso. Cabe señalar que la aplicación de esta herramienta teórica puede llegar a ser muy útil en la predicción y el diseño de reacciones de aceptor en medios orgánicos.

Las mejores condiciones generales de reacción utilizando BS-LVS se establecieron en 500 mM de aceptor, 400 mM de sacarosa y 5 U mL⁻¹ de enzima en sistema acuoso, condiciones en las cuales se evaluó la fructosilación de diferentes fenoles y alcoholes. De esta manera, se logró la producción

de un fructósido en la más alta concentración reportada hasta ahora con una fructosiltransferasa (30 mM). Cabe señalar que cinco de los nueve fructósidos de alcoholes y fenoles sintetizados (**Fru-Cat**, **Fru-Rsr**, **Fru-4mPh**, **Fru2-4HB** y **Fru-Ph**) no se habían reportado previamente. Se observó una mayor fructosilación utilizando compuestos fenólicos como aceptores al comparar con el uso de alcoholes primarios.

La preferencia de la fructosilación de grupos fenólicos con respecto a los hidroxilos primarios se confirmó con la reacción de aceptor utilizando el compuesto bifuncional 4-hidroxibencil alcohol. En esta reacción la enzima mostró ser altamente selectiva, transfiriendo el residuo fructosilo sobre el grupo fenólico a una velocidad diez veces mayor que sobre el alcohol primario y acumulando hasta 4 mM.

Con el objetivo de explicar la influencia de la estructura química de diferentes aceptores sobre la reacción, se calculó la nucleofilia de los diferentes aceptores utilizados utilizando métodos de química cuántica. Los cálculos de la nucleofilia demostraron que tanto los fenoles como los alcoholes primarios, una vez desprotonados, poseen valores de nucleofilia prácticamente iguales; Sin embargo, se observó que tanto en moléculas monofuncionales como en moléculas bifuncionales conteniendo ambos grupos funcionales, existe una preferencia marcada de reactividad hacia los hidroxilos fenólicos. Este comportamiento se explica por la diferencia de valores de pKa que presentan las diferentes moléculasceptoras. En efecto, los valores inferiores de pKa de los hidroxilos fenólicos comparados con los valores correspondientes de los hidroxilos primarios, explicó el porqué a los valores de pH de las reacciones con BS-LVS (alrededor de 6), los hidroxilos fenólicos formaron especies desprotonadas de manera más efectiva, resultando así en mejores rendimientos con estos sustratos.

SECCIÓN II

En una segunda etapa del proyecto y con el fin de cumplir con el objetivo de tener un método eficiente de glicosilación, se buscó modificar el sistema de reacción. El sistema elegido para favorecer la producción de fructósido de **Hq**, consideró que la mayor producción de **Fru-Hq** se obtiene al inicio de la reacción, donde la concentración de sacarosa es mayor y la velocidad de hidrólisis del mismo **Fru-Hq** es la más baja. Bajo estas consideraciones se diseñó un sistema de reacción en lote alimentado que permitió mantener la concentración de sacarosa constante a un valor igual a la concentración inicial en una reacción en lote (400 mM). En estas condiciones, la

reacción en lote alimentado permitió pasar de un 7 % de rendimiento respecto a la **Hq** inicial en una reacción en lote, hasta un 15 % de rendimiento.

En este sistema de reacción una observación interesante fue que la síntesis de fructósido es mayor al inicio de una reacción en lote alimentado y hacia el final se reduce significativamente. En contraste, la producción de polímero se vio favorecida en tiempos largos de reacción, sugiriendo una mayor selectividad por la transferencia a polímero que a la **Hq**.

Asimismo, la inhibición generada por la glucosa acumulada en el lote alimentado no parece ser la principal causante de la disminución en la transferencia hacia el aceptor, ya que la velocidad de transformación de sacarosa no se ve afectada a lo largo de la reacción. Al parecer, en este sistema el fenómeno que predomina y que permite una rápida transformación de la sacarosa es la alta eficiencia con la que BS-LVS realiza la reacción de transferencia a polímero.

Considerando entonces la síntesis de polímero un factor limitante en la síntesis de **Fru-Hq**, se planteó la posibilidad de reducir el efecto de esta reacción de polimerización mediante la evaluación de diferentes mutantes de BS-LVS. Estas mutantes fueron seleccionadas en términos del valor del cociente de sus actividades de hidrólisis/transferencia. Todas las mutantes seleccionadas fueron capaces de realizar la fructosilación de **Hq**. Las mutantes más hidrolíticas Y429N, R433A y H243L, permitieron obtener mayor rendimiento de **Fru-Hq** respecto a la sacarosa convertida. La mutante S164A que se caracteriza por su mayor actividad de transferencia que de hidrólisis, produjo la menor cantidad de fructósido, lo que refuerza la hipótesis de que la síntesis de polímero compite fuertemente con la de fructósido.

La mutante Y429N permitió mejorar el rendimiento de **Fru-Hq** hasta un 18 % respecto a la hidroquinona inicial, mejorando el resultado obtenido con la enzima silvestre y siendo éste rendimiento 15 veces mayor que lo reportado para otras levansacarosas, lo cual demuestra la relativamente alta eficiencia de la mutante Y429N de la levansacarasa de *B. subtilis*, cuando ésta es utilizada en un sistema en lote alimentado.

Se encontró también que, al igual que la enzima BS-LVS, la mutante Y429N hidroliza el fructósido **Fru-Hq**, siendo menor la velocidad de hidrólisis con la mutante. Sin embargo en presencia de sacarosa, la velocidad de hidrólisis de **Fru-Hq** no disminuye de manera evidente, a diferencia de lo que sucede con la silvestre BS-LVS, lo cual puede explicarse por la baja afinidad que se ha reportado para la mutante Y429N por la sacarosa.

Además se encontró que la mutante Y429N sufre un efecto menor en la actividad debida a la presencia de glucosa. Por lo anterior, se considera que Y429N fue mejor que la silvestre en lote alimentado por la menor síntesis de FOS y/o la menor velocidad de hidrólisis de **Fru-Hq** y/o la menor inhibición por glucosa.

De manera global, se identificaron como factores limitantes de la síntesis de fructósido los siguientes: 1) Hidrólisis del fructósido, 2) inhibición por glucosa, 3) presencia de oligosacáridos en el sistema que compiten con **Hq** como aceptores y 4) mayor preferencia de la enzima para transferir al agua que a **Hq**.

En la etapa final del proyecto, se evaluaron otros compuestos como aceptores, como parte del objetivo de ampliar la metodología desarrollada a la glicosilación nucleófilos diferentes a los alcoholes, por ejemplo aminas. Sin embargo, no fue posible glicosilar enzimáticamente con BS-LVS las aminas primarias y secundarias evaluadas, así como algunos aminoácidos, debido probablemente a dificultad de generar el nucleófilo activado, dados sus valores de pKa.

Aunque BS-LVS no fue capaz de glicosilar aminoácidos en el grupo α -amino o en cadenas laterales, el derivado etil éster del aminoácido tirosina sí resultó aceptor de un grupo fructosilo, que dada la presencia del grupo fenólico sería de esperarse que la fructosilación ocurriera en dicha posición. Asimismo, otros compuestos semejantes estructuralmente a la tirosina actuaron también como aceptores. La tirosina en su forma libre (no esterificada) no actuó como aceptor, debido probablemente a la baja solubilidad de este aminoácido.

Al evaluar tiofenoles como otra alternativa novedosa en reacciones de aceptor con BS-LVS, no se encontró ningún producto de glicosilación. Sin embargo, con 2-mercaptoetanol fue posible observar por TLC probables productos de glicosilación sobre el grupo -SH, aunque no fueron purificados para su análisis estructural.

Finalmente, se encontraron productos de glicosilación con BS-LVS al emplear como aceptor antioxidante L-epicatequina, hasta el momento la molécula hidrofóbica de mayor peso molecular que se logró glicosilar con esta enzima.

Con lo anterior se confirma el potencial de la enzima BS-LVS en reacciones de fructosilación, dada la amplia gama de compuestos que puede utilizar como aceptores y que favorecen a la formación de glicósidos novedosos, con propiedades modificadas respecto a sus agliconas. De esta manera,

los procedimientos enzimáticos del presente proyecto así como las herramientas de diseño utilizadas, representan una buena referencia para la síntesis de productos glicosilados novedosos con uso potencial en cosméticos o fármacos.

9 PERSPECTIVAS

Una de las principales limitantes en la reacción de fructosilación de compuestos hidrofóbicos fue la baja afinidad de la enzima por estos aceptores, comparada con la afinidad para transferir al agua, a la propia sacarosa o a FOS. Por tal motivo, sería deseable el desarrollo de estrategias para aumentar la afinidad por aceptores hidrofóbicos. Un modelado computacional permitiría identificar las interacciones entre el sitio activo de la enzima y aceptores hidrofóbicos, con el fin de diseñar mutaciones para mejorar dichas interacciones y aumentar su afinidad. Otra alternativa es realizar mutaciones al azar, para posteriormente seleccionar entre las mutantes resultantes aquellas que hayan sido mejoradas.

Con relación a los fructósidos sintetizados que no habían sido reportados previamente, sería importante realizar un estudio de su actividad biológica con base en la actividad que presentan algunas moléculas análogas; por ejemplo el fructósido **Fru₂-4HB**, es análogo de la gastrodina (glucósido), la cual se ha reportado con actividad anticoagulante y anticonvulsiva. Otras actividades que podrían explorarse en los fructósidos sintetizados son: antiinflamatoria, analgésica o inhibitoria de tirosinasa.

10 BIBLIOGRAFÍA

Alberto F, Bignon C, Sulzenbacher G, Henrissat B, y Czjzek M (2004). The three-dimensional structure of invertase (β -fructosidase) from *Thermotoga maritima* reveals a bimodular arrangement and an evolutionary relationship between retaining and inverting glycosidases.

Journal of Biological Chemistry. 279: 18903-18910.

An S-J, Park S-K, Hwang I, Choi SY, Kim SK, Kwon O-S, Jung SJ, Baek N-I, Lee HY, Won MH, y Kang T-C (2003). Gastrodin decreases immunoreactivities of γ -aminobutyric acid shunt enzymes in the hippocampus of seizure-sensitive gerbils.

Journal of Neuroscience Research. 71: 534-543.

Arcamone F-M (2007). Sabarubicin.

Topics in Current Chemistry. 283: 171-189.

Bertrand A, Morel S, Lefoulon F, Rolland Y, Monsan P, y Remaud-Simeon M (2006). *Leuconostoc mesenteroides* glucansucrase synthesis of flavonoid glucosides by acceptor reactions in aqueous-organic solvents.

Carbohydrate Research. 341: 855-863.

Beutlerl JA (2009). Natural products as a foundation for drug discovery.

Current Protocols in Pharmacology. 9.11.1-21.

Blixt O, Razi N (2008). Enzymatic glycosylation by transferases.

En: Glycoscience. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. pp. 1361-1385.

Borgia JA, Malkar NB, Abbasi HU, y Fields GB (2001). Difficulties encountered during glycopeptide syntheses.

Journal of Biomolecular Techniques. 12: 44-68.

Bridiau N, Taboubi S, Marzouki N, Legoy MD, y Maugard T (2006). β -Galactosidase Catalyzed Selective Galactosylation of Aromatic Compounds.

Biotechnology Progress. 22: 326-330.

Bülter T, Elling L (1999). Enzymatic synthesis of nucleotide sugars.

Glycoconjugate Journal. 16: 147-159.

Canedo M, Jimenez-Estrada M, Cassani J, y López-Munguía A (1999). Production of maltosylfructose (erlose) with levansucrase from *Bacillus subtilis*.

Biocatalysis and Biotransformation. 16: 475-485.

Cantarel B, Coutinho P, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, y Henrissat B (2009). The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics.

Nucleic Acids Research. 37: 233-238.

Carmona AT, Moreno-Vargas A, y Robina I (2008). Glycosylation methods in oligosaccharide synthesis. Part 1.

Current Organic Synthesis. 5: 33-60.

Castillo E, Lopez-Munguía A (2004). Synthesis of levan in water-miscible organic solvents.

Journal of Biotechnology. 114: 209-217.

- Chambert R, Treboul G, y Dedonder R (1974). Kinetic studies of Levansucrase of *Bacillus subtilis*. *European Journal of Biochemistry*. 41: 285-300.
- Chandrasekhar J, Andrade JG, y Schleyer PvR (1981). Thermodynamic stability of carbonyl anions, R-hivin.C:O. A molecular orbital examination. *Journal of the American Chemical Society*. 103: 5612-5614.
- Cheeke PR (2001). Glycosides: Naturally occurring. *Encyclopedia of Life Sciences, John Wiley & Sons Ltd*. 1-6.
- Cote GL, Dunlap CA, Appell M, y Momany FA (2005). Alternansucrase acceptor reactions with D-tagatose and L-glucose. *Carbohydrate Research*. 340: 257-262.
- Daines AM, Maltman BA, y Flitsch SL (2004). Synthesis and modifications of carbohydrates, using biotransformations. *Current Opinion in Chemical Biology*. 8: 106-113.
- de Montalk GP, Remaud-Simeon M, Willemot RM, Sarcabal P, Planchot V, y Monsan P (2000). Amylosucrase from *Neisseria polysaccharea*: novel catalytic properties. *FEBS Letters*. 471: 219-223.
- de Roode BM, Zuilhof H, Franssen MCR, van der Padt A, y de Groot A (2000). Why are some alcohols easy to glucosylate with β -glucosidases while others are not? A computational approach. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2*. 2217-2224.
- Dembitsky VM (2004). Chemistry and biodiversity of the biologically active natural glycosides. *Chemistry and Biodiversity*. 1: 673-781.
- Dembitsky VM (2005a). Astonishing diversity of natural surfactants: 5. Biologically active glycosides of aromatic metabolites. *Lipids*. 40: 869-900.
- Dembitsky VM (2005b). Astonishing diversity of natural surfactants: 6. Biologically active marine and terrestrial alkaloid glycosides. *Lipids*. 40: 1081-1105.
- Demchenko AV (2003). 1,2-*cis* O-Glycosylation: Methods, Strategies, Principles. *Current Organic Chemistry*. 7: 35-79.
- Dewick PM (2002). Medicinal Natural Products. A biosynthetic approach. John Wiley & Sons, Ltd, pp 38-252.
- Dudíková J, Mastihubová M, Mastihuba V, y Kolarova N (2007). Exploration of transfructosylation activity in cell walls from *Cryptococcus laurentii* for production of functionalised β -D-fructofuranosides. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 45: 27-33.
- Eggleston G (2008). Sucrose and related oligosaccharides. En: Glycoscience (eds Fraser-Reid B, Tatsuta K, Thiem J), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. pp. 1163-1183.
- Euzenat O, Guibert A, y Combes D (1997). Production of fructo-oligosaccharides by levansucrase from *Bacillus subtilis* C4. *Process Biochemistry*. 32: 237-243.

- Euzenat O, Guibert A, y Combes D (1998). Production and purification of *Bacillus subtilis* C4 Levansucrase. *Annals New York Academy of Sciences*. 288-294.
- Fernandes FAN, Rodrigues S (2007). Evaluation of enzymatic reactors for large-scale panose production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 142: 95-104.
- Fischer E (1893). Ueber die glucoside der alkohole. *Berichte der Deutschen chemischen Gesellschaft*. 26: 2400-2412.
- Funayama M, Arakawa H, Yamamoto R, Nishino T, Shin T, y Murao S (1995). Effects of α - and β -Arbutin on activity of tyrosinases from mushroom and mouse melanoma. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 59: 143-144.
- Glinkii G. Synthetic glycoamines, methods for their use that affect cell (1998). PCT/US97/21604.
- Goedl C, Sawangwan T, Mueller M, Schwarz A, y Nidetzky B (2008a). A high-yielding biocatalytic process for the production of 2-O-(α -D-glucopyranosyl)-sn-glycerol, a natural osmolyte and useful moisturizing ingredient. *Angewandte Chemie, International Edition*. 47: 10086-10089.
- Goedl C, Schwarz A, Mueller M, Brecker L, y Nidetzky B (2008b). Mechanistic differences among retaining disaccharide phosphorylases: insights from kinetic analysis of active site mutants of sucrose phosphorylase and α , α -trehalose phosphorylase. *Carbohydrate Research*. 343: 2032-2040.
- Gómez de Segura A, Alcalde M, Bernabé M, Ballesteros A, y Plou FJ (2006). Synthesis of methyl α -D-glucooligosaccharides by entrapped dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* B-1299. *Journal of Biotechnology*. 124: 439-445.
- Haslam E (2002). Plant Secondary Metabolism. *Encyclopedia of Life Sciences, John Wiley & Sons Ltd*. 1-11.
- Heightman TD, Vasella AT (1999). Recent insights into inhibition, structure, and mechanism of configuration-retaining glycosidases. *Angewandte Chemie, International Edition*. 38: 750-770.
- Henry RJ, Darbyshire B (1980). Sucrose: sucrose fructosyltransferase and fructan:fructan fructosyltransferase from *Allium cepa*. *Phytochemistry*. 19: 1017-1020.
- Hernández L, Arrieta J, Betancourt L, Falcón V, Madrazo J, Coego A, y Menéndez C (1999). Levansucrase from *Acetobacter diazotrophicus* SRT4 is secreted via periplasm by a signal-peptide-dependent pathway. *Current Microbiology*. 39: 146-152.
- Hettwer U, Gross M, y Rudolph K (1995). Purification and characterization of an extracellular levansucrase from *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *Journal of Bacteriology*. 177: 2834-2839.
- Illanes A, Altamirano C (2008). Enzyme Reactors. En: *Enzyme Biocatalysis* (ed Illanes A), Springer Netherlands. pp. 205-251.

- Jaramillo P, Pérez P, Contreras R, Tiznado W, y Fuentealba P (2006). Definition of a nucleophilicity scale. *Journal of Physical Chemistry A*. 110: 8181-8187.
- Jaramillo P, Pérez P, y Fuentealba P (2009). On the nucleophilicity of boryllithium compounds. A theoretical study. *Journal of Physical Chemistry A*. 113: 6812-6817.
- Jensen MH, Mirza O, Albenne C, Remaud-Simeon M, Monsan P, Gajhede M, y Skov LK (2004). Crystal structure of the covalent intermediate of amylosucrase from *Neisseria polysaccharea*. *Biochemistry*. 43: 3104-3110.
- Jung J-H, Seo D-H, Ha S-J, Song M-C, Cha J, Yoo S-H, Kim T-J, Baek N-I, Baik M-Y, y Park C-S (2009). Enzymatic synthesis of salicin glycosides through transglycosylation catalyzed by amylosucrases from *Deinococcus geothermalis* and *Neisseria polysaccharea*. *Carbohydrate Research*. 344: 1612-1619.
- Kang J, Kim Y-M, Kim N, Kim D-W, Nam S-H, y Kim D (2009). Synthesis and characterization of hydroquinone fructoside using *Leuconostoc mesenteroides* levansucrase. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 83: 1009-1016.
- Kim H, Kong H, Choi B, Yang Y, Kim Y, Lim MJ, Neckers L, y Jung Y (2005). Metabolic and pharmacological properties of rutin, a dietary quercetin glycoside, for treatment of inflammatory bowel disease. *Pharmaceutical Research*. 22: 1499-1509.
- Kim P-Y, Pollard DJ, y Woodley JM (2007). Substrate supply for effective biocatalysis. *Biotechnology Progress*. 23: 74-82.
- Kino K, Satake R, Morimatsu T, Kuratsu S, Shimizu Y, Sato M, y Kirimura K (2008). A new method of synthesis of alkyl β -glycosides using sucrose as sugar donor. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 72: 2415-2417.
- Klamt A (1995). Conductor-like Screening Model for Real Solvents: a new approach to the quantitative calculation of solvation phenomena. *Journal of Physical Chemistry*. 99: 2224-2235.
- Klamt A (2005). COSMO-RS: From quantum chemistry to fluid phase thermodynamics and drug design. Elsevier, Amsterdam.
- Klamt A, Eckert F (2000). COSMO-RS: a novel and efficient method for the a priori prediction of thermophysical data of liquids. *Fluid Phase Equilibria*. 172: 43-72.
- Kren V (2008). Glycoside vs. Aglycon: The role of glycosidic residue in biological activity. En: Glycoscience. Chemistry and chemical biology (eds Fraser-Reid B, Tatsuta K, Thiem J), Springer-Verlag, New York. pp. 2589-2644.
- Kren V, Martínková L (2001). Glycosides in Medicine: The role of glycosidic residue in biological activity. *Current Medicinal Chemistry*. 8: 1303-1328.
- Kren V, Rezanka T (2008). Sweet antibiotics - the role of glycosidic residues in antibiotic and antitumor activity and their randomization. *Fems Microbiology Reviews*. 32: 858-889.

