

03072



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA



**REACCIONES DE ALCOHOLISIS
CON BETA-GALACTOSIDASA DE *Escherichia coli*
EN MICELAS INVERTIDAS.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA
P R E S E N T A

ING. LAURA MONICA SALGADO LAGUNES

CUERNAVACA, MORELOS.

1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO AL TEMA:

Presidente
Secretario
Vocal
Suplente
Suplente

Dr. Alberto Darzon Israel
Dr. Agustín López-Munguía Canales
Dr. Eduardo Barzana García
Dr. Rafael Vázquez Duhak
Dra. Gloria Soberón Chávez.

El presente trabajo se desarrolló en el Departamento de Bioingeniería del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo el asesoramiento del Dr. Agustín López-Munguía Canales.

Los estudios de maestría fueron posibles gracias al apoyo económico otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca crédito 91899, así como a la beca de alimentación y hospedaje por parte del Instituto de Biotecnología.

AGRADECIMIENTOS

Las personas a quienes quisiera agradecer saben lo que represento esta etapa de mi vida, la cual no fue fácil y por eso ahora la valoro aun mas. A todos ellos quisiera dedicarles esta tesis.

A mi mamá Amalia Lagunes a quien le debo casi todo lo que soy por lo que esta tesis también es suya. Espero que esta sea una manera de corresponder a todo lo que me ha dado.

En forma muy especial al Dr. Agustín López-Munguía a quien admiro por su gran calidad humana y por ayudarme a cumplir esta meta.

A los miembros del jurado que contribuyeron en buena manera a la corrección de este escrito gracias a sus atinadas observaciones.

Al Técnico Fernando González quien me ayudo con el análisis por HPLC y al Dr. Leobardo Serrano en el diseño de experimentos.

A mi padre Francisco Salgado por su amor a la vida y el coraje para enfrentarla. Le agradezco todo el apoyo que de alguna manera me ha brindado aunque no hemos estado juntos.

A mi hermana Mimi y mi sobrina Alexia con quienes quisiera compartir este logro y agradecerles todo su cariño que aun la distancia no lo ha podido cambiar.

A mi muy querido amigo Sergio quien incondicionalmente me ha apoyado en las buenas y en las malas, siempre con una sonrisa.

A mis amigos Mariacela, Gus, Barbus, Daniel, Lariza, Vanesita y Nayeli quienes con la suma de los pequeños y grandes detalles me han demostrado su amistad y cariño.

Y para quien estuvo todo el tiempo conmigo dándome todo su amor, cariño y mucha paciencia, a quien quisiera corresponderle con todavía mas amor por siempre. Con todo mi amor para Rafael.

RESUMEN.

El uso de enzimas en medio orgánico, ha despertado gran interés en el estudio de nuevos procesos enzimáticos para la síntesis de productos comerciales. La modificación de reacciones convencionales así como el desarrollo de nuevas reacciones, forman parte de las alternativas que presenta la biocatálisis en medio orgánico. Dentro de éstas destacan en particular los sistemas con micelas invertidas, ya que ofrecen grandes ventajas dentro de las que se encuentran: el que los sustratos sean solubilizados en la fase acuosa o en la fase orgánica, dependiendo de su naturaleza; el aparente incremento de actividad en algunos sistemas; la posibilidad de controlar la especificidad de la enzima; la reducción de la contaminación microbiana. En el caso de hidrolasas, estos sistemas permiten la eliminación de la reacción de hidrólisis y/o llevar a cabo reacciones inusuales en agua. Por otro lado, existe un creciente interés en las reacciones de alcoholólisis como vía para la producción de alquilglucósidos por vía enzimática, debido a la demanda de estas moléculas dentro del grupo de los detergentes no-iónicos.

En este trabajo se presenta el estudio con la β -galactosidasa de *E. coli* en micelas invertidas compuestas de butano/octano/agua en el que realiza reacciones de alcoholólisis sintetizando butil-galactósido. La originalidad de este trabajo radica en que hasta ahora no se ha utilizado un sistema micelar en el que uno de sus componentes sea además sustrato en la reacción.

INDICE.

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 6 |
| 2. OBJETIVOS..... | 9 |
| 3. GENERALIDADES..... | 10 |
| 3.1. MÉTODO QUÍMICO Y ENZIMÁTICO DE PRODUCCIÓN DE ALQUIL-GLICÓSIDOS. 10 | |
| 3.2. PROPIEDADES DE LA β-GALACTOSIDASA DE <i>E. coli</i>..... | 12 |
| 3.3. REACCIONES CON β-GALACTOSIDASA DE <i>E. coli</i> EN DIFERENTES SISTEMAS..... | 18 |
| 3.3.1. <i>Reacciones en solventes orgánicos.....</i> | <i>18</i> |
| 3.3.2. <i>Reacciones de alcoholes.....</i> | <i>19</i> |
| 3.3.3. <i>Síntesis de alquil-glicósidos.....</i> | <i>20</i> |
| 3.3.4. <i>Recuperación del producto.....</i> | <i>22</i> |
| 3.3.5. <i>Aplicaciones de los alquil-glicósidos.....</i> | <i>23</i> |
| 3.4. MICELAS INVERTIDAS..... | 24 |
| 3.4.1. <i>Características generales.....</i> | <i>24</i> |
| 3.4.2. <i>Factores que afectan la formación de micelas invertidas.....</i> | <i>27</i> |
| 3.4.3. <i>Métodos de estabilización.....</i> | <i>30</i> |
| 3.4.4. <i>Estabilidad las enzimas en micelas invertidas.....</i> | <i>30</i> |
| 3.4.5. <i>Cinética enzimática en micelas invertidas.....</i> | <i>32</i> |
| 3.4.6. <i>Reacciones en micelas invertidas con β-galactosidasa de <i>E. coli</i>.....</i> | <i>37</i> |
| 4. MATERIALES Y METODOS..... | 39 |
| 4.1. <i>Preparación de micelas invertidas.....</i> | <i>39</i> |
| 4.2. <i>Determinación de la actividad de la β-galactosidasa en diferentes sistemas.....</i> | <i>40</i> |
| 4.2.1. <i>Análisis cualitativo por cromatografía en placa fina.....</i> | <i>40</i> |
| 4.2.2. <i>Actividad en fase acuosa y lactosa.....</i> | <i>40</i> |
| 4.2.3. <i>Actividad en micelas invertidas.....</i> | <i>42</i> |
| 4.3. <i>Diseño experimental en el diagrama de fases butano/octano/lactosa.....</i> | <i>44</i> |
| 4.4. <i>Estudios de velocidad inicial con micelas invertidas.....</i> | <i>48</i> |
| 4.4.1. <i>Efecto del tamaño de la micela.....</i> | <i>48</i> |
| 4.4.2. <i>Efecto en la forma de preparación.....</i> | <i>48</i> |

| | |
|---|-----------|
| 4.4.3. Efecto de la concentración de enzimas..... | 49 |
| 4.4.4. Efecto de la temperatura..... | 49 |
| 4.5. Estudios cinéticos en diferentes sistemas para la síntesis de butil-galactósido..... | 50 |
| 4.5.1. Estudio preliminar sobre el efecto de la concentración de lactosa..... | 50 |
| 4.5.2. Estudio cinético usando como sustrato ONPG..... | 51 |
| 4.6. Estabilidad de la β -galactosidasa de <i>E. coli</i> | 53 |
| 4.7. Síntesis de butil-galactósido en micelas invertidas con β -galactosidasa..... | 54 |
| 5. RESULTADOS Y DISCUSION..... | 55 |
| 5.1. Diagrama de fase butanol/octano/lactosa en solución..... | 56 |
| 5.1.1. Meditamiento de la región optimizada..... | 60 |
| 5.2. Efecto del tamaño de la micela invertida (W_0) en la velocidad inicial de síntesis de butil-galactósido..... | 62 |
| 5.3. Efecto del método de preparación de las micelas invertidas en la velocidad inicial de síntesis de butil-galactósido..... | 64 |
| 5.4. Efecto de la concentración de lactosa en diferentes sistemas para la síntesis de butil-galactósido..... | 65 |
| 5.5. Efecto de la concentración de la enzima en la velocidad inicial en micelas invertidas..... | 69 |
| 5.6. Estudio cinético para diferentes sistemas con ONPG como sustrato..... | 71 |
| 5.7. Estabilidad de la β -galactosidasa de <i>E. coli</i> en los diferentes sistemas de reacción a 37°C..... | 76 |
| 5.8. Efecto de la temperatura en la estabilidad de la β -galactosidasa en micelas invertidas..... | 82 |
| 5.9. Efecto de la temperatura en la velocidad inicial de síntesis de butil-galactósido en micelas invertidas..... | 83 |
| 5.10. Síntesis de butil-galactósido en micelas invertidas..... | 84 |
| 6. CONCLUSIONES..... | 88 |
| 7. BIBLIOGRAFIA..... | 90 |

INDICE DE TABLAS.

| | |
|---|----|
| Tabla I. Ejemplos de enzimas utilizadas en reacciones de alcoholisis..... | 11 |
| Tabla II. Temperatura y pH óptimo de la enzima β -galactosidasa de diversas fuentes..... | 14 |
| Tabla III. Constante de Michaelis para diferentes sustratos de la β -galactosidasa de <i>E. coli</i> | 16 |
| Tabla IV. Técnicas de análisis utilizadas en enzimología micelar..... | 25 |
| Tabla V. Agregación de moléculas anfifílicas en solventes hidrocarbonados..... | 26 |
| Tabla VI. Estabilidad enzimática en sistemas de micelas invertidas..... | 32 |
| Tabla VII. Clasificación de los modelos cinéticos en micelas invertidas..... | 34 |
| Tabla VIII. Composición de la mezcla de reacción para micelas invertidas usando lactosa como sustrato..... | 43 |
| Tabla IX. Composición de la mezcla de reacción de micelas invertidas usando ONPG como sustrato..... | 43 |
| Tabla X. Matriz de experiencias del diseño experimental para encontrar regiones de máxima actividad en el sistema micelar..... | 46 |
| Tabla XI. Matriz de experiencias para una región específica del sistema micelar butano/octano/lactosa en solución, en la que se encontró la mas alta actividad enzimática..... | 47 |
| Tabla XII. Composición básica de las micelas invertidas para diferentes valores de W_o | 48 |
| Tabla XIII. Comparación de los sistemas acuoso, bifásico y de micelas invertidas en la cinética observada de la β -galactosidasa de <i>E. coli</i> empleando lactosa como sustrato..... | 69 |
| Tabla XIV. Comparación de los sistemas para la hidrólisis de ONPG..... | 76 |
| Tabla XV. Estabilidad de la β -galactosidasa en diferentes sistemas a 37°C..... | 82 |

INDICE DE FIGURAS.

| | |
|---|----|
| Figura 1. Estructura de diferentes sustratos de la enzima β -galactosidasa de <i>E. coli</i> | 16 |
| Figura 2. Mecanismo de reacción propuesto reteniendo la configuración anomérica para enzimas como la β -galactosidasa de <i>E. coli</i> | 18 |
| Figura 3. Métodos de solubilización de enzimas en sistemas de micelas invertidas..... | 31 |
| Figura 4. Diferentes maneras de expresar la concentración de sustrato en micelas invertidas..... | 37 |
| Figura 5. (a) Distribución de la enzima y sustrato entre la pseudofase micelar y la fase oleosa continua; (b) localización posible de la enzima en micelas invertidas..... | 38 |
| Figura 6. Actividad de la β -galactosidasa en micelas invertidas variando la composición del sistema butano/octano/lactosa en solución amortiguadora..... | 59 |
| Figura 7. Optimización de la región de mayor actividad de la β -galactosidasa en micelas invertidas en el diagrama de fases butano/octano/agua en solución amortiguadora..... | 61 |
| Figura 8. Efecto del tamaño de micela en la velocidad alcoholisis con β -galactosidasa en micelas invertidas..... | 63 |
| Figura 9. Efecto del orden de adición del sustrato y la enzima en las micelas invertidas en la velocidad inicial de síntesis de butil-galactósido..... | 65 |
| Figura 10. Efecto de la concentración de lactosa en la fase global en la velocidad inicial para la síntesis de butil-galactósido en micelas invertidas con β -galactosidasa..... | 66 |
| Figura 11. Efecto de la concentración de lactosa en la fase global en la velocidad inicial para la síntesis de butil-galactósido en un sistema bifásico con β -galactosidasa..... | 67 |
| Figura 12. Efecto de la concentración de lactosa en la velocidad inicial para la hidrólisis de lactosa en un sistema acuoso con β -galactosidasa de <i>E. coli</i> | 68 |
| Figura 13. Efecto de la concentración de la enzima en fase acuosa en la velocidad inicial de síntesis de butil-galactósido en micelas invertidas..... | 71 |
| Figura 14. Efecto de la concentración de ONPG (fase global) en la velocidad inicial para la síntesis de butil-galactósido en micelas invertidas con β -galactosidasa..... | 73 |
| Figura 15. Efecto de la concentración de ONPG en la velocidad inicial para su hidrólisis en medio acuoso con β -galactosidasa..... | 74 |
| Figura 16. Efecto de la concentración de ONPG en la velocidad inicial de síntesis con β -galactosidasa de butil-galactósido en medio acuoso saturado con n-butanol..... | 75 |
| Figura 17. Estabilidad de la β -galactosidasa de <i>E. coli</i> en un sistema bifásico, 50% amortiguador y 50% (p/p) n-butanol..... | 77 |
| Figura 18. Estabilidad de la β -galactosidasa de <i>E. coli</i> en un sistema bifásico 50% amortiguador y 50% (p/p) n-octano..... | 78 |
| Figura 19. Estabilidad de la enzima β -galactosidasa de <i>E. coli</i> en medio acuoso..... | 79 |
| Figura 20. Estabilidad de la enzima β -galactosidasa de <i>E. coli</i> en un sistema acuoso saturado con n-butanol..... | 80 |
| Figura 21. Estabilidad de la enzima β -galactosidasa de <i>E. coli</i> en sistema micelar..... | 81 |
| Figura 22. Efecto de la temperatura en la estabilidad de la enzima β -galactosidasa de <i>E. coli</i> en micelas invertidas..... | 83 |
| Figura 23. Efecto de la temperatura de reacción en la velocidad inicial de síntesis de butil-galactósido en micelas invertidas..... | 84 |
| Figura 24. Evolución de la reacción de síntesis de butil-galactósido a 25°C en micelas invertidas por reacción de alcoholisis con β -galactosidasa de <i>E. coli</i> usando ONPG como sustrato..... | 86 |
| Figura 25. Síntesis de butil-galactósido a 25°C en micelas invertidas por reacciones de alcoholisis con β -galactosidasa de <i>E. coli</i> usando lactosa como sustrato..... | 86 |

1. INTRODUCCIÓN.

Tradicionalmente el funcionamiento de las enzimas se ha restringido a medios acuosos. Sin embargo, a través de investigaciones se ha comprobado que las enzimas pueden ejercer su potencial catalítico en medios prácticamente libres de agua. Basándose en lo anterior, se han desarrollado diferentes sistemas para estudiar reacciones enzimáticas como son solventes orgánicos, fluidos supercríticos, fase gaseosa, así como micelas invertidas.¹ Se ha encontrado que muchas enzimas en este tipo de sistemas -como medios bifásicos- se desnaturalizan rápidamente en condiciones de operación, por lo que se ha optado por otras alternativas como el uso en micelas invertidas, donde no se ha observado este problema.

Las reacciones enzimáticas llevadas a cabo en micelas invertidas ofrecen grandes ventajas dentro de las que se encuentran: el que los sustratos, dependiendo de su naturaleza, sean solubilizados en la fase acuosa o en la fase orgánica; el aparente incremento de actividad en algunos sistemas; la posibilidad de controlar la especificidad de la enzima y la reducción de la contaminación microbiana. En el caso de hidrolasas, la eliminación de la reacción de hidrólisis y/o llevar a cabo reacciones inusuales en agua.² Sin embargo, el potencial de las enzimas en síntesis orgánica, la búsqueda de actividades alternas o inclusive de nuevas propiedades, requiere de estudios básicos concernientes a los mecanismos que gobiernan su funcionamiento en medio orgánico.³

Las carbohidrasas son enzimas que han sido ampliamente utilizadas en sistemas en solventes orgánicos. En las reacciones que catalizan estas enzimas pueden actuar distintos aceptores distintos al agua, como un carbohidrato o un

alcohol; este es el caso de reacciones de transglicosidación y alcoholólisis respectivamente. De hecho, las reacciones de alcoholólisis, en las que se obtiene alquil-glicósidos, pueden considerarse como un caso particular de las transglicosidaciones, donde el acceptor es un alcohol en vez de un carbohidrato. Existe un creciente interés en la síntesis de alquil-glicósidos por vía enzimática, debido a la demanda de estas moléculas dentro del grupo de los detergentes no iónicos, en productos farmacéuticos, en cosméticos, etc.⁴ Por ejemplo, el octil-glicósido es empleado en la extracción y la reconstitución de proteínas membranales, siendo uno de los mejores biosurfactantes conocidos.⁵

Podemos mencionar que los surfactantes son típicamente usados en casi todos los sectores de la industria moderna, la producción mundial excede las tres millones de toneladas anuales (con un valor estimado de \$4 billones de dólares). El consumo doméstico de surfactantes representa 54% del mercado total, mientras que el uso industrial representa solamente el 32%. Para productos de cuidado personal, el consumo es de 6-8% por lo que es un mercado importante en términos de financiamiento.⁶ Comparando los métodos por los que se puede obtener alquil-glicósidos tenemos que, en la síntesis química de alquil-glicósidos se obtiene una mezcla de productos anoméricos α y β , mientras que por vía enzimática se tiene una alta especificidad. Enzimáticamente existen tres vías para la síntesis de alquil-glicósidos: reacciones de condensación, alcoholólisis o síntesis inversa y de transglicosidación.

Una de las líneas de investigación del grupo de biocatálisis del Instituto de Biotecnología es el estudio de las reacciones enzimáticas en medios no-con convencionales. Se han estudiado las reacciones de alcoholólisis con la enzima invertasa para la síntesis de metil-fructósido en la cual se definieron condiciones

óptimas de reacción. En este contexto, la enzima invertasa se ha utilizado para realizar reacciones en sistemas bifásicos con alcoholes de bajo peso molecular probando diferentes estrategias como son reacciones de alcoholólisis, hidrólisis inversa y transesterificación. También se han probado sistemas de micelas invertidas para la síntesis de butil-fructósido mediante reacciones de alcoholólisis, aunque la conclusión general es que la invertasa no es apta para la producción de estos compuestos.

En el presente trabajo se estudia la β -galactosidasa de *E. coli* en micelas invertidas compuestas de butanol/octano/agua para la síntesis de butil-galactósido a partir de lactosa y o-nitrofenol galactósido (ONPG), en el cual se evaluaron diferentes factores que afectan la reacción, tanto cinéticos como fisicoquímicos. La originalidad de este trabajo radica en que hasta ahora no se ha utilizado un sistema micelar en el que uno de sus componentes sea además sustrato en la reacción.

2. OBJETIVOS.

Objetivo General:

Realizar reacciones de alcoholólisis en micelas invertidas utilizando transglucosidasas.

Objetivos Específicos:

1. Probar la capacidad de la enzima β -galactosidasa de *E. coli* para llevar a cabo reacciones de alcoholólisis en un sistema de micelas invertidas.
2. Sintetizar butil-galactósido con β -galactosidasa de *E. coli* en micelas invertidas.
3. Efectuar un estudio comparativo sobre la síntesis de butil-galactósido en diferentes sistemas: medio bifásico y medio micelar.

3. GENERALIDADES.

3.1. MÉTODO QUÍMICO Y ENZIMÁTICO DE PRODUCCIÓN DE ALQUIL-GLUCÓSIDOS.

Los alquil-glicósidos pueden sintetizarse por métodos químicos y por métodos enzimáticos. Comparando estos métodos tenemos que en la síntesis química de alquil-glicósidos se obtiene una mezcla de productos anoméricos α y β , mientras que por vía enzimática se tiene una alta especificidad. Entre los métodos de síntesis química que permiten la formación de enlaces glicosídicos se encuentra el método clásico de Koenigs-Knorr en el que el halógeno de bromo o de cloro actúan como grupo salientes. Destacan también los métodos en los que se usan el trichloroacetamido y el tioetil como grupos salientes. Usualmente los catalizadores utilizados son de alto costo, son tóxicos, y en algunos casos también son explosivos. Las sales de metales pesados como $Hg(CN)_2$ y $AgClO_4$ son empleados como catalizadores. Se usan grupos protectores como alil, acetil, benzil y benzoil para promover reacciones regioselectivas y ajustar las reactividades de los donadores electrófilos y del grupo hidroxilo aceptor; esto con el fin de obtener una buena estereoselectividad y buenos rendimientos. Por esta razón, las reacciones requieren de varios pasos, dependiendo de la complejidad estructural del producto deseado.⁷

Es obvio que las enzimas al ser catalizadores eficientes y altamente selectivos en condiciones suaves de reacción, pueden usarse para sintetizar este tipo de compuestos. Existen tres vías para la síntesis enzimática de alquil-glicósidos: reacciones de condensación, de alcoholólisis o de síntesis inversa y de transglicosidación.⁸

En la Tabla I se muestran las enzimas que se han utilizado en reacciones de

alcohólisis con resultados positivos en los últimos años. Las enzimas que se han estudiado con mayor detalle son la β -xilosidasa, la β -glucosidasa y la β -galactosidasa.

