

00580

UNAM
POSGRADO



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN INGENIERIA

CARACTERIZACION DE UN SISTEMA ENZIMATICO PARA
LA PRODUCCION DE ALQUILGLICOSIDOS A ALTA
TEMPERATURA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MAESTRA EN INGENIERIA

P R E S E N T A :

I.Q. CARMINA MONTIEL PACHECO



DIRECTOR: DR. EDUARDO BARZANA GARCIA

MEXICO, D. F.,

2005

m 344309



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

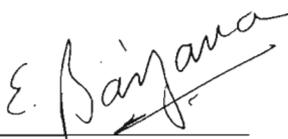
Presidente: Dr. Jesús Gracia Fadrique (FQ)
Vocal: Dr. Mariano García Garibay (UAM-I)
Secretario: Dra. Rosario A. Muñoz Clares (FQ)
Primer Suplente: Dr. Miguel A. Costas Basín (FQ)
Segundo Suplente: Dr. Rogelio Rodríguez Sotres (FQ)

Sitio donde se desarrollo la tesis

Departamento de Alimentos y Biotecnología
Laboratorio 314.
Facultad de Química.

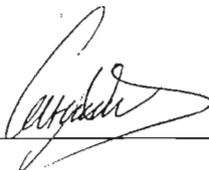
Director de la tesis.

Dr. Eduardo Bárzana García



Sustentante.

IQ. Carmina Montiel Pacheco



*A LA UNAM Y CONACYT
Por el cobijo y apoyo brindado*

*A Lalo Bárzana, a Sandra Pérez, Rosario Muñoz e Ismael Bustos
Por su espacio, su tiempo y sus conocimientos.
Gracias por compartir conmigo esta aventura*

A todos los que son y seguirán siendo parte de mi mundo

CONTENIDO**Resumen**

Introducción	1
Objetivos	5
I. Generalidades	6
I.1. Biocatálisis en medio orgánico	6
I.2. Organismos extremófilos	8
I.3. β -glicosidasas	10
I.4. Alquilglicósidos	13
I.5. Importancia del agua en la catálisis enzimática	18
I.6. Reacción de Maillard	21
II. Materiales y métodos	26
II.1. Métodos	26
II.1.1. Preparación de la enzima	26
II.1.2. Determinación de proteína	26
II.1.3. Síntesis enzimática de heptilglicósidos	26
II.1.4. Cuantificación de heptilglicósidos por HPLC	27
II.1.5. Evaluación de la partición del sistema	30
II.1.6. Dispersión acuosa y contenido de agua	32
II.1.7. Efecto del octilglucósido y acetato de etilo sobre la producción de heptilglicósido	33
II.1.8. Oscurecimiento no enzimático	33
II.1.9. Efecto del contenido de agua sobre el oscurecimiento no enzimático y producción de heptilglicósido	34

II.1.10 Efecto de la agitación	34
II.2.9. Electroforesis SDS-PAGE	35
III. Resultados y discusión	36
III.1. Síntesis enzimática del heptilglucósido	36
III.2. Evaluación de la partición del sistema	37
III.3. Dispersión acuosa y contenido de agua	45
III.4. Efecto del octilglucósido y acetato de etilo sobre la producción del heptilglucósido	48
III.5. Efecto de la agitación sobre la producción de heptilglucósidos	50
III.6. Oscurecimiento no enzimático	51
III.7. Efecto del contenido de agua sobre el oscurecimiento no enzimático y la producción de heptilglucósido.	54
III. 8 Actividad residual	59
Conclusiones	60
Perspectivas	62
Referencias	63

RESUMEN

Los alquilglicósidos son tensoactivos no iónicos que presentan propiedades detergentes, espumantes, emulsificantes y antimicrobianas. Estos compuestos han sido sintetizados por varios métodos, incluyendo la síntesis catalizada por la enzima β -glicosidasa. La producción de heptilglicósidos a 90°C a partir de glucosa y lactosa empleando una β -glicosidasa hipertermófila en un medio constituido por heptanol:agua (93:7%,v/v), ha sido estudiada en nuestro grupo de trabajo. Sin embargo, no se alcanzó una conversión completa de los sustratos debido, aparentemente, a una fuerte inhibición por producto.