- Laatsch H, Fotso S (2008). Naturally occurring anthracyclines. *Topics in Current Chemistry*. 282: 3-74.
- Lairson LL, Henrissat B, Davies GJ, y Withers SG (2008). Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms. *Annual Review of Biochemistry*. 77: 521-555.
- Lairson LL, Withers SG (2004). Mechanistic analogies amongst carbohydrate modifying enzymes. *Chemical Communications*. 2243-2248.
- Lian G, Gao Q, y Lin F (2008). Synthesis of fructofuranosides: efficient glycosylation with *N*-phenyltrifluoroacetamidate as the leaving group. *Carbohydrate Research*. 343: 2992-2996.
- Liu Y, Tang X, Pei J, Zhang L, Liu F, y Li K (2006). Gastrodin Interaction with human fibrinogen: Anticoagulant effects and binding studies. *Chemistry - A European Journal*. 12: 7807-7815.
- Lyness EW, Doelle HW (1983). Levansucrase from *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology Letters*. 5: 345-350.
- Macomber R (1996). Alcohols, Phenols and Thiols. En: *Organic Chemistry Vol. II* University Science Books. pp. 160-183.
- Madlová A, Antošová M, Polakovic M, y Bálaš V (2000). Thermal stability of fructosyltransferase from *Aureobasidium pullulans*. *Chemical Papers*. 54: 339-344.
- Martínez A (1997). Estrategias de fermentación para la producción de β -galactosidasa de *Escherichia coli* en *Bacillus subtilis*. Tesis, Instituto de Biotecnología-UNAM, pp. 16-20.
- Materska M, Perucka I (2005). Antioxidant activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper fruit (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 1750-1756.
- Mena A (2007). Glicosilación enzimática de compuestos hidrofóbicos mediante el uso de glicosiltransferasas activas en solventes orgánicos. Tesis, Instituto de Biotecnología-UNAM, pp. 31-60.
- Meng GY, Fütterer K (2003). Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase. *Nature Structural Biology*. 10: 935-941.
- Meulenbeld GH, de Roode BM, y Hartmans S (2002). Enzymatic synthesis of thioglucosides using almond β -glucosidase. *Biocatalysis and Biotransformation*. 20: 251-256.
- Meulenbeld GH, Hartmans S (2000). Transglycosylation by *Streptococcus mutans* GS-5 glucosyltransferase-D: Acceptor specificity and engineering of reaction conditions. *Biotechnology and Bioengineering*. 70: 363-369.
- Meulenbeld GH, Zuilhof H, van Veldhuizen A, van den Heuvel RHH, y Hartmans S (1999). Enhanced (+) -catechin transglucosylating activity of *Streptococcus mutans* GS-5 glucosyltransferase-D due to fructose removal. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 4141-4147.

- Michael A. On the synthesis of helicin and phenolglucoside (1879).
American Chemical Journal. 1: 305-312.
- Mishra B, Priyadarsini KI, Kumar MS, Unnikrishnan MK, y Mohan H (2003). Effect of O-glycosilation on the antioxidant activity and free radical reactions of a plant flavonoid, chrysoeriol.
Bioorganic and Medicinal Chemistry. 11: 2677-2685.
- Monsan P, Bozonnet S, Albenne C, Joucla G, Willemot RM, y Remaud-Simeon M (2001). Homopolysaccharides from lactic acid bacteria.
International Dairy Journal. 11: 675-685.
- Moon YH, Kim G, Lee JH, Jin XJ, Kim DW, y Kim D (2006). Enzymatic synthesis and characterization of novel epigallocatechin gallate glucosides.
Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 40: 1-7.
- Morrison JF (2001). Enzyme Activity: Reversible inhibition.
Encyclopedia of Life Sciences, John Wiley & Sons Ltd.
- Mukasa H, Shimamura A, y Tsumori H (2000). Nigeroooligosaccharide acceptor reaction of *Streptococcus sobrinus* glucosyltransferase GTF-I.
Carbohydrate Research. 326: 98-103.
- Mydock LK, Demchenko AV (2010). Mechanism of chemical O-glycosylation: from early studies to recent discoveries.
Organic and Biomolecular Chemistry. 8: 497-510.
- Nagem RAP, Rojas AL, Golubev AM, Korneeva OS, Eneyskaya EV, Kulminskaya AA, Neustroev KN, y Polikarpov I (2004). Crystal structure of exo-inulinase from *Aspergillus awamori*: the enzyme fold and structural determinants of substrate recognition.
Journal of Molecular Biology. 344: 471-480.
- Nakahara K, Kontani M, Ono H, Kodama T, Tanaka T, Ooshima T, y Hamada S (1995). Glucosyltransferase from *Streptococcus sobrinus* catalyzes glucosylation of catechin.
Applied and Environmental Microbiology. 61: 2768-2770.
- Nakano H, Murakami H, Shizuma M, Kiso T, Lustosa de Araujo T, y Kitahata S (2000). Transfructosylation of thiol group by β -fructofuranosidases.
Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 64: 1472-1476.
- Nishikawa T, Adachi M, y Isobe M (2008). C-Glycosylation.
En: *Glycoscience, chemistry and chemical biology*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. pp. 755-811.
- Olano C, Mendez C, y Salas JA (2009). Antitumor compounds from actinomycetes: from gene clusters to new derivatives by combinatorial biosynthesis.
Natural Product Reports. 26: 628-660.
- Olivares-Illana V, Lopez-Munguia A, y Olvera C (2003). Molecular characterization of inulosucrase from *Leuconostoc citreum*: a fructosyltransferase within a glucosyltransferase.
Journal of Bacteriology. 185: 3606-3612.

Olivares-Illana V, Wachter-Rodarte C, Le Borgne S, y López-Munguía A (2002). Characterization of a cell-associated inulosucrase from a novel source: a *Leuconostoc citreum* strain isolated from *Pozol*, a fermented corn beverage of Mayan origin.

Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. 28: 112-117.

Olvera C, Centeno-Leija S, y Lopez-Munguia A (2007). Structural and functional features of fructansucrases present in *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293.

Antonie van Leeuwenhoek. 92: 11-20.

Ortega T (1998). Natural products hold their own in drug discovery.

Chemical Market Reporter. 254: FR10.

Ortiz-Soto ME, Olivares-Illana V, y Lopez-Munguia A (2004). Biochemical properties of inulosucrase from *Leuconostoc citreum* CW28 used for inulin synthesis.

Biocatalysis and Biotransformation. 22: 275-281.

Ortiz-Soto ME, Rivera M, Rudiño-Piñera E, Olvera C, y López-Munguía A (2008). Selected mutations in *Bacillus subtilis* levansucrase semi-conserved regions affecting its biochemical properties

Protein Engineering, Design & Selection. 21: 589.

Oscarson S (2000). Thioglycosides.

En: Carbohydrates in chemistry and biology (eds Ernst B, Hart GW, Sinaÿ P), Wiley-VCH Verlag GmbH. pp. 93-116.

Oscarson S (2008). S-Glycosylation.

En: Glycoscience (eds Fraser-Reid B, Tatsuta K, Thiem J). pp. 661-695.

Oscarson S, Sehgelmeble FW (2000). A novel β -directing fructofuranosyl donor concept. Stereospecific synthesis of sucrose.

Journal of the American Chemical Society. 122: 8869-8872.

Ozimek LK, Kralj S, Kaper T, van der Maarel MJEC, y Dijkhuizen L (2006a). Single amino acid residue changes in subsite -1 of inulosucrase from *Lactobacillus reuteri* 121 strongly influence the size of products synthesized.

FEBS journal. 272: 4113.

Ozimek LK, Kralj S, van der Maarel MJEC, y Dijkhuizen L (2006b). The levansucrase and inulosucrase enzymes of *Lactobacillus reuteri* 121 catalyse processive and non-processive transglycosylation reactions.

Microbiology. 152: 1187-1196.

Ozimek LK, van Hijum SAFT, van Koningsveld GA, van der Maarel MJEC, Geel-Schutten GH, y Dijkhuizen L (2004). Site-directed mutagenesis study of the three catalytic residues of the fructosyltransferases of *Lactobacillus reuteri* 121.

FEBS Letters. 560: 131-133.

Pavlov AE, Sokolov VM, y Zakharov VI (2001). Structure and reactivity of glycosides: IV. Koenigs-Knorr synthesis of aryl β -D-glucopyranosides using phase-transfer catalysts.

Russian Journal of General Chemistry. 71: 1811-1814.

Pilgrim A, Kawase M, Ohashi M, Fujita K, Murakami K, y Hashimoto K (2001). Reaction kinetics and modeling of the enzyme-catalyzed production of lactosucrose using β -fructofuranosidase from *Arthrobacter* sp. K-1.

Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 65: 758-765.

- Plou FJ, Gómez de Segura A, y Ballesteros A (2007). Application of glycosidases and transglycosidases in the synthesis of oligosaccharides.
En: *Industrial Enzymes* (eds Polaina J, MacCabe AP), Springer, Valencia, Spain. pp. 141-157.
- Plou FJ, Martin MT, de Segura AG, Alcalde M, y Ballesteros A (2002). Glucosyltransferases acting on starch or sucrose for the synthesis of oligosaccharides.
Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne de Chimie. 80: 743-752.
- Prodanovic R, Milosavic N, Sladic D, Zlatovic M, Bozic B, Velickovic TC, y Vujcic Z (2005). Transglucosylation of hydroquinone catalysed by alpha-glucosidase from baker's yeast.
Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 35: 142-146.
- Rasor JP, Voss E (2001). Enzyme-catalyzed processes in pharmaceutical industry.
Applied Catalysis A: General. 221: 145-158.
- Richard GT, Morel S, Willemot RM, Monsan P, y Remaud-Simeon M (2003). Glucosylation of α -butyl- and α -octyl-D-glucopyranosides by dextransucrase and alternansucrase from *Leuconostoc mesenteroides*.
Carbohydrate Research. 338: 855-864.
- Ritsema T, Smeekens SCM (2003). Engineering fructan metabolism in plants.
Journal of Plant Physiology. 160: 811-820.
- Robynt JF (2008). General properties, occurrence, and preparation of carbohydrates.
En: *Glycoscience* (eds Fraser-Reid B, Tatsuta K, Thiem J), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg . pp. 57-99.
- Rohr J, Thiericke R (1992). Angucycline group antibiotics.
Natural Product Reports. 9: 103-137.
- Scheckermann C, Wagner F, y Fischer L (1997). Galactosylation of antibiotics using the β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*.
Enzyme and Microbial Technology. 20: 629-634.
- Schottelius M, Wester HJ, Reubi JC, Senekowitsch-Schmidtke R, y Schwaiger M (2002). Improvement of pharmacokinetics of radioiodinated Tyr³-octreotide by conjugation with carbohydrates.
Bioconjugate Chemistry. 13: 1021-1030.
- Seibel J, Beine R, Moraru R, Behringer C, y Buchholz K (2006). A new pathway for the synthesis of oligosaccharides by the use of non-Leloir glycosyltransferases.
Biocatalysis and Biotransformation. 24: 157-165.
- Seo ES, Lee JH, Park JY, Kim D, Han HJ, y Robynt JF (2005). Enzymatic synthesis and anti-coagulant effect of salicin analogs by using the *Leuconostoc mesenteroides* glucansucrase acceptor reaction.
Journal of Biotechnology. 117: 31-38.
- Shaikh FA, Withers SG (2008). Teaching old enzymes new tricks: engineering and evolution of glycosidases and glycosyl transferases for improved glycoside synthesis.
Biochemistry and Cell Biology. 86: 169-177.
- Sheldon RA, van Rantwijk F (2004). Biocatalysis for sustainable organic synthesis.
Australian Journal of Chemistry. 57: 281-289.

- Shin MH, Cheong N-Y, Lee J-H, y Kim KH (2009). Transglucosylation of caffeic acid by a recombinant sucrose phosphorylase in aqueous buffer and aqueous-supercritical CO₂ media. *Food Chemistry*. 115: 1028-1033.
- Stick R (2001). Oligosaccharide Synthesis. En: Carbohydrates: the sweet molecules of life. Academic Press, London. pp. 179-212.
- Sturgeon RJ (2002). Carbohydrates. *Encyclopedia of Life Sciences, John Wiley & Sons Ltd*. 1-12.
- Sugimoto K, Nomura K, Nishimura T, Kiso T, Sugimoto K, y Kuriki T (2005). Syntheses of α -arbutin- α -glycosides and their inhibitory effects on human tyrosinase. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 99: 272-276.
- Summer JB, Howell SF (1935). A method for determination of saccharase activity. *Journal of Biological Chemistry*. 108: 51-54.
- Suzuki K, Fukumura T, Shibasaki-Kitakawa N, y Yonemoto T (2002). Kinetic model for synthesis of fructosyl-stevioside using suspended β -fructofuranosidase. *Biochemical Engineering Journal*. 10: 207-215.
- Szwengiel A, Czarnecka M, y Czarnecki Z (2007). Levan synthesis during associated action of levansucrase and *Candida cacaoi* DSM 2226 yeast. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 57: 433-440.
- Tanaka H, Iwata Y, Takahashi D, Adachi M, y Takahashi T (2005). Efficient Stereoselective Synthesis of γ -N-Glycosyl Asparagines by N-Glycosylation of Primary Amide Groups. *Journal of the American Chemical Society*. 127: 1630-1631.
- Thimm J, Thiem J (2008). Enzymatic glycosylation by glycohydrolases and glycosynthases. En: Glycoscience (eds Fraser-Reid B, Tatsuta K, Thiem J), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. pp. 1387-1409.
- Thorson JS, Hosted Jr TJ, Jiang J, Biggins JB, y Ahlert J (2001). Nature's carbohydrate chemists: The enzymatic glycosylation of bioactive bacterial metabolites. *Current Organic Chemistry*. 5: 139-167.
- Torres P, Poveda A, Jimenez-Barbero J, Parra JL, Comelles F, Ballesteros AO, y Plou FJ (2011). Enzymatic synthesis of α -glucosides of resveratrol with surfactant activity. *Advanced Synthesis & Catalysis*. 353: 1077-1086.
- van Hijum SAFT, van der Maarel MJEC, y Dijkhuizen L (2003). Kinetic properties of an inulosucrase from *Lactobacillus reuteri* 121. *FEBS Letters*. 534: 207-210.
- van Rantwijk F, Oosterom MWV, y Sheldon RA (1999). Glycosidase-catalysed synthesis of alkyl glycosides. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 6: 511-532.
- Verhaest M, Ende WVd, Roy KL, De Ranter CJ, Laere AV, y Rabijns A (2005). X-ray diffraction structure of a plant glycosyl hydrolase family 32 protein: fructan 1-exohydrolase IIa of *Cichorium intybus*. *The Plant Journal*. 41: 400-411.

- Vijayakumar R, Divakar S (2005). Synthesis of guaiacol- α -D-glucoside and curcumin-bis- α -D-glucoside by an amyloglucosidase from *Rhizopus*. *Biotechnology Letters*. 27: 1411-1415.
- Vuong TV, Wilson DB (2010). Glycoside Hydrolases: Catalytic Base/Nucleophile Diversity. *Biotechnology and Bioengineering*. 107: 195-205.
- Weijers CAGM, Franssen MCR, y Visser GM (2009). Glycosyltransferase-catalyzed synthesis of bioactive oligosaccharides. *Biotechnology Advances*. 26: 436-456.
- Weymouth-Wilson AC (1997). The role of carbohydrates in biologically active natural products. *Natural Product Reports*. 14: 99-110.
- Wilson I (2008). Biosynthesis and degradation of mono-, oligo-, and polysaccharides: Introduction. En: *Glycoscience* (eds Fraser-Reid B, Tatsuta K, Thiem J), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. pp. 2243-2264.
- Win T, Isono N, Kusnadi Y, Watanabe K, Obae K, Ito H, y Matsui H (2004). Enzymatic synthesis of two novel non-reducing oligosaccharides using transfructosylation activity with β -fructofuranosidase from *Arthrobacter globiformis*. *Biotechnology Letters*. 26: 499-503.
- Wu PH, Giridhar R, y Wu WT (2006). Surface display of transglucosidase on *Escherichia coli* by using the ice nucleation protein of *Xanthomonas campestris* and its application in glucosylation of hydroquinone. *Biotechnology and Bioengineering*. 95: 1138-1147.
- Yoon SH, Fulton DB, y Robyt JF (2004). Enzymatic synthesis of two salicin analogues by reaction of salicyl alcohol with *Bacillus macerans* cyclomaltodextrin glucanyltransferase and *Leuconostoc mesenteroides* B-742CB dextranucrase. *Carbohydrate Research*. 339: 1517-1529.
- Yoon SH, Fulton DB, y Robyt JF (2010). Enzymatic synthesis of L-DOPA α -glycosides by reaction with sucrose catalyzed by four different glucansucrases from four strains of *Leuconostoc mesenteroides*. *Carbohydrate Research*. 345: 1730-1735.
- Zhu X, Schmidt RR (2009). New principles for glycoside-bond formation. *Angewandte Chemie International Edition*. 48: 1900-1934.

11 APÉNDICE



Enzymatic fructosylation of aromatic and aliphatic alcohols by *Bacillus subtilis* levansucrase: Reactivity of acceptors

Arlette Mena-Arizmendi^a, Joel Alderete^b, Sergio Águila^a, Alain Marty^{c,d,e}, Alfonso Miranda-Molina^a, Agustín López-Munguía^a, Edmundo Castillo^{a,*}

^a Departamento Ingeniería Celular y Biotecnología, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 510-3, Av. Universidad 2001, Cuernavaca, Morelos 62250, Mexico

^b Grupo de Química Teórica y Computacional, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Concepción, Casilla 160-C, Concepción, Chile

^c Université de Toulouse, INSA, UPS, INP LISBP, 135 Avenue de Rangueil, F-31077 Toulouse, France

^d INRA, UMR792 Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, F-31400 Toulouse, France

^e CNRS, UMR5504, F-31400 Toulouse, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 December 2010

Received in revised form 25 January 2011

Accepted 1 February 2011

Available online 26 February 2011

Keywords:

Levansucrase
Activity coefficients
COSMO-RS
Organic solvents
Acceptor reaction
Phenols
Phenolic fructosides

ABSTRACT

Levansucrases from *Bacillus subtilis* (BS-LVS) and *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* ATCC 8293 (LevC), inulosucrase from *Leuconostoc citreum* (IsIA) and an invertase from *Saccharomyces cerevisiae* (Inv) were evaluated in acceptor reactions with non-sugar acceptors. Among them, BS-LVS was selected for the fructosylation of aromatic or aliphatic alcohols due to its high activity and stability. The effects of acceptor concentration, enzyme concentration and the presence of a co-solvent in the fructosylation efficiency of hydroquinone were evaluated. It was demonstrated that this reaction is kinetically controlled, producing the best yields of phenolic fructosides when 500 mM of acceptor and 5 U mL⁻¹ of enzyme were employed. Higher enzyme loads resulted in the rapid hydrolysis of the products. Increased amounts of organic co-solvent up to 50% (v/v) reduced fructoside yield due to a concomitant decrease in the thermodynamic activity of the acceptor, as confirmed by theoretical calculations using COSMO-RS; moreover, increased fructose transfer to levan and reduced hydrolysis were observed. It was found that BS-LVS preferentially fructosylates aromatic over aliphatic alcohols. A maximum fructoside production (19–35 mM) was obtained with dihydroxybenzene acceptors such as hydroquinone, whereas reactions with primary alcohols, such as benzyl alcohol resulted in lower fructosylation efficiency. This selectivity was also demonstrated by the fact that 4-hydroxybenzylalcohol, a bifunctional acceptor, was fructosylated at a rate ten times faster on its aromatic hydroxyl group. BS-LVS selectivity over phenol fructosylation was inversely correlated with the acceptor pK_a value.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Glycosides are compounds formed by a carbohydrate covalently linked to a non-sugar moiety (aglycon). They are widely distributed

Abbreviations: BS-LVS, *B. subtilis* levansucrase; Inv, *S. cerevisiae* β-D-fructofuranosidase; IsIA, *L. citreum* inulosucrase; LevC, *L. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* ATCC 8293 levansucrase; GlyTFs, glycosyltransferases; FTfs, fructosyltransferases; GTfs, glucosyltransferases; 2M2P, 2-methyl-2-propanol; **Hq**, hydroquinone; **Rsr**, resorcinol; **Cat**, catechol; **4mPh**, 4-methoxyphenol; **Ph**, phenol; **Bnz**, benzyl alcohol; **Bu**, butanol; **4HB**, 4-hydroxybenzyl alcohol; **Fru-Hq**, 4-hydroxyphenyl-β-D-fructofuranoside; **Fru-Rsr**, 3-hydroxyphenyl-β-D-fructofuranoside; **Fru-Cat**, 2-hydroxyphenyl-β-D-fructofuranoside; **Fru-4mPh**, 4-methoxyphenyl-β-D-fructofuranoside; **Fru-Ph**, phenyl-β-D-fructofuranoside; **Fru-Bnz**, benzyl-β-D-fructofuranoside; **Fru-Bu**, n-butyl-β-D-fructofuranoside; **Fru-4HB**, 4-(hydroxy)-benzyl-β-D-fructofuranoside; **Fru-2-4HB**, 4-(hydroxymethyl)phenyl-β-D-fructofuranoside.

* Corresponding author. Tel.: +52 55 56 22 76 09; fax: +52 777 17 23 88.