Tabla I. Ejemplos de enzimas utilizadas en reacciones de alcohólisis.

| Enzima | Fuente | Sustrato | Aceptor |
|---|------------------|-----------------------------|--|
| β -xilosidasa | <i>A. niger</i> | xilobiosa | alcoholes C ₁ -C ₈ ^{9,10} |
| α -glucosidasa | arroz | maltosa | alcoholes C ₁ -C ₈ ¹⁰ |
| | levadura | maltosa | alcoholes C ₁ -C ₈ ¹⁰ |
| | café | rafinosa | L-serina prot. ¹¹ |
| β -glucosidasa | almendra | celobiosa | alcoholes C ₁ -C ₈ ^{10,12} |
| | | metil-glucósido | alcoholes C ₁ -C ₈ |
| | | glucosa | alcoholes C ₁ -C ₁₂ ^{12,13} |
| | <i>A. niger</i> | celobiosa | alcoholes C ₁ -C ₁₀ ¹⁰ |
| | <i>T. viride</i> | celobiosa | alcoholes C ₇ y C ₈ ¹⁴ |
| β -galactosidasa | <i>E. coli</i> | lactosa | alcoholes C ₁ -C ₈ ¹⁰ |
| | | | mono, dióles C ₂ -C ₄ ¹⁵ |
| | | | L-serina prot. ^{A,11} |
| | <i>A. niger</i> | lactosa | alcoholes C ₁ -C ₈ ¹⁰ |
| | <i>A. niger</i> | metil-galactósido | hexanol ¹⁶ |
| Invertasa | levadura | sacarosa | alcoholes C ₁ -C ₈ ¹⁷ |
| | | fructosa | alcoholes C ₁ -C ₈ ¹⁷ |
| α -manosidasa | leguminosa | manosa | D,L-Ser,D,L-Thr ¹⁸ |
| α -N-acetilgalactosaminidasa | hígado de bovino | N-acetilgalacto-samina | D,L-Ser,D,L-Thr ¹⁸ |
| homogenizado | | fenil- β -glucósido y | alcoholes C ₁ -C ₈ ¹⁹ |
| celular de <i>Sulfolobus solfataricus</i> | | lactosa | |

A. Serina protegida en los grupos amino y carboxilo.

B. β -galactosidasa de *A. niger* modificada químicamente con polímeros de polietilenglicol.

De acuerdo con la literatura, la enzima que más eficientemente realiza la reacción de alcohólisis es la β -xilosidasa. Drouet et al. (1994), estudiaron las reacciones de tranxilosilación con β -xilosidasa de *Aspergillus niger*, obteniéndose los alquil-xilósidos correspondientes. Emplearon diferentes alcoholes alifáticos como aceptores, dentro de los cuales incluyeron alcoholes primarios: etanol, propanol, butanol; alcoholes secundarios: 2-propanol, 2-butanol; y finalmente ter-butanol

como alcohol terciario. Este grupo concluye que para la obtención de alquinoxilósidos empleando como aceptores alcoholes de tipo terciario, los rendimientos son mayores cuando se realiza la reacción de transxilosidación que cuando se efectúa la reacción de hidrólisis inversa²⁰.

3.2. PROPIEDADES DE LA β -GALACTOSIDASA DE *E. coli*.

La β -galactosidasa de *E. coli* está considerada dentro del grupo de las hidrolasas. Esta proteína está constituida por un tetrámero, con una cadena polipeptídica de 1023 aminoácidos que se pliega en 5 dominios secuenciales, con un segmento extendido en el amino terminal. Con la participación de este segmento en una subunidad de interfase y el hecho de que cada sitio activo está constituido con elementos de dos diferentes subunidades, se obtiene una estructura de α -complementación.²¹

El dominio catalítico presenta una estructura común de barriles (α/β)₈, la cual se ha observado también en xilanasas/glucanasas de *Cellulomonas fimi*. Para enzimas que catalizan reacciones de hidrólisis en las que los carbohidratos retienen la configuración, un aminoácido carboxílico, glutamato o aspartato, está invariablemente presente como un nucleófilo catalítico, y en muchos de los casos un glutamato o un aspartato también parecen funcionar como un ácido/base general. Además, residuos de tirosina y triptofano se encuentran comúnmente en el sitio activo de las glicosidasas. Se presume que la combinación del carácter hidrofóbico y el enlace de hidrógeno proporciona un ambiente favorable para el enlace con el azúcar.²⁴

La enzima β -galactosidasa de *E. coli* tiene un ion de Mg^{2+} esencial en su sitio activo, el cual puede proporcionar una posible alternativa para la catálisis ácida por actuar como un electrófilo catalítico. Alternativamente, este ion metálico puede

modular simplemente tanto la orientación como el pK_a de otro residuo que funcione como catalizador ácido/base.²¹

En relación al mecanismo de reacción de la β -galactosidasa, se ha propuesto la transferencia del residuo galactosa de un galactósido a un aceptor (como agua, otro azúcar o alcohol) ocupando la galactosa y el aceptor una misma posición en la molécula enzimática. Aquí el aceptor entraría solo después de que la enzima ha removido la galactosa del donador.

El pH óptimo de reacción está en función de la fuente enzimática; por ejemplo, se puede observar en la Tabla II que la lactasa de *E. coli* tiene un pH óptimo de 7.0, mientras que la enzima de *K. fragilis* muestra una mayor actividad a pH de 6.6. Se ha propuesto que la dependencia de la actividad enzimática con el pH está influenciada fuertemente por iones divalentes.²²

A partir de la influencia del pH en el K_m y en la velocidad máxima de hidrólisis de ONPG con β -galactosidasa bacteriana, se ha deducido la existencia de dos grupos disociables cuyos valores de pK son 6.7 y 8.9 a 20°C. Se ha identificado el grupo disociable en el lado alcalino como un grupo sulfidrilo (-SH), lo cual se apoya en la inhibición de la enzima por iones de metales pesados y por *p*-mercuribenzoato. Por otro lado, al otro grupo se le determinó a 5°C un calor de disociación de 5.75 Kcal/mol. Por este hecho se sostiene que es bastante probable el que este grupo sea el anillo imidazol de un residuo de histidina.²³

En la Tabla II se observa que la temperatura óptima de la enzima, también depende de su origen. En general, la temperatura óptima varía desde 35 hasta 65°C. Se ha reportado que la enzima β -galactosidasa de origen bacteriano en

algunos casos muestra una mayor actividad a 37°C, mientras que la de origen fúngal como *K. fragilis* tiene una temperatura óptima de reacción entre 37 y 40°C.²²

La β -galactosidasa de *E. coli* es bastante estable desde el punto de vista térmico, tanto en forma purificada como en células completas (libres o inmovilizadas), a diferencia de la enzima proveniente de levadura que es termolábil.²³

Tabla II. Temperatura y pH óptimo de la enzima β -galactosidasa de diversas fuentes.

| Fuente de la enzima | pH óptimo | T óptima (°C) | Observaciones |
|------------------------------------|-----------|---------------|---------------|
| <i>A. niger</i> | 4 | 65 | A |
| <i>K. lactis</i> | 6.5 | 45 | A |
| | 6.3-6.8 | 35-40 | A |
| | 6.3 | 37 | B |
| <i>Fusarium nonifforme</i> | 4-5 | 50-60 | A |
| <i>A. oryzae</i> | 4-5 | 55-60 | A |
| <i>Candida pseudotropicalis</i> | 7.5 | 30 | A |
| <i>Totulopsis sphaerica</i> (J-28) | 7 | 30 | A |
| <i>T. versatilis</i> (M 6) | 7 | 30 | A |
| <i>E. coli</i> | 7 | 55 | A |
| | 7 | 55 | C |
| <i>E. coli</i> (ML 308) | 7 | 37 | A |
| <i>E. coli</i> (ATCC 26) | 6.8 | 55 | A |
| <i>E. coli</i> (K-12) | 6.5 | 37 | A |
| | 7.3 | 45 | C |
| | 7 | 55 | B |
| <i>E. coli</i> (K-10) | 7.2 | 55 | B |
| <i>E. coli</i> (E-106) | 8.0 | 55 | B |
| | 5.5 | 55 | B |

A: Enzima purificada libre; B: Células completas libres/inmovilizadas y C: Enzima purificada inmovilizada.

Se ha observado el efecto que ejercen sobre la enzima diversos iones durante la hidrólisis de ONPG, p-nitrofenol galactósido (PNPG) y lactosa. Después de incubar la enzima en presencia de iones de metales pesados (Cu^{2+} , Hg^{2+} y Zn^{2+}),

éstos ejercen una fuerte inhibición; en tanto que los iones Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} y Ba^{2+} , incrementan la actividad con respecto al control. El ión amonio eleva la actividad enzimática, pero tanto su sal del amortiguador tris hidroximetilamonió metano como el citrato de potasio son inhibidores y el EDTA a 25 mM reduce la actividad en poco más del 75%. Finalmente, el ion sodio incrementa la velocidad de hidrólisis de ONPG, mientras que no tiene ningún efecto sobre la hidrólisis de PNPG o lactosa.²³

La enzima actúa sobre una amplia variedad de β -galactósidos. Es bastante específica respecto a la parte glicona de la molécula (galactosa), con una amplia tolerancia para variaciones estructurales de la parte aglicona de la molécula del sustrato. Los principales requerimientos de la parte glicona para la actividad son la forma del anillo (D-galactopiranosidos para las D-galactosidasas), configuración anomérica correcta y orientación correcta de los grupos hidroxilos.⁷ La glucosa y otros glucósidos o alquil o aril alcoholes pueden servir como aglicona.

La misma enzima cataliza reacciones de transglucosidación cuando el aceptor es diferente al agua: 3-o- β -D-galactopiranosil-D-glucosa, 6-o- β -D-galactopiranosil-D-galactosa (galactobiosa) y otros oligosacáridos pueden sintetizarse por la acción de la β -galactosidasa en lactosa.

Los valores de K_m de diferentes sustratos para la enzima β -galactosidasa de *E. coli* se reportan en la Tabla III. Los cambios en la estructura de la aglicona se presentan en la Figura 1. Cambios en el anillo de la galactosa (sustitución, reducción, oxidación y cambios en la configuración estérica) producen un sustrato derivado inerte.

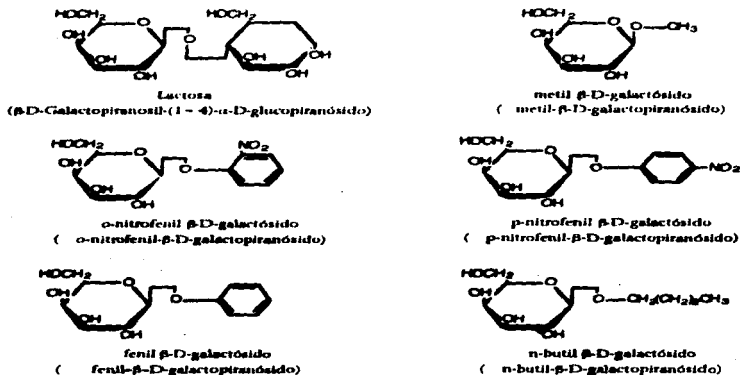


Figura 1. Estructura de diferentes sustratos de la enzima β -galactosidasa de *E. coli*.

Tabla III. Constante de Michaelis para diferentes sustratos de la β -galactosidasa de *E. coli*.²³

| Compuesto | Km (M) |
|--|-----------------------|
| o-nitrofenil β -galactósido (ONPG) | 1.84×10^{-3} |
| p-nitrofenil β -galactósido (PNPG) | 0.97×10^{-3} |
| o-nitro α -L-arabinósido | 2.6×10^{-3} |
| fenil β -D-galactósido | 7.3×10^{-4} |
| metil β -D-galactósido | 6.9×10^{-3} |
| n-butil- β -D-galactósido | 6.9×10^{-4} |
| lactosa | 5.5×10^{-3} |
| alolactosa | 8.3×10^{-3} |
| lactositol | 3.0×10^{-2} |
| lactobionato | 4.0×10^{-2} |

La inversión del enlace β -galactósido a la configuración alfa produce un galactósido resistente a la hidrólisis enzimática. Sin embargo, los α -galactósidos no son excluidos del sitio activo como puede inferirse de su inhibición competitiva de la actividad enzimática.

Estudios semi-cuantitativos indican que en general, la velocidad de hidrólisis depende del tipo de unión entre el β -D-galactósido y la contraparte aglicona; y que estas velocidades decrecen en el orden $(1\rightarrow6) > (1\rightarrow4) > (1\rightarrow3) > (1\rightarrow1)$.⁷ Por otro lado, los α -D-galactósido, α ó β -D-glucósidos, α -D-manósidos y β -D-fructósidos no se hidrolizan.²³

Mecanismo de reacción de la enzima.

La enzima β -galactosidasa es una glicosidasa que hidroliza el enlace glicosídico reteniendo la configuración anomérica. Las enzimas que retienen la configuración utilizan un mecanismo de doble desplazamiento involucrando un intermediario glicosil-enzima (Figura 2). La enzima emplea dos ácidos carboxílicos en el sitio activo, un residuo funciona en general como un ácido y una base mientras el otro actúa como un nucleófilo y un grupo saliente. Este mecanismo involucra un par de iones en un intermediario covalente.

Como ya se mencionó, Wallenfels y Malhotra han propuesto un mecanismo para la acción de la β -galactosidasa de *E. coli* en donde se plantea la transferencia de un residuo de galactosa de un galactósido a un aceptor, que puede ser agua, otro azúcar o alcohol. En este mecanismo se propone que la aglicona y el aceptor ocupan la misma posición en la molécula enzimática, en donde el aceptor entra sólo después de haber sido removida la aglicona.²³

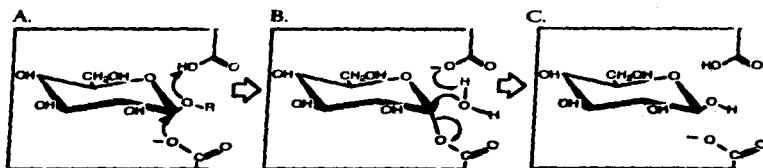


Figura 2. Mecanismo de reacción de doble desplazamiento propuesto para enzimas como la β -galactosidasa de *E. coli* reteniendo la configuración anomérica. R= Glucosa.²⁴

A. Ataque del nucleófilo hacia la lactosa y la liberación la aglicona (glucosa). B. Complejo galactosil-enzima y ataque del aceptor (agua). C. Enzima y galactosa liberada.

3.3. REACCIONES CON β -GALACTOSIDASA DE *E. coli* EN DIFERENTES SISTEMAS.

3.3.1. Reacciones en solventes orgánicos.

Uno de los primeros reportes en los que se describen reacciones de alcoholisis catalizadas por enzimas es el de Bourquelot y Bridel que sorprendentemente data de 1913, en el cual se describe la síntesis de varios alquil- β -galactósidos a partir de glucosa y diversos alcoholes en altas concentraciones, utilizando a la enzima β -galactosidasa.²³ Nilsson (1988), reporta el uso de α -D-galactosidasa de baya de café y β -galactosidasa de *E. coli* empleando como sustratos rafinosa y lactosa respectivamente para la obtención de alquil- α -galactósidos y β -D-galactósidos en un solo paso de reacción. Se utilizaron diversos alcoholes como aceptores en estas reacciones: bencílico, alílico y trimetilsilil etanol.²⁴

3.3.2. Reacciones de alcoholólisis.

La enzima β -galactosidasa de *E. coli* ha sido ampliamente estudiada en reacciones de alcoholólisis por Shinoyama y col. (1988) quienes han ensayado una amplia gama de alcoholes, desde alcoholes solubles en agua hasta alcoholes de alto peso molecular, alcoholes primarios, secundarios y terciarios, así como alifáticos y aromáticos. Estos autores encontraron diferencias en los rendimientos con los diferentes aceptores entre la β -galactosidasa de *E. coli* y la de *A. oryzae*, así como de otras fuentes, lo que permite concluir que el rendimiento de la reacción depende de la fuente de la enzima es decir, de ciertas diferencias estructurales. Las β -galactosidasas resultaron ser eficientes con alcoholes solubles pero incapaces de utilizar como aceptores, alcoholes insolubles alifáticos.^{9,10} Crout et al. (1990), demostraron la selectividad de la β -galactosidasa de *E. coli* por el hidroxilo primario sobre el secundario utilizando dioles como aceptores;¹⁵ resultados similares fueron reportados por Tricone et al. (1991) para propanodiol.¹⁶

Matsumura et al. (1991), sintetizaron n-alkil- β -D-galactopiranosidos por reacción de alcoholólisis de ONPG o lactosa con 1,8-octanodiol, 1,10-decanodiol, 1-octanol y 1-decanol, en donde incluían además acetona en el medio de reacción. Encontraron que el ONPG es un mejor donador glicosílico, comparando las velocidades de reacción y rendimiento obtenidos con lactosa.²⁷

En otro estudio, Stevenson et al. (1993) emplearon β -galactosidasa de *Kluyveromyces fragilis* y *K. lactis*, concluyendo que en general las glicosidasas tienen especificidad a aceptores pequeños, y que existe una limitación real en la solubilidad de los aceptores en agua. Sin embargo, aceptores insolubles en agua como octanol, se pueden galactosidar con buenos rendimientos. Encontraron además que el rendimiento en la síntesis de alquil-galactósidos se puede optimizar con un exceso de lactosa o del aceptor (aunque altas concentraciones de sustrato no podrían utilizarse debido a limitaciones de solubilidad). Analizaron también el

uso de cosolventes donde al parecer, el uso de estos incrementa los rendimientos de síntesis con aceptores moderadamente hidrofóbicos con baja solubilidad en agua, aunque se ha visto que los cosolventes como dioxano, acetonitrilo, dimetilformamida y tetrahidrofurano pueden causar la inactivación de la β -galactosidasa.²⁸

La enzima β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* se modificó químicamente con PEG generándose un derivado que puede sintetizar butil-galactósidos. Se probaron PEG's de diferentes pesos moleculares y los derivados presentaron diferencias en cuanto a la estabilidad y solubilidad en solventes orgánicos. Sin embargo, Beecher y col. (1990) mencionan que los derivados obtenidos únicamente retienen el 50% de la actividad original. Además, la velocidad de transglucosidación catalizada por enzimas modificadas químicamente disminuyó ligeramente por el reemplazo de hexanol por cadenas de alcohol más largas.²⁹

3.3.3. Síntesis de alquil-glicósidos.

Reacciones de alcoholólisis.