En este trabajo estudiamos algunos de los factores que podrían influir en el sistema con el fin de establecer las causas que limitan el progreso de la reacción bajo las condiciones de trabajo descritas. El estudio sistemático de la reacción de transglicosidación de la lactosa demuestra que la síntesis del heptilgalactósido depende fuertemente del contenido y de la distribución del agua dentro del reactor. Se determinó que la solubilidad del agua en heptanol es menor a la reportada, generándose un sistema bifásico que determina la partición de los sustratos, productos y de la enzima.

Por otro lado, se observó un oscurecimiento no enzimático que pudo asociarse a la modificación química y la inactivación de la enzima en un tiempo corto de reacción. Asimismo, mediante la adición de octilglucósido, compuesto análogo del producto de reacción, se demostró que la inhibición de la síntesis del heptilgalactósido no se debe a una inhibición competitiva por producto.

Finalmente, en un intento por evitar la coalescencia del agua, se emplearon acetato de etilo como co-disolvente y dodecil sulfato de sodio (SDS) y octilglucósido como tensoactivos. Y aunque se logró disminuir la coalescencia del agua, ninguno de esos agentes mejoró la conversión del sustrato.

INTRODUCCIÓN

Los alquilglicósidos son tensoactivos no iónicos que se emplean en productos cosméticos, detergentes domésticos e industriales (Rybinski y Hill, 1998). Presentan buena estabilidad química en un intervalo amplio de pH, tienen capacidad antimicrobiana y son biodegradables (Panitarux y Adachi, 1995). Algunos alquilglicósidos se han empleado como intermediarios en la catálisis enzimática para la producción de ésteres de alquilglicósidos utilizados en la industria farmacéutica por sus propiedades anti-tumorales y antivirales (Otto *et al.*, 1998).

El primer alquilglicósido fue sintetizado e identificado por Emil Fischer hace más de 100 años, y la primera patente que describe su uso en detergentes se registró en Alemania 40 años después. El trabajo inicial de Fischer, que involucra la reacción de glucosa con alcoholes hidrofílicos como metanol, etanol, glicerol, etc., fue empleado posteriormente con alcoholes de cadenas largas desde C₈ hasta C₁₆. En los procesos químicos industriales no se obtienen alquil monoglicósidos puros sino una mezcla de alquil mono-, di-, triglicósidos- y oligosacáridos. Dada la baja especificidad de la reacción química, los productos industriales se denominan alquilpoliglicósidos y se caracterizan químicamente por la longitud de la cadena alquilo y el número promedio de unidades de glucosa (Rybinski y Hill, 1998).

Los métodos para la síntesis de alquilglicósidos requieren de la protección y desprotección de los grupos reactivos hidroxilo de los carbohidratos y la activación del carbono anomérico, o bien el uso de catalizadores selectivos como son las enzimas. Algunas rutas para la obtención de glicósidos se muestran de manera general en la figura 1.