E-mail address: edmundo@ibt.unam.mx (E. Castillo).

in nature and engaged in diverse functions, mostly as secondary metabolites [1,2]. In recent years, natural phenolic glycosides have generated industrial interest due to their diverse biological activities in humans. For instance, glycosides of flavonoids are widely used as radical-scavenging molecules [3–6], whereas β-arbutin is used as a skin-whitening agent [7]. Glycosylation strategies can also be useful to modify the physicochemical properties of the aglycon (i.e., to increase its water solubility or stability), modulating its pharmacological properties [8,9]. Despite the great interest in using phenolic glycosides as therapeutic agents, antioxidants or free radical scavengers, the most important limitation in their industrial application is their low content in plants and the complexity of their synthesis [10–12]. Indeed, chemical strategies involve multi-step reactions for the protection and deprotection of hydroxyl groups as well as the use of heavy metal salts [13,14], which result in a complex mixture of products and toxic by-products [1].

To overcome these limitations, enzymatic glycosylation has emerged as an interesting alternative, taking advantage of the

intrinsic selectivity of enzymes. Throughout the past decades, glycosidases have been the most frequently reported enzymes for the glycosylation of primary and secondary alcohols, whereas the glycosylation of phenols has been seldom addressed [8,15]. In general, low yields of phenol glycosides have been reported [16,17], a result that has been attributed to the low nucleophilicity of these acceptor molecules [8,15].

Alternatively, non-Leloir glycosyltransferases (GlyTFs) have been successfully applied for glycosylation reactions using sucrose as a donor for the transfer of the glycosyl moiety to the acceptor molecule [18]. GlyTFs include fructosyltransferases (FTFs) and glucosyltransferases (GTFs), which are enzymes capable of transferring fructose or glucose, respectively, to an acceptor such as a glycan growing chain (polymerisation), water (hydrolysis) or another suitable compound added to the reaction medium (acceptor reaction), resulting in a glycoside

Although there are some studies reporting the glycosylation of several phenolic molecules such as flavonoids and dihydroxybenzenes, this has only been achieved at low acceptor concentrations (from 3 to 10 mM). In consequence, productivity remains low and limited by the acceptor solubility. This is the case for flavonoids such as catechin, luteolin, quercetin, myricetin and epigallocatechin, which were glucosylated in the phenolic group using glucansucrases from *Streptococcus* sp. and *Leuconostoc* sp. [19–22]. To cope with this limitation, different water-miscible organic solvents have been used to enhance acceptor solubility, but low amounts of glucosides were observed [20].

For small phenolic molecules, such as catechol, 4-methylcatechol and 3-methoxycatechol, which have higher solubility in water, glycosylation was successful using the glucosyltransferase-D from *S. mutans* GS-5 in an aqueous medium, with yields of 65%, 50% and 75%, respectively, using 40 mM of acceptor [23]. However, high concentrations of these compounds (200 mM) led to a dramatic loss in enzyme activity. More recently, the fructosylation of hydroquinone was reported using a levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* at a high initial concentration of the acceptor (350 mM) but with a rather low fructoside final concentration (4 mM) [24].

In this context, the availability of biocatalysts with high transferase activity and specificity as well as high stability in the presence of high concentrations of phenolic compounds is still required to enhance the glycosylation yields of hydroxylated aromatic compounds. Levansucrase from *Bacillus subtilis* (BS-LVS) has been proved to be a robust biocatalyst, showing high activity and stability in non-conventional media, such as organic solvents [25], and high efficiency in acceptor reactions [26]. In this work, the enzymatic fructosylation of phenolic compounds such as hydroquinone, catechol and resorcinol catalysed by FTFs is reported. The selectivity of BS-LVS for the fructosylation of different aromatic or aliphatic alcohols was studied and explained in terms of the chemical and thermodynamic properties of the acceptors.

2. Experimental

2.1. Materials

Hydroquinone, benzyl alcohol, 4-hydroxybenzyl alcohol, 4-methoxyphenol, sucrose, fructose, glucose and arbutin were supplied by Sigma–Aldrich Inc. (MO, USA). Phenol was obtained from Merck (Edo. de México, México). Catechol and resorcinol were purchased from Fluka (Buchs, Switzerland). Butanol, 2-methyl-2-propanol, diisopropyl ether and methyl *tert*-butyl ether were acquired from J.T. Baker (Edo. de México, México). All substances were of high purity grade ($\geq 98\%$). Acetonitrile and acetone were of HPLC grade and were supplied by Burdick & Jackson (MI,

USA). Silica gel 0.04–0.063 mm was obtained from Macherey–Nagel (Düren, Germany); Sephadex™ G10 and Lipophilic Sephadex™ LH20 were purchased from Sigma–Aldrich, Inc. (MO, USA). β -D-Fructofuranosidase (EC 3.2.1.26) from *S. cerevisiae* (Inv) was purchased from Sigma Chemical Co. (MO, USA).

2.2. Enzymes

Levansucrase (E.C. 2.4.1.10) from *B. subtilis* (BS-LVS) was produced from a strain derived from *B. subtilis* Marburg 168 as previously reported [25]. This strain, designated with the genotype Δ npr, Δ apr, CmR, degU32 (Hy), overexpresses the BS-LVS gene (sacB). After fermentation, the extracellular enzyme was precipitated using 25% (w/v) PEG (Mw: 5000), centrifuged ($22,100 \times g$, 25 min) and recovered in phosphate buffer 50 mM, pH 6.0 [26,27]. Inulosucrase (E.C. 2.4.1.9) from *L. citreum* (IsIA) in cell-associated form was used. The microorganism was grown as previously reported [28], the culture was centrifuged ($15,300 \times g$, 10 min), and cells containing IsIA activity were washed and recovered in phosphate buffer 50 mM, pH 6.0. The gene coding for LevC, a levansucrase from *L. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* ATCC 8293, was expressed in *Escherichia coli* TOP 10 under the conditions previously reported [29]. The culture was centrifuged ($8630 \times g$, 10 min), and cells were recovered in 50 mM phosphate buffer, pH 6.0. After cell rupture (French press, 1125 psi) and centrifugation ($22,100 \times g$, 10 min), the supernatant containing levansucrase activity was directly used in the reaction. A commercial β -D-fructofuranosidase (EC 3.2.1.26) from *S. cerevisiae* (Inv) was employed.

2.3. Analytical methods

2.3.1. Enzyme activity

The activity of the enzymes studied was determined from the initial rate of reducing sugar release (fructose and glucose) from a 292 mM sucrose solution in phosphate buffer 50 mM, pH 6.0 for FTFs, or acetate buffer 50 mM pH 4.5 for β -D-fructofuranosidase using the dinitrosalicylic acid (DNS) method with glucose as a standard [30]. One activity unit (U) was defined as the amount of enzyme releasing the equivalent of $1 \mu\text{mol}$ of reducing sugar per minute ($\mu\text{mol min}^{-1}$). The global enzyme activity in reactions containing phenolic acceptors was evaluated as the initial rate of sucrose consumption by high-performance liquid chromatography (HPLC). Samples from these reactions were inactivated in boiling water for 10 min and analysed. Fructoside yields were calculated from sucrose conversion as determined by HPLC. All of these assays and further experiments were performed in triplicate and error bars are included in graphs.

2.3.2. TLC analysis of fructosylation reactions

TLC was performed using HPTLC silica gel 60 glass plates (Merck, Darmstadt, Germany) and 85:15 (v/v) acetonitrile/water as the mobile phase. Plates were eluted twice, and the aromatic substrates and product spots were visualised with iodine vapour. Subsequently, sugars and products were revealed by spraying α -naphthol solution (2.4% α -naphthol in an ethanol/water/ H_2SO_4 83:7:11 mixture) and heating at 100°C for 1 min.

2.3.3. HPLC analysis of fructosylation reactions

HPLC analyses were performed using a Waters HPLC system (Waters Corp., MA, USA) equipped with a 600E system controller, using an Alltech Prevail Carbohydrate ES column ($5 \mu\text{m}$, $250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$) (Alltech Associates, Inc., IL, USA) or a Waters Spherisorb ODS-2 column ($5 \mu\text{m}$, $250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$, Waters Corp., MA, USA). System was coupled to a 410 refractive index (RI) detector and a 996 photodiode array detector (Waters Corp., MA, USA) at 280 nm (or 223 nm). Fructosylation products were quantified using

the corresponding purified fructosides as standards. See [Supporting Information \(SI\)](#) file for details.

2.4. Enzyme selection

To select the most active and efficient enzyme for these acceptor reactions, the already described enzymes (three FTFs and one fructosidase) were evaluated in reactions containing different amounts of hydroquinone, benzyl alcohol or butanol as acceptors. Reactions containing 0–400 mM acceptor, sucrose 292 mM and enzyme 1 U mL⁻¹ in the appropriate buffer were incubated at 30 °C using an Eppendorf Thermomixer comfort (Hamburg, Germany). In all cases, reactions without an acceptor were carried out as controls. Enzyme performance was quantitatively evaluated in terms of the enzyme activity described in Section 2.3.1; the substrates and products were identified by TLC.

2.5. Effect of substrate concentration on acceptor reactions

Hydroquinone was used as a model substrate to select the reaction conditions for BS-LVS. Reactions containing 400 mM sucrose and 100–500 mM hydroquinone as an acceptor with 1 U mL⁻¹ of BS-LVS in phosphate buffer 50 mM and pH 6.0 were incubated for 20 h at 30 °C. Samples were withdrawn, heat-inactivated and diluted for product and sugar analysis by HPLC.

Stability of BS-LVS during storage in hydroquinone was evaluated by incubation of the enzyme in a 500 mM hydroquinone in phosphate buffer 50 mM, pH 6.0. Aliquots were withdrawn from 0 to 24 h, and the global enzyme activity measured as already described. The size of the samples from the incubation solution was calculated to dilute the hydroquinone content in the reaction medium to 25 mM. This concentration was considered low enough to avoid any effect on the enzyme activity. A control reaction was carried out using the enzyme without previous contact with hydroquinone. Residual enzyme activity was measured from the initial rate of sucrose conversion by HPLC during 45 min of reaction.

2.6. Effect of enzyme concentration on acceptor reactions

The effect of enzyme concentration (1–20 U mL⁻¹ BS-LVS) on fructoside production was evaluated in reactions containing 400 mM sucrose and 500 mM hydroquinone in phosphate buffer 50 mM, pH 6.0. Reactions were incubated 20 h at 30 °C. The fructoside concentration in the samples was determined by HPLC.

2.7. Acceptor reaction in aqueous–organic mixtures

The effect of 2-methyl-2-propanol as an organic co-solvent in the acceptor reactions was evaluated in solutions containing up to 50% (v/v) of the solvent, 400 mM sucrose, 500 mM hydroquinone and 5 U mL⁻¹ BS-LVS in phosphate buffer 50 mM pH 6.0 incubated at 30 °C.

2.8. Isolation and purification of fructosides

Fructosides were produced by BS-LVS (5 U mL⁻¹) in reactions with 400 mM sucrose and 500 mM acceptor (850 mM for butanol and 200 mM for 4-hydroxybenzyl alcohol and phenol). Purification techniques consisted in gel chromatography, flash chromatography or preparative HPLC using a Waters Spherisorb®S5 ODS2 semi-prep column (5 μm, 250 mm × 20 mm, Waters Corp., MA, USA). See [SI file](#) for details.

2.9. Structural analysis (RMN)

NMR spectra were acquired either on a Varian Unity NMR Spectrometer operating at 400 MHz for ¹H and 100 MHz for ¹³C nuclei or on an Eclipse JEOL (E) NMR spectrometer operating at 300 MHz for ¹H and 75 MHz for ¹³C nuclei. Chemical shifts are reported in parts per million (ppm) relative to H₂O and were made on the basis of ¹H-¹H COSY, HMBC and HSQC spectral analysis as required. HRFABMS spectra in a matrix of *m*-nitrobenzyl alcohol were recorded on a JEOL JMX-AX 505 HA mass spectrometer. Purified fructosides structure was elucidated on the basis of the 1D (¹H, ¹³C) and 2D (COSY, HSQC and HMBC) NMR experiments. All products corresponded to monofructosides. The 4-(hydroxy)-benzyl-β-D-fructofuranoside (**Fru₁-4HB**) was used as a model for structural description. Structural details of all synthesised compounds are included in [SI file](#).

2.10. Nucleophilicity index calculation

Calculations were carried out using the GAUSSIAN 09 program. The geometry of the neutral and anionic species were optimised at the B3LYP/6-311+G (d, p) level; the inclusion of diffuse functions has been shown to be important for anionic species [31]. The nucleophilicity index (ω^-) was evaluated from the frontier molecular orbital values, according to Jaramillo et al. [32,33]:

$$\omega^- = \frac{1(\mu_a - \mu_b)^2}{2(\eta_a + \eta_b)^2} \eta_a$$

where $\mu \approx (\varepsilon_H + \varepsilon_L)/2$ is the electronic chemical potential; $\eta \approx (\varepsilon_L - \varepsilon_H)$ is the hardness; the subscript *a* is the nucleophile, either neutral or anionic; *b* the electrophile (fructose). ε_H and ε_L correspond to the HOMO and LUMO energies, respectively.

2.11. COSMO-RS calculations

A full description of COSMO-RS (Conductor-like Screening Model for Realistic Solvents) theory developed by Klamt et al. is provided elsewhere [34–36]. In this work, Turbomol 5.9.1 and COSMOtherm version C2.1 release 01.07 software were employed (COSMOlogic GmbH & Co. KG, Leverkusen, Germany, 2007). Three-dimensional molecular structures of the compounds and solvents, as well as a minimisation of their molecular conformations, were implemented with Marvin Sketch 5.3.8 software (v.2010 ChemAxon, <http://www.chemaxon.com/>). Structural conformers were not calculated due to the structural simplicity of the evaluated compounds. The generation of molecular COSMO files was performed with the Turbomole 5.9.1 program package at the density functional theory level using the BP (B88-VWN-P86) functional with a triple- ζ valence polarised basis set (TZVP). The infinite dilution activity coefficients estimation was computed with a non-iterative mode carried out on COSMOtherm version C2.1 release 01.07.

3. Results and discussion

3.1. Enzyme selection

The enzyme activities of three FTFs (BS-LVS, IsIA and LevC) and one β-fructofuranosidase (Inv) were evaluated in the presence of sucrose and different concentrations of hydroquinone (**Hq**), butanol (**Bu**) and benzyl alcohol (**Bnz**) as fructosyl acceptors. These were compared to the activity of the control reaction without an acceptor ([Fig. 1](#)). The higher water solubility of **Bu** allowed the use of higher concentrations of this acceptor.

Under these conditions, BS-LVS was the enzyme retaining the highest activity at high acceptor concentration. Indeed, BS-LVS

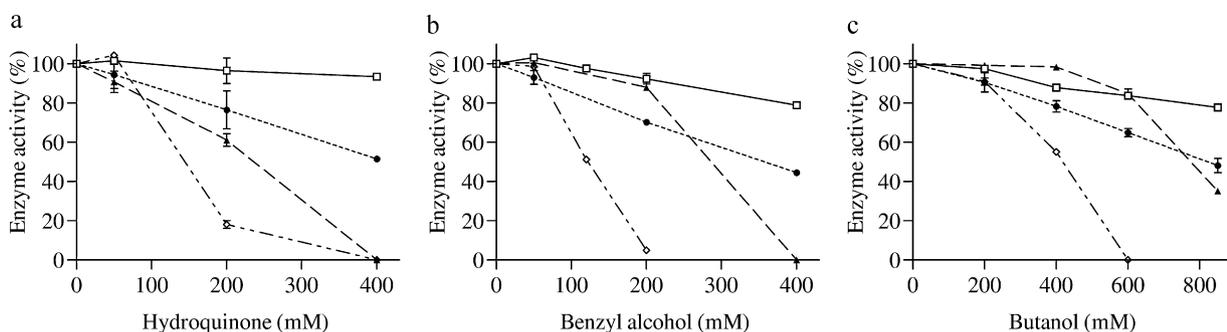


Fig. 1. Relative enzyme activity of FTFs and Inv in acceptor reactions with (a) hydroquinone, (b) benzyl alcohol and (c) butanol. (□) BS-LVS; (●) Inv; (▲) IslA; (◇) LevC.

retained more than 95% of its activity in the presence of 400 mM **Hq** (Fig. 1a) and more than 80% in 400 mM **Bnz** (Fig. 1b) and 850 mM **Bu** (Fig. 1c).

Conversely, a drastic decrease in activity was observed for Inv, IslA and LevC when concentrations of **Bnz** and **Hq** were increased. Previous reports have dealt with the low stability of some glycosyltransferases and glycosidases in the presence of phenolic compounds as acceptors [16,23]. The high activity of BS-LVS in the presence of these phenolic compounds is in agreement with its high activity and stability in the presence of organic solvents [25].

To evaluate the fructosylation efficiency, all four enzymes were evaluated in the presence of 200 mM **Hq** and analysed by TLC, using arbutin, a monoglucosylated hydroquinone derivative, as a standard. These results are shown in Fig. 2, where it is observed in the TLC plates that all four enzymes retained a fraction of their activity; different extents of glucose, fructose and polymer formation can be observed.

All enzymes were capable of forming a fructosylated product that elutes at the same R_f as arbutin, which corresponds to monofructosylated **Hq** (**Fru-Hq**). However, a qualitative comparison with fructoside spots showed that the largest amount of **Fru-Hq** was obtained with BS-LVS. On the other hand, very low amounts of fructoside were observed for FTFs IslA and LevC, in agreement with low amounts of fructose and/or glucose released. It is notable that, although Inv is rather stable in 200 mM **Hq**, the acceptor reaction leading to the formation of **Fru-Hq** takes place at the lowest efficiency among the assayed enzymes. It may therefore be concluded that among these enzymes, BS-LVS presents the highest stability in the presence of phenolic compounds and the highest **Hq** fructosylation efficiency. In addition, these results demonstrate that, in general, FTFs are better catalysts for **Hq** fructosylation than

β -fructofuranosidase. As a consequence, BS-LVS was selected for further analysis in acceptor reactions.

3.2. Effect of substrate concentration on acceptor reactions

It has been previously reported that the efficiency of GTFs on acceptor reactions is highly influenced by the nature and concentration of the acceptor [37,38]. Considering that **Fru-Hq** is an efficient tyrosinase inhibitor [24], the enzymatic fructosylation of hydroquinone mediated by BS-LVS was studied as a reference reaction to establish suitable conditions for acceptor reactions. For this purpose, the sucrose concentration was set at 400 mM: high concentrations are reported to favour transfer over hydrolysis reactions [26,28]. **Hq** concentration was varied from 100 to 500 mM, which is close to the limit of **Hq** solubility. After 20 h of reaction, sucrose was converted, and the fructosylated products were quantified by HPLC.

In all of the reactions studied, only one fructosylated product was identified as **Fru-Hq**, with the highest concentration (22 mM) obtained from 500 mM **Hq** (black bars in Fig. 3).

It is worth mentioning that at this acceptor concentration sucrose conversion was the lowest (gray bars in Fig. 3), suggesting low stability of BS-LVS at high concentrations of **Hq**. Therefore, BS-LVS storage stability in 500 mM **Hq** at 30 °C was evaluated over 24 h. Samples were withdrawn at different time intervals, and the initial rate of sucrose conversion in the absence of an acceptor was assayed as described (see Section 2.5). During the first two hours of incubation in **Hq**, more than half of the BS-LVS activity was lost (Fig. S1 in Supporting Information file), and all of the activity disappeared after 24 h. This time-dependent inactivation of BS-LVS was

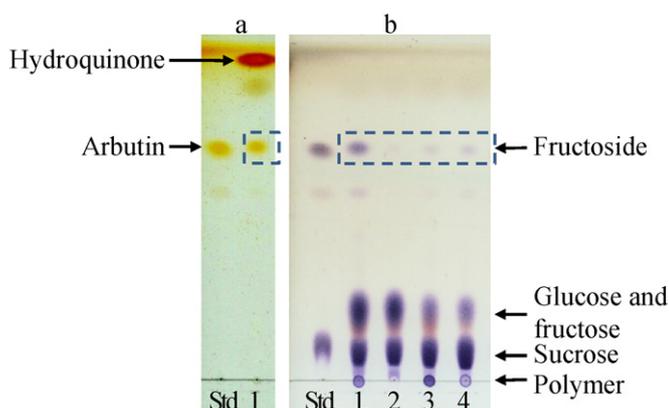


Fig. 2. TLC analysis of the fructosylation reaction catalysed by FTFs and Inv using **Hq** as acceptor. (a) Layer was visualized with iodine (only two lines are shown); (b) the same layer was visualized with α -naphthol. (Std) Sucrose and arbutin standards. (1) BS-LVS, (2) Inv, (3) IslA, and (4) LevC.

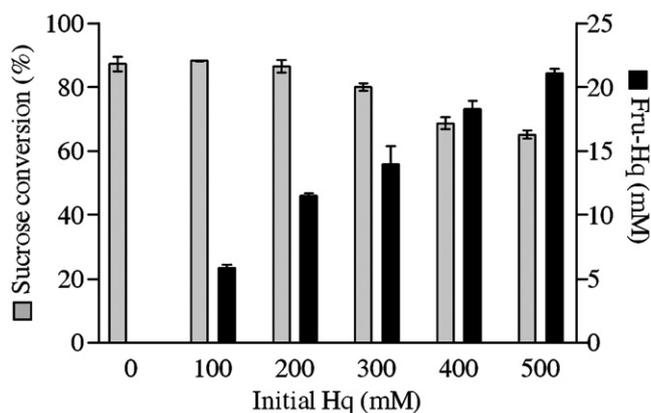


Fig. 3. Fructoside synthesised and sucrose converted by BS-LVS after 20 h of reaction as a function of the initial concentration of **Hq**. The concentrations of **Fru-Hq** produced are shown as black bars; the percentage of sucrose converted is shown as gray bars. Reactions were carried out in 400 mM sucrose and 1 U mL⁻¹ of enzyme at 30 °C.