En la síntesis de alquil-glicósidos con carbohidrasas en presencia de agua y alcohol (principalmente en sistemas bifásicos) existe una competencia entre la hidrólisis y la alcoholólisis; además, la enzima utiliza al alquil-glicósido sintetizado como sustrato y lo hidroliza.¹⁷ En sistemas bifásicos, una condición extrema podría ser una mezcla de alcohol y agua en la que pueden alcanzarse altas concentraciones de sustrato con baja actividad de agua, favoreciendo el equilibrio hacia la síntesis y extrayendo el producto obtenido en la fase orgánica, reduciendo así el problema de hidrólisis del alquil-glicósido.^{9,12,13}

La relación alcoholólisis/hidrólisis parece estar controlada por diferentes factores como son el tipo de enzima^{9,10} y la concentración de agua presente en el

sistema.^{9,10,12,13} Para la β -galactosidasa de *E. coli* se encontró una clara competencia entre la reacción de alcoholólisis vs hidrólisis, mientras que para la β -galactosidasa de *A. oryzae* no se detectó reacción de hidrólisis en presencia de alcoholes de bajo peso molecular hasta butanol al 25% (v/v).¹⁰

En algunos casos de reacciones de alcoholólisis se presentan problemas con la estabilidad de la enzima. En reacciones en fase acuosa con alcoholes solubles, se encontró que para la enzima invertasa de levadura, a medida que se incrementó la concentración del alcohol, la conversión en la reacción decrece como consecuencia de la desnaturalización de la enzima. Se encontró para esta misma enzima, que existe una dependencia entre el tamaño de la cadena alifática del alcohol y la estabilidad, ya que al incrementar el tamaño del alcohol la pérdida de actividad es mayor.¹⁷ Por otro lado, la α -glucosidasa se inactiva en presencia de alcoholes solubles, mientras que la β -xilosidasa resultó ser muy estable a estos compuestos.¹⁰ En otros estudios con invertasa, se reporta que la máxima concentración de alcohol que la enzima soporta depende de la naturaleza y forma de la enzima (células completas, enzima soluble o inmovilizada); además, aunque la enzima se inhibe en altas concentraciones de sustrato, el efecto inhibitorio del metanol sobre la enzima es menos severo bajo estas condiciones. Este efecto no se observa cuando la sacarosa se sustituye parcialmente con otro azúcar.^{17,30} En estudios realizados con β -xilosidasa y β -glucosidasa en sistemas bifásicos con alcoholes de bajo peso molecular como 1-propanol, no se encontraron problemas de desnaturalización.^{9,10,12-14}

Reacciones de alcoholólisis en presencia de cosolventes.

En otros estudios también relacionados con las reacciones de alcoholólisis, se ha analizado el efecto de cosolventes en el sistema como una alternativa para disminuir la actividad de agua, sin aumentar la concentración de alcohol. Dado que con frecuencia existen problemas de desnaturalización, se ha modificado químicamente a la β -galactosidasa por enlace covalente con polímeros de polietilenglicol, habiéndose obtenido una enzima más estable en presencia de cosolventes como el dimetilsulfóxido (DMSO).¹⁶ En sistemas orgánicos con bajo contenido de agua, la cantidad de sustrato (carbohidrato) disponible para la reacción es limitada, ya que éste es insoluble en los alcoholes hidrofóbicos. Debido a esto, Beecher y col. (1990) propusieron un sistema con cosolventes, donde el DMSO favorece la solubilización del carbohidrato y del alcohol hidrofóbico en tricloroetano. La enzima β -galactosidasa modificada con PEG-8000 y PEG 20 000, resultó ser muy soluble en solventes no polares como 1,1,1-tricloroetano, y su estabilidad en presencia del cosolvente mejoró en relación a la enzima nativa. La principal desventaja es la pobre estabilidad aparente de la enzima, ya que para el caso de la enzima modificada con PEG-2000 se observa una marcada inactivación.

3.3.4. Recuperación del producto.

En una reacción química o enzimática, la separación del producto se facilita en forma considerable cuando este puede extraerse en una segunda fase, influyendo además en la cinética y el equilibrio de la reacción. El hexil- β -xilósido sintetizado en la reacción de la β -xilósidasa se extrae de la fase orgánica y su recuperación, se hace por medio de precipitación con acetona de la fase orgánica (hexanol).⁹ Otro método de separación, en este caso para hexil- β -glucósido consiste en evaporar el hexanol a presión reducida.^{12,15} Por último, un sistema de recuperación propuesto

para heptil- β -glucósido fue por adsorción en carbón activado, con la posterior elución con propanol.⁹

3.3.5. Aplicaciones de los alquil-glucósidos.

Entre las aplicaciones de alquil-glucósidos que se han reportado en la bibliografía destacan:

- Algunos alquil-glicósidos se utilizan en estudios de bioquímica-básica sobre membranas celulares. El octil-glucósido es un agente solubilizante de proteínas de membrana.³¹
- Existen glicósidos de terpenoides y esteroides con actividad fisiológica, los cuales pueden sintetizarse mediante reacciones de alcoholólisis.³²
- Desde el punto de vista industrial, existe un gran potencial para estos compuestos como surfactantes y tensoactivos si se utilizan como aceptores alcoholes hidrofóbicos. Compuestos formados por carbohidratos y cadenas hidrocarbonadas se utilizan como biosurfactantes en la industria petrolera, en la industria química, en bio-remediación,³³ y en las industrias alimentarias, farmacéuticas y de cosméticos.³⁴

Los ésteres de ácidos grasos de sacarosa u otros azúcares se utilizan como emulsificantes en alimentos. Estos se sintetizan en reacciones de transesterificación química en dimetilformamida, lo cual, aunado a la formación de subproductos, limita su aplicación.³⁴ Una alternativa para evitar estos problemas, así como el uso de catalizadores tóxicos y la falta de selectividad es utilizar glicósidos como tensoactivos.

3.4. MICELAS INVERTIDAS.

3.4.1. Características generales.

La definición general de micelas se refiere a partículas compuestas de agregados de surfactante. Estas pueden tener diferentes formas (esférica, elipsoidal, cilíndrica, laminar), tamaños y orientación de las moléculas de surfactante (normales o inversas, dependiendo de la naturaleza del medio). En soluciones concentradas se forman también estructuras más complejas denominadas cristal líquido. Las micelas se forman espontáneamente cuando un surfactante se disuelve en un solvente apropiado (medio de dispersión) a una concentración más alta de un valor crítico (concentración crítica micelar, CMC). En solución acuosa se forman micelas normales con la cabeza polar del surfactante orientada hacia el agua. En solventes no-polares, la estructura de las micelas es invertida: las cabezas polares forman la estructura de la micela invertida, en la que las colas no-polares están expuestas al solvente.³⁵

Las soluciones micelares tienen la capacidad de solubilizar o disolver sustancias insolubles en otros medios de dispersión. Así, las soluciones micelares acuosas permiten solubilizar lípidos, mientras que los sistemas de micelas invertidas pueden solubilizar agua, otros compuestos polares y sustancias solubles en agua, incluyendo macromoléculas tales como proteínas o enzimas. Las soluciones micelares son pseudo-homogéneas y ópticamente transparentes.³⁵ Las técnicas de análisis comúnmente empleadas para análisis estructurales, centros activos de proteínas y monitoreo de reacciones se muestran en la Tabla IV.

Tabla IV. Técnicas de análisis utilizadas en enzimología micelar.

| Función | |
|---------|---|
| I. | Análisis de estructura y centros activos: |
| A. | Fosforescencia. |
| B. | Polarización y time-resolved fluorescencia. |
| C. | Dicroísmo circular. |
| D. | Espectroscopía visible-UV. |
| E. | Resonancia magnética nuclear (NMR). |
| II. | Monitoreo de reacciones: |
| A. | Espectroscopía IR. |
| B. | Luminiscencia. |
| C. | Espectroscopía visible-UV. |
| D. | HPLC. |

En general, las micelas se forman espontáneamente en sistemas que contienen un surfactante y dos líquidos inmiscibles. Existe un gran número de ejemplos de diagramas de fases bien caracterizados de sistemas ternarios surfactante-agua-solvente orgánico, donde hay formación de micelas. Las micelas son estructuras dinámicas no unidas por enlaces covalentes, que intercambian permanentemente moléculas de surfactante y sustancias solubilizadas, directamente o a través del solvente. La alta velocidad de intercambio entre las micelas hace que estos sistemas sean considerados como un medio continuo, pareciéndose a solventes anfífilicos.³⁵

El término "micela invertida" se refiere a estructuras que se forman en una región específica del diagrama de fases para mezclas de tres componentes formadas por un solvente orgánico apolar, un surfactante y agua. Sin embargo, en algunos casos es necesaria la presencia de un cosolvente.³⁶ Los sistemas típicamente usados están formados por: agua, un alcano (normalmente isoctano) y dioctil sulfosuccinato de sodio, un surfactante aniónico mejor conocido como AOT.

Aerosol-OT es una sustancia de marca registrada por American Cyanamide que contiene dioctil sulfosuccinato de sodio como agente activo. Este compuesto se abrevia como AOT cuando es químicamente puro. Otros sistemas que se han utilizado en enzimología micelar son hexano/ agua/ cetil bromuro de trimetilamonio (CTAB) e isoctano/ cloroformo/ agua/ CTAB donde el surfactante es catiónico, y ciclohexano/agua/Brij 96 donde el surfactante es no-iónico.³⁷ Algunos surfactantes comunes que forman micelas invertidas en solventes apolares se resumen en la Tabla V.⁴¹ En el equilibrio, esta región está formada por pequeñas esferas de 20 a 100 Å de radio, rodeadas por una capa de surfactante orientado por su parte polar a la superficie del agua.^{38,39} Este último componente es el de mayor concentración en la solución y forma el continuo en el que se encuentran suspendidas las micelas invertidas.

Tabla V. Agregación de moléculas anfifílicas en solventes hidrocarbonados.

| Surfactante | Solvente | T(°C) | n* |
|------------------------------|-------------|-------|-------|
| AOT | Ciclohexano | 28 | 45-66 |
| | Benzeno | 28 | 23 |
| Dodecil benzoato de amonio | Ciclohexano | 20 | 4-9 |
| Dodecil propionato de amonio | Ciclohexano | 20 | 5 |
| | Benzeno | 25 | 3 |
| Lectina | Benzeno | 20 | 80 |
| | Benzeno | 20 | 19 |

*n= es el número de agregación promedio, es decir el número de moléculas de surfactante que forman una micela.

3.4.2. Factores que afectan la formación de micelas invertidas.

A. Concentración relativa de los componentes.

Como se mencionó con anterioridad, las micelas invertidas pueden formarse en una región específica del diagrama ternario de las soluciones formadas por tres componentes. En general, la formación de micelas invertidas se da en un rango limitado de concentración de agua que frecuentemente es inferior al 10%. En estos sistemas, la cantidad de surfactante oscila entre 1-40%, mientras que el solvente orgánico es el componente de mayor concentración.²⁶ Los valores comúnmente encontrados en experimentos realizados con micelas invertidas en reacciones enzimáticas son para soluciones acuosas concentradas de proteínas de 1 a 20 mM, para amortiguador de 200 a 300 mM y para sustratos solubles en agua aproximadamente de 100 mM dispersos en una solución de surfactante en un solvente orgánico. Adicionalmente, los sustratos apolares se pueden disolver en un solvente orgánico.

Es importante aclarar que no existen modelos con los cuales se pueda predecir la relación de concentración en que se forman micelas invertidas para un sistema determinado, por lo que es necesario determinar el diagrama de fases. En términos generales, es posible caracterizar las dimensiones de la micela utilizando el parámetro W_o , definido como:

$$W_o = \frac{[\text{Agua}]}{[\text{Surfactante}]}$$

En general, al aumentar el número de moléculas de agua por molécula de surfactante (W_o), aumenta el tamaño micelar.²⁷ De manera opuesta, al mantener fija la cantidad de agua y aumentar la concentración de surfactante, aumenta la concentración de micelas invertidas y disminuye su tamaño. Por último, las micelas invertidas mantienen su tamaño y aumentan en concentración cuando la

relación molar del agua y surfactante añadidos, se mantiene constante aumentando de manera proporcional ambos parámetros³⁷. El razonamiento anterior es correcto para sistemas en los que el surfactante se localiza exclusivamente en la pared de la micela. Cuando el surfactante se particiona al solvente orgánico, este análisis no es válido.³⁶

B. Características fisicoquímicas de los componentes.

La región del diagrama de fases en la que se obtienen micelas invertidas depende de las características fisicoquímicas de los componentes del sistema. De esta manera, los valores mínimo y máximo de W_o , a los cuales se forman micelas invertidas, así como las características de las mismas (número de agregación, propiedades del agua intramicelar y estabilidad a diferentes temperaturas, por ejemplo) dependen de las propiedades específicas del solvente orgánico y del surfactante. Las zonas en donde se forman las micelas invertidas dependen de interacciones determinadas por la estructura molecular de los componentes de la solución, así como por las interacciones no covalentes (puentes de hidrógeno, interacciones dipolo-dipolo, dipolo-dipolo inducido e interacciones de dispersión) entre los diferentes componentes del sistema.³⁶

C. Naturaleza del solvente orgánico.

Las propiedades del solvente orgánico, determinan el tipo de micela que se forma. Esto se debe a que la disposición espacial de los grupos químicos del solvente determina las interacciones solvofóbicas dominantes en la interfase formada por el solvente orgánico y el extremo apolar del surfactante. En general, al aumentar la polaridad del solvente, aumenta el número de agregación del surfactante (número de moléculas de surfactante que forman una micela). Así

mismo, el grado de hidratación del surfactante aumenta al aumentar la polaridad del medio.³⁶

D. Naturaleza del surfactante.

Otro componente que influye en las características de las micelas invertidas, es el surfactante. Estas moléculas anfifílicas separan los comportamientos acuoso y orgánico del sistema. Es por esto que la estructura y propiedades químicas de éstas moléculas, modulan y determinan el equilibrio entre ambas fases. Tanto las identidades moleculares de las regiones polar y no-polar de la molécula, así como las interacciones específicas de estas dos regiones con el agua y el solvente orgánico determinan el grado de hidratación del surfactante, la solubilidad del surfactante en el medio orgánico y el número de agregación. Otro factor importante, es el denominado "Balance Hidrofóbico-Hidrofilico" (HLB), que está definido como la relación entre las polaridades relativas de los dos extremos de la molécula.³⁶

En algunos casos, la formación de micelas invertidas requiere de la presencia de un cosolvente -generalmente un alcohol de cadena larga $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_2\text{OH}$ (donde $n \leq 5$), que altera la polaridad de la pared de la micela e interfiere en el empaquetamiento de las porciones apolares del surfactante.

E. El agua.

Generalmente la cavidad interior de la micela está formada por moléculas de agua. Las propiedades de este componente dependen fuertemente del tamaño de la micela. De esta manera, las micelas pequeñas (en general, a $W_o \leq 10$ para el sistemas con AOT como surfactante) contienen agua fuertemente unida al surfactante. Debido a esto, sus características físico-químicas difieren de las características del agua en solución. A medida que el tamaño de la micela aumenta,

las propiedades del agua en la cavidad interior tienden asintóticamente a los valores obtenidos en soluciones acuosas.⁴¹ El aumento en el tamaño micelar como función del W_o , así como las propiedades del agua al variar las condiciones del sistema, dependen en gran medida de las interacciones agua/surfactante, así como de la distribución de estos dos componentes en el seno del sistema.³⁶

3.4.3. Métodos de solubilización.

En la práctica, la solubilización de enzimas en sistemas de micelas invertidas puede hacerse por tres diferentes vías: inyección, adición de la enzima seca y transferencia de la enzima desde la fase acuosa hacia la fase orgánica con surfactante. Los métodos de inyección y adición son básicamente usados en aplicaciones biocatalíticas, y el método de transferencia es adecuado para la extracción líquido-líquido usando como base proteínas hidrofílicas (Figura 3).⁴¹

3.4.4. Estabilidad las enzimas en micelas invertidas

Es bien conocido que las enzimas son usualmente más estables en condiciones con baja concentración de agua ya que se reduce la inactivación al aumentar la rigidez del medio. Se han realizado estudios para conocer la estabilidad de las enzimas en sistemas micelares. La estabilidad de la quimotripsina en un sistema de micelas invertidas AOT/isoctano depende de W_o : a valores de W_o pequeños la enzima muestra una gran estabilidad (y actividad) comparada con la que se observa en solución acuosa. En el mismo sentido, la papaína tiene un tiempo de vida media superior reemplazando el medio acuoso por un sistema micelar AOT/isoctano ($W_o = 21$), a pesar de que la actividad enzimática disminuye. Martinek et al. (1981), han estudiado la estabilidad de varias enzimas en diferentes sistemas micelares.⁴⁰ Sin embargo, es necesario llevar a cabo un mayor

número de estudios para descifrar los mecanismos responsables de la protección de que son objeto las enzimas encapsuladas en micelas invertidas. En la Tabla VI se presentan datos de la estabilidad enzimática en sistemas de micelas invertidas.⁴¹

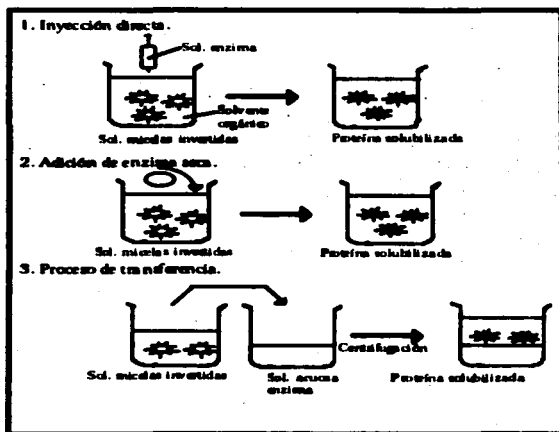


Figura 3. Métodos de solubilización de enzimas en sistemas de micelas invertidas.

Tabla VI. Estabilidad enzimática en sistemas de micelas invertidas.

| Enzima | $t_{1/2}$ Sistema micelar AOT/isoctano | $t_{1/2}$ Sistema acuoso | T(°C) |
|---|---|-----------------------------|-------|
| Tirosinasa | 2.75 min ^a 2.50 min | 2.75 min | 20 |
| Papaína | 24 días | 10 días | 25 |
| Alcohol deshidrogenasa de hígado de caballo. | 14 días ^b | 10 días | 25 |
| β -galactosidasa de <i>E. coli</i> | 20 h ($W_o = 37$) 20 h ($W_o = 21$) < 1 h ($W_o = 9$) | 20 h | - |

^aCTAB/hexano/cloroformo. ^bAOT/ciclohexano.

3.4.5. Cinética enzimática en micelas invertidas.

Los criterios más frecuentemente empleados para clasificar los modelos cinéticos de enzimas en micelas invertidas se basan en la naturaleza dinámica de estos sistemas, en particular a lo que se refiere a la importancia de la difusión en la reacción. De esta forma, se reportan modelos difusionales y no-difusionales según se resume en la Tabla VII.²⁷

Modelos difusionales.²⁷

Modelo puramente difusional.

Dentro de la categoría de modelos difusionales, se encuentran el modelo puramente difusional que no es un modelo cinético en el sentido propio. Este modelo considera que las micelas invertidas están exentas de difusión intermicelar, por lo que la difusión intramicelar de los sustratos al parecer determina la cinética de la enzima en micelas invertidas. En este modelo, la micela invertida y la enzima se consideran como esferas rígidas y el sustrato se considera

como un objeto de geometría conocida, por lo que sus respectivos coeficientes de difusión pueden calcularse. La reacción se lleva a cabo en la superficie de la enzima, la cual ocupa una posición central en la micela invertida, solamente después de que ciertos eventos difusionales ocurren: una micela invertida que contiene enzima y otra que contiene al sustrato se fusionan, sus contenidos se mezclan y la enzima tiene acceso al sustrato. La velocidad de reacción depende de las constantes de velocidad de los pasos de difusión intramicelar.

Modelo de aproximación intramicelar.

Dentro del grupo de modelos difusionales, podemos incluir dos modelos más: el modelo propuesto por el grupo alemán de Verhaert, Hilhorts y Veeger y el propuesto por Oldfield.³⁷ La importancia de la difusión en estos modelos se muestra principalmente por la definición especial que se hace de la concentración de sustrato, por su relevancia en la velocidad de reacción. Los dos modelos consideran que las moléculas de sustrato confinadas en el medio acuoso están distribuidas aleatoriamente entre el "pool" de agua de acuerdo a una distribución de Poisson. La difusión lenta del sustrato en el "pool" de agua, significa que una enzima atrapada en una micela invertida experimenta la concentración de sustrato en el "pool" de agua y así la concentración experimentada por la enzima es el promedio de la concentración de sustrato en estos "pools" de agua. Los "pool" de agua pueden contener una o más moléculas de sustrato. De acuerdo a ambos modelos, los "pools" de agua vacíos no contribuyen a la concentración de sustrato que la enzima experimenta. El modelo de Oldfield restringe el número máximo de ocupación a 1, por lo que los "pools" de agua contienen una o ninguna molécula de sustrato por micela invertida. La Figura 4 ilustra las diferentes maneras mediante las que puede definirse la concentración de sustrato.³⁷

Tabla VII. Clasificación de los modelos cinéticos en micelas invertidas.²⁷

| Modelo | Observaciones |
|--|---|
| ♦ Difusional | |
| 1. Puramente difusional | ♦ Hay difusión intermicelar de las micelas y difusión intramicelar de los sustratos. |
| 1. Aproximación intramicelar | |
| No. de ocupación ¹ = 1 | ♦ La velocidad de intercambio entre las micelas limita el número de recambio. |
| No. de ocupación= n | ♦ Como arriba. |
| ♦ No-difusional | |
| 1. Polidisperso | ♦ Hay dispersión de las micelas, Coexisten micelas pequeñas, grandes y óptimas. |
| 1. Aproximación pseudofásica | ♦ Distribución de solutos de acuerdo a los coeficientes de partición entre la pseudofase micelar y la fase orgánica continua: |
| Al sustrato | Las micelas invertidas están formadas por: |
| | 1. Una pseudofase: micelar |
| | 2. Dos pseudofases: interfase y acuosa. |
| | 3. Tres pseudofases: interfase, agua enlazada y agua libre. |
| | 4. Tres pseudofases: interfase, agua enlazada y agua libre. |
| A la enzima | |
| 2. Distribución del potencial eléctrico. | ♦ Iones incluyendo el sustrato, con distribución en el interior del "pool" acuoso de acuerdo al potencial eléctrico generado por la carga de la capa del surfactante. |

¹Número de moléculas de sustrato que se encuentran en el "pool" de agua de una micela invertida.