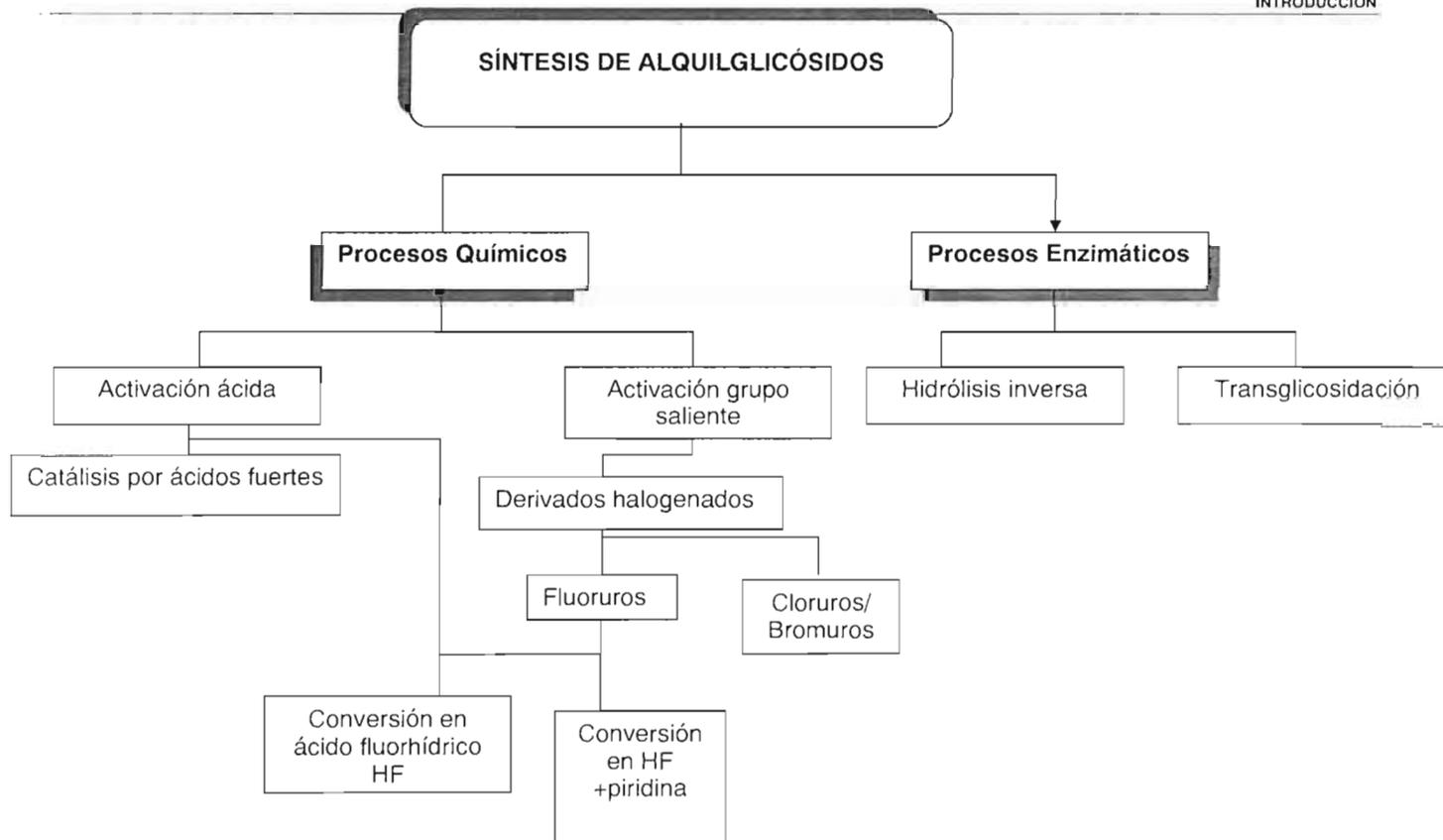


Figura 1 Rutas de obtención de alquilglicósidos.

Las rutas químicas se pueden dividir en dos grupos: a) donde se lleva a cabo un equilibrio de oligomerización en reacciones catalizadas por ácidos fuertes (glicosilaciones de Fischer, Biermann y Lange, 1986); como: reacciones con ácido fluorhídrico en presencia de carbohidratos, y b) la vía irreversible donde el carbono anomérico del carbohidrato es activado por grupos salientes (como haluros y grupos sulfonio). Con este último método resultan productos únicos más que mezclas complejas de compuestos, especialmente cuando se usan técnicas de protección de grupos (Rybinski y Hill, 1998) .

El método enzimático en contraste a la síntesis química, proporciona ventajas tales como la regio y estereoselectividad, obtención de un producto de reacción y por tanto métodos sencillos de purificación (Panintrarux y Adachi, 1995), además de emplear sustratos de relativamente bajo valor agregado como es el caso de la lactosa. Este azúcar (disacárido) es un sustrato atractivo para la síntesis enzimática debido a que constituye aproximadamente el 70-75% de los sólidos en el suero, subproducto de la manufactura del queso (