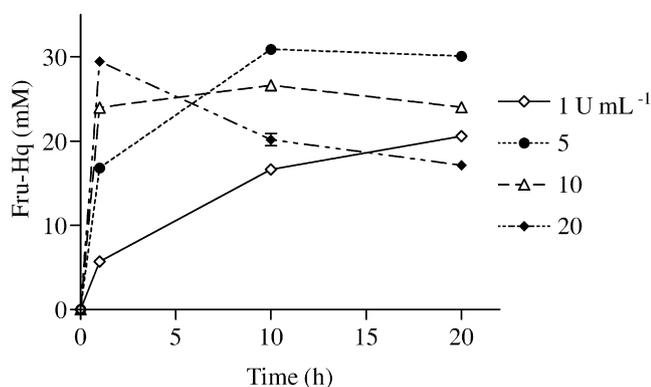


Fig. 4. Effect of enzyme concentration on the kinetics of fructoside production. Reactions were carried out in 400 mM sucrose and 500 mM **Hq** at 30 °C.

not reversible because after incubation, the enzyme was diluted to very low **Hq** concentrations to measure the activity. Although these results show an unfavourable effect of **Hq** on BS-LVS, it should be noted that the efficiency of the enzyme under operational conditions is usually higher due to the sucrose stabilisation effect on the enzyme [39]. This can be observed in Fig. 3, where in operational conditions a relatively high conversion of sucrose with the concomitant production of **Fru-Hq** is observed.

3.3. Effect of enzyme concentration

The effect of enzyme concentration on sucrose conversion and fructoside production was studied in reactions containing 400 mM sucrose and 500 mM **Hq**. As shown in Fig. 4, an important improvement on **Fru-Hq** initial production rate is observed with increasing BS-LVS concentration, with the highest **Fru-Hq** production obtained at 5 U mL⁻¹. Although at higher concentrations of enzyme (10 and 20 U mL⁻¹) a high initial **Fru-Hq** synthesis rate is observed, it is followed by a decrease in rate proportional to enzyme activity, suggesting that **Fru-Hq** synthesis is subjected to kinetic control.

From these results, it is clear that the selection of enzyme concentration in the reaction medium plays a major role in defining **Fru-Hq** yield and productivity. In fact, the higher the enzyme activity in the reaction, the higher the initial fructosylation rate and sucrose conversion, but the faster **Fru-Hq** is lost by hydrolysis. The effect of enzyme concentration was further studied following the evolution of the acceptor reaction with a BS-LVS activity of 5 U mL⁻¹ (Fig. 5). In this case, **Fru-Hq** concentration reaches 30 mM with an almost total conversion of sucrose after 10 h of reaction, as compared to 22 mM **Fru-Hq** and 65% sucrose conversion obtained with 1 U mL⁻¹ (Fig. 3). In all cases, when sucrose is exhausted, the fructoside concentration decreases. When purified **Fru-Hq** was treated with BS-LVS in the absence of sucrose, it was readily hydrolysed (results not shown). However, because the affinity of the enzyme for sucrose is higher, to maximise the **Fru-Hq** synthesis and avoid hydrolysis, further experiments were performed at 500 mM acceptor, 400 mM sucrose and 5 U mL⁻¹ BS-LVS.

3.4. Effect of organic co-solvent on the acceptor reaction

One of the most frequently used strategies to enhance yields in enzymatic processes involving hydrophobic substrates in aqueous media is the use of organic co-solvents. The general idea when using this approach is that these organic solvents may increase the solubility of the substrates and, therefore, their availability for the enzymatic reaction [16,20,40]. An additional effect of co-solvents has been reported in reactions with BS-LVS, where high

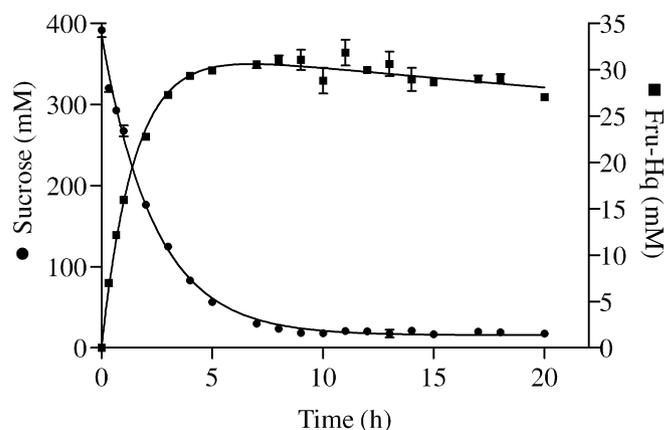


Fig. 5. Evolution of hydroquinone fructoside (**Fru-Hq**) synthesis and sucrose consumption by BS-LVS in reactions containing 400 mM sucrose, 500 mM **Hq** and 5 U mL⁻¹ of enzyme at 30 °C.

2M2P concentrations enhance the initial rate and lead to a higher transfer/hydrolysis ratio due to the depletion of thermodynamic water activity [25]. Therefore, the reactions with phenolic acceptors were carried out in 0–50% 2M2P in the reaction medium and evaluated in terms of **Fru-Hq** yield and sucrose conversion.

Unexpectedly, while sucrose conversion was practically equivalent for all of the 2M2P concentrations evaluated (data not shown), **Fru-Hq** synthesis was drastically reduced as 2M2P concentration increased (black bars in Fig. 6). It is worth mentioning that the fructose released decreased with increasing 2M2P content (results not shown), indicating that the co-solvent favours the transfer of fructosyl groups to the growing levan polymer chain, reducing the transfer to water (hydrolysis).

The effect of solvent mixtures on enzymatic processes has been evaluated in terms of reaction rates and these, in turn, have been evaluated as a function of thermodynamic activity coefficients (γ) of the substrates [41]. Actually, this coefficient may be considered as a measure of how much the substrate interacts with the medium and, consequently, of how it is available for the reaction. A robust and reliable way to predict thermophysical data for liquid systems, such as γ coefficients, has recently been reported [42]. The COnductor-like Screening MOdel for Realistic Solvation (COSMO-RS) method is based on a combination of quantum chemical calculations for solutes and solvents and statistical thermodynamics procedures. This method allows for the estimation

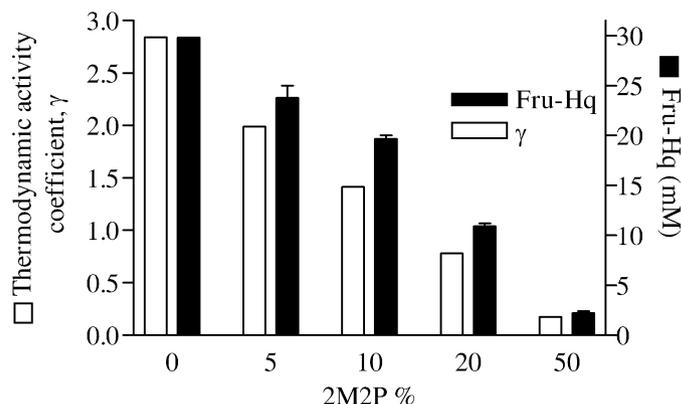


Fig. 6. Fructosylation of **Hq** with BS-LVS in aqueous–organic mixtures: the predicted thermodynamic activity coefficients (γ) of **Hq** are shown as white bars. Reactions were carried out in 400 mM sucrose, 500 mM **Hq** and 5 U mL⁻¹ of enzyme in the appropriate aqueous–organic mixture. In all reactions, conversion was higher than 85%.

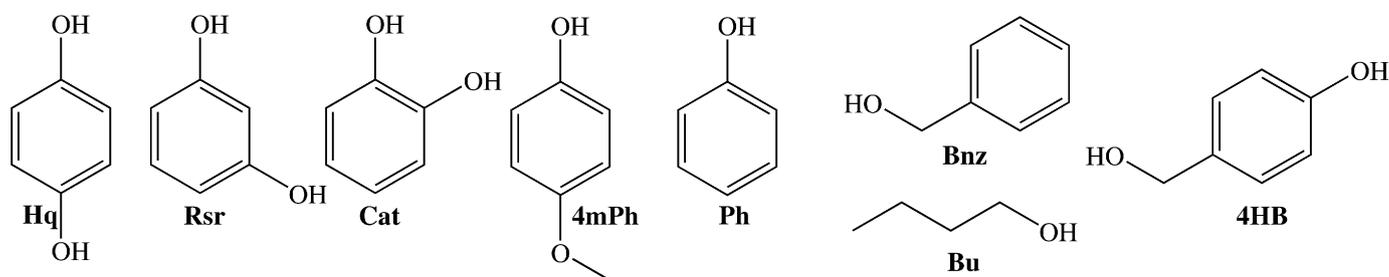


Fig. 7. Acceptors used in fructosylation reactions with BS-LVS: **Hq**, hydroquinone; **Rsr**, resorcinol; **Cat**, catechol; **4mPh**, 4-methoxyphenol; **Ph**, phenol; **Bnz**, benzyl alcohol; **Bu**, butanol; **4HB**, bifunctional acceptor 4-hydroxybenzyl alcohol.

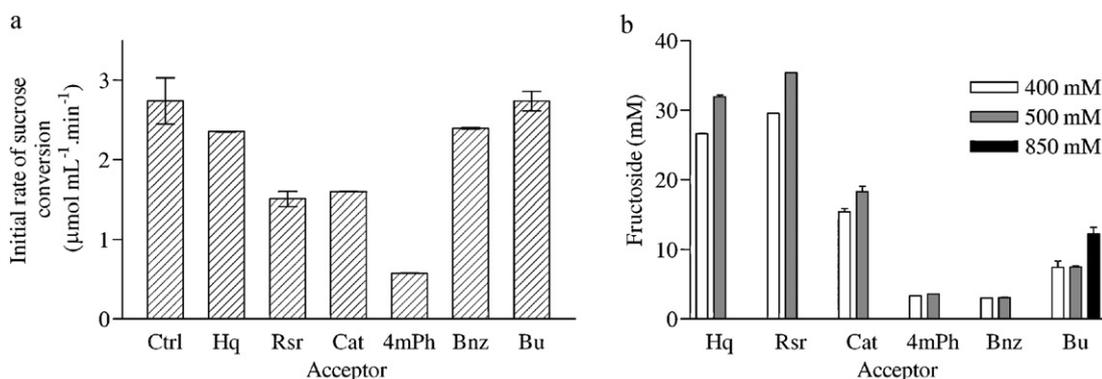


Fig. 8. Fructosylation of aromatic and primary alcohol acceptors with BS-LVS. (a) Initial rate of sucrose conversion with 500 mM acceptor. (b) Total fructoside produced at 400 mM (white bars), 500 mM (gray bars) and 850 mM (black bars) initial acceptor concentration. All reactions were carried out with 400 mM sucrose and 5 U mL⁻¹ of enzyme at 30 °C.

of solvent–solute molecular surface interactions and, from these estimations, the prediction of thermodynamic properties for liquid systems. Thus, to explain why the presence of 2M2P results in a negative effect on fructosylation, γ values of **Hq** in water/2M2P mixtures were predicted using the COSMO-RS method and are reported in Fig. 6, where it may be observed that γ values decrease almost linearly with increasing 2M2P concentration (white bars in Fig. 6).

Indeed, the hydrophobic character of **Hq** leads to a stronger molecular interaction with 2M2P than with water, decreasing the γ value as the amount of 2M2P increases. Hence, it may be concluded that the reduction in **Hq** fructosylation is due to the lower availability of the acceptor in this co-solvent. Conversely, the presence of 2M2P decreases the water activity, favouring the transfer of fructose to levan with the concomitant decrease of hydrolysis of sucrose. Therefore, the addition of a hydrophobic organic co-solvent in acceptor reactions with **Hq** is not an adequate strategy to improve fructosylation, water being a better solvent.

3.5. Acceptor reactions with hydrophobic substrates

To extend the fructosylation strategy to other aromatic or aliphatic alcohols, resorcinol (**Rsr**), catechol (**Cat**), 4-methoxyphenol (**4mPh**), phenol (**Ph**), benzyl alcohol (**Bnz**) and butanol (**Bu**) were also evaluated in acceptor reactions with BS-LVS (Fig. 7). These reactions were carried out under the previously selected conditions, *i.e.*, 400 mM sucrose, 5 U mL⁻¹ of enzyme and an adequate concentration of the acceptor. All substrates are soluble at 500 mM, except **4mPh** and **Bnz**, whose maximum solubility in water is 320 mM and 370 mM (at 25 °C), respectively; the high water solubility of **Bu** allowed for the evaluation of the effect of higher concentrations of this acceptor (850 mM).

In all cases, the highest fructoside concentrations were obtained at the highest concentration of acceptor (500 mM for dihydroxy-

benzenes or 850 mM **Bu**). Surprisingly, high initial rates of sucrose conversion (Fig. 8a) and high fructoside concentration (Fig. 8b) were obtained in reactions with **Hq**, **Cat** and **Rsr**, dihydroxybenzenes of reported low nucleophilicity, whereas reactions with **Bu** and **Bnz**, which are reportedly better nucleophiles [15,43], resulted in lower fructoside concentrations. In these conditions, negligible initial rates were observed when phenol was used as the acceptor.

It is important to note that, although the initial rates of sucrose conversion for **Bu** and **Bnz** are similar to those observed for dihydroxybenzenes (Fig. 8a), the final fructoside concentrations were considerably lower (Fig. 8b). This suggests that even if **Bu** and **Bnz** do not seem to affect BS-LVS activity, these primary alcohols are not good acceptors: all sucrose converted is either hydrolysed or transferred to levan.

Interestingly, even when the activity of BS-LVS in the presence of **4mPh** was greatly reduced, the fructoside yield relative to sucrose converted was higher than that observed for **Bnz**, leading to the conclusion that **4mPh** is a better acceptor than primary alcohols, as shown in Table 1 for 500 mM of **4mPh**. In this context, BS-LVS may be considered an interesting catalyst for fructosylation and other synthetic applications, as fructoside yields (*i.e.*, 30 mM **Fru-Hq**)

Table 1
Nucleophilicity (ω^-) and pK_a values for the different acceptors evaluated.

Acceptor	pK _a	Nucleophilicity (ω^-) ^a	Fructosylation yield (%) ^b
Butanol	16.95	0.0194	1.91
Benzyl alcohol	15.20	0.0102	0.81
4-Methoxyphenol	9.94	0.0065	6.25
Hydroquinone	9.68	0.0104	9.51
Catechol	9.34	0.0080	6.86
Resorcinol	8.91	0.0066	11.70

^a Nucleophilicity calculated for the deprotonated species.

^b Yield relative to sucrose conversion, using 500 mM acceptor and 400 mM sucrose.

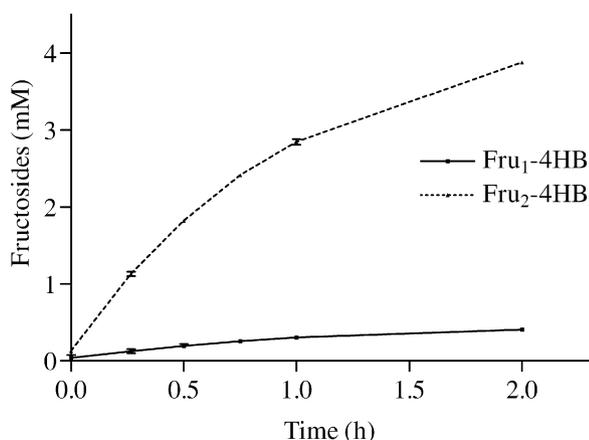


Fig. 9. Evolution of the fructosylation products in acceptor reactions of BS-LVS with **4HB**. Reaction conditions: 400 mM sucrose, 200 mM **4HB**, 5 U mL⁻¹ at 30 °C.

are higher than those previously reported for phenolic compounds (4 mM) [24].

3.6. Influence of acceptor nucleophilicity on the fructosylation reaction

To explain the better acceptor selectivity shown by BS-LVS for phenols over primary alcohols, a bifunctional compound such as 4-hydroxybenzyl alcohol (**4HB**) was used as an acceptor (Fig. 7). This substrate allows a direct selectivity comparison because it holds a phenol and a primary hydroxyl within the same molecule. The reaction was carried out in a medium saturated with 200 mM **4HB** (water solubility of **4HB** is around 54 mM at 20 °C).

Two different fructosylated products **Fru₁-4HB** and **Fru₂-4HB** were identified, corresponding to the fructosylation of **4HB** on the primary and aromatic -OH, respectively, as confirmed by NMR and HPLC.

When evaluating the reaction kinetics, it was observed that the initial rate of **Fru₁-4HB** formation was 10 times lower (5.03 μmol L⁻¹ min⁻¹) than the initial rate of **Fru₂-4HB** formation (50.64 μmol L⁻¹ min⁻¹), demonstrating the higher specificity of BS-LVS for aromatic hydroxyls (Fig. 9).

According to the acid/base reaction mechanism proposed for BS-LVS [44,45], in the first step, the Glu342 residue donates a proton to the glycosyl oxygen atom of the leaving glucosyl residue, whereas the nucleophile Asp86 residue forms a typical glycosyl-enzyme intermediate. In the second step, the deprotonated Glu342 acts as a general base to activate (deprotonate) the acceptor molecule, making it able to attack the fructose C2 to form the new glycosidic linkage (Fig. S2 in SI file).

Deprotonated hydroxyls in the acceptor molecules are regarded as better nucleophiles than their non-deprotonated species. Therefore, a critical step in the acceptor reaction is the ability of a hydroxylated acceptor molecule to donate a proton and become a better nucleophile. This property may be associated with the pK_a of the acceptor.

To explain the different reactivity of primary and aromatic alcohols in acceptor reactions with BS-LVS, the nucleophilicity (ω^-) values of the deprotonated species of some of the acceptors studied were calculated according to Jaramillo et al. [32,33] and compared to pK_a values reported for different aromatic and primary alcohols. These values are given in Table 1, where it is clear that the values of ω^- are in the same order of magnitude for both aromatic and primary deprotonated alcohols, indicating that once the aromatic and primary alcohols are deprotonated, both species may behave as good nucleophiles. Nevertheless, the same data revealed an inverse

relationship between fructosylation yield and pK_a values. Indeed, the fructosylation of **4HB** on the aromatic hydroxyl (pK_a = 9.48; ω^- = 0.0041) proceeds 10 times faster than the fructosylation of its primary hydroxyl (pK_a = 15.21; ω^- = 0.009). This indicates that the higher reactivity of phenolic groups may be explained by their ability to be deprotonated and become activated nucleophiles.

In terms of BS-LVS catalytic behaviour, these facts suggest that the higher acidity of phenolic compounds facilitates the loss of their acidic proton, especially when they are confronted with the basic environment of the catalytic site in BS-LVS, that is, when Glu342 is deprotonated. Therefore, phenolic molecules become better acceptors, as higher efficiencies in enzymatic fructosylation reactions with BS-LVS were observed.

4. Conclusions

Among several enzymes that are able to fructosylate hydrophobic compounds, BS-LVS was selected due to its activity in the presence of aromatic or aliphatic alcohol acceptors. In particular, BS-LVS was very efficient in fructosylation reactions due to its higher stability in the presence of hydrophobic compounds, allowing concentrations of up to 500 mM in the reaction medium. Three different activities are commonly present in BS-LVS with sucrose: transfer of fructose to levan, transfer of fructose to an acceptor and sucrose hydrolysis. Surprisingly, the common strategy to improve glycosylation of hydrophobic molecules by the addition of organic co-solvents resulted in an important reduction of sucrose hydrolysis and also a decrease in the fructosylation yield, favouring the fructose transfer to levan. This behaviour was theoretically explained in terms of the effect of the solvent on the acceptor thermodynamic activity, and this concept may become a useful tool in predicting and designing acceptor reactions in organic media.

Several fructosides were produced and purified through acceptor reactions in aqueous media; the synthesis of **Fru-Cat**, **Fru-Rsr**, **Fru-4mPh**, **Fru₂-4HB** and **Fru-Ph** is reported for the first time. Indeed, to our knowledge, we report the highest concentration of **Fru-Hq** (30 mM) using a fructosyltransferase as catalyst. It was found that phenolic compounds are fructosylated with higher efficiencies than primary alcohols, and this reaction selectivity correlates with the pK_a value of the acceptor, with higher yields at low pK_a values, where the amount of deprotonated acceptor is higher. The present enzymatic procedures and design tools represent a good reference for the synthesis of novel glycosylated products, with potential use in cosmetics and pharmaceuticals.