Modelos no-difusionales.¹⁷

Los modelos no-difusionales consideran que el flujo de sustrato a la enzima en micelas invertidas no está limitado por la transferencia de masa, porque la reacción enzimática es lenta comparada con el intercambio de sustrato entre los "pools" de agua. Usando lo anterior como punto de partida, se han propuesto diferentes modelos para explicar los fenómenos observados en micelas invertidas, tales como superactividad y perfiles en forma de campana.

Modelo polidisperso.

Este modelo se desarrolló por el grupo de Martinek. Se ha observado en estudios cinéticos que los perfiles de k_{cat} vs W_0 resultan en una campana. Este grupo considera la posible existencia de diferentes poblaciones de micelas con una dispersión estadística de tamaños, aunque para la cinética de la enzima, solamente tres formas son relevantes: pequeñas, óptimas y grandes. La k_{cat} de la enzima en micelas óptimas es alto, mientras que en micelas subóptimas (pequeñas y grandes) es mucho más baja o nula.

Modelo de aproximación pseudofásica.

Este modelo fue propuesto por el grupo de Bru y considera tanto a la enzima como al sustrato. La aproximación pseudofásica puede usarse cuando la velocidad de reacción es mucho más baja que la escala de tiempo para el intercambio entre solubilizados. En tales condiciones, todas las fases dispersadas pueden considerarse como un medio pseudo-contínuo en equilibrio. Así el volúmen que juega un papel importante en la concentración de solutos es el volúmen total de la pseudofase en la cual reside el soluto.

La aproximación pseudofásica se usó por primera vez por Levashov y col. para describir la cinética de enzimas en micelas invertidas. Ellos consideraron el

caso simple de la pseudofase micelar en una fase continua de aceite, y establecieron un coeficiente de partición del sustrato entre ambos. La idea de la distribución de la enzima entre la pseudofase micelar se introdujo para explicar fenómenos como la curva en forma de campana y superactividad. En la Figura 5(a) se muestra la distribución del sustrato y enzima con las correspondientes constantes de equilibrio, mientras que en la Figura 5(b) se muestra la posible localización de la enzima y el sustrato de acuerdo al esquema pseudofásico.

Modelo de distribución del potencial eléctrico.

El potencial eléctrico se origina por la carga en la superficie de las cabezas de surfactante. El modelo considera las dimensiones de la enzima para estimar la distancia desde la periferia micelar hasta la superficie de la enzima y por ende su contribución a la distribución de potencial eléctrico, asumiendo una localización central de la proteína.

Para concluir, es importante considerar el punto de vista empleado para explicar el comportamiento cinético de enzimas en micelas invertidas y su comparación con respecto al comportamiento en agua. Algunos modelos difusionales o no, consideran que el centro de actividad catalítica no cambia por el atrapamiento en micelas invertidas, y que las diferencias observadas pueden explicarse tomando en cuenta la difusión del sustrato hacia la enzima (modelo puramente difusional), el intercambio de los sustratos entre el "pool" de agua (modelo de aproximación intramicelar) o la distribución del sustrato dentro del "pool" de agua (modelo de distribución de potencial eléctrico). Por otro lado, algunos modelos no-difusionales, principalmente el modelo polidisperso y el modelo de aproximación pseudofásica, asumen que el centro de actividad catalítica expresado por la enzima se afecta por los procesos difusionales, y que las

diferencias en relación con el comportamiento en agua pueden deberse a cambios en la conformación de la proteína.

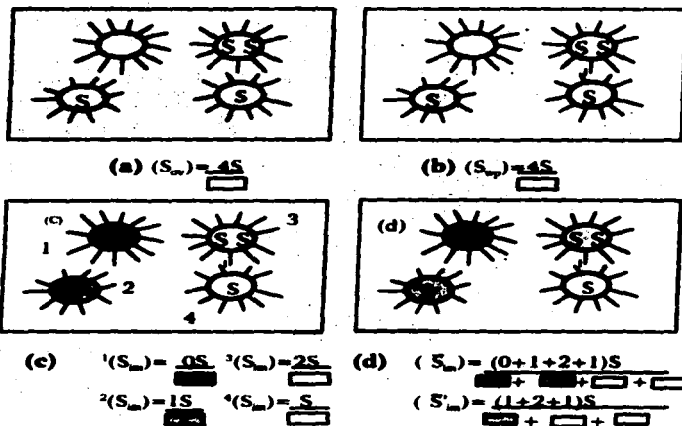


Figura 4. Diferentes maneras de expresar la concentración de sustrato en micelas invertidas. (a) Concentración global; (b) Concentración del "pool" de agua; (c) concentración intramolecular; (d) Concentración intramolecular promedio

3.4.6. Reacciones en micelas invertidas con β -galactosidasa de *E. coli*.

Hasta ahora solo se ha encontrado un trabajo en el que la β -galactosidasa se solubiliza en micelas invertidas manteniendo su actividad. Shiomori et al. (1994)

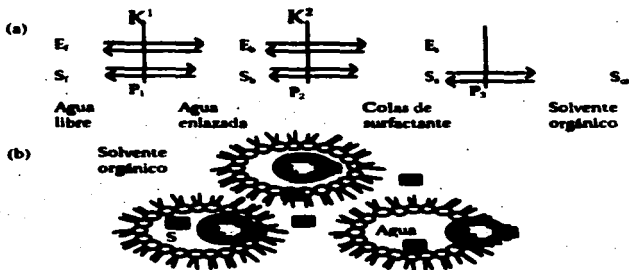


Figura 5. (a) Distribución de la enzima y sustrato entre la pseudofase micelar y la fase oleosa continua; (b) localización posible de la enzima en micelas invertidas.

estudiaron la actividad de hidrólisis de ONPG y la estabilidad de la β -galactosidasa de *E. coli* en micelas invertidas compuestas por AOT/isooctano. Este grupo encontró que el efecto de W_o sobre la actividad inicial de la enzima es diferente de la típica curva en forma de campana descrita para enzimas monoméricas como la lipasa y la α -quimotripsina en micelas invertidas. La actividad inicial de la enzima presenta dos picos a $W_o = 10$ y a 45, este último valor al parecer se debe al tamaño de la β -galactosidasa. En cuanto a la estabilidad de la β -galactosidasa, estos autores encontraron que dependía de la relación agua/surfactante. Las enzimas solubilizadas a bajos W_o fueron inestables y se desnaturalizaron en micelas invertidas, mientras que solubilizadas a $W_o = 21$ y 37 fueron muy estables, con el mismo comportamiento que en medio acuoso.⁴²

4. MATERIALES Y METODOS.

4.1. Preparación de micelas invertidas.

Preparación de la enzima.

La enzima β -galactosidasa de *E. coli* EC. 3.2.1.23 de Sigma Grado VIII se diluyó en amortiguador de fosfato de sodio 0.1 M pH 7.0 para obtener una concentración final de 0.95 mg. de enzima/mL. y se almacenó a 4°C. Para su uso posterior se diluyó con cloruro de magnesio $MgCl_2$, 0.03 M y amortiguador de fosfato de sodio 0.1 M pH 7.0, por lo que la concentración final fue de 1mM de $MgCl_2$. Todos los reactivos que se utilizaron fueron de Sigma.

Procedimiento.

Las micelas invertidas se prepararon agregando bromuro de hexadeciltrimetil-amonio (CTAB) a la fase orgánica (formada por butanol y octano), se agitó en vortex hasta obtener una emulsión. Posteriormente se añadió el sustrato (solución de lactosa u ONPG) a la concentración deseada en amortiguador de fosfato de sodio 0.1 M pH 7.0 y se agitó en vortex durante 20 segundos hasta obtener una solución transparente.

Las diferentes composiciones de las soluciones de micelas invertidas así como los volúmenes de reacción empleados durante este trabajo se especifican en el texto en el capítulo de resultados.

4.2. Determinación de la actividad de la β -galactosidasa en diferentes sistemas.

4.2.1. Análisis cualitativo por cromatografía en placa fina.

Se aminaron placas de sílica (HP-K High Performance Silica Gel), tamaño 10 x 10 cm; grueso de la placa: 200 μm (Whatman) con una solución de dietanolamina 0.1 M con 10 mM de ácido acético disuelto en acetonitrilo. La fase móvil fue acetonitrilo: agua en una relación 80:20 y el revelador fue α -naftol-etanol. Para revelar las placas se calentaron a 100°C durante 5 min aproximadamente y la concentración de la muestra fue de 2-5 mg/mL.

4.2.2. Actividad en fase acuosa.

Actividad utilizando lactosa como sustrato.

La determinación de la actividad de la enzima β -galactosidasa de *E. coli* se llevó a cabo en un volumen de reacción de 0.75 mL y una concentración de 25 mM de lactosa, la cual se incubó a 37°C durante 3 min; posteriormente se añadió la enzima para tener una concentración final de 0.95 mg enzima/mL. Se tomó una muestra de 200 μL a diferentes tiempos y se inactivó mediante ebullición durante 10 min. Las muestras se cuantificaron por HPLC.

Los análisis de los productos de las reacciones tanto en fase acuosa como en micelas invertidas utilizando lactosa como sustrato, se llevaron a cabo en un cromatógrafo Waters-Millipore con detector de índice de refracción Waters 410. Se utilizó una columna de sílica aminada (análisis de carbohidratos) Novapak 4mm (4.6 x 250 mm). Waters-Millipore. El eluyente fue una mezcla de acetonitrilo-agua 75:25 a un flujo de 1.4 mL/min.

La cuantificación de los productos se hizo evaluando la glucosa producida o por la lactosa consumida, ya que en estas condiciones de análisis no fue posible obtener una buena resolución de los productos restantes.

Actividad utilizando ONPG como sustrato.

Fundamento.

Debido a que la β -galactosidasa hidroliza al cromógeno ONPG, éste se puede usar como sustrato de prueba en el ensayo de la lactasa. El método descrito es el elaborado por Lederberg, modificado ligeramente por Kuby⁴³ y adaptado en este trabajo para sistemas acuosos y de micelas invertidas.

El glicósido (ONPG) a pH 7.0 y en amortiguador de fosfato de sodio 0.1 M pH 7.0 da lugar a soluciones incoloras. Al ser hidrolizada una molécula de ONPG, se obtiene una de galactosa y una de o-nitrofenol (ONP); pero en micelas invertidas se obtienen como productos butil-galactósido y o-nitrofenol (ONP).

En solución alcalina, el ONP es objeto de cambios tautoméricos, que originan una coloración amarilla, que puede ser cuantificada colorimétricamente y cuyo cambio con el tiempo puede relacionarse con la actividad enzimática. La absorbancia máxima del ONP se obtiene a 420 nm.

Procedimiento⁴⁴

1. Se mezcla 1.73 mL de amortiguador de fosfato de sodio 0.1 M pH 7.0, 66 μ L cloruro de magnesio 0.03 M, 66 μ L de solución de enzima y 66 μ L de β -mercaptoetanol 3.36 M.
2. Se incuba la solución anterior a 37°C durante 3 min.
3. Se agrega 66 μ L de solución de 68 mM de ONPG en amortiguador de fosfato de sodio 0.1 M pH 7.0 y se agitó en vortex.

4. En un espectrofotómetro DU-600 Beckman se leen las absorbancias a 420 nm cada 15 seg durante 5 min obteniéndose la pendiente (m) en la zona de velocidad inicial.

La actividad la β -galactosidasa de *E. coli* en solución acuosa con ONPG. (Act), se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Act} = \left(\frac{m}{\ell \cdot \epsilon_{420}} \right) \cdot D = \frac{\text{mmoles ONP}}{\text{mL} \cdot \text{min}} = \frac{\text{Unidades}}{\text{mL}}$$

Ecuación 1

donde: m: Pendiente de la recta.
 ϵ_{420} : coeficiente de extinción molar del ONP.
 ℓ : longitud de la celda.
 D: Dilución de la muestra

$$D = \frac{\text{Vol. total reacción}}{\text{Vol. enzima}}$$

Ecuación 2

Cálculo del coeficiente de extinción molar del ONP (ϵ_{420}).

Se realizó una curva patrón variando la concentración de ONP de 0 - 0.2 mmol/mL y se leyó la absorbancia a 420 nm. La pendiente de la gráfica, es decir el ϵ_{420} , fué de 1.8469 $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

4.2.3. Actividad en micelas invertidas.

Lactosa como sustrato.

Las micelas invertidas se prepararon siguiendo el método general, de acuerdo con lo antes descrito (Tabla VIII). Los tubos se incubaron a 37°C durante 3 min, para iniciar la reacción se añadió la enzima β -galactosidasa en amortiguador de fosfato de sodio 0.1 M pH 7.0 y se agitó en vortex hasta que se

obtuvo una solución transparente. Inmediatamente después se tomó una muestra de 200 μ L. Para inactivar la enzima se colocó la muestra en ebullición durante 10 min. Posteriormente se tomaron muestras a diferentes intervalos de tiempo y se analizaron los productos de reacción por HPLC.

Tabla VIII. Composición de la mezcla de reacción para micelas invertidas usando lactosa como sustrato.

| Compuesto | |
|---|----------|
| n-butanol | 55 % p/p |
| n-octano | 22 % p/p |
| amortiguador de fosfato de sodio 0.1 M pH 7.0 | 23 % p/p |
| mM lactosa (global) | 10 |
| mM lactosa (fase acuosa) | 50 |
| W _c | 20 |
| MCTAB (global) | 0.547 |

El volumen de reacción fue de 1.76 mL.

ONPG como sustrato.

Blanco de reacción:

Se preparó la mezcla de reacción según el método general para preparar las micelas invertidas de acuerdo a las composiciones que se indican en la Tabla IX, pero en lugar de añadir la enzima β -galactosidasa se añade únicamente amortiguador de fosfato de sodio 0.1 M pH 7.0 en la proporción correspondiente.

Tabla IX. Composición de la mezcla de reacción de micelas invertidas usando ONPG como sustrato.

| Compuesto | |
|---|----------|
| n-butanol | 55 % p/p |
| n-octano | 22 % p/p |
| amortiguador de fosfato de sodio 0.1 M pH 7.0 | 23 % p/p |
| mg enzima/mL | 4.76 |
| mM ONPG (global) | 10 |
| mM ONPG (fase acuosa) | 50 |
| W _c | 20 |
| MCTAB (global) | 0.547 |

El volumen de reacción fue de 1.76 mL.

Procedimiento:

Se preparó la mezcla de reacción según el método general para preparar las micelas invertidas con las cantidades que se indican en la Tabla IX sin añadir la enzima. Se incubó la solución anterior a 37°C durante 3 min. Para iniciar la reacción se añadió la enzima β -galactosidasa y se agitó en vórtex hasta obtener de nuevo una solución transparente (aproximadamente durante 10 seg). Se midieron las absorbancias restando el blanco en el espectrofotómetro DU-600 Beckman cada 15 seg durante 5 min.

La actividad de la β -galactosidasa en micelas invertidas se calculó mediante:

$$Act = \frac{m}{\epsilon 490} \cdot 1000 = \frac{\mu\text{moles ONP}}{L - \text{min}}$$

4.3. Diseño experimental en el diagrama de fases butanol/octano/lactosa

Para encontrar las composiciones de n-butanol/n-octano/lactosa en amortiguador de fosfato de sodio 0.1 M pH 7.0 en donde se forman micelas invertidas, se probaron diferentes proporciones de los tres componentes, manteniendo constante la concentración de lactosa en la fase acuosa (29 mM lactosa) y la relación agua-surfactante ($W_o=20$). En las zonas en donde se encontró formación de micelas, se seleccionó una región para llevar a cabo un diseño experimental. Este diseño tiene como objetivo analizar las diferentes regiones para ubicar aquellas donde se encuentra la mayor actividad enzimática.

La región que se seleccionó fue 55% Butanol \pm 89, 5% Octano \pm 39 y 6% Amortiguador \pm 40 (%p/p). Se utilizó un diseño experimental para un sistema de tres pseudo-componentes que se ajustó a un modelo cuadrático canónico reducido de polinomio de grado 3.⁴⁵ El número total de observaciones fue 16; la matriz de

experiencias que contiene los puntos de prueba se presenta en la Tabla X. Este modelo comprende 7 coeficientes:

$$\eta = \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{123} X_1 X_2 X_3$$

Ecuación 3

donde, X_1 : amortiguador, X_2 : octano y X_3 : butanol. En este caso, la matriz de transformación para el sistemas de tres pseudo-componentes fue la siguiente:

$$\begin{aligned} X_1 &= 0.4Z_1 + 0.06Z_2 + 0.06Z_3 \\ X_2 &= 0.05Z_1 + 0.39Z_2 + 0.05Z_3 \\ X_3 &= 0.55Z_1 + 0.55Z_2 + 0.89Z_3 \end{aligned}$$

donde Z_1 (0.40, 0.05, 0.55); Z_2 (0.06, 0.39, 0.55) y Z_3 (0.06, 0.05, 0.89) que corresponden a puntos en el diagrama de fases que estan ubicados en la región seleccionada y que estan definidos como: amortiguador-octano-Butanol (%p/p).

En los puntos experimentales se determinó la velocidad inicial como parámetro de repuesta. Las micelas invertidas se prepararon según el método general, de acuerdo a las composiciones deseadas. El sustrato que se utilizó fue lactosa. Para iniciar la reacción se añadió el volumen necesario de enzima para obtener al final una concentración en la fase acuosa de 24 mg enzima/mL. La velocidad inicial se cuantificó durante los primeros 15 minutos. Para detener la reacción, las muestras se inactivaron a ebullición por 10 min. Los productos de reacción se cuantificaron por HPLC.

Tabla X. Matriz de experiencias del diseño experimental para encontrar regiones de máxima actividad en el sistema micelar.

| No | X ₁ | X ₂ | X ₃ |
|----|----------------|----------------|----------------|
| 1 | 1 | 0 | 0 |
| 2 | 0 | 1 | 0 |
| 3 | 0 | 0 | 1 |
| 4 | 0.5 | 0.5 | 0 |
| 5 | 0.5 | 0 | 0.5 |
| 6 | 0 | 0.5 | 0.5 |
| 7 | 0.33 | 0.33 | 0.33 |
| 14 | 0.5 | 0.25 | 0.25 |
| 15 | 0.25 | 0.5 | 0.25 |
| 16 | 0.25 | 0.25 | 0.5 |
| 17 | 0.25 | 0.75 | 0 |
| 18 | 0.75 | 0.25 | 0 |
| 19 | 0.25 | 0 | 0.75 |
| 20 | 0.75 | 0 | 0.25 |
| 21 | 0 | 0.25 | 0.75 |
| 22 | 0 | 0.75 | 0.25 |

El análisis de los datos se realizó mediante el programa estadístico L.P.R.A.I-NEMROD-Aix-Marseille-SURREPC-V8710 para obtener los coeficientes de cada uno de los parámetros, así como las curvas de isorespuesta.

Modelamiento de la región optimizada.

Para predecir con mayor exactitud la velocidad inicial en la región en donde se encontró mayor actividad, se ajustó un modelo para una región más específica que comprendía la siguiente zona 55% Butanol «72, 13.5% Octano «30.5 y 14.5% Amortiguador «31.5 (%p/p). Se procedió a un ajuste similar al anterior.⁴⁸ El número total de observaciones fue 11.; la matriz de experiencias con los puntos de prueba se presenta en la Tabla XI. Este modelo comprende 6 coeficientes:

$$\eta = \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3$$

Ecuación 4

donde, X_1 : amortiguador, X_2 : octano y X_3 : butanol. En este caso, la matriz de transformación para el sistemas de tres pseudo-componentes fue la siguiente:

$$\begin{aligned} X_1 &= 0.315Z_1 + 0.145Z_2 + 0.145Z_3 \\ X_2 &= 0.135Z_1 + 0.305Z_2 + 0.135Z_3 \\ X_3 &= 0.55Z_1 + 0.55Z_2 + 0.72Z_3 \end{aligned}$$

donde $Z_1(0.315, 0.135, 0.55)$; $Z_2(0.145, 0.305, 0.55)$ y $Z_3(0.145, 0.135, 0.72)$ los cuales corresponden a puntos en el diagrama de fases %amortiguador-%octano-%butanol (p/p) de la región de máxima actividad encontrada.

Tabla XI. Matriz de experiencias para una región específica del sistema micelar butanol/octano/lactosa en solución, en la que se encontró la mas alta actividad enzimática.

| No | X_1 | X_2 | X_3 |
|----|-------|-------|-------|
| 1 | 1 | 0 | 0 |
| 2 | 0 | 1 | 0 |
| 3 | 0 | 0 | 1 |
| 4 | 0.5 | 0.5 | 0 |
| 5 | 0.5 | 0 | 0.5 |
| 6 | 0 | 0.5 | 0.5 |
| 7 | 0.147 | 0.206 | 0.647 |
| 8 | 0 | -0.5 | 1.5 |
| 9 | 1.5 | -0.5 | 0 |
| 10 | 0.5 | -0.5 | 1 |
| 11 | 1 | -0.5 | 0.5 |

En los puntos experimentales se determinó la velocidad inicial como parámetro de respuesta. Las micelas invertidas se prepararon y cuantificaron como se describió en el punto anterior. El análisis estadístico se realizó como en el experimento anterior.

4.4. Estudios de velocidad inicial con micelas invertidas.

4.4.1. Efecto del tamaño de la micela.

Se prepararon micelas invertidas con diferentes relaciones molares de amortiguador de fosfato de sodio 0.1 M pH 7.0 y surfactante (CTAB). Esta relación (W_0) se varió entre 5 y 200.

Las micelas se prepararon siguiendo el método descrito, de acuerdo a las proporciones reportadas en la Tabla XII, para obtener las composiciones deseadas. Para determinar la actividad en micelas con esta composición, se procedió como ya se describió, empleando una concentración final de enzima en la fase acuosa de 24 mg enzima/mL. Se analizaron las muestras por HPLC, determinandose la velocidad inicial para cada W_0 .

Tabla XII. Composición básica de las micelas invertidas para diferentes valores de W_0 .

| Compuesto | |
|---|---------|
| n-butanol | 62 %p/p |
| n-octanol | 26 %p/p |
| amortiguador de fosfato de sodio 0.1 M pH 7.0 | 12 %p/p |
| mM lactosa (global) | 7.3 |
| mM lactosa (fase acuosa) | 7.3 |

El volumen de reacción fue de 1.76 mL. La concentración de CTAB se varió de acuerdo al W_0 deseado.

4.4.2. Efecto en la forma de preparación.

Se elaboraron micelas invertidas cambiando el orden en que se adicionaban la enzima o el sustrato (en este caso lactosa). La forma tradicional consiste en agregar la enzima al final: éste método se denominó "lactosa+enzima". La reacción por tanto se inicia mediante la adición de la enzima y se evalúa según se describió con anterioridad.

Las micelas invertidas que se prepararon dejando la adición de la solución de lactosa al final, método "enzima+lactosa" se formaron de la siguiente forma: se agregó el CTAB a la fase orgánica (formada por butanol y octano) y se agitó en vortex hasta obtener una emulsión. Posteriormente se añadió la enzima de acuerdo a la concentración deseada, y se agitó en vortex durante 20 segundos hasta obtener una solución transparente. Para iniciar la reacción se agregó la solución de lactosa agitando en vortex. Posteriormente se evaluó la reacción como ya describió. La composición de las micelas invertidas fue la misma que la descrita en la Tabla VIII.

4.4.3. Efecto de la concentración de enzima.

Se prepararon micelas con la composición básica, es decir 55% butanol, 22% octano y 23% lactosa en solución (96p/p) y el W_o fue de 20 en un volumen de reacción de 1.76 mL. La concentración global de CTAB fue de 0.547 M. En este caso la concentración de ONPG (global) fue de 1 mM, mientras que la concentración en fase acuosa fue de 5 mM. Se emplearon las siguientes concentraciones de enzima en la fase acuosa: 0.95 - 4.8, 9.5, 14.3, 19.0, 23.8 y 47.6 mg/mL, y se determinó la velocidad inicial para cada concentración usando como sustrato ONPG.

4.4.4. Efecto de la temperatura.

Se probó un rango de temperatura de 25 a 85 °C y se determinó la velocidad inicial en micelas invertidas usando ONPG como sustrato. La micela blanco se preparó únicamente con agua MQ filtrada en un volumen de 0.88 mL con la misma composición de las micelas invertidas de reacción (Tabla IX).

4.5. Estudios cinéticos en diferentes sistemas para la síntesis de butilgalactósido.

4.5.1. Estudio preliminar sobre el efecto de la concentración de lactosa.

Sistema de micelas invertidas.

La composición de las mezclas de reacción empleadas para determinar las constantes cinéticas, se obtuvieron variando la concentración de lactosa (global) entre 0.5 y 15 mM. La composición de la micelas invertidas fue de 55% butanol, 22% octano y 23% lactosa en solución (%p/p). La concentración de enzima que se empleó fue de 23.8 mg enzima/mL en fase acuosa y el W_0 fue de 20 en un volumen de reacción de 1.76 mL. La concentración de lactosa (global) en las mezclas de reacción, se varió entre 3 y 45 mM.

Sistema bifásico.

Este sistema de reacción consiste en una relación n-butanol y agua de 70.5:29.5 (%p/p) para mantener constante la relación que se tenía en las micelas invertidas de estos dos componentes. La concentración de enzima fue al igual que el caso anterior de 23.8 mg enzima/mL en fase acuosa.

Estos experimentos se realizaron en reactores enchaquetados a temperatura constante de 37°C y la agitación fue provista por medio de una propela. En este caso, la muestra se tomaba con el sistema bien mezclado para incluir las dos fases de que esta compuesta la mezcla de reacción (fase acuosa y n-butanol). Antes de analizar las muestras se centrifugaron a 12 000 rpm por 3 min y por separado se cuantificó cada una de las fases por HPLC.

El análisis de los productos de las reacciones se llevó a cabo como se mencionó anteriormente, sin embargo, en este caso el eluyente fue una mezcla de acetónitrilo-agua 87:13 a un flujo de 1.4 mL/min, lo que permite lograr una separación de la glucosa y la galactosa que en las condiciones estándar no es

posible cuantificar. En sistemas bifásicos la enzima β -galactosidasa realiza también la hidrólisis de la lactosa.

Sistema acuoso.

Para la determinación de las constantes cinéticas en solución acuosa de la enzima se prepararon las reacciones con un volumen de reacción de 1.5 mL, las cuales se incubaron a 37°C durante 3 min; posteriormente se añadió la enzima para tener una concentración final de 2.4 mg enzima/mL y se determinó la velocidad de reacción. La concentración de lactosa en las reacciones llevadas a cabo para realizar este estudio oscilaron entre 1 y 50 mM de lactosa.

4.5.2. Estudio cinético usando como sustrato ONPG.

Sistema micelar.

La composición de las mezclas de reacción, en todos los casos fue una proporción de 55% butanol, 22% octano y 23% lactosa en solución (%p/p); el volumen de reacción fue de 1.76 mL. La concentración de ONPG (global) se varió entre 0.5 - 20 mM y se determinó la velocidad inicial. La concentración de enzima que se utilizó en esta serie de experimentos fue de 4.76 mg. de enzima/mL en fase acuosa y la relación agua y surfactante CTAB se mantuvo constante a 20.

Sistema acuoso.

Para la determinación de las constantes cinéticas en solución acuosa se prepararon las reacciones con un volumen de reacción de 0.75 mL los cuales se incubaron a 37°C durante 3 min; posteriormente se añadió la enzima para tener una concentración final de 0.95 mg enzima/mL. Las concentración de ONPG en las reacciones llevadas a cabo para realizar el estudio cinético oscilaron entre 0.1 y 15 mM.

El procedimiento que se siguió para la determinación de la velocidad inicial fue una modificación al método general para cuantificar la actividad en medio acuoso con ONPG como sustrato, los pasos que se siguieron fueron los siguientes:

1. Las soluciones de ONPG a una concentración dada se incubaron a 37°C durante 3 min.
2. Se agregó la solución de enzima para obtener una concentración final de 0.95 mg enzima/mL y se agitó en vortex.
3. En un espectrofotómetro DU-600 Beckman se leyeron las absorbancias a 420 nm cada 15 seg durante 3 min. La actividad se calculó mediante la Ecuación 1.

Sistema acuoso saturado con n-butanol.

Para saturar el amortiguador de fosfato de sodio 0.1 M. pH 7.0, se colocaron 20 mL y se agregó 6 mL de n-butanol con agitación constante con propela en un reactor encaquetado a 37°C en un sistema abierto durante 3 horas, separando posteriormente las fases.

Para conocer el efecto del n-butanol sobre la actividad de la β -galactosidasa se calcularon las constantes cinéticas. Se cuantificó tanto la actividad total de la enzima, que incluye tanto la velocidad de hidrólisis como la de alcoholisis.

Para la determinación de las constantes cinéticas en solución acuosa saturada con n-butanol se procedio igual que en el punto anterior.

4.6. Estabilidad de la β -galactosidasa de *E. coli*.

Se almacenó a 37°C, 5 mL de la solución de enzima en *n*-butanol, octano, medio acuoso o medio acuoso saturado con butanol con agitación constante de tipo propela con 5 mL. A diferentes intervalos de tiempo se tomó una muestra de 66 μ L y se midió la actividad, agregando el sustrato

En el caso del sistema micelar se almacenó a 37°C y 25°C una solución de micelas con la composición que se muestra en la Tabla VIII. El ensayo de actividad se realizó a muestras tomadas a diferentes intervalos de tiempo.

Micelas blanco

Para el estudio anterior, se preparó una solución de micelas blanco de la siguiente manera: se emulsificaron 0.0875 g. de CTAB en 0.258 mL de *n*-butanol y 0.093 mL octano, agregando posteriormente 0.0875 mL de amortiguador de fosfato de sodio 0.1 M pH 7.0. Se agitó en vortex durante 20 seg hasta obtener una solución transparente. A 1.8 mL. de amortiguador de fosfato de sodio 0.1 M pH 7.0 y 66 μ L. de $MgCl_2$, 0.03 M se agregaron 66 μ L de la solución de micela blanco anterior y se agitó en vortex. Por último se añadió 66 mL de ONPG 68 mM y de nuevo se agitó en vortex.

Mezcla de reacción

A 1.78 mL de amortiguador de fosfato de sodio 0.1 M pH 7.0 y 66 mL de $MgCl_2$, 0.03 M se agregó 66 μ L de la solución almacenada a 37°C y se agitó en vortex. Para iniciar la reacción se añadió 66 mL de ONPG 68 mM y en el espectrofotómetro DU60-Beckman se leyó la absorbancia a 420 nm cada 0.3 seg durante 5 min. Las actividades se calcularon con la Ecuación 1.

4.7. Síntesis de butil-galactósido en micelas invertidas con β -galactosidasa.

Síntesis de butil-galactósido usando ONPG como sustrato.

La mezcla de reacción se preparó en un volumen de reacción de 4.4 mL de acuerdo a la composición de la Tabla IX y a la forma de preparación general de micelas invertidas, en la que la concentración de sustrato fue de 15 mM. La reacción se inició con la adición de la enzima en solución. Se tomaron muestras cada 10 minutos durante las 2 primeras horas de la reacción y posteriormente a intervalos mas largos de tiempo. Debido a que no se contó con un método de inactivación de la enzima que evitase la desestabilización del sistema micelar, se leyó simultáneamente en el espectrofotómetro a 420 nm. Para tomar las lecturas en tiempos avanzados de la reacción fue necesario diluir las muestras por lo que se prepararon micelas con agua MQ.

Síntesis de butil-galactósido usando lactosa como sustrato.

Se prepararon micelas invertidas (Tabla VIII) empleando 25 mM de lactosa y 4.76 mg enzima/mL de enzima en un volumen total de reacción de 5.27 mL. Se tomaron muestras a diferentes intervalos de tiempo durante las primeras 8 horas, 24 y 96 horas de reacción. Se analizaron los productos de reacción por HPLC en las condiciones especificadas.

5. RESULTADOS Y DISCUSION.

Las glicosidasas se han utilizado para sintetizar alquil-glicósidos, principalmente en medios bifásicos en los que generalmente una fase esta constituida por el alcohol y la otra por la fase acuosa que contiene a la enzima y al sustrato. Por esta razón, en muchos casos no ha sido posible eliminar la reacción de hidrólisis, siendo necesaria la búsqueda de sistemas en los que sea posible controlar el contenido de agua y de esta manera dirigir la selectividad de la reacción hacia la alcoholólisis. Las micelas invertidas presentan las características antes mencionadas. Tradicionalmente se ha empleado el sistema AOT/isooctano en reacciones enzimáticas y en general para la solubilización de proteínas y aminoácidos en micelas invertidas. Sin embargo, el sistema micelar compuesto por CTAB/octano y un cosolvente (hexanol), también ha sido ampliamente difundido. En este último caso, al necesitarse un alcohol como cosolvente para la formación de micelas, es posible sustituir éste por otro alcohol sin cambiar considerablemente sus propiedades, como puede ser el butanol, ya que se conoce el diagrama de tres componentes para la formación de micelas por un trabajo anterior realizado en el laboratorio. La selección del alcohol determina las características del producto obtenido, en este caso el butil-galactósido tiene una cadena alifática pequeña por lo que es un tensoactivo débil, como es de esperarse al incrementar el tamaño de la cadena del alcohol se obtienen mejores tensoactivos. Sin embargo para los fines del proyecto solo se tiene el interés de estudiar un modelo de síntesis de este tipo de compuestos. Por lo anterior, se seleccionó el sistema butanol/octano/ agua y CTAB como surfactante, para realizar un estudio sobre reacciones de alcoholólisis. Es conveniente recalcar que en este caso uno de los componentes micelares participa tanto en la formación de la micela como en la reacción.

Considerando que uno de los objetivos de este trabajo es el sintetizar alquil-galactósidos, se seleccionó al n-butanol ya que es un alcohol de cadena alifática pequeña pero que se encuentra dentro de los alcoholes insolubles. Al emplear este alcohol, es posible efectuar estudios comparativos sobre la síntesis de butil-galactósido en diversos tipos de sistemas: bifásico, micelas invertidas e inclusive en un medio homogéneo dada la posibilidad de disolver hasta 9% de butanol en agua.

En la reacción en dos fases, dada la alta actividad de agua, se ha reportado que la enzima efectúa tanto la reacción de alcoholisis como la de hidrólisis, y aunque las condiciones para optimizar este sistema no han sido ampliamente estudiadas, es un hecho que el estudio de esta reacción en micelas invertidas permitiría un mayor control de la selectividad de la reacción.

5.1. Diagrama de fases butanol/octano/lactosa en solución.

Para iniciar este estudio fue necesario encontrar las regiones del diagrama de tres componentes (butanol/octano/lactosa en solución), en las que había formación de micelas. La evaluación se hizo cualitativa, tomándose como base la propiedad de que las micelas invertidas son transparentes. Principalmente se buscaba encontrar una zona de formación micelar con un alto porcentaje de butanol, ya que como se señaló, este compuesto es también sustrato de la enzima para la síntesis de butil-galactósido. Es importante señalar que no existe una correlación que permita predecir las regiones en las que hay formación de micelas, ya que esta depende de la composición de la micelas invertidas así como del tipo de surfactante empleado y del sustrato que este disuelto en la fase acuosa. En estas condiciones, se encontró una amplia zona en la que hubo formación de micelas, ubicada entre los siguientes límites: 55 % butanol \pm 89, 5% octano \pm 39 y 6% lactosa en solución \pm 40 (%p/p).

Una vez definida esta región, se realizó un diseño experimental que permitiera seleccionar y optimizar la composición micelar teniendo como criterios la obtención de una adecuada actividad de la enzima β -galactosidasa y una alta selectividad hacia la reacción de alcoholólisis disminuyendo o eliminando la reacción de hidrólisis. El diseño se hizo para mezclas de tres componentes en la región específica antes señalada dentro del diagrama de fases butanol/octano/lactosa en solución. Cabe mencionar que las micelas formadas se almacenaron a temperatura ambiente y éstas fueron estables al menos por dos semanas. En la sección de materiales y métodos se presenta en forma matricial los puntos que se probaron experimentalmente. Con los datos obtenidos se propuso la siguiente ecuación que describe el efecto de la composición micelar en la velocidad inicial de reacción y que corresponde, a un modelo cúbico reducido (modelo cúbico de scheffe):

$$V_0 = -141.1X_1 + 1358.3X_2 + 27.8X_3 - 14117.5X_1 \cdot X_2 - 101.14X_1 \cdot X_3 - 2712.1X_2 \cdot X_3 + 32493.9X_1 \cdot X_2 \cdot X_3$$

Ecuación 5

donde, X_1 : fracción (%p/p) del amortiguador,
 X_2 : fracción (%p/p) del octano y
 X_3 : fracción (%p/p) del butanol.

Este modelo no solo describe el efecto en la velocidad de reacción en el sistema micelar de cada uno de los componentes, sino también las interacciones cuadráticas entre dos componentes y un término cúbico que corresponde a la interacción entre el butanol, octano y agua. En la Figura 6 se muestran las curvas de isorespuesta así como la representación tri-dimensional de la actividad de la enzima β -galactosidasa en micelas invertidas. Es importante mencionar que en la región estudiada hasta con un 40% (p/p) de agua no se encontró hidrólisis sino exclusivamente alcoholólisis.

Comparando el sistema micelar con el bifásico, tenemos que la enzima en sistemas de dos fases con 10% de alcohol, cataliza tanto la reacción de alcoholólisis como la de hidrólisis.³⁰ Los coeficientes calculados en el modelo indican que los componentes orgánicos tienen un efecto positivo, mientras que la fase acuosa parece tener un efecto negativo en la actividad de la enzima. Es conveniente señalar que la Ecuación 5 no presenta un buen ajuste a los datos experimentales, debido a que en ciertas zonas del diagrama experimental de tres fases, la actividad cae bruscamente y el modelo no puede predecir estos cambios. El paquete estadístico utilizado, no calcula la composición óptima de micelas debido a la complejidad del sistema. Sin embargo, con las curvas de isorespuesta se seleccionó la región con la máxima actividad, para proponer un segundo modelo resultado de esta segunda región optimizada. Esta región está delimitada por 55% Butanol \pm 72, 13.5% Octano \pm 30.5 y 14.5% lactosa en solución \pm 31.5 (%p/p).

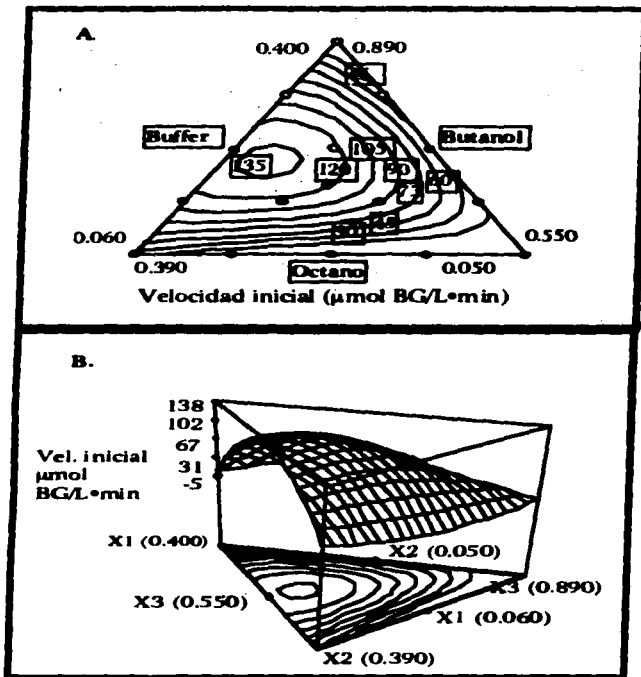


Figura 6. Actividad de la β -galactosidasa en micelas invertidas variando la composición del sistema butanol/octano/lactosa en solución amortiguadora. A. Curvas de isorespuesta. B. Representación tri-dimensional de la Velocidad inicial. (X_1 : fracción (%p/p) del amortiguador, X_2 : fracción (%p/p) del octano y X_3 : fracción (%p/p) del butanol)

5.1.1. Modelamiento de la región optimizada.

Con el modelo anterior fue posible encontrar una región de máxima actividad y además, desarrollar un modelo que a diferencia del anterior, únicamente contenga el efecto individual de los componentes y las interacciones entre dos componentes. Sin embargo, en este caso es posible predecir la velocidad con mayor grado de confiabilidad. El modelo ajustado fue el siguiente:

$$V_0 = -6975.9X_1 - 1505.1X_2 - 928.5X_3 + 8658.9X_1 \cdot X_2 + 13169.2X_1 \cdot X_3 + 4058.4X_2 \cdot X_3$$

Ecuación 6

En la Figura 7 se muestran las curvas de isorespuesta así como la representación tri-dimensional de la actividad de la enzima β -galactosidasa en micelas invertidas para la segunda región optimizada.