Acknowledgments

E. Castillo thanks DGAPA-UNAM for a sabbatical fellowship and INSA-Toulouse for an invited researcher fellowship. A. Mena-Arizmendi thanks CONACyT for Ph.D. fellowship 169648. This work has been supported by the grants IN226706-3 PAPIIT-UNAM and CONACyT 40609-Z. Authors also thank M.E. Rodríguez and F. Gonzalez from IBt-UNAM for technical assistance, as well as Victoria Labastida and Gabriela Vargas from CIQ-UAEM, for mass spectroscopy and NMR analysis, and J.M. Hurtado from IBt-UNAM for assistance with computing resources.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.molcatb.2011.02.002.

References

- [1] B.M. de Roode, A.C.R. Franssen, A. van der Padt, R.M. Boom, *Biotechnol. Prog.* 19 (2003) 1391–1402.

- [2] P.R. Cheeke, Encyclopedia of Life Sciences, John Wiley & Sons Ltd., 2001.
- [3] R.W. Hofmann, E.E. Swinny, S.J. Bloor, K.R. Markham, K.G. Ryan, B.D. Campbell, B.R. Jordan, D.W. Fountain, *Ann. Bot.* 86 (2000) 527–537.
- [4] H. Matsuda, T. Wang, H. Managi, M. Yoshikawa, *Bioorg. Med. Chem.* 11 (2003) 5317–5323.
- [5] B. Mishra, K.I. Priyadarsini, M.S. Kumar, M.K. Unnikrishnan, H. Mohan, *Bioorg. Med. Chem.* 11 (2003) 2677–2685.
- [6] C. Rice-Evans, *Curr. Med. Chem.* 8 (2001) 797–807.
- [7] P.H. Wu, R. Giridhar, W.T. Wu, *Biotechnol. Bioeng.* 95 (2006) 1138–1147.
- [8] F. van Rantwijk, M.W.V. Oosterom, R.A. Sheldon, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 6 (1999) 511–532.
- [9] M. Schottelius, H.J. Wester, J.C. Reubi, R. Senekowitsch-Schmidtke, M. Schwaiger, *Bioconj. Chem.* 13 (2002) 1021–1030.
- [10] A.V. Demchenko, *Curr. Org. Chem.* 7 (2003) 35–79.
- [11] F.A. Shaikh, S.G. Withers, *Biochem. Cell Biol.* 86 (2008) 169–177.
- [12] M. Skerget, P. Kotnik, M. Hadolin, H.R. Hras, M. Simonic, Z. Knez, *Food Chem.* 89 (2005) 191–198.
- [13] Y.G. Du, G.H. Wei, R.J. Linhardt, *J. Org. Chem.* 69 (2004) 2206–2209.
- [14] K. Toshima, K. Tatsuta, *Chem. Rev.* 93 (1993) 1503–1531.
- [15] B.M. de Roode, H. Zuilhof, M.C.R. Franssen, A. van der Padt, A. de Groot, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* (2000) 2217–2224.
- [16] R. Vijayakumar, S. Divakar, *Biotechnol. Lett.* 27 (2005) 1411–1415.
- [17] R. Prodanovic, N. Milosavic, D. Sladic, M. Zlatovic, B. Bozic, T.C. Velickovic, Z. Vujcic, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 35 (2005) 142–146.
- [18] F.J. Plou, A.G. de Segura, A. Ballesteros, in: J. Polaina, A.P. MacCabe (Eds.), *Industrial Enzymes*, Springer, Valencia, Spain, 2007, pp. 141–157.
- [19] K. Nakahara, M. Kontani, H. Ono, T. Kodama, T. Tanaka, T. Ooshima, S. Hamada, *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (1995) 2768–2770.
- [20] A. Bertrand, S. Morel, F. Lefoulon, Y. Rolland, P. Monsan, M. Remaud-Simeon, *Carbohydr. Res.* 341 (2006) 855–863.
- [21] G.H. Meulenbeld, H. Zuilhof, A. van Veldhuizen, R.H.H. van den Heuvel, S. Hartmans, *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (1999) 4141–4147.
- [22] Y.H. Moon, G. Kim, J.H. Lee, X.J. Jin, D.W. Kim, D. Kim, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 40 (2006) 1–7.
- [23] G.H. Meulenbeld, S. Hartmans, *Biotechnol. Bioeng.* 70 (2000) 363–369.
- [24] J. Kang, Y.-M. Kim, N. Kim, D.-W. Kim, S.-H. Nam, D. Kim, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 83 (2009) 1009–1016.
- [25] E. Castillo, A. Lopez-Munguía, *J. Biotechnol.* 114 (2004) 209–217.
- [26] M. Canedo, M. Jimenez-Estrada, J. Cassani, A. López-Munguía, *Biocatal. Biotransform.* 16 (1999) 475–485.
- [27] M.A. Perez-Oseguera, L. Guereca, A. López-Munguía, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45 (1996) 465–471.
- [28] M.E. Ortiz-Soto, V. Olivares-Illana, A. Lopez-Munguia, *Biocatal. Biotransform.* 22 (2004) 275–281.
- [29] C. Olvera, S. Centeno-Leija, A. Lopez-Munguia, *Antonie van Leeuwenhoek* 92 (2007) 11–20.
- [30] J.B. Sumner, S.F. Howell, *J. Biol. Chem.* 108 (1935) 51–54.
- [31] J. Chandrasekhar, J.G. Andrade, P.V.R. Schleyer, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 5612–5614.
- [32] P. Jaramillo, P. Pérez, P. Fuentealba, *J. Phys. Chem. A* 113 (2009) 6812–6817.
- [33] P. Jaramillo, P. Pérez, R. Contreras, W. Tiznado, P. Fuentealba, *J. Phys. Chem. A* 110 (2006) 8181–8187.
- [34] A. Klamt, *J. Phys. Chem.* 99 (1995) 2224–2235.
- [35] A. Klamt, F. Eckert, *Fluid Phase Equilib.* 172 (2000) 43–72.
- [36] A. Klamt, *COSMO-RS: From Quantum Chemistry to Fluid Phase Thermodynamics and Drug Design*, Elsevier, Amsterdam, 2005.
- [37] A. Gómez de Segura, M. Alcalde, M. Bernabé, A. Ballesteros, F.J. Plou, *J. Biotechnol.* 124 (2006) 439–445.
- [38] J. Seibel, R. Beine, R. Moraru, C. Behringer, K. Buchholz, *Biocatal. Biotransform.* 24 (2006) 157–165.
- [39] A. Madlová, M. Antořová, M. Polakovic, V. Báleš, *Chem. Pap.* 54 (2000) 339–344.
- [40] J. Dudíková, M. Mastihubová, V. Mastihuba, N. Kolarova, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 45 (2007) 27–33.
- [41] G.C. Sandoval, J.-S. Condoret, A. Marty, *AIChE J.* 47 (2001) 718–726.
- [42] A. Klamt, F. Eckert, W. Arlt, *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* 1 (2010) 101–122.
- [43] R. Macomber, *Organic Chemistry*, vol. II, University Science Books, 1996, pp. 160–183.
- [44] G.Y. Meng, K. Fütterer, *Nat. Struct. Biol.* 10 (2003) 935–941.
- [45] R. Chambert, G. Treboul, R. Dedonder, *Eur. J. Biochem.* 41 (1974) 285–300.

Análisis de RMN de los fructósidos sintetizados

Análisis de RMN realizados para elucidar la estructura química de los productos de fructosilación reportados en este trabajo, obtenidos mediante la síntesis enzimática catalizada por BS-LVS. A continuación se muestran los espectros obtenidos por RMN ^1H y RMN ^{13}C . En algunos de los fructósidos se realizaron estudios en dos dimensiones, para los cuales también se incluyen los espectros correspondientes (COSY, HSQC y/o HMBC). Los desplazamientos químicos se reportan en partes por millón (ppm) relativos a la molécula de H_2O . Para cada producto de fructosilación se detallan en un párrafo las señales encontradas, con las asignaciones a protones y carbonos, de acuerdo con la numeración dada en la figura correspondiente a cada fructósido.

Fructósido de catecol

2-hidroxifenil- β -D-fructofuranósido (Fru-Cat). RMN ^1H (400 MHz, D_2O): δ 7.24 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-3); 7.04 (1H, t, $J = 7.6$ Hz, H-5); 6.91 (1H, d, $J = 8$ Hz, H-6); 6.85 (1H, t, $J = 7.6$ Hz, H-4); 4.27 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3'); 4.08 (1H, t, $J = 8.0$ Hz, $J = 8.8$ Hz, H-4'); 3.88 (1H, ddd, $J = 2.67$ Hz, $J = 7.2$ Hz, $J = 7.2$ Hz, H-5'); 3.69 (1H, dd, $J = 2.6$ Hz, $J = 12.2$ Hz, H-6'b); 3.66 (1H, d, $J = 12.4$ Hz, H-1'b), 3.61 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-1'a); 3.45 (1H, dd, $J = 7.0$ Hz, $J = 12.2$ Hz, H-6'b). RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O): $\delta = 148.14$ (C-1), 140.31 (C-2), 125.63 (C-5), 124.21 (C-3), 120.62 (C-4), 116.80 (C-6), 107.04 (C-2'), 81.69 (C-5'), 76.42 (C-3'), 73.85 (C-4'), 61.85 (C-6'), 60.60 (C-1'). HRFABMS (modo positivo), calcd. para $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_7\text{Na}$: 295.2468, encontrado: 295.0815.

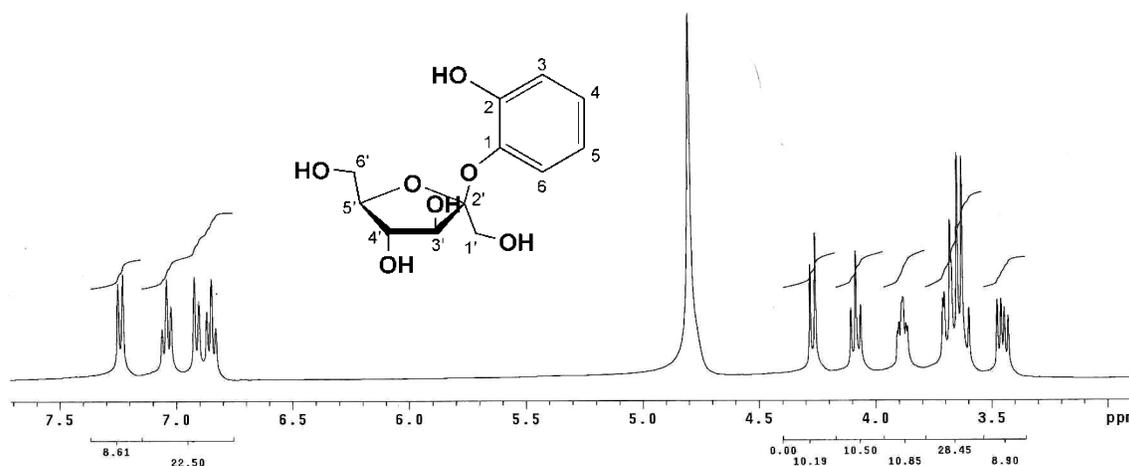


Figura A1. Espectro de RMN ^1H del producto de fructosilación **Fru-Cat**. Realizado en espectrómetro Varian operando a 400 MHz.

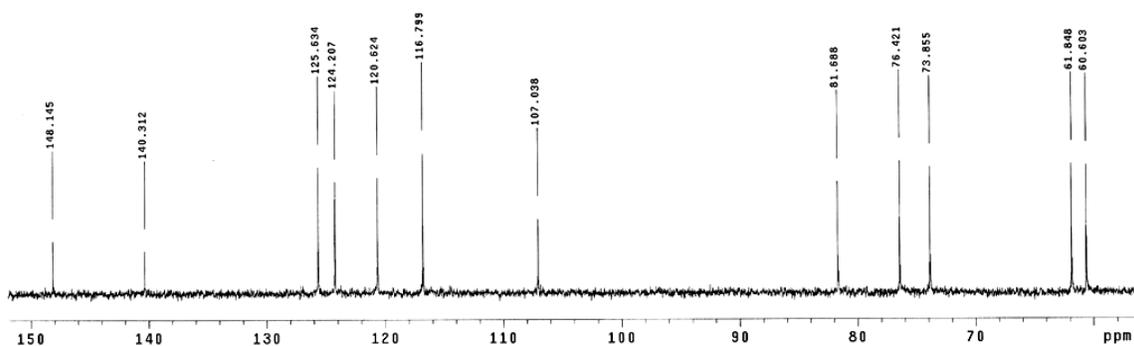


Figura A2. Espectro de RMN ^{13}C del producto de fructosilación **Fru-Cat**. Realizado en espectrómetro Varian operando a 100 MHz.

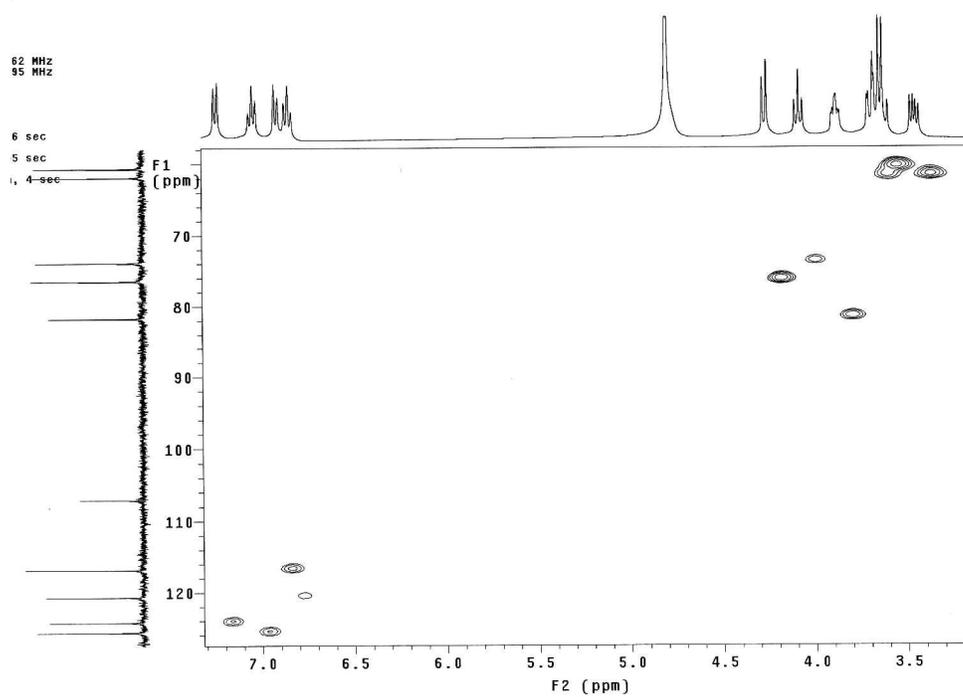


Figura A3. Análisis en doble dimensión HSQC del producto de fructosilación **Fru-Cat**.

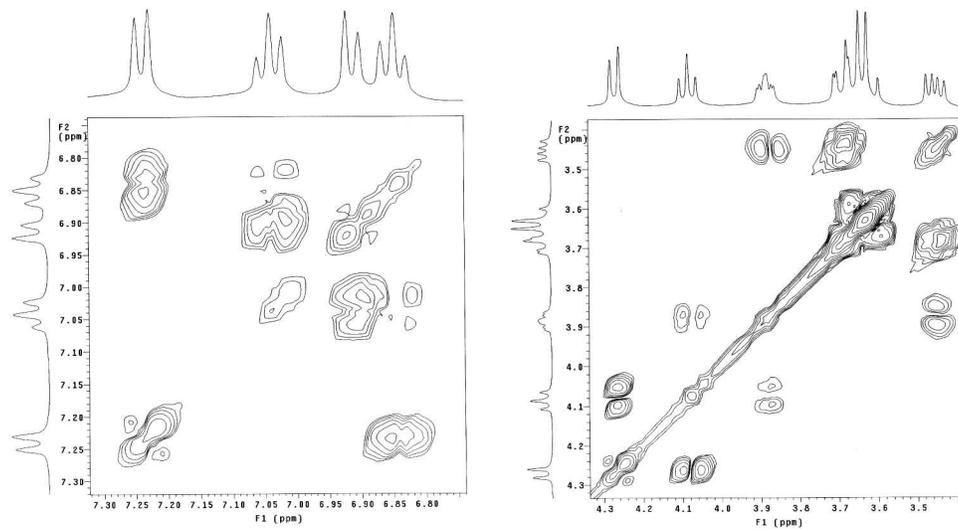


Figura A4. Análisis en doble dimensión COSY del producto de fructosilación **Fru-Cat**.

Fructósido de hidroquinona

4-hidroxifenil- β -D-fructofuranósido (Fru-Hq). RMN ^1H (400 MHz, D_2O): δ 7.05 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-5 y H-3); 6.78 (2H, d, $J = 9.2$ Hz, H-6 y H-2); 4.25 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3'); 4.11 (1H, t, $J = 8.0$ Hz, $J = 8.0$ Hz, H-4'); 3.91 (1H, ddd, $J = 3.2$ Hz, $J = 7.6$ Hz, $J = 7.6$ Hz, H-5'); 3.78 (1H, dd, $J = 3.2$ Hz, $J = 12.4$ Hz, H-6'a); 3.63 (1H, dd, $J = 7.6$ Hz, $J = 12.4$ Hz, H-6'b); 3.61 (1H, d, $J = 12.4$ Hz, H-1'a); 3.53 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-1'b). RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O): $\delta = 152.06$ (C-1), 146.10 (C-4), 123.72 (C-2 y C-6), 115.80 (C-3 y C-5), 106.04 (C-2'), 81.78 (C-5'), 76.07 (C-3'), 74.69 (C-4'), 62.80 (C-6'), 60.27 (C-1'). HRFABMS (modo positivo), calcd. para $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{O}_7$: 273.2592, encontrado: 273.0943.

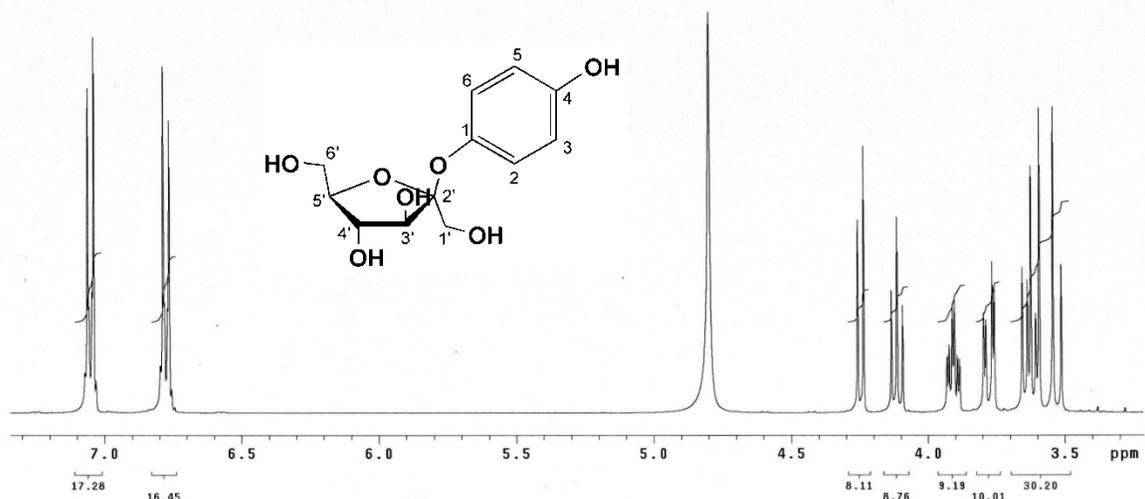


Figura A5. Espectro de RMN ^1H del producto de fructosilación **Fru-Hq**. Realizado en espectrómetro Varian operando a 400 MHz.

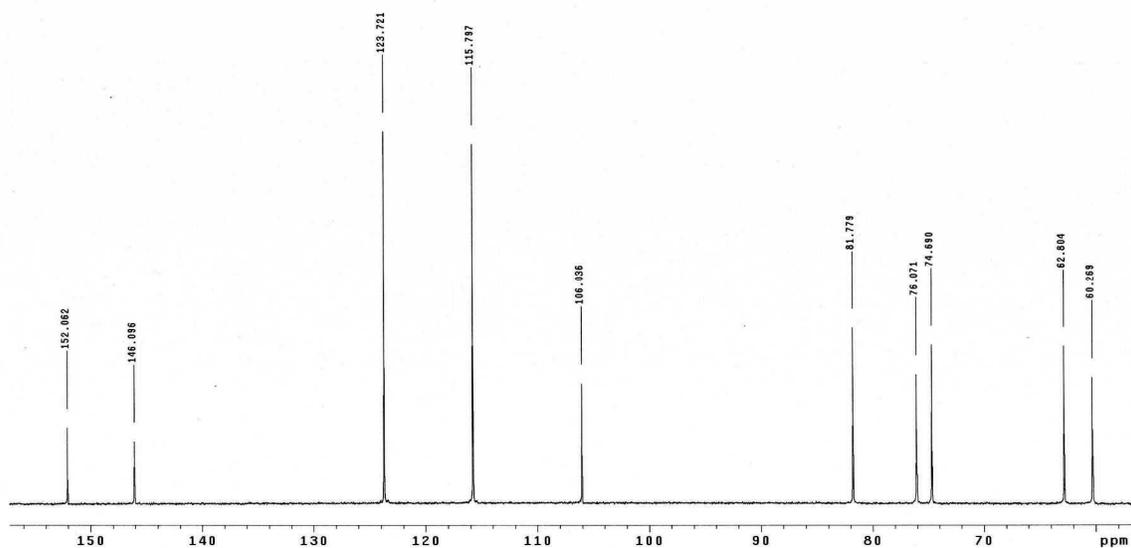


Figura A6. Espectro de RMN ^{13}C del producto de fructosilación **Fru-Hq**. Realizado en espectrómetro Varian operando a 100 MHz.