Los coeficientes del modelo indican que al menos la interacción entre dos componentes tiene un efecto positivo sobre la actividad de la enzima. Sin embargo, desde el punto de vista estadístico, todos los componentes tienen un efecto negativo en la velocidad, siendo su interacción lo que resulta benéfico. Es obvio entonces que la Ecuación 6 no tiene un sentido físico y solo permite predecir la velocidad inicial para la región analizada. Por medio de las curvas de isorespuesta y el modelo propuesto, se calculó la actividad para diferentes composiciones. Se seleccionó finalmente la composición que tuviese el contenido mas alto de agua, ya que se corroboró que en estas condiciones no hay reacción de hidrólisis, y se permite así solubilizar una mayor cantidad de sustrato. La composición seleccionada a partir de este estudio para el sistema micelar butanol/ octano/ agua fue de 55/ 22/ 23 (%p/p) respectivamente.

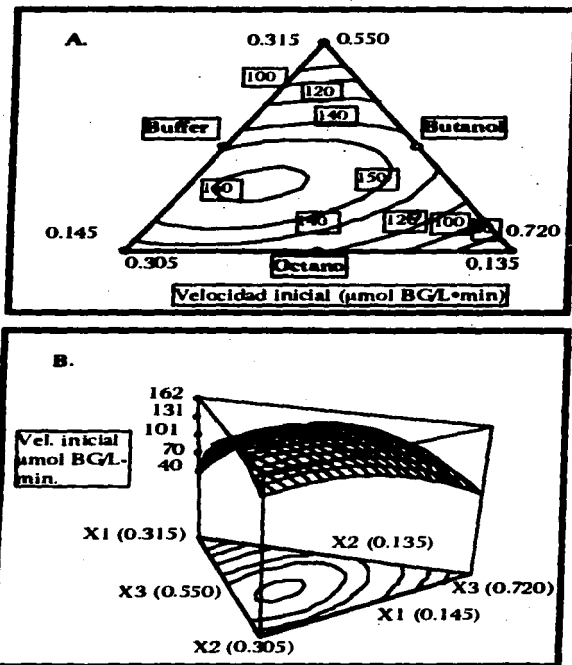


Figura 7. Optimización de la región de mayor actividad de la β -galactosidasa en micelas invertidas en el diagrama de fases butanol/octano/agua en solución amortiguadora. A. Curvas de nivel. B. Representación tri-dimensional. X_1 : fracción (%p/p) del amortiguador. X_2 : fracción (%p/p) del octano y X_3 : fracción (%p/p) del butanol)

5.2. Efecto del tamaño de la micela invertida (W_o) en la velocidad inicial de síntesis de butil-galactósido.

Uno de los principales factores que afectan la actividad en micelas invertidas es el tamaño de la micela. Por esta razón, una vez optimizada la composición del sistema micelar, se continuó el estudio analizando el efecto del tamaño de la micela, el cual puede llevarse a cabo tomando como referencia la relación agua/surfactante (W_o).

Se estudió el efecto del tamaño de la micela (efecto del parámetro W_o) en la velocidad inicial de alcoholísis para la síntesis de butil-galactósido con β -galactosidasa, observándose un comportamiento clásico para estos sistemas, en forma de campana. En la Figura 8 se observa que la relación óptima agua/surfactante en términos de actividad de alcoholísis fue 20. De acuerdo con diversos reportes de la literatura, en estas condiciones el tamaño de la micela y el tamaño de la proteína podrían ser iguales. Existen datos sobre el tamaño de la micela para sistemas micelares en el que se emplea AOT como surfactante.³⁷ Sin embargo, no se encontraron relaciones similares para sistemas que utilizan CTAB, lo que impide una explicación cuantitativa de los resultados encontrados. En un trabajo paralelo realizado en el laboratorio en el que se predice el tamaño de las micelas con base en un modelo Termodinámico en el que se minimiza el AG de formación de micelas, se encontró que a medida que disminuye el W_o , el diámetro de las micelas conteniendo proteínas va disminuyendo y se hace asintótico en el valor en el que este es igual al tamaño de la β -galactosidasa estimado ($\varnothing = 110 \text{ \AA}$), mientras que el radio de las micelas vacías continúa disminuyendo.

La dependencia del valor de k_{cat} sobre la relación molar de concentración agua y surfactante es usualmente en forma de campana. Este comportamiento se ha observado con diferentes enzimas, tales como α -chimotripsina, tripsina,

lisozima, fosfolipasa A₂, alcohol deshidrogenasa, pirfosfatasa, lipasa pancreática, peroxidasa, fosfatasa alcalina e hidroxysteroides deshidrogenasa.³⁹ Se ha propuesto que cuando el diámetro óptimo de la micela coincide con el tamaño molecular de la enzima atrapada, se observa el kcat o la velocidad inicial más elevada: tal es el caso de la α -quimotripsina, peroxidasa y lipogenasa.³⁹ Por otro lado, la caída en la actividad antes de este punto se debe a que el tamaño de la enzima comparado con el de la micela es mucho mayor mientras que la caída posterior puede deberse a que el tamaño de la micela es superior al de la enzima y en este caso se presentan problemas de difusión intramicelar.

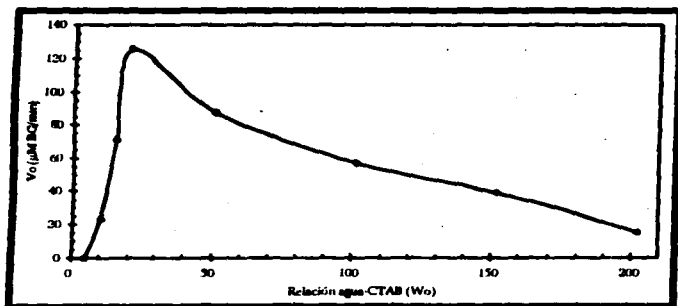


Figura 8. Efecto del tamaño de micela en la velocidad alcoholólisis con β -galactosidasa en micelas invertidas. La composición butanol/octano/agua fue 62/26/12 (%p/p) respectivamente; se emplearon una concentración de enzima de 24 mg/mL y una concentración de lactosa de 7.3 mM en la fase global a 37°C.

5.3. Efecto del método de preparación de las micelas invertidas en la velocidad inicial de síntesis de butil-galactósido.

Existen tres formas de atrapar a las enzimas en micelas invertidas: primero la enzima puede solubilizarse por transferencia espontánea de la proteína a un sistema de dos fases que consiste de un volumen igual de solución acuosa de proteína y uno del solvente orgánico con el surfactante. Un segundo procedimiento consiste en la solubilización de enzima liofilizada en micelas invertidas hidratadas formadas previamente. El tercero y más común consiste de la microinyección de enzima disuelta en amortiguador en una solución agitada de surfactante en solvente orgánico.⁴⁶ Este último procedimiento se utilizó a lo largo de los experimentos realizados.

Para determinar si la forma de preparación de las micelas tiene algún efecto en la velocidad inicial observada, relacionado con la disponibilidad del sustrato o de enzimas se realizaron los siguientes experimentos. Cuando el sustrato se agrega al final de la preparación del experimento para iniciar la reacción, podría haber una fase lag ante la baja disponibilidad de sustrato. Por otro lado, al añadirse la enzima al inicio de la reacción se puede inactivar dado el efecto denaturalizante de los solventes orgánicos. También podrían presentarse diferencias relacionadas con la difusión y partición tanto de la enzima como del sustrato. Por esta razón, se realizó un experimento en el que las micelas invertidas se prepararon de dos formas: (1) la enzima se añadió al final del experimento, (lactosa + enzima); (2) el sustrato (lactosa) se agregó al final del experimento, (enzima + lactosa).

Como puede observarse en la Figura 9, la forma de preparación no tiene un efecto significativo en la velocidad de reacción observada.

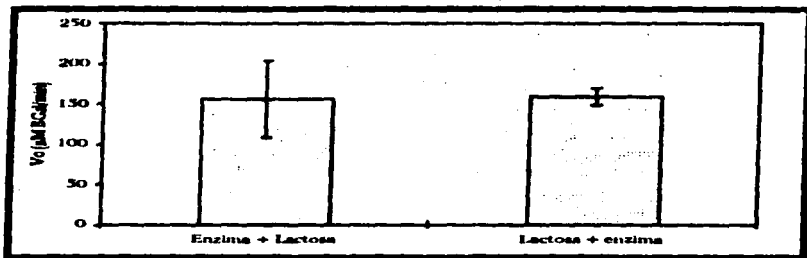


Figura 9. Efecto del orden de adición del sustrato y la enzima en las micelas invertidas en la velocidad inicial de síntesis de butil-galactósido. El W_o fue de 20 y 10 mM lactosa (global).

5.4. Efecto de la concentración de lactosa en diferentes sistemas para la síntesis de butil-galactósido.

Se realizó un estudio preliminar para comparar los diferentes sistemas que pueden emplearse para sintetizar butil-galactósido mediante reacciones de alcoholísis, incluyendo el sistema acuoso, aunque en este último sistema, la enzima hidroliza también a su sustrato natural, la lactosa. La comparación se enfocó básicamente a las diferencias en la velocidad inicial para sintetizar el alquil-galactósido.

Sistema micelar.

El butil-galactósido se puede sintetizar por la enzima β -galactosidasa mediante reacciones de alcoholísis en micelas invertidas. La cinética de la enzima se muestra en la Figura 10 donde puede constatarse que, al igual que en otros casos, la enzima obedece el comportamiento de Michaelis y Menten. La velocidad

máxima encontrada para la síntesis de butil-galactósido fue de 162.6 μ moles lactosa/L-min, mientras que el K_m para este sistema fue de 3.79 mM lactosa en la fase global. La velocidad máxima considerando la concentración de enzima usada fue de 34.15 μ mol lactosa/ g enzima \cdot min.

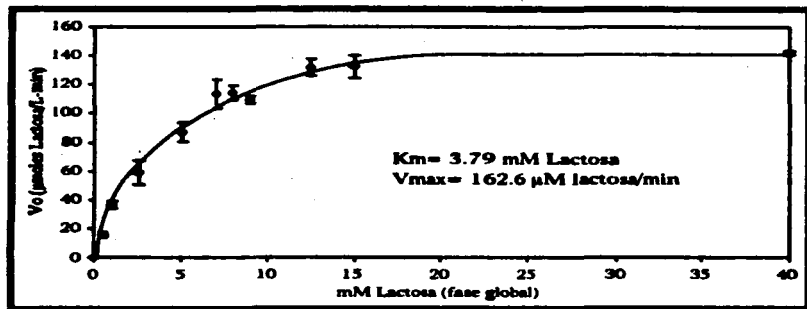


Figura 10. Efecto de la concentración de lactosa en la fase global en la velocidad inicial para la síntesis de butil-galactósido en micelas invertidas con β -galactosidasa (pH 7.0 y $T=37^{\circ}\text{C}$). La concentración de la enzima fue de 4.76 mg enzima/mL.

Sistema bifásico.

Para el caso del sistema bifásico, este consiste de un medio de reacción donde el 50% es la fase acuosa, la enzima puede efectuar tanto la reacción de hidrólisis como la de alcoholisis. Tomando en cuenta lo anterior y los problemas que representaba el cuantificar cada una de las velocidades se determinó la velocidad global, es decir la velocidad de consumo de lactosa. En la Figura 11 se muestra la cinética de la β -galactosidasa en el sistema bifásico 50% butanol- 50%

agua (%p/p). En estas condiciones el sistema también obedece la cinética de Michaelis y Menten, con una velocidad máxima de degradación de lactosa de 1068 μ moles lactosa/L-min, mientras que el K_m para este sistema fue de 8.72 mM lactosa en la fase global. La velocidad máxima, considerando la concentración de enzima fue de 160.12 μ mol lactosa/g enzima \cdot min.

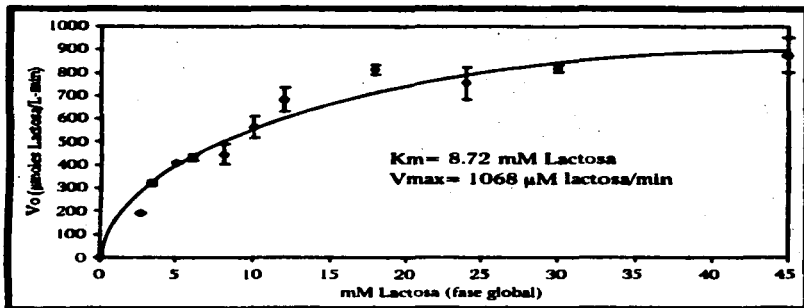


Figura 11. Efecto de la concentración de lactosa en la fase global en la velocidad inicial para la síntesis de butil-galactósido en un sistema bifásico con β -galactosidasa (pH 7.0 y T=37°C). La concentración de enzima fue de 6.7 mg/mL.

Sistema acuoso.

Se consideró necesario contar con un control, para comparar el comportamiento cinético de la enzima en otros sistemas con respecto al medio acuoso. Después de efectuar un estudio clásico de cinética enzimática en medio acuoso según se reporta en la Figura 12, se encontró que la enzima presenta una velocidad máxima de 201.8 μ moles lactosa/L-min y un K_m de 7.88 mM. La

velocidad específica fue de $84.8 \mu\text{mol lactosa/g enzima}\cdot\text{min}$. De acuerdo a lo reportado en la bibliografía, el K_m para lactosa es de 5.5 mM , por lo que el valor determinado experimentalmente no difiere significativamente del reportado.²³

Estos valores permiten hacer una comparación de los diferentes sistemas en los que la β -galactosidasa utiliza a la lactosa como sustrato.

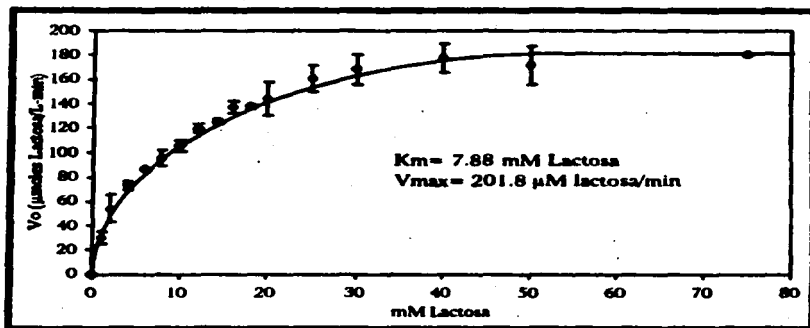


Figura 12. Efecto de la concentración de lactosa en la velocidad inicial para la hidrólisis de lactosa en un sistema acuoso con β -galactosidasa de *E. coli* a 37°C y $\text{pH} = 7.0$. La concentración de enzima fue de 2.3 mg/mL .

Los resultados se resumen en la Tabla XIII. Haciendo un estudio comparativo se encuentra que la afinidad por el sustrato no cambia significativamente en los tres sistemas. Sin embargo la velocidad específica para el medio bifásico es 4.7 veces superior a la velocidad observada en el sistema micelar, aunque es importante recordar que en el sistema bifásico se incluye también la velocidad de hidrólisis. Sin embargo, la velocidad observada para el sistema

bifásico es también superior (casi el doble) a la velocidad en medio acuoso, lo que puede deberse a un efecto activador del alcohol en el sistema, que no se manifiesta en el sistema micelar, probablemente debido a que la concentración de alcohol se vuelve limitante o bien existe un exceso de enzima. Por otro lado, aunque las diferencias en el K_m no son muy importantes pareciera haber una mayor afinidad por la lactosa en el medio micelar. Como quiera que sea, no se observa algún efecto difusional de la lactosa en la cinética de la reacción, en lo que al análisis de la lactosa se refiere.

Tabla XIII. Comparación de los sistemas acuoso, bifásico y de micelas invertidas en la cinética observada de la β -galactosidasa de *E. coli* empleando lactosa como sustrato.

| Sistema | K_m (mM lactosa) | Velocidad específica ($\mu\text{mol lactosa}/\text{g enzima}\cdot\text{min}$) |
|----------|--------------------|---|
| Micelar | 3.79 | 34.15 |
| Bifásico | 8.72 | 160.12 |
| Acuoso | 7.88 | 84.8 |

La velocidad específica presentada corresponde a la desaparición de lactosa, independientemente del producto de reacción.

5.5. Efecto de la concentración de la enzima en la velocidad inicial en micelas invertidas.

De acuerdo con lo antes discutido, se realizó un estudio para determinar el efecto de la concentración de la enzima en la velocidad inicial observada, ya que al parecer la menor actividad observada en la β -galactosidasa en micelas invertidas podría deberse a un efecto de saturación en el que un exceso de enzima pudiese ser la causa de la menor actividad específica. Como puede observarse en la Figura 13, la velocidad inicial de síntesis de butil-galactósido depende de la concentración de enzima utilizada en forma lineal hasta una concentración en la fase acuosa de 4.76 mg enzima/mL. A concentraciones mayores de enzima la linealidad se pierde, por

lo que en principio deja de existir un control cinético. Este resultado permite explicar parcialmente las diferencias de velocidad máxima obtenidas para los sistemas antes descritos, ya que la concentración a la que se realizaron estos experimentos fue de 23.8 mg enzima/mL, prácticamente 5 veces mas enzima del aparente valor de saturación. Es interesante constatar que dada esta situación, si calculamos la velocidad específica para la β -galactosidasa en el sistema micelar a partir de la pendiente de la recta de la Figura 13, el valor obtenido resulta ser de 77.61 μ mol ONP/ mg enzima \cdot min, aunque como se verá mas adelante este estudio se realizo a concentración de sustrato no saturante (1mM de ONPG en fase global).

Existen diversas hipótesis para explicar el efecto observado de la concentración de enzima en la velocidad inicial. La primera es que el medio presenta una típica curva de saturación en relación con la enzima, por lo que, a altas concentraciones, la enzima se particiona en las diferentes pseudofases del sistema micelar, quedando atrapada tanto dentro de la micelas invertidas como en la fase orgánica. La segunda hipótesis esta relacionada con problemas de difusión. Sin embargo, en el estudio termodinámico al que ya se hizo referencia, se encontró que justamente a la concentración de enzima a la que se observa el efecto "saturante" el número de micelas vacías se hace prácticamente cero. Por arriba de este valor las micelas no pueden acomodar mas enzima quedando "suspendida" en el sistema, mientras que por abajo de este valor el mismo número de micelas vacías en proporción de las llenas va aumentando considerablemente.

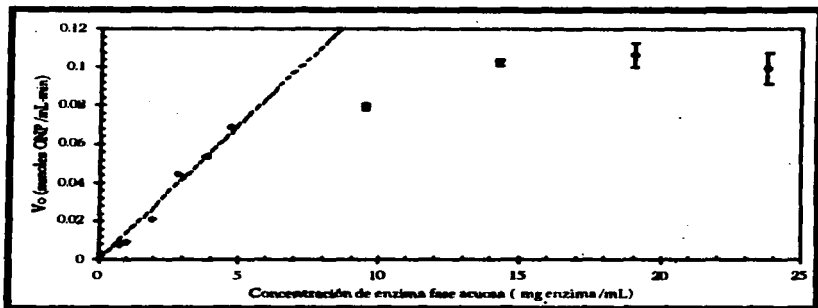


Figura 13. Efecto de la concentración de la enzima en fase acuosa en la velocidad inicial de síntesis de butil-galactósido en micelas invertidas a 37°C.

5.6. Estudio cinético para diferentes sistemas con ONPG como sustrato.

Una vez encontrada la concentración de enzima en la que existe control cinético en el sistema micelar, se eligió una concentración de enzima en la fase acuosa de 4.76 mg/mL, para efectuar una segunda comparación cinética entre los diferentes sistemas empleando ONPG como sustrato. Se decidió utilizar ONPG dada la mayor afinidad de la enzima por este sustrato, y la facilidad analítica para monitorear la reacción.