Fructósido de resorcinol

3-hidroxifenil- β -D-fructofuranósido (Fru-Rsr). RMN ^1H (400 MHz, D_2O): δ 7.13 (1H, t, $J = 8.0$ Hz, $J = 8.4$ Hz, H-5); 6.73 (1H, dd, $J = 2.0$ Hz, $J = 8.0$ Hz, H-6); 6.69 (1H, t, $J = 2.4$ Hz, H-2); 6.59 (1H, dd, $J = 2.4$ Hz, $J = 8.4$ Hz, H-4); 4.22 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3'); 4.10 (1H, t, $J = 8$ Hz, H-4'); 3.92 (1H, ddd, $J = 3.2$ Hz, $J = 7.7$ Hz, $J = 7.7$ Hz, H-5'); 3.75 (1H, dd, $J = 3.4$ Hz, $J = 12.2$ Hz, H-6'a); 3.64 (1H, d, $J = 13.6$ Hz, H-1'a); 3.60 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-1'b); 3.59 (1H, dd, $J = 7.4$ Hz, $J = 12.2$ Hz, H-6'b). RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O): δ = 156.36 (C-1), 154.51 (C-3), 130.23 (C-5), 113.79 (C-3), 111.09 (C-4), 109.07 (C-6), 106.32 (C-2'), 82.08 (C-5'), 76.30 (C-3'), 74.74 (C-4'), 62.97 (C-6'), 59.89 (C-1'). HRFABMS (modo positivo), calcd. para $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_7\text{Na}$: 295.2410, encontrado: 295.0789.

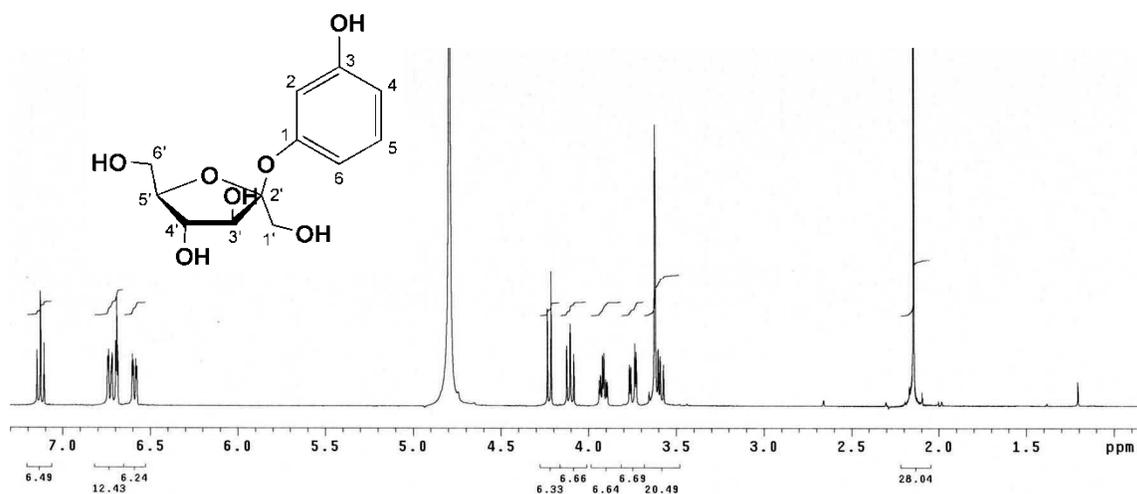


Figura A7. Espectro de RMN ^1H del producto de fructosilación **Fru-Rsr**. Realizado en espectrómetro Varian operando a 400 MHz. Señal a 2.15 ppm correspondiente al disolvente.

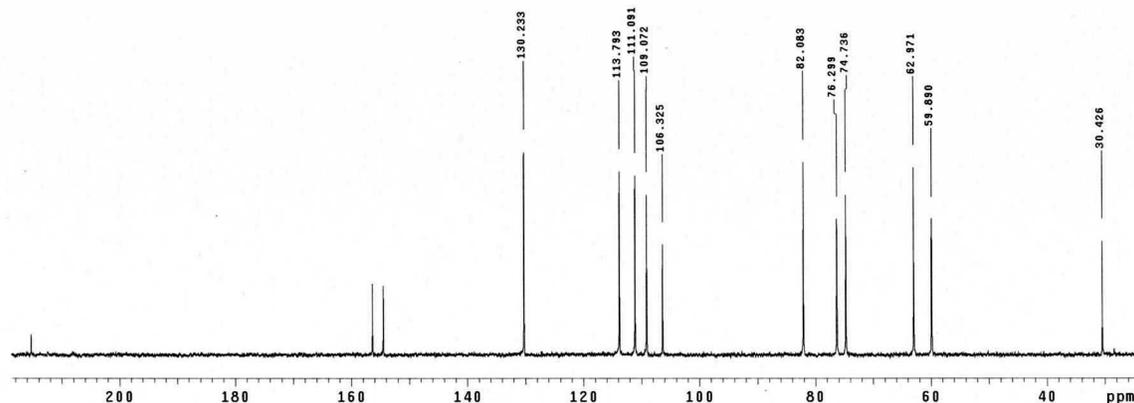


Figura A8. Espectro de RMN ^{13}C del producto de fructosilación **Fru-Rsr**. Realizado en espectrómetro Varian operando a 100 MHz. Señal en 30.4 ppm correspondiente al disolvente.

Fructósido de 4-metoxifenol

4-metoxifenil- β -D-fructofuranósido (Fru-4mPh). RMN ^1H (400 MHz, D_2O): δ 6.97 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3 y H-5); 6.73 (2H, $J = 9.2$ Hz, H-2 y H-6); 4.09 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3'); 3.95 (1H, t, $J = 8.0$ Hz, $J = 8.4$ Hz, H-4'); 3.75 (1H, ddd, $J = 3.2$ Hz, $J = 7.8$ Hz, $J = 7.8$ Hz, H-5'); 3.61 (1H, dd, $J = 2.8$ Hz, $J = 11.6$ Hz, H-6'a); 3.60 (3H, s, H-7); 3.46 (1H, dd, $J = 8.0$ Hz, $J = 12.4$ Hz, H-6b'); 3.45 (1H, d, $J = 12.4$ Hz, H-1'a); 3.38 (1H, d, $J = 12.4$ Hz, H-1'b). RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O): δ = 155.40 (C-1), 146.73 (C-4), 123.51 (C-2 y C-6), 114.54 (C-3 y C-5), 106.10 (C-2'), 81.81 (C-5'), 76.07 (C-3'), 74.63 (C-4'), 62.74 (C-6'), 60.22 (C-1'), 55.77 (C-7). HRFABMS (modo positivo), calcd. para $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_7\text{Na}$: 309.2676, encontrado: 309.0949.

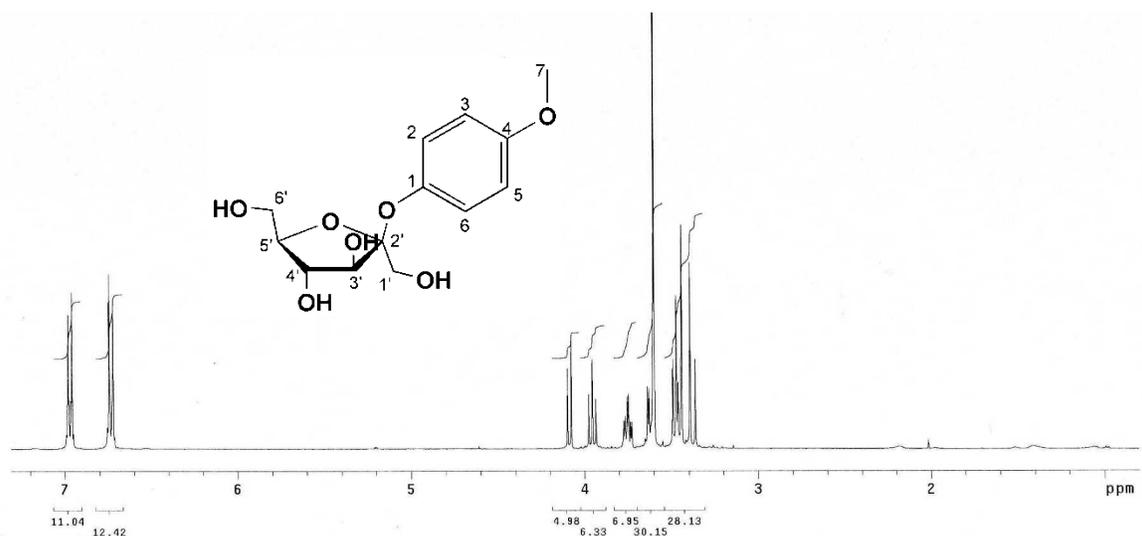


Figura A9. Espectro de RMN ^1H del producto de fructosilación **Fru-4mPh**. Realizado en espectrómetro Varian operando a 400 MHz.

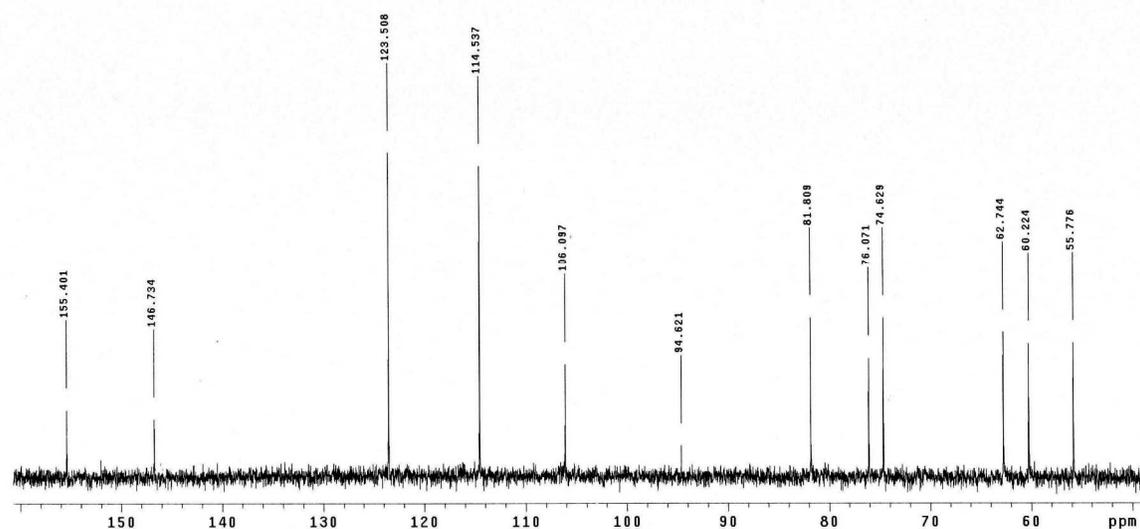


Figura A10. Espectro de RMN ^{13}C del producto de fructosilación **Fru-4mPh**. Realizado en espectrómetro Varian operando a 100 MHz

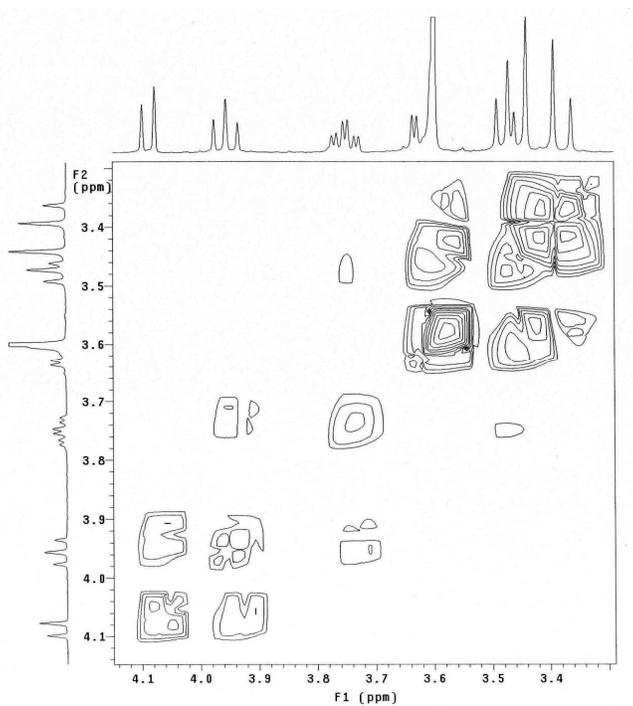


Figura A11. Análisis en doble dimensión COSY del producto de fructosilación **Fru-4mPh**

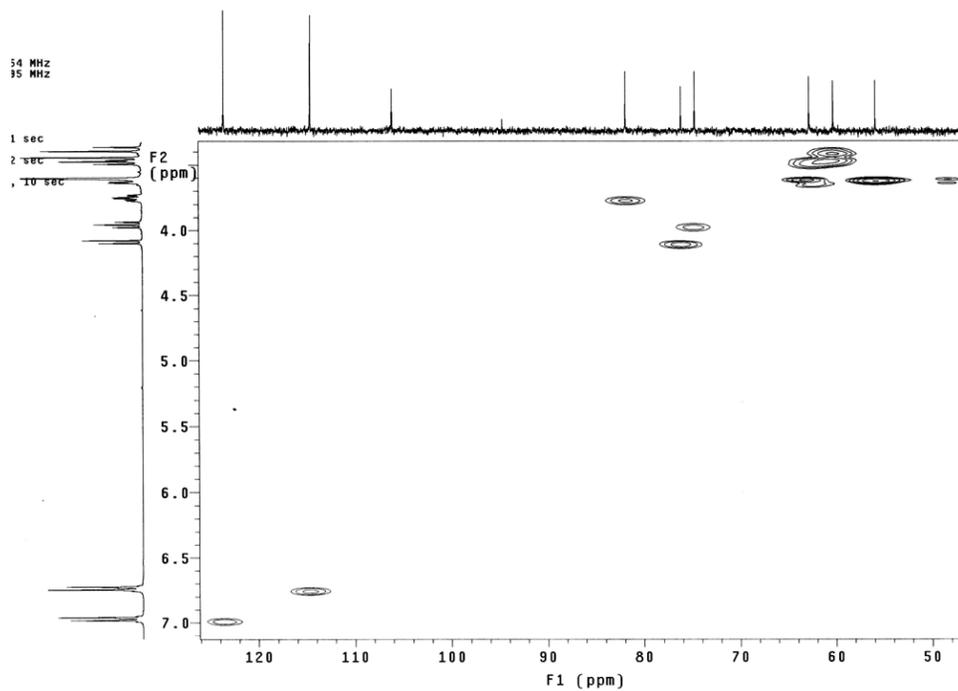


Figura A12. Análisis en doble dimensión HSQC del producto de fructosilación **Fru-4mPh**

Fructósido de alcohol bencílico

bencil- β -D-fructofuranósido (**Fru-Bnz**). RMN ^1H (300 MHz, D_2O): δ 7.35-7.25 (m, 5H, ArH); 4.12 (1H, d, $J = 8.7$ Hz, H-3'); 4.01 (1H, t, $J = 7.5$ Hz, $J = 8.7$ Hz, H-4'); 3.78 (1H, ddd, $J = 3.3$ Hz, $J = 7.4$ Hz, $J = 7.4$ Hz, H-5'); 3.72 (1H, d, $J = 12.3$ Hz, H-1a); 3.66 (1H, dd, $J = 3.3$ Hz, $J = 12.15$ Hz, H-6'a); 3.61 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-1b); 3.46 (1H, dd, $J = 7.5$ Hz, $J = 12.3$ Hz, H-6'b). RMN ^{13}C (75 MHz, D_2O): $\delta = 138.87$ (C-2), 129.50 (C-4 y C-6), 128.78 (C-5), 128.67 (C-3 y C-7), 104.87 (C-2'), 82.06 (C-5'), 77.31 (C-3'), 75.63 (C-4'), 64.36 (C-1), 63.46 (C-6'), 61.03 (C-1'). HRFABMS (modo positivo), calcd. para $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_6\text{Na}$: 293.2682, encontrado: 293.0965.

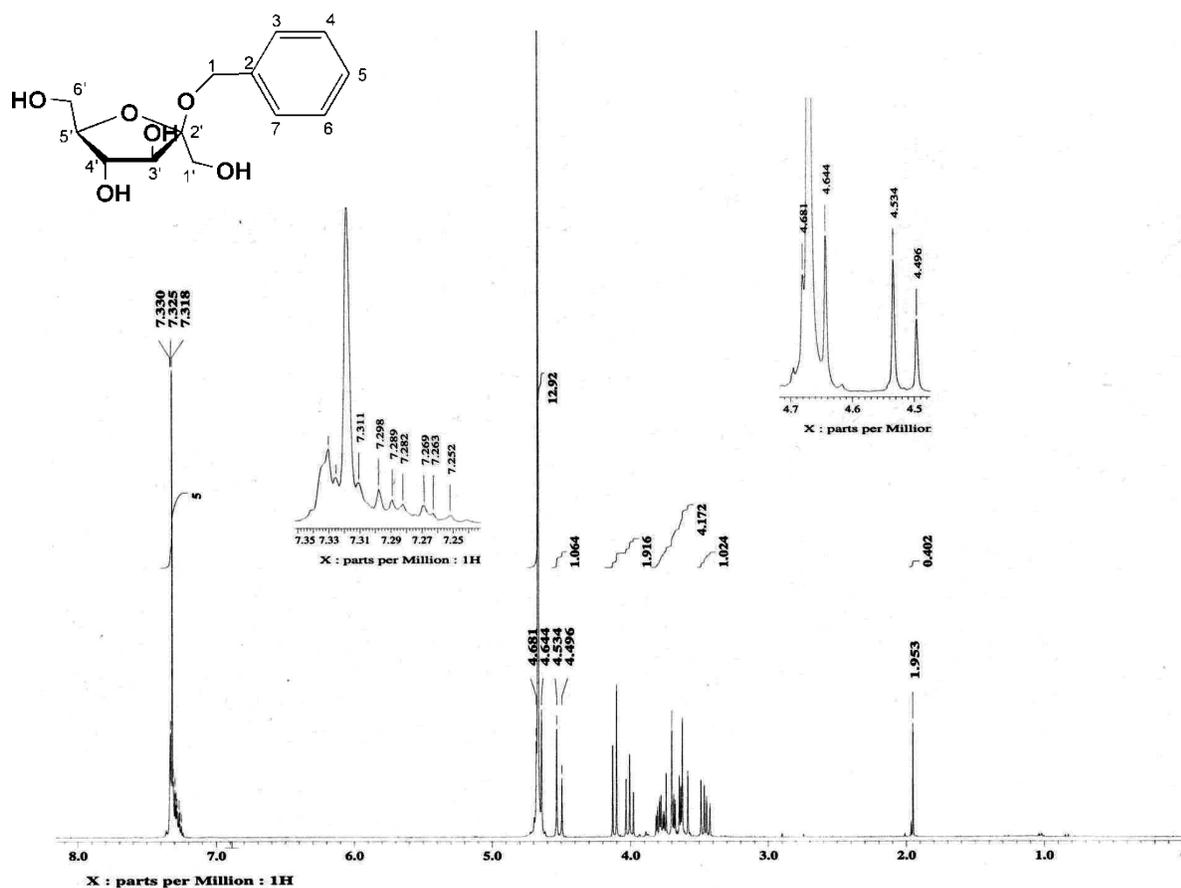


Figura A13. Espectro de RMN ^1H del producto de fructosilación **Fru-Bnz**. Realizado en un equipo Eclipse JEOL (E) operando a 300 MHz.