Los diferentes sistemas analizados fueron: (1) sistema micelar, (2) medio acuoso, y (3) medio acuoso saturado con n-butanol. La comparación se realizó con base en la velocidad global de consumo del sustrato. Cabe señalar que para el medio acuoso, la velocidad total de desaparición de ONPG corresponde a la

velocidad de hidrólisis, para el medio acuoso saturado con n-butanol, la velocidad global es igual a la suma de la velocidad de hidrólisis y la velocidad de síntesis de butil-galactósido y en el caso del sistema micelas invertidas, en la zona de experimentación la velocidad total es igual a la velocidad de síntesis de butil-galactósido. En esta comparación se utilizó ONPG como sustrato, llevando a cabo la reacción a 37°C, aprovechando las ventajas que tiene el sistema micelar de poder utilizar métodos espectrofotométricos.⁴⁶

Sistema micelar.

Como se ha mencionado, la enzima β -galactosidasa puede sintetizar al butil-galactósido mediante reacciones de alcoholisis en micelas invertidas. Como puede observarse en la Figura 14, la velocidad máxima encontrada para la síntesis de butil-galactósido siguiendo una cinética de Michaelis fue de 396.1 μ moles ONP/L \cdot min, utilizando una concentración de 4.76 mg. de enzima/mL en fase acuosa, mientras que el Km para este sistema fue de 2.36 mM ONPG en la fase global. La velocidad específica encontrada en este caso fue de 415.9 μ mol lactosa/g enzima \cdot min. Utilizando cromatografía en placa fina, se comprobó que la enzima cataliza únicamente la reacción de alcoholisis.

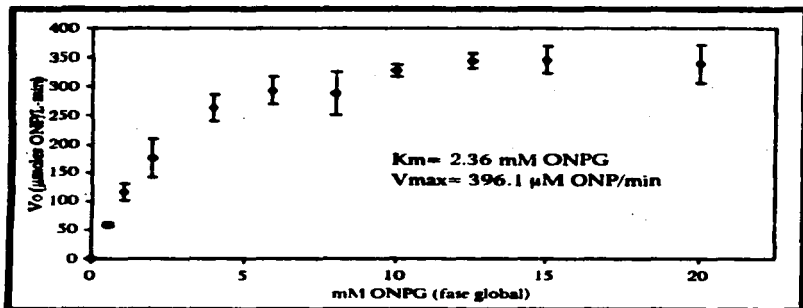


Figura 14. Efecto de la concentración de ONPG (fase global) en la velocidad inicial para la síntesis de butil-galactósido en micelas invertidas con β -galactosidasa. La concentración de enzima fue de 0.95 mg/mL.

Sistema acuoso.

Siguiendo una cinética de Michaelis-Menten la enzima β -galactosidasa presentó una velocidad específica para la degradación de ONPG de 381 $\mu\text{mol ONP/g. enzima}\cdot\text{min}$ y una constante de afinidad de 0.263 mM ONPG, como puede constatarse en la Figura 15. Estos resultados se encuentran dentro de los rangos reportados en la bibliografía,²³ como en el caso del estudio cinético con lactosa como sustrato, este experimento puede usarse como referencia para comparar los diferentes sistemas en los que el ONPG es usado como sustrato por la enzima β -galactosidasa.

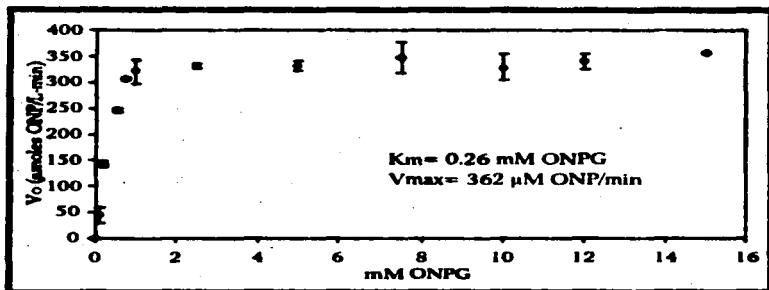


Figura 15. Efecto de la concentración de ONPG en la velocidad inicial para su hidrólisis en medio acuoso con β -galactosidasa. La concentración de enzima fue de 0.95 mg/mL.

Sistema acuoso saturado con n-butanol.

La enzima también efectúa la reacción en la fase acuosa saturada con alcohol (n-butanol), por lo que al parecer no es necesario tener un exceso de este, ya que no contribuye en gran medida a la disminución de la actividad de agua y por tanto a dirigir la selectividad de la reacción hacia la alcoholólisis. Debido a limitaciones analíticas la reacción en fase acuosa saturada con butanol se utilizó para inducir el comportamiento de la enzima en dos fases. Aunque en este trabajo no se determinó la relación alcoholólisis/hidrólisis, la cual nos permitiría conocer las diferencias entre el sistema bifásico y el sistema micelar.

Los parámetros cinéticos determinados fueron velocidad específica de 681.12 $\mu\text{mol ONP/g enzima}\cdot\text{min}$ y Km de 1.8 mM.

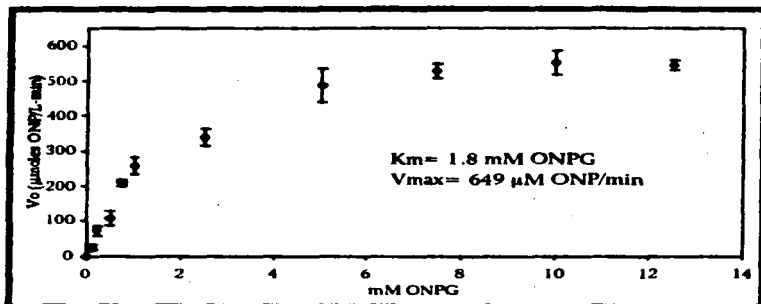


Figura 16. Efecto de la concentración de ONPG en la velocidad inicial de síntesis con β -galactosidasa de butil-galactósido en medio acuoso saturado con n-butanol. La concentración de enzima fue de 0.95 mg/mL.

En la Tabla XIV se presenta una comparación cinética de las diferentes vías para sintetizar butil-galactósido, tomando como referencia el sistema acuoso. La constante de afinidad calculada en este trabajo coincide con la reportada en la bibliografía. La afinidad de la enzima por el ONPG en micelas invertidas y en medios bifásicos es ligeramente mayor que en medio acuoso, lo cual indica ciertas dificultades en el sistema de reacción ONPG pero únicamente en el medio acuoso. En cuanto a la velocidad total con la que la β -galactosidasa hidroliza el sustrato, las cantidades son muy semejantes, aunque en este caso se observa también una activación de la enzima en sistemas bifásicos (la velocidad determinada representa la velocidad de alcoholólisis y la de hidrólisis). Podemos señalar que la enzima β -galactosidasa de *E. coli* en micelas invertidas tiene la ventaja de catalizar solamente la reacción de alcoholólisis con una adecuada velocidad de reacción.

Tabla XIV. Comparación de los sistemas para la hidrólisis de ONPG.

| Sistema | Km (mM ONPG) | Velocidad específica (μmol ONP/ g enzima $\cdot\text{min}$) |
|-------------------------------|-----------------|---|
| Micelar | 2.36 | 415.9 |
| Acuoso saturado con n-butanol | 1.8 | 681.12 |
| Acuoso | 0.26 | 380 |

La velocidad específica presentada es igual a la velocidad total de reacción.

5.7. Estabilidad de la β -galactosidasa de *E. coli* en los diferentes sistemas de reacción a 37°C.

Se realizó un estudio de estabilidad de la enzima β -galactosidasa en diferentes sistemas para conocer el efecto individual de cada uno de los componentes que conforman el sistema micelar en este trabajo, así como el sistema acuoso que nos sirve como referencia. La estabilidad en micelas invertidas también fue objeto de estudio, para de esta manera, conocer el efecto global de los compuestos. Conocer el efecto del butanol sobre la estabilidad de la enzima permite comparar la estabilidad en las micelas con la que presenta en medio bifásico, ya que ambos sistemas de reacción representan las opciones viables para la síntesis de galactósidos.

Estabilidad de la β -galactosidasa en sistemas bifásico 50% butanol.

La enzima β -galactosidasa de *E. coli* presenta una baja estabilidad en solventes orgánicos como el butanol, por lo que al realizar reacciones de alcoholólisis en un sistema bifásico, la enzima rápidamente pierde actividad en contacto con el butanol. El butanol se disuelve únicamente en un 9% en agua a 15°C,⁴⁷ aumentando la solubilidad al incrementar la temperatura. A 37°C, temperatura a la que se hicieron los experimentos de estabilidad, el butanol se encontrará en una mayor

proporción. El tiempo de vida media resultó ser de 16 min y la constante de desactivación fue de 2.54 h^{-1} , como se observa en la Figura 17, donde la estabilidad de la enzima almacenada en butanol se describe de acuerdo con un modelo de primer orden.

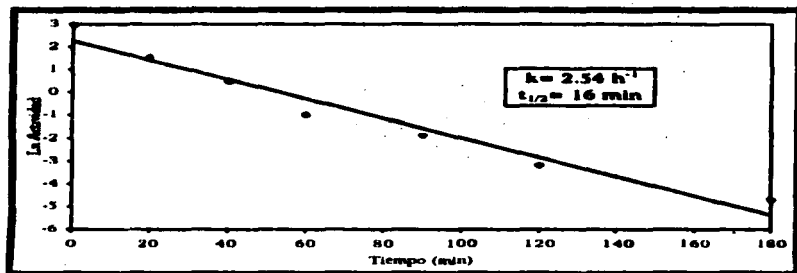


Figura 17. Estabilidad de la β -galactosidasa de *E. coli* en un sistema bifásico, 50% amortiguador y 50% (p/p) n-butanol a 37°C , con agitación constante. ($r^2=0.9615$)

Estabilidad de la β -galactosidasa en sistemas bifásico 50% octano.

Uno de los principales componentes del sistema micelar es el n-octano, el cual se encuentra en una proporción de 23 % p/p. Este compuesto al igual que otros solventes orgánicos tienen un efecto negativo en la estabilidad de la enzima β -galactosidasa. En la Figura 18, se muestra la curva de desactivación de la enzima almacenada en presencia de n-octano. El tiempo de vida media resultó ser de 82 min y la constante de desactivación de primer orden fue de 0.51 h^{-1} . Como se sabe, el n-octano es un compuesto no-miscible en agua y debido a su baja solubilidad en la misma, tiene un menor efecto sobre la enzima que en otros compuestos parcialmente miscibles en agua como es el caso del butanol. En el sistema micelar,

con n-butanol y n-octano como solventes orgánicos, el butanol tendría mayor efecto desestabilizante sobre la β -galactosidasa que el n-octano.

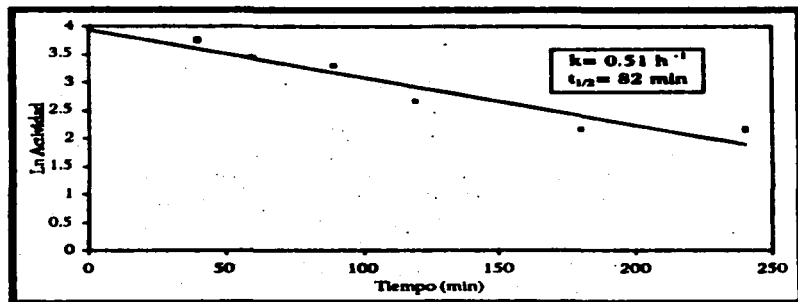


Figura 18. Estabilidad de la β -galactosidasa de *E. coli* en un sistema bifásico 50% amortiguador y 50% (p/p) n-octano a 37°C con agitación constante. ($r^2=0.898$)

Estabilidad de la enzima en el sistema acuoso.

La β -galactosidasa de *E. coli* en medio acuoso es relativamente estable, ya que como se muestra en la Figura 19, el tiempo de vida media es de 315 min y la constante de desactivación fue de 0.13 h⁻¹. De acuerdo a lo reportado en la bibliografía, la enzima requiere para su actividad de la presencia del ión magnesio. Además, dado que la enzima se encuentra conformada estructuralmente como un tetrámero y a su gran tamaño (500 KDa), la enzima naturalmente tiende a ser inactiva.

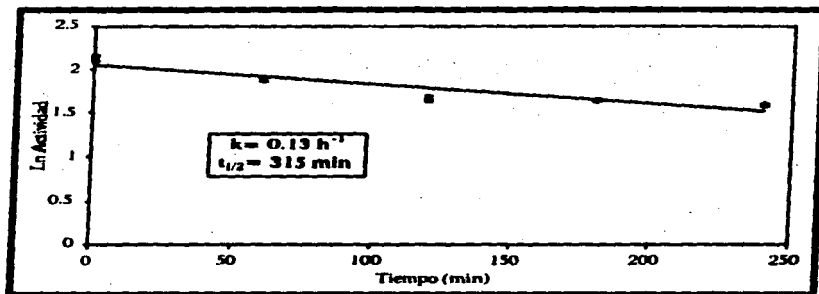


Figura 19. Estabilidad de la enzima β -galactosidasa de *E. coli* en medio acuoso a 37°C. ($r^2 = 0.867$)

Estabilidad de la β -galactosidasa de *E. coli* en el sistema acuoso saturado con n-butanol.

En un sistema acuoso saturado con n-butanol, la cantidad de solvente soluble en el agua a 37°C es suficiente para ejercer su efecto desactivante sobre la enzima; sin embargo, como es de esperar, el tiempo de vida media es muy similar al del sistema bifásico. En la curva de desactivación de la enzima que se reporta en la Figura 20, se encontró que el valor de la constante de inactivación fue de 1.91 h^{-1} y el tiempo de vida media fue de 22 min. La actividad de la enzima cae rápidamente en presencia de amortiguador de fosfato de sodio 0.1 M pH 7.0 saturado con n-butanol en comparación con el sistema acuoso.

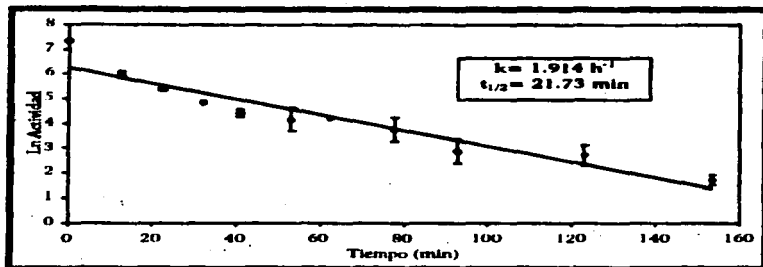


Figura 20. Estabilidad de la enzima β -galactosidasa de *E. coli* en un sistema acuoso saturado con *n*-butanol a 37°C con agitación constante mediante propela. ($r^2=0.907$)

Estabilidad de la β -galactosidasa en el sistema de micelas invertidas.

Las micelas invertidas ofrecen un mejor microambiente para la estabilidad de la enzima, como se observa con la quimotripsina en micelas invertidas con CTAB, la invertasa a 75°C en micelas invertidas con Triton X-100, y en lipasa a diferentes pH's y temperaturas en micelas invertidas con AOT. Uno de los factores que pueden influenciar la estabilidad en micelas invertidas puede ser la naturaleza del agua, especialmente en su estado estructurado como ocurre cerca de la interfase de la membrana biológica en la célula viva.⁴⁸

Sin embargo, la estabilidad de la β -galactosidasa de *E. coli* en micelas invertidas fue menor a la del sistema acuoso. En la Figura 21 se muestra que el tiempo de vida media en el sistema micelar a 37°C fue de 67 min y la constante de desactivación a esta temperatura fue de 0.62 h⁻¹. Esto implica una baja estabilidad de la enzima en micelas invertidas a 37°C, aunque por otro lado, para la síntesis de butil-galactósido, el sistema es mucho más eficiente que el bifásico.

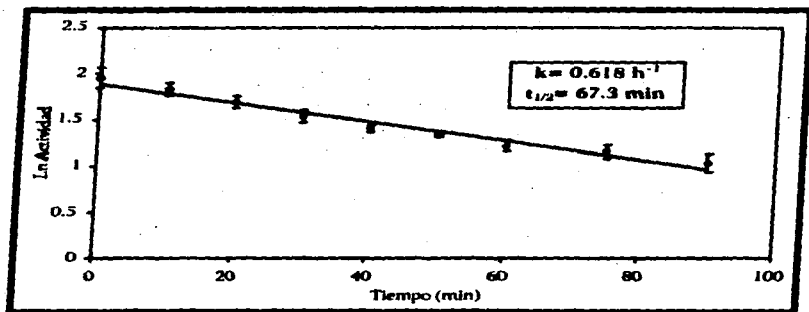


Figura 21. Estabilidad de la enzima β -galactosidasa de *E. coli* en sistema micelar a 37°C. ($r^2 = 0.966$)

Resumiendo, se determinó la estabilidad de la enzima β -galactosidasa de *E. coli* en diferentes sistemas: acuoso; acuoso saturado con *n*-butanol; sistema bifásico 50% fase acuosa y 50% (p/p) *n*-butanol, sistema bifásico 50% fase acuosa y 50% (p/p) *n*-octano; y el sistema micelar. En la Tabla XV se presentan las constantes de desactivación de primer orden obtenidas a 37°C. Se observa claramente que el sistema micelar es más inestable que el sistema acuoso y que es el butanol, más que el octano el elemento nocivo para la reacción. Sin embargo, la síntesis de butilgalactósido puede realizarse mediante diferentes estrategias. Específicamente se intentó en este trabajo llevar a cabo la reacción de alcoholólisis en dos fases (amortiguador / butanol) o por reacción de alcoholólisis en sistema de micelas invertidas. De estos dos, la enzima es más estable en el micelar.

Tabla XV. Estabilidad de la β -galactosidasa en diferentes sistemas a 37°C.

| Sistema | k (h ⁻¹) | Tiempo de vida Media (min) |
|-------------------------------|-------------------------|-------------------------------|
| Acuoso (control) | 0.13 | 315 |
| Micelas invertidas | 0.618 | 67 |
| Acuoso saturado con n-butanol | 1.91 | 22 |
| 50 % w/w Butanol | 2.54 | 16 |
| 50 % w/w Octano | 0.51 | 82 |

5.8. Efecto de la temperatura en la estabilidad de la β -galactosidasa en micelas invertidas.

Dado que el tiempo de vida media de la enzima β -galactosidasa a 37°C fue menor que el medio acuoso, se estudió la estabilidad de la enzima a 25°C, temperatura que representa condiciones muy suaves para sintetizar alquil-galactósidos. Como se observa en la Figura 22, la constante de desactivación fue menor a una temperatura de 25°C ($k = 0.132 \text{ h}^{-1}$). El tiempo de vida media a 25°C es muy semejante al del medio acuoso a 37°C, por lo que en estas condiciones puede llevarse a cabo la síntesis de butil-galactósido, donde las diferencias en actividad son mínimas (Figura 23), mientras que el tiempo de vida media casi se quintuplica. Esto resultó en un incremento en productividad.

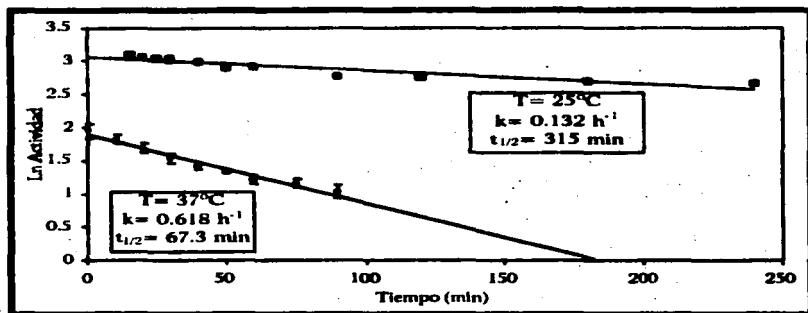


Figura 22. Efecto de la temperatura en la estabilidad de la enzima β -galactosidasa de *E. coli* en micelas invertidas. (● $T = 37^\circ\text{C}$ y ○ $T = 25^\circ\text{C}$)

5.9. Efecto de la temperatura en la velocidad inicial de síntesis de butil-galactósido en micelas invertidas.

Se ha visto que las enzimas en solventes orgánicos tienen una estabilidad mayor. Además, este mismo efecto se ha observado en micelas invertidas con β -galactosidasa, la cual ha sido reportada como medianamente estable en diferentes formas de la enzima; ya sea como enzima libre, inmovilizada o en células completas. La temperatura óptima para los casos anteriores, se encuentra en un rango entre 37 y 65°C . Las β -galactosidasas de origen bacteriano al parecer son menos resistentes a la temperatura que las fungales, aunque el óptimo para β -galactosidasas bacteriana se sitúa en 55°C . Los resultados de este estudio se reportan en la Figura 23. Poco se ha estudiado sobre el efecto de la temperatura en la β -galactosidasa de *E. coli* en solventes orgánicos. En este trabajo se encontró que

la enzima tiene un óptimo a 65°C, bajo las condiciones estudiadas. Sin embargo, de acuerdo al estudio realizado de estabilidad, se observa que es muy inestable. De esta manera no solo se vuelven críticos los minutos que dura el ensayo, sino inclusive el tiempo de incubación de la enzima previo al inicio de la reacción.