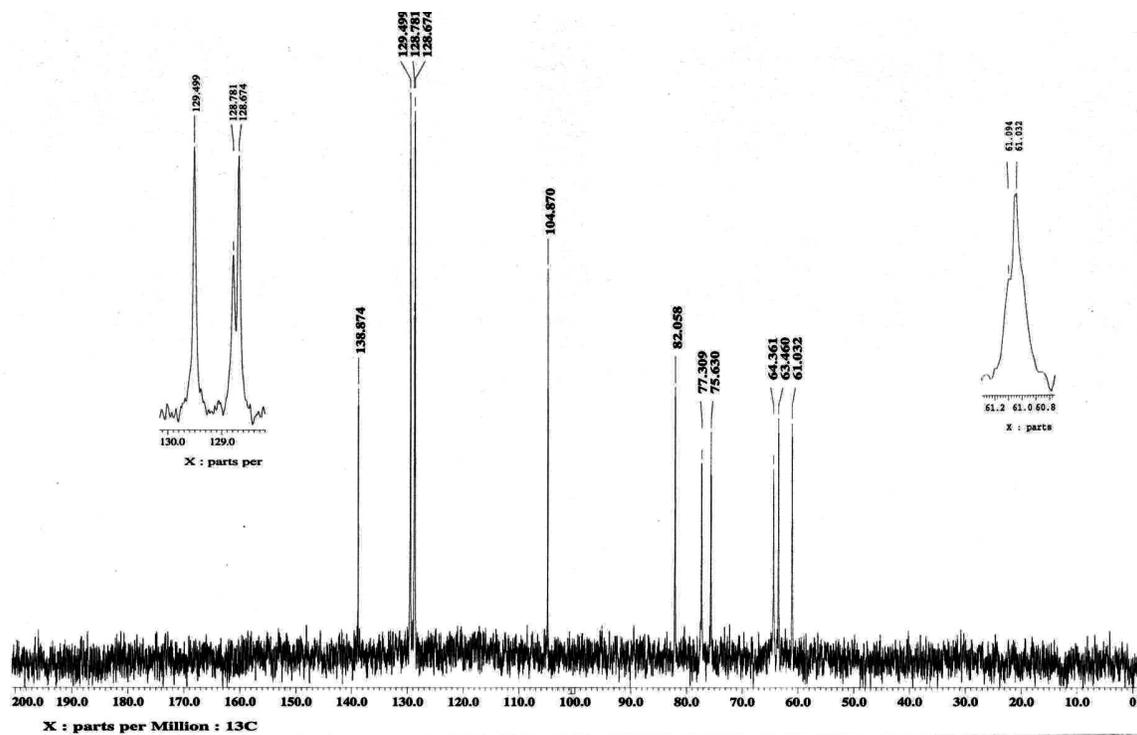


Figura A14. Espectro de RMN ^{13}C del producto de fructosilación **Fru-Bnz**. Realizado en un equipo Eclipse JEOL (E) operando a 75 MHz.

Fructósido de fenol

fenil- β -D-fructofuranósido (Fru-Ph). RMN ^1H (400 MHz, D_2O): δ 7.26 (2H, ddd, $J = 1.87$ Hz, $J = 6.9$ Hz, $J = 6.9$ Hz, H-3 y H-5); 7.16 (2H, ddd, $J = 1.2$ Hz, $J = 1.6$ Hz, $J = 8.6$ Hz, H-2 y H-6); 7.07 (1H, ddd, $J = 1.3$ Hz, $J = 7.2$ Hz, $J = 7.2$ Hz, H-4); 4.24 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3'); 4.11 (1H, t, $J = 7.6$ Hz, $J = 7.6$ Hz, H-4'); 3.91 (1H, ddd, $J = 3.1$ Hz, $J = 7.7$ Hz, $J = 7.7$ Hz, H-5'); 3.72 (1H, dd, $J = 3.2$ Hz, $J = 12.4$ Hz, H-6'a); 3.60 (1H, d, $J = 12.8$ Hz, H-1'a); 3.57 (1H, d, $J = 12.4$ Hz, H-1'b); 3.56 (1H, dd, $J = 7.6$ Hz, $J = 12.0$ Hz, H-6'b). RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O): δ = 153.20 (C-1), 129.50 (C-3 y C-5), 124.12 (C-4), 121.82 (C-2 y C-6), 106.17 (C-2'), 81.98 (C-5'), 76.19 (C-3'), 74.72 (C-4'), 64.94 (C-6'), 59.94 (C-1'). HRFABMS (modo positivo), calcd. para $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_6\text{Na}$: 279.2416, encontrado: 279.0913.

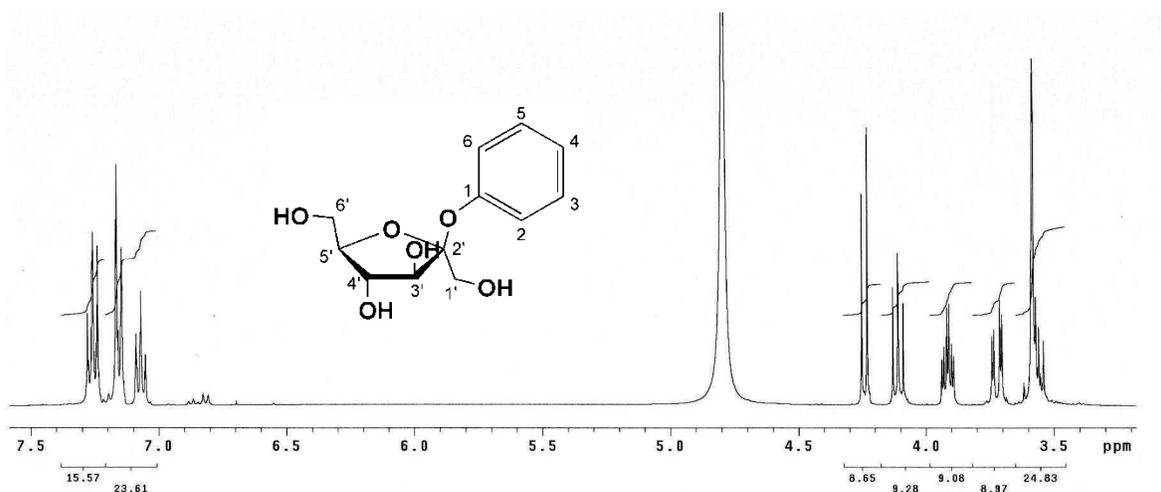


Figura A15. Espectro de RMN ^1H del producto de fructosilación **Fru-Ph**. Realizado en espectrómetro Varian operando a 400 MHz.

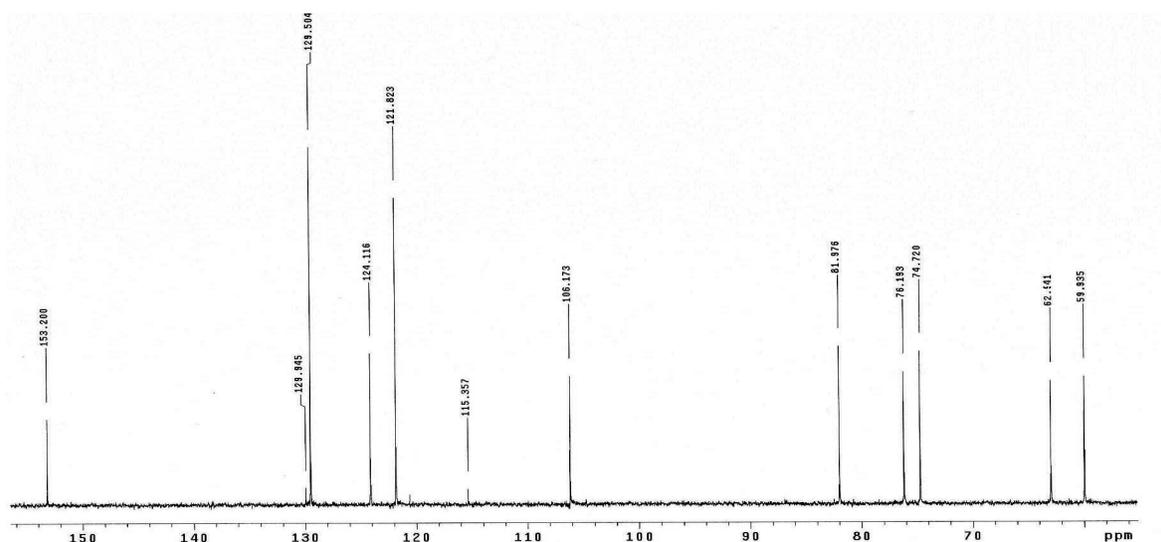


Figura A16. Espectro de RMN ^{13}C del producto de fructosilación **Fru-Ph**. Realizado en espectrómetro Varian operando a 100 MHz.

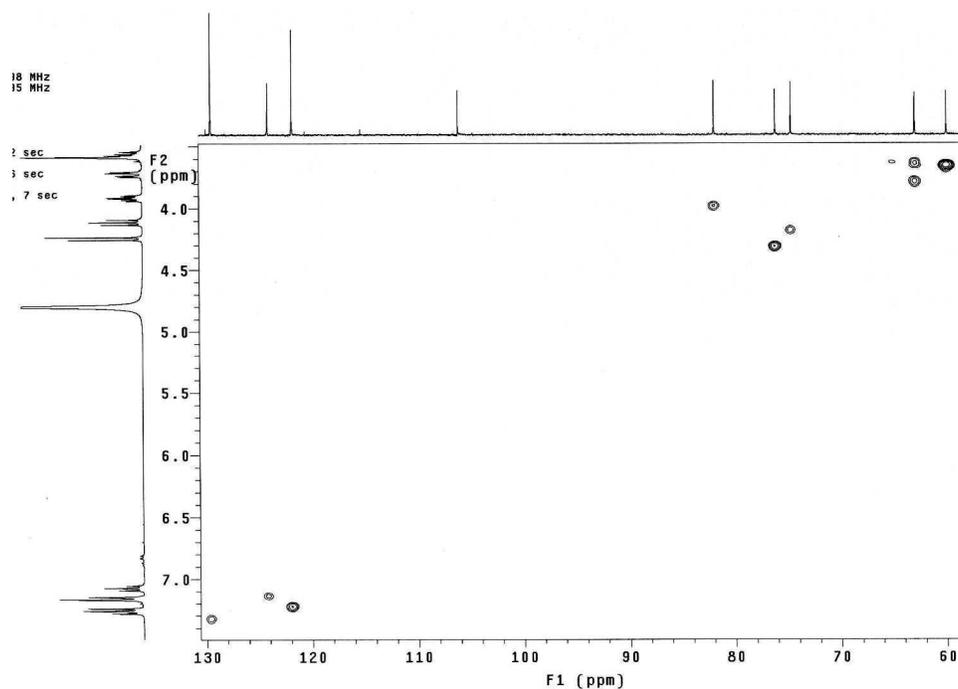


Figura A17. Análisis en doble dimensión HSQC del producto de fructosilación Fru-Ph.

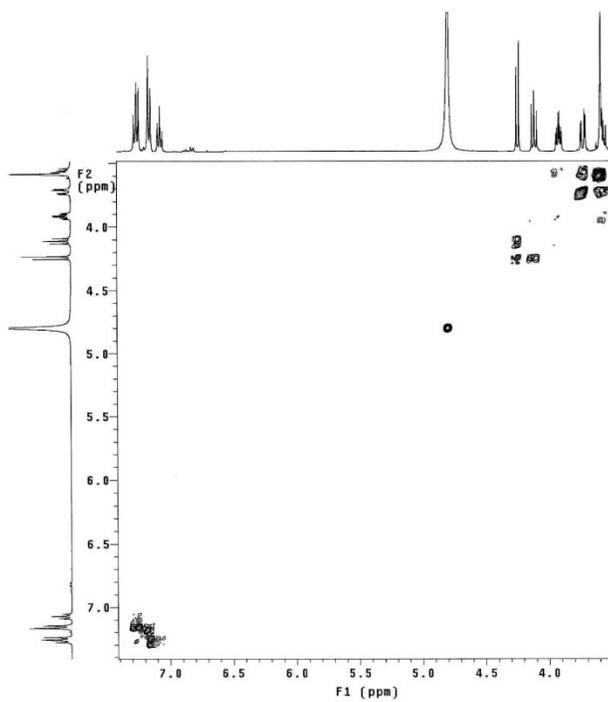


Figura A18. Análisis en doble dimensión COSY del producto de fructosilación Fru-Ph.

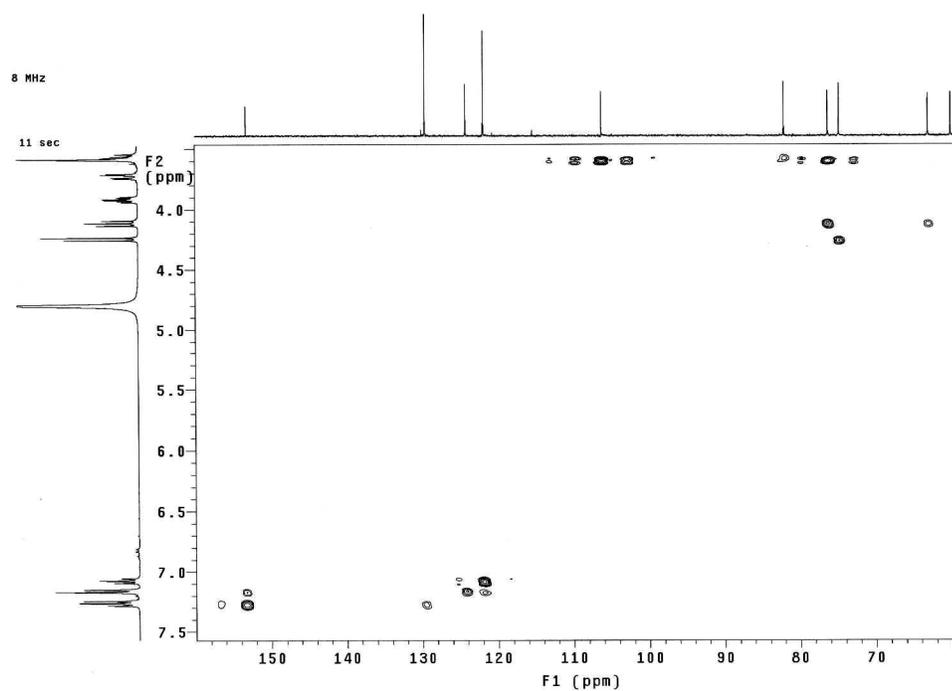


Figura A19. Análisis en doble dimensión HMBC (correlación a tres enlaces) del producto de fructosilación **Fru-Ph**

Fructósido de alcohol 4-hidroxibencílico, en el hidroxilo fenólico

4-(Hidroxiometil)fenil- β -D-fructofuranósido (**Fru₂-4HB**). RMN ^1H (400 MHz, D_2O): δ 7.40 (2H, dd, $J = 2.2$ Hz, $J = 8.8$ Hz, H-3 y H-5); 7.29 (2H, dd, $J = 2.0$ Hz, $J = 8.8$ Hz, H-2 y H-6); 4.65 (2H, s, H-7); 3.86 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3'); 4.23 (1H, t, $J = 8.0$ Hz, $J = 8.4$ Hz, H-4'); 4.04 (1H, ddd, $J = 3.2$ Hz, $J = 7.8$ Hz, $J = 7.8$ Hz, H-5'); 3.86 (1H, dd, $J = 3.2$ Hz, $J = 12.8$ Hz, H-6'a); 3.76 (1H, d, $J = 12.8$ Hz, H-1'a); 3.73 (1H, d, $J = 12.8$ Hz, H-1'b); 3.70 (1H, dd, $J = 7.4$ Hz, $J = 12.2$ Hz, H-6'b). RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O): $\delta = 152.91$ (C-1), 136.06 (C-6), 128.87 (C-3 y C-5), 122.12 (C-2 y C-4), 106.36 (C-2'), 82.11 (C-5'), 76.48 (C-3'), 74.76 (C-4'), 63.55 (C-1'), 62.90 (C-6'), 60.16 (C-7). HRFABMS (modo positivo), calcd. para $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_7\text{Na}$: 309.2676, encontrado: 309.1010.

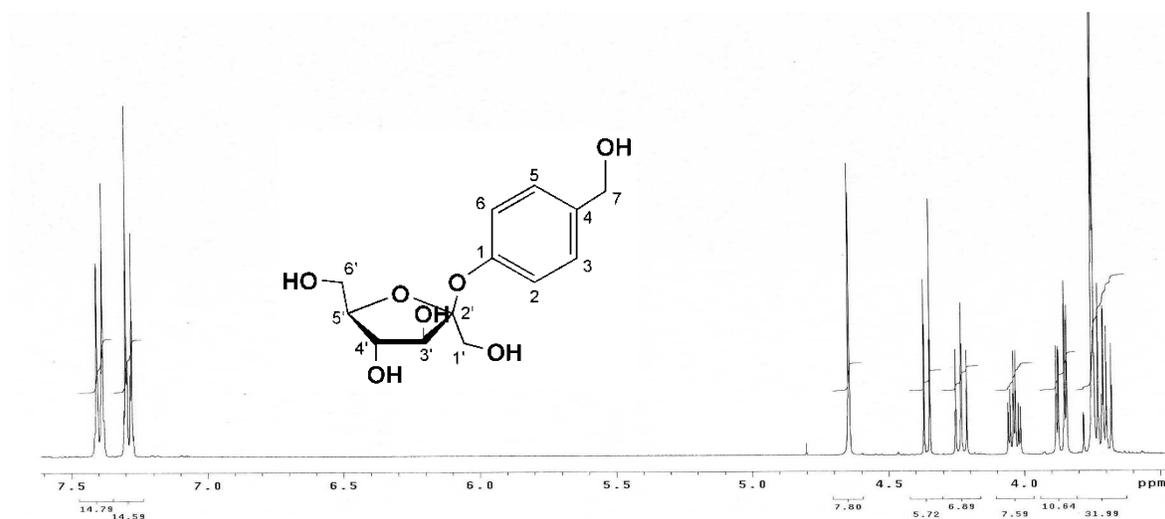


Figura A20. Espectro de RMN ^1H del producto de fructosilación **Fru₂-4HB**. Realizado en espectrómetro Varian operando a 400 MHz.

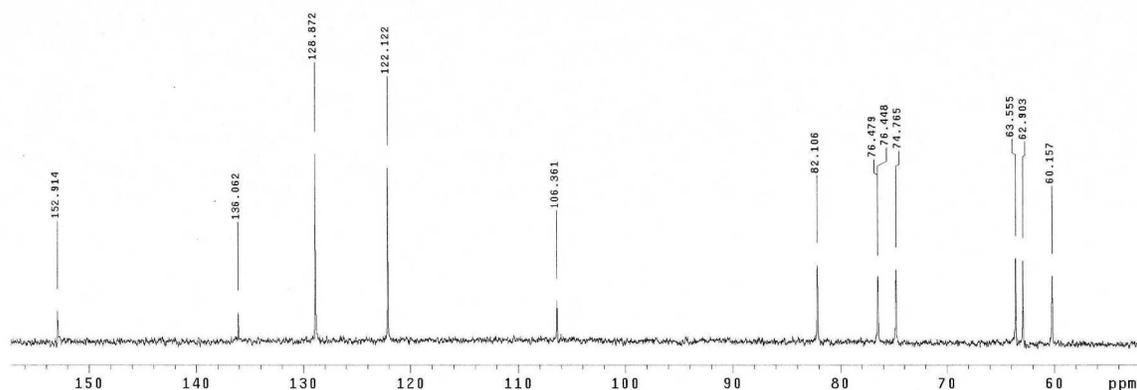


Figura A21. Espectro de RMN ^{13}C del producto de fructosilación **Fru₂-4HB**. Realizado en espectrómetro Varian operando a 100 MHz.

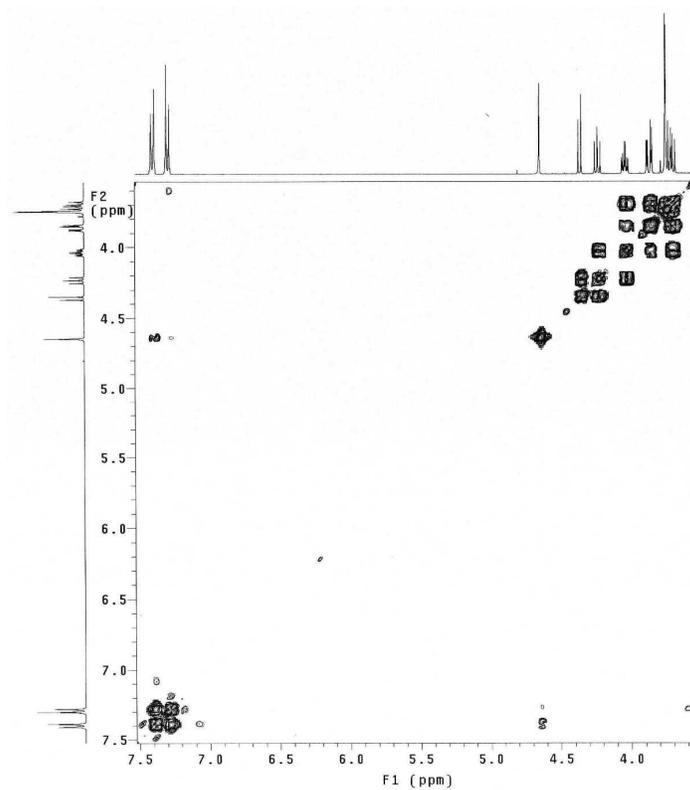


Figura A22. Análisis en doble dimensión COSY del producto de fructosilación Fru₂-4HB.

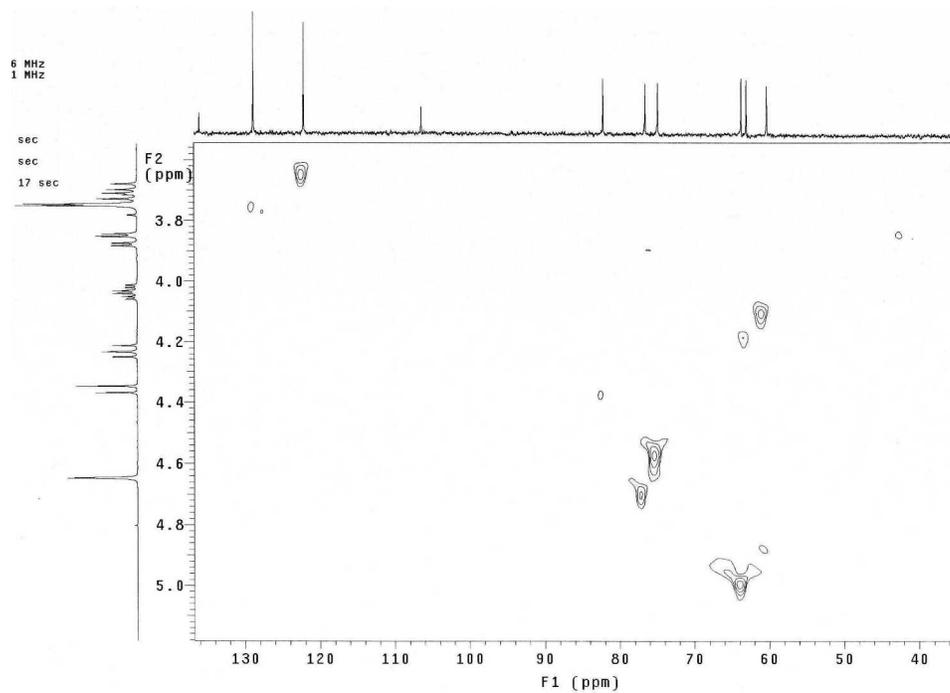


Figura A23. Análisis en doble dimensión HSQC del producto de fructosilación Fru₂-4HB.

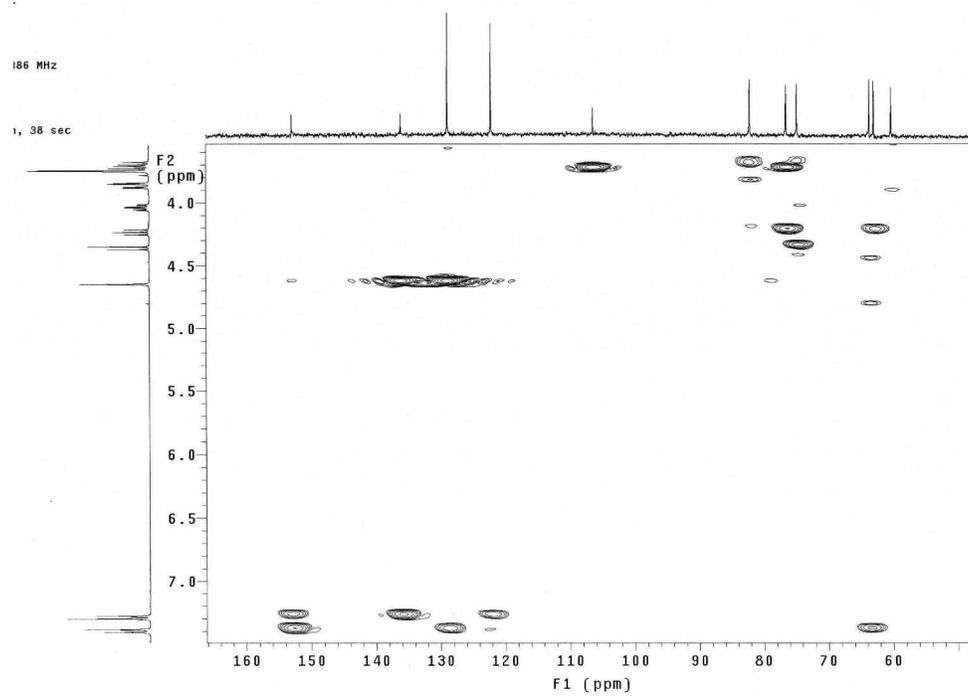


Figura A24. Análisis en doble dimensión HMBC (correlación a tres enlaces) del producto de fructosilación **Fru₂-4HB**.

Fructósido de alcohol 4-hidroxibencílico, en el hidroxilo primario

4-(hidroxi)-bencil- β -D-fructofuranósido (Fru₁-4HB). RMN ¹H (400 MHz, D₂O): δ 7.31 (2H, dd, $J = 2.4$ Hz, $J = 8.4$ Hz, H-2 y H-6); 6.91 (2H, dd, $J = 2.6$ Hz, $J = 8.4$ Hz, H-3 y H-5); 4.68 (1H, d, $J = 10.8$ Hz, H-7a); 4.53 (1H, d, $J = 10.8$ Hz, H-7b); 4.21 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3'); 4.09 (1H, t, $J = 8.4$ Hz, $J = 8.4$ Hz, H-4'); 3.89 (1H, ddd, $J = 3.2$ Hz, $J = 7.5$ Hz, $J = 7.5$ Hz, H-5'); 3.82 (1H, d, $J = 12.4$ Hz, H-1'a); 3.78 (1H, dd, $J = 3.2$ Hz, $J = 12.4$ Hz, H-6'a); 3.70 (1H, d, $J = 12.4$ Hz, H-1'b); 3.59 (1H, dd, $J = 7.4$ Hz, $J = 12.2$ Hz, H-6'b). RMN ¹³C (100 MHz, D₂O): δ = 155.31 (C-1), 130.02 (C-2 y C-6), 129.98 (C-4), 115.49 (C-3 y C-5), 104.10 (C-2'), 81.30 (C-5'), 76.52 (C-3'), 74.90 (C-4'), 63.39 (C-7), 62.74 (C-6'), 60.31 (C-1'). FABMS (modo positivo): C₁₃H₁₈O₇: 286, C₁₃H₁₈O₇Na: 309, C₁₃H₁₈O₇K: 325.

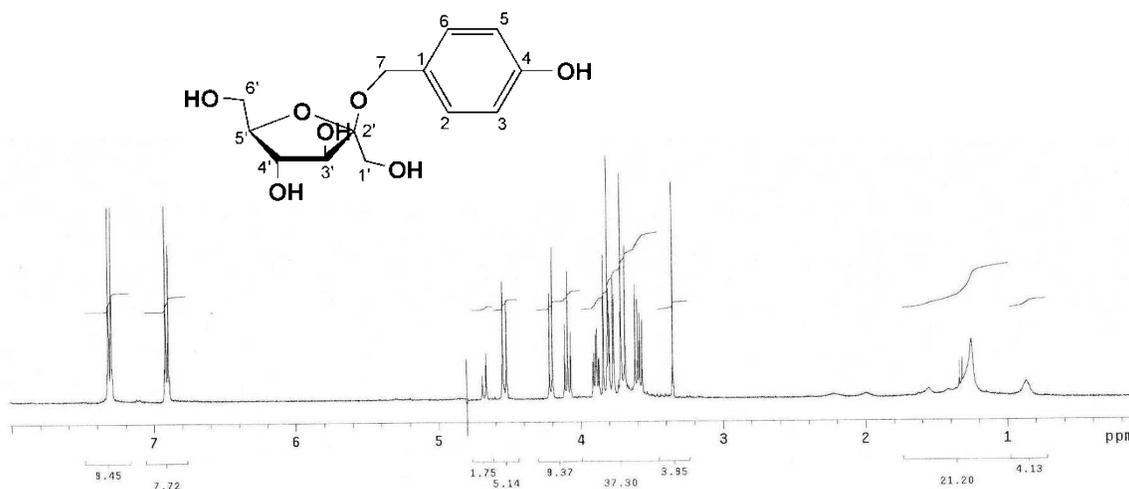


Figura A25. Espectro de RMN ¹H del producto de fructosilación **Fru₁-4HB**. Realizado en espectrómetro Varian operando a 400 MHz.

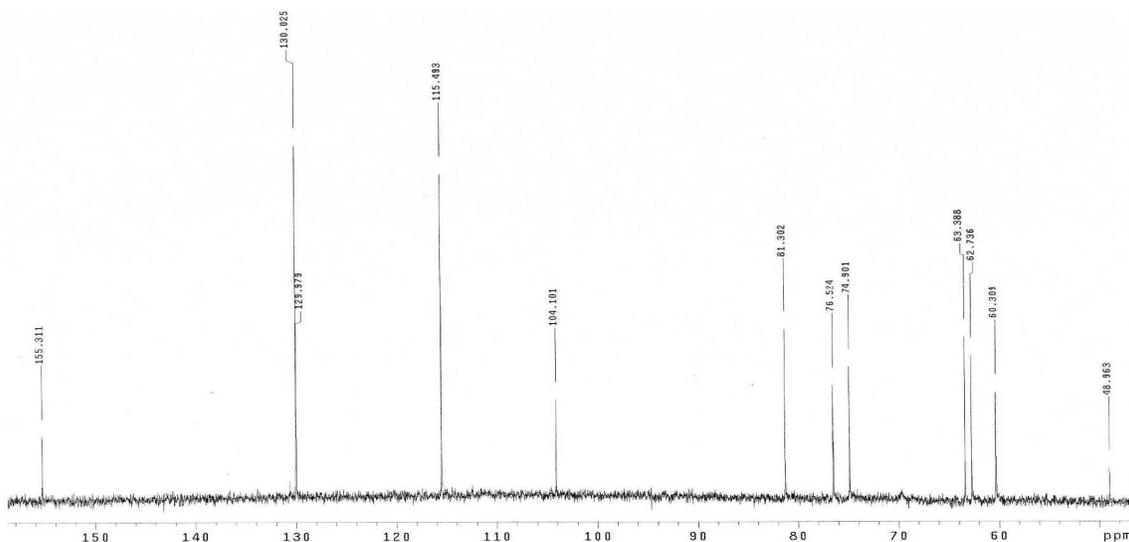


Figura A26. Espectro de RMN ¹³C del producto de fructosilación **Fru₁-4HB**. Realizado en espectrómetro Varian operando a 100 MHz.

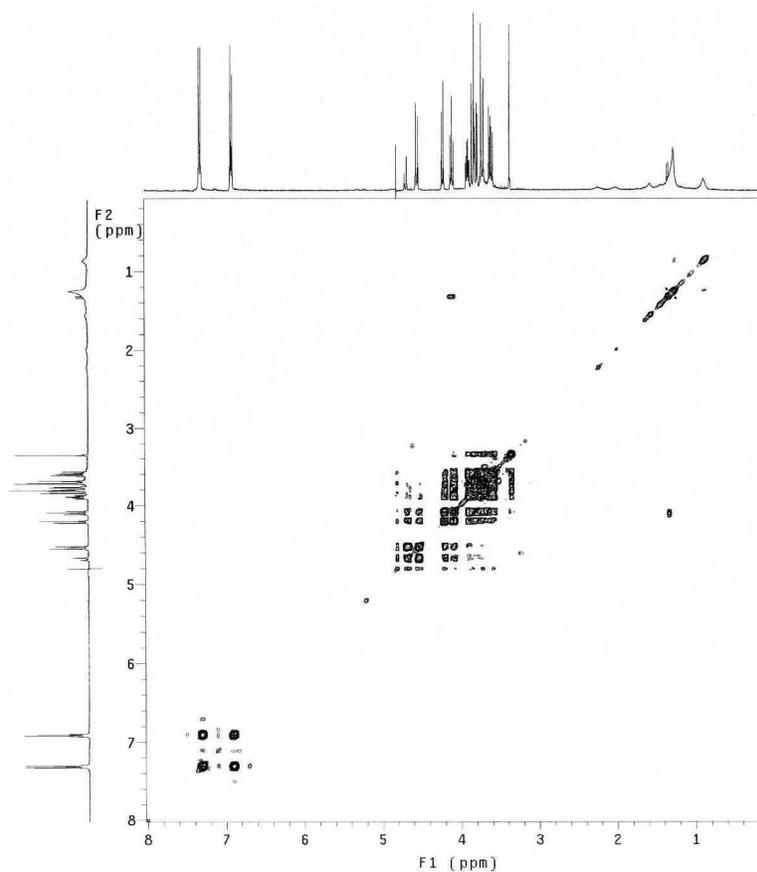


Figura A27. Análisis en doble dimensión COSY del producto de fructosilación Fru₁-4HB.

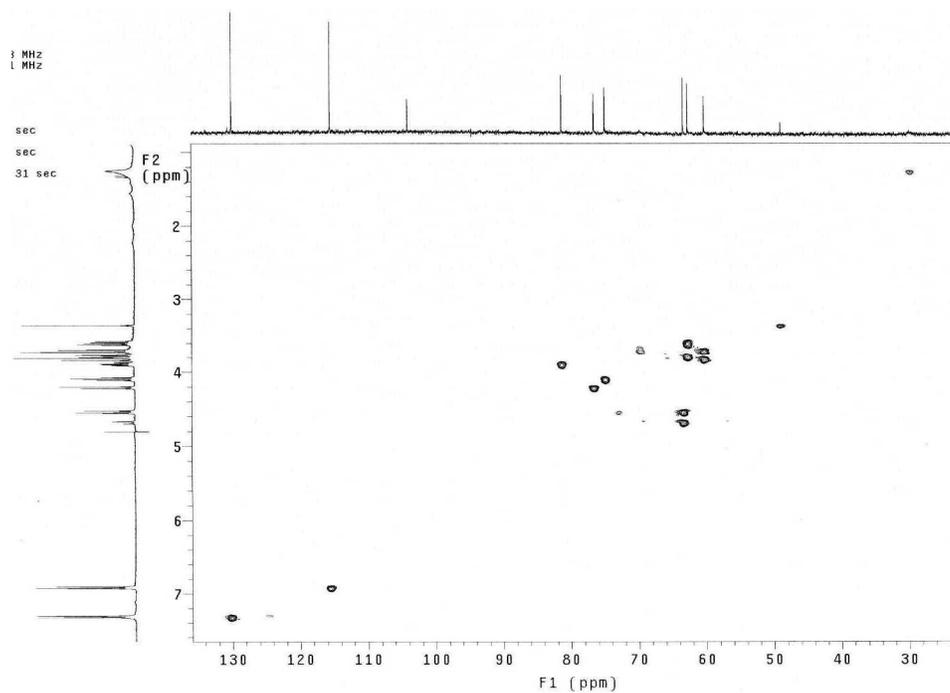


Figura A28. Análisis en doble dimensión HSQC del producto de fructosilación Fru₁-4HB.

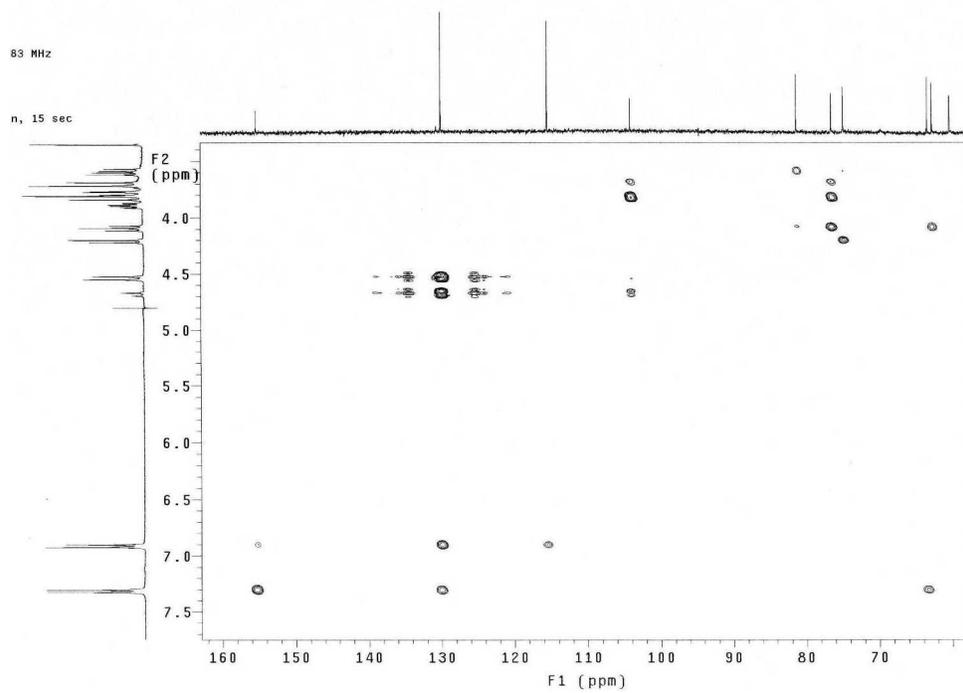


Figura A29. Análisis en doble dimensión HMBC (correlación a tres enlaces) del producto de fructosilación **Fru₁-4HB**.

Fructósido de n-butanol

n-butil- β -D-fructofuranósido (**Fru-Bu**). RMN ^1H (400 MHz, D_2O): δ 4.16 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3'); 4.06 (1H, t, $J = 8.0$ Hz, $J = 8.0$ Hz, H-4'); 3.85 (1H, ddd, $J = 3.2$ Hz, $J = 7.6$ Hz, $J = 7.6$ Hz, H-5'); 3.80 (1H, dd, $J = 3.2$ Hz, $J = 12.0$ Hz, H-6'a); 3.74 (1H, d, $J = 12.4$ Hz, H-1'a); 3.65 (1H, d, $J = 12.4$ Hz, H-1'b); 3.64 (1H, dd, $J = 7.6$ Hz, $J = 12.8$ Hz, H-6'b); 3.51 (2H, m, H-1); 1.52 (3H, t, $J = 7.6$ Hz, H-4); 1.51 (2H, quin, $J = 7.0$ Hz, H-2); 1.34 (2H, m, H-3). RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O): $\delta = 103.83$ (C-2'), 81.15 (C-5'), 76.56 (C-3'), 75.21 (C-4'), 63.06 (C-6'), 61.51 (C-1'), 60.19 (C-1), 30.36 (C-2), 18.81 (C-3), 13.30 (C-4). HRFABMS (modo positivo), calcd. para $\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}_6\text{Na}$: 259.2520, encontrado: 259.1083.

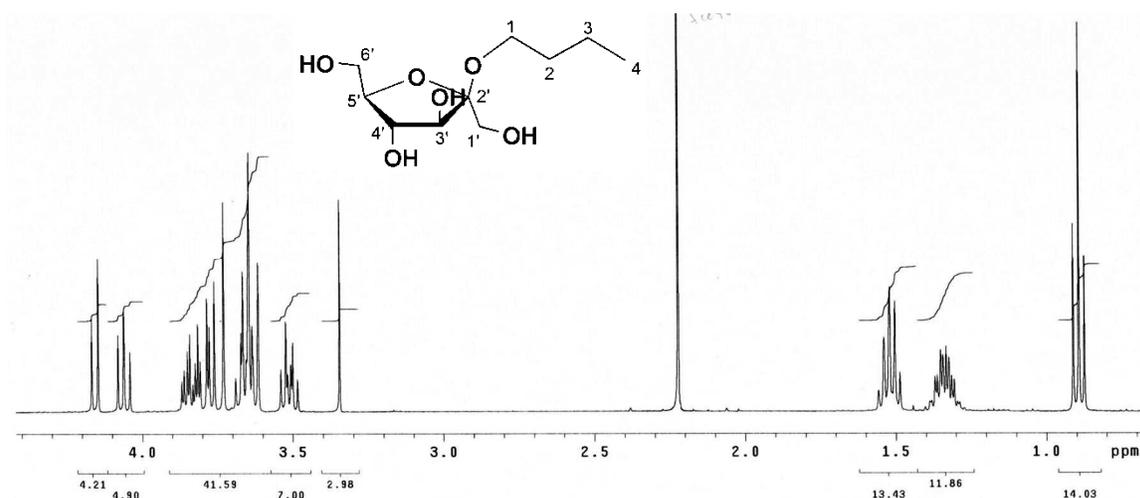


Figura A30. Espectro de RMN ^1H del producto de fructosilación **Fru-Bu**. Realizado en espectrómetro Varian operando a 400 MHz.

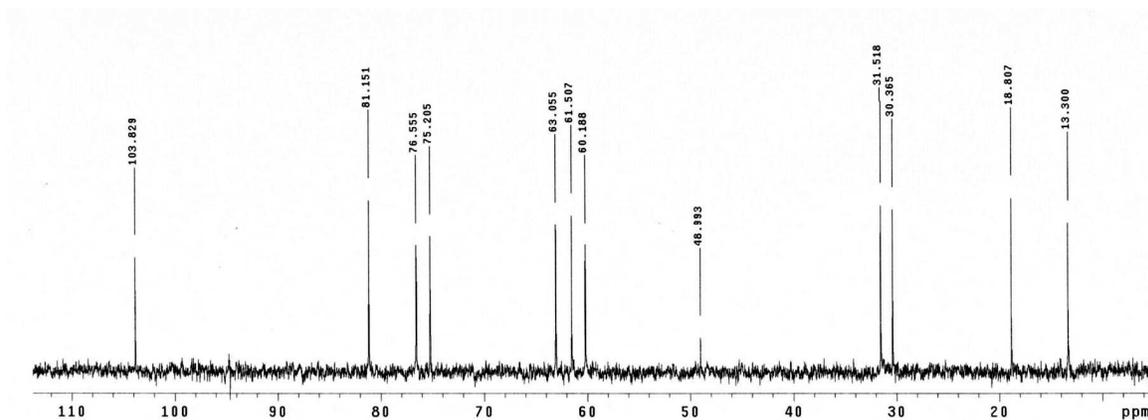


Figura A31. Espectro de RMN ^{13}C del producto de fructosilación **Fru-Bu**. Realizado en espectrómetro Varian operando a 100 MHz.