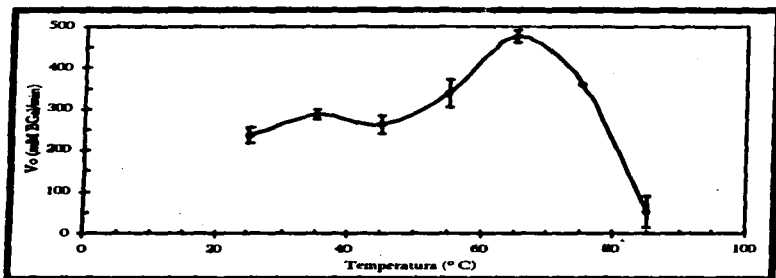


Figura 23. Efecto de la temperatura de reacción en la velocidad inicial de síntesis de butil-galactósido en micelas invertidas.

5.10. Síntesis de butil-galactósido en micelas invertidas con β -Galactosidasa de *E. coli*.

Reacción de alcoholólisis con ONPG como sustrato.

Como se ha descrito ampliamente en la bibliografía, la enzima β -galactosidasa puede usar una amplia variedad de sustratos. En una primera etapa, el ONPG se utilizó para la síntesis de butil-galactósido dada la flexibilidad analítica.

En la Figura 24 se presenta la evolución de la reacción de alcoholólisis: la concentración de ONPG en la fase global fue de 15 mM. La conversión de ONPG

fue del 100% en cuatro horas de reacción. Por consiguiente la concentración final alcanzada en la fase global fue de 3.5 g/L de butil-galactósido (15 mM).

Síntesis de butil-galactósido usando lactosa como sustrato.

La lactosa es el sustrato natural de la enzima β -galactosidasa. Este compuesto tiene la ventaja de ser de mayor disponibilidad que los otros sustratos que puede emplear por la enzima, como el ONPG. La síntesis de butil-galactósido a partir de lactosa se llevó a cabo en micelas invertidas, estos resultados se presentan en la Figura 25. Al igual que con el ONPG, la enzima convierte al 100% la lactosa en butil-galactósido. Sin embargo, existen algunas diferencias entre la cinética de producción a partir de ONPG y lactosa como son: el tiempo de reacción para alcanzar el 100% de conversión de la lactosa es 40 horas y la concentración final fue de 6 g/L de butil-galactósido. En sistemas bifásicos se ha reportado que la enzima β -galactosidasa de *Kluyveromyces fragilis* alcanza una conversión del 23% y una concentración del butil-galactósido correspondiente de 10 g/L con un tiempo de reacción de 24 horas, en el que la lactosa a una concentración de 182 mM fue el donador glicosílico.⁴⁹

CONSIDERACIONES FINALES.

Existen aun muchos y muy diversos aspectos que se deben estudiar para comprender el comportamiento de las enzimas en micelas invertidas. Sin embargo este trabajo tiene algunas aportaciones. El sistema micelar utilizando CTAB como surfactante no se ha utilizado ampliamente, a pesar de que ofrece algunas ventajas

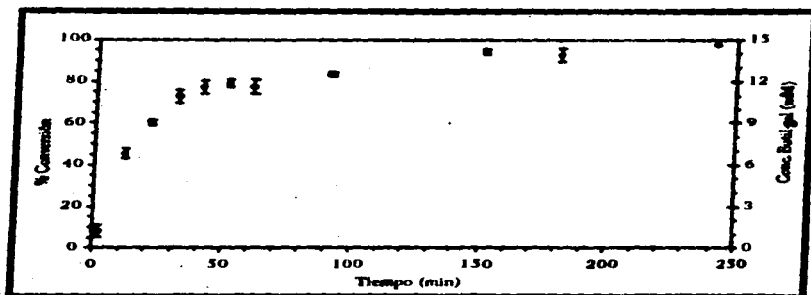


Figura 24. Evolución de la reacción de síntesis de butil-galactósido a 25°C en micelas invertidas por reacción de alcoholólisis con β-galactosidasa de *E. coli* usando ONPG como sustrato.

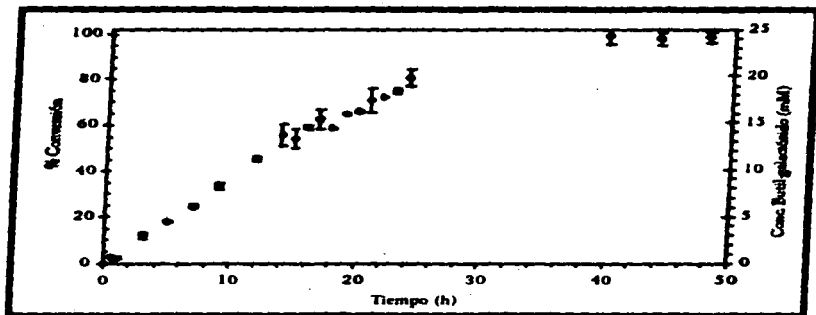


Figura 25. Síntesis de butil-galactósido a 25°C en micelas invertidas por reacciones de alcoholólisis con β-galactosidasa de *E. coli* usando lactosa como sustrato.

sobre el sistema que emplea AOT; como se mencionó, el CTAB necesita de un cosolvente para la formación de micelas y para el caso particular de la reacción de alcoholísis, el butanol u otro alcohol puede ser empleado. De esta manera el alcohol es sustrato en la reacción para la síntesis de butil-galactósido y elemento del sistema micelar.

Las principales ventajas de utilizar micelas invertidas para la síntesis de alquil-galactósidos en comparación con sistemas bifásicos, es que la enzima actúa específica y exclusivamente para la reacción de alcoholísis. Adicionalmente, la enzima presenta una mayor estabilidad en relación con el sistema bifásico y es más estable a la temperatura. Es necesario continuar el estudio del sistema propuesto, ya que falta contestar preguntas tales como la explicación al comportamiento de la actividad con respecto al W_o . ¿Cuál es el efecto de la concentración de surfactante? ¿cómo implementar un método de síntesis paralela de alquil-galactósidos con β -galactosidasa y alquil-glucósidos α -glucosidasa empleando la glucosa residual, para la obtención de una mezcla de productos? En cuanto a la purificación del producto, es posible que esta se pueda realizar por medio de extracciones y/o evaporación de los solventes. Debido a que existe un mayor interés por los alquil-glicósidos de cadenas más largas es necesario explorar la síntesis de éstos utilizando los conocimientos obtenidos durante este estudio.

Una de las limitaciones más importantes del método de producción de alquil-glicósidos en micelas invertidas en general, es que la concentración máxima de sustrato está controlada por la composición acuosa del sistema aunado, en el caso de la lactosa, a la baja solubilidad del disacárido en agua, por lo que una siguiente etapa del proyecto podría abocarse a incrementar la productividad incrementando la concentración de lactosa en el medio.

6. CONCLUSIONES

Dentro de las grandes ventajas de utilizar las micelas invertidas en reacciones de alcoholisis, destaca el hecho de que la enzima β -galactosidasa únicamente lleva a cabo la síntesis de butil-galactósido a concentraciones de agua de aproximadamente 40%. Las condiciones para la producir el compuesto se estudiaron y optimizaron a lo largo de este trabajo.

1. Se demostró la capacidad de la enzima β -galactosidasa para realizar la síntesis de butil-galactósido en micelas invertidas con diferentes composiciones de lactosa en amortiguador/octano/butanol, dentro de las cuales se ubicaron regiones en las que la enzima únicamente realiza reacciones de alcoholisis. Con los datos obtenidos se propuso un modelo estadístico que permite predecir la velocidad inicial de síntesis de butil-galactósido para una composición de micela dada, encontrándose así regiones de alta velocidad. Sin embargo, el modelo obtenido de un diseño experimental es empírico y no permite explicar el efecto de los diferentes componentes de la micela ni sus interacciones en la actividad y en la formación de micelas.
2. Se encontró que para una relación de W, de 20 se presenta un óptimo en la velocidad de síntesis de butil-galactósido en las condiciones estudiadas y utilizando CTAB como surfactante. La velocidad inicial de alcoholisis de la enzima β -galactosidasa describe una curva típica de forma de campana en relación con el tamaño de partícula.
3. La forma de preparación del sistema micelar no tiene un efecto significativo en la velocidad inicial de síntesis de butil-galactósido con la enzima β -galactosidasa.
4. La enzima β -galactosidasa presenta una estabilidad baja en un sistema de reacción con butanol al 50% w/w, mientras que su estabilidad es mayor en

octano al 50% w/w, ya que el tiempo de vida media es de 16 y 82 min respectivamente. Al parecer la estabilidad de la enzima en micelas invertidas a $W_o = 20$ y 37°C es baja. Sin embargo, al disminuir la temperatura a 25°C la estabilidad mejora sensiblemente, aumentando tiempo de vida media de 67 a 315 min. Este aumento en la estabilidad podría representar un ventaja de las micelas invertidas contra los sistemas de dos fases para la síntesis de alquilgalactósidos.

5. Al realizar el estudio del efecto de la temperatura sobre la velocidad inicial de reacción en micelas invertidas, se observó que esta aumenta al incrementarse la temperatura, como era de esperarse. La temperatura óptima fue de 65°C , por arriba de lo reportado para el medio convencional y el sistema bifásico.
6. El sistema de micelas invertidas con β -galactosidasa presenta un comportamiento "saturante" en relación con la concentración de enzima, ya que a bajas concentraciones de enzima (menos de $4.76 \text{ mg enzima/mL}$ en fase acuosa) se presenta un comportamiento lineal con la velocidad inicial, pero al incrementarse la concentración de enzima la velocidad inicial permanece casi constante.
7. Se determinaron los parámetros cinéticos de la enzima β -galactosidasa en diferentes sistemas: acuoso, acuoso saturado con butanol y en micelas invertidas, donde al parecer el sistema acuoso saturado tiene una velocidad máxima total mayor que en micelas invertidas.
8. El butil-galactósido se sintetizó a partir de lactosa y ONPG en micelas invertidas, la enzima convierte al 100% los sustratos. El tiempo de reacción para alcanzar el 100% de conversión de 25 mM de lactosa fue 40 horas; mientras que con 15 mM de ONPG, el galactósido se sintetiza en 4 horas.

7. BIBLIOGRAFIA.

1. García, M., Quintero, R. y López-Munguía, A. (1993). *Biocología Alimentaria*. Ed. Limusa. México.
2. Pina, G., Valencia-González, M. y Díaz-García, M. (1996). Enzymes in reverse micellar media. *Anales de Química Int.* Ed. 92:312-319
3. Adlercreutz, P. (1991). One the importance of the support material for enzymatic synthesis in organic media. *Eur. J. Biochem.* 199: 609-614
4. Yuktaka, K. et al. Equilibrium study of alkyl- β -D-glucoside synthesis from glucose and alcohol by β -glucosidase. *Enzyme Engineering XII*, vol. 750 Pp. 312-316.
5. Chahid, Z. et al. (1994). Synthèse d' octylglucoside biocatalysée par l'activité β -glucosidasiqque de la farine d'amande. *OCL*, 1(2): 145-151.
6. Samey, D. and Vulfson, E. (1995). Application of enzymes to the synthesis of surfactants. *TIBTECH*, 13: 164-172.
7. Blanch, H. W., Clark, D. S. y Dekker, M. (1991). *Applied Biocatalysis*. Vol.1. Cap. 4. 117-177.
8. Adlercreutz, P. (1991). One the importance of the support material for enzymatic synthesis in organica media. *Eur. J. Biochem.* 199: 609-614.
9. Shinoyama, H., Kanuyama, Y. and Yashi, T. (1988). Enzymatic synthesis of alkyl- β -xilosidea from xylobiose by application of the tranaxyllosyl reaction of *Aspergillus niger* β -xiloside. *Agric. Biol. Chem.* 52(9): 2197-2202.
10. Shinoyama, H. and Yasui, T. (1988). Superiority of *Aspergillus niger* β -xiloside for the enzymatic synthesis of alkyl- β -xilosides in the presence of a variety of alcohols. *Agric. Biol. Chem.* 52(9): 2375-277.
11. Cantacuzene, D. and Attal, S. (1991). Enzymic synthesis of galactopyranosyl-L-serine derivatives using galactosides. *Carbohydr. Res.* 211: 327-331.
12. Vulfson, E. N., Patel, R., Beecher, J. E., Andrews, A. T. and Law, B. A. (1990)a. Glycoside in organic solvents: I. Alkyl-glucoside synthesis in a water-organic two-phase system. *Enzyme Microb. Technol.* 12 (12): 950-954.
13. Vulfson, E. N., Patel, R. and Law, B. A. (1990)b. Alkyl- β -glucoside synthesis in a water-organic two-phase system. *Biotechnol. Lett.* 12 (6): 397-402.
14. Shinoyama, H., Takei, K., Ando, A., Fujii, T., Sasaki, M., Doi, Y. and Yasui, T. (1991)a. Enzymatic synthesis of useful alkyl- β -glucosides. *Agric. Biol. Chem.* 55 (6): 1679-1681.

15. Crout, D. H. G., MacManus, D. A. and Critchley, P. (1990). Enzymatic synthesis of glycosides using the β -galactosidase of *Escherichia coli*: regio- and stereo-chemical studies. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*: 1865-1868.
16. Beecher, J. E., Andrews, A. T. and Vulson, E. N. (1990). Glycosidases in organic solvents: II. Transglycosylation catalysed by polyethylene glycol-modified β -galactosidase. *Enzyme Microb. Technol.* 12 (12): 955-959.
17. Selisko, B., Ulbrich, R., Schellenberger, A. and Muller, U. (1990). Invertase-catalyzed reaction in alcoholic solutions. *Biotechnol. Bioeng.* 35: 1006-1010.
18. Johanson, E., Hedbys, L. and Larsson, P. O. (1991). Enzymatic synthesis of monosaccharide-amino acid conjugates. *Enzyme Microb. Technol.* 13 (10): 781-787.
19. Trincone, A., Nicolaus, B., Lama, L., Morzillo, P., De Rosa, M. and Gambacorta, A. (1991). Enzyme-catalyzed synthesis of alkyl- β -D-glycosides with crude homogenate of *Sulfolobus solfataricus*. *Biotechnol. Lett.* 13 (4): 235-240.
20. Drouet, P. et al. (1994). Enzymatic synthesis of alkyl β -D-xyloides by transxyloxylation and reverse hydrolysis. *Biotech. Bioeng.* 43: 1075- 1080.
21. Jacobson, R. H., Zhang, X.-J., DuBose, R. F. y B. W. Matthews. (1994). Three-dimensional structure of β -galactosidase from *E. coli*. *Nature.* 369, 761-766.
22. Torres, J. A. (1992). Optimización del proceso para la producción de β -Galactosidasa de *E. coli* por *Kluyveromyces fragilis*. Tesis de Licenciatura. UNAM.
23. Carales, A. O. (1985). Inmovilización de células con actividad β -Galactosidasa para la hidrólisis de lactosa en leche. Tesis de Licenciatura. UNAM.
24. McCarter, J. D. y Withers, S. G. (1994). Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Current Opinion in Structural Biology.* 4: 885-892.
25. Bourquelot, E. and Bridel, M. (1913). *Ann. Chim.*, 23:145.
26. Nilsson, K. G. (1983). A simple strategy for changing the regioselectivity of glycosides-catalyzed formation of disaccharides. Part II. Enzymatic synthesis in situ of various acceptor glycosides. *Carbohydr. Res.*, 542: 53.
27. Matsumura, S., Kubokawa, H. and Yoshikawa, S. (1991). Enzymatic synthesis of w-hydroxyalkyl and n-alkyl β -D-galactopyranosides by the transglycosylation reaction of β -galactosidase. *Chemistry Letters*, 945-948.
28. Stevenson, D., Stanley, R. and Furcaux, R. (1993). Optimization of alkyl β -D-galactopyranoside synthesis from lactosa using commercially available β -galactosidases. *Biotechnology and Bioengineering.* 42: 657-666.

29. Beecher, J., Andrews, A. and Vulson, E. (1990). Glycosidases in organic solvents: II. Transgalactosylation catalyzed by polyethylene glycol-modified β -galactosidase. *Enzyme Microb. Technol.* 12:955-959.
30. Rodríguez, M., Gómez A., González, F., Barzana, E. and López-Munguía, A. (1996). Selectivity of methyl-fructoside synthesis with β -fructofuranosidase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 39: 167-175.
31. Rosevear, P., VanAken, T. Baxter, J. and Ferguson-Miller, S. (1980). Alkyl-glycoside detergents: a simpler synthesis and their effects on kinetics and physical properties of cytochrome c oxidase. *Biochemistry*. 19: 4108-4115.
32. Ooi, Y. Hashimoto T., Mitauo, N. y Satoh, T. (1984). Enzymatic synthesis of chemically unstable cardiac glycosides by β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Tetrahedron Lett.* 25(21): 2241-2244.
33. Van Dyke, M. I., Lee, H., and Trevors, J. T. (1991). Applications of microbial surfactants. *Biotechnol. Adv.* 9: 241-252.
34. McEvily, A. J. and Zaks, A. (1991). Emulsifiers and surfactants. In *Biotechnology and Food Ingredients*. Ed. Van Nostrand Reinhold, New York. pp. 193-221.
35. Levashov, A. V., N. Kiyachko. (1995). Micellar enzymology for enzyme engineering. *Ideas and Realization*. *Ann N. Y. Acad Sci.* 750: 80-84.
36. Fernández-Velasco, D. (1993). *Catálisis, estabilidad y termoestabilidad enzimática en relación al diagrama de fases de un sistema de micelas invertidas*. Tesis de Maestría. UNAM.
37. Bru, R. Sánchez-Ferrer, A., García-Carmona F. (1995). Review: Kinetic models in reverse micelles. *Biochem. J.* 310: 721-739.
38. Garza-Ramos, G., Fernández-Velasco, D. A., Tuena de Gómez-Puyou, M. y Gómez-Puyou, A. (1992). *Biomolecules in Organic solvents*. Ed. CRC Press
39. Martinek, K., Levashov, A. V., Kiyachko, N. L., Khmel'nitski, Y. L. y Berezin, I. V. (1986) Review: Micellar enzymology. *Eur. J. Biochem.* 155: 453-468.
40. Martinek, K., Levashov, A. V., Kiyachko, N. L., Pantin, V. I. y I. V. Berezin. (1981). The principles of enzyme stabilization. VI. Catalysis by water-soluble enzymes trapped into reversed micelles of surfactants in organic solvents. *Biochimica et Biophysica Acta.* 657: 277-294.
41. Georgina P. L., Valencia-González M. J., M. E. Díaz-García. (1996). Enzymes in reverse micellar media. *Anales de Química Int. Ed.* 92: 312-319.

42. Shiomori, K., Kawano, Y., Kuboi, R. and Komazawa, I. (1994). Activity of β -galactosidase solubilized in reverse micelles and selective back-extraction from micellar phase. *Journal of Chemical Engineering of Japan*. 27(3): 410-414.
43. Kuby, S. A. and H.A., Lardy. Purification and kinetics of β -galactosidase from *E. coli*, Strain k-12. (1953). *J. Amer. Chem. Soc.* 75: 890-896.
44. Villanueva C., A. (1994). Elaboración de un biocatalizador con actividad β -galactosidasa de *E. coli* a partir de una cepa recombinante de *Bacillus subtilis*. Tesis de Licenciatura. UNAM.
45. Fencuille, D., Mathieu, D. y Phan-Tan-Luu, R. Methodologie de la recherche experimentale. matrices d'expériences appliqués aux mélanges. L.P.R.A.I. France.
46. Gómez-Puyou, A., Darzon, A., Tuena de Gómez-Puyou. (1992). *Biomolecules in Organic Solvents*. C.R.C. Press, USA.
47. Perry, R. H., Chilton, C. H. (1973). *Chemical engineer's handbook*. 5a. ed. McGraw-Hill., USA.
48. Subramani, S. y D. Madamwar. (1995). Stability of arginase in reverse micelles. *Biotechnology Techniques*. 9(1): 45-48.
49. Ismail, A. y Ghoul, M. (1996). Enzymatic synthesis of butylglycoisides by glycoisidases. 18(10): 1199-1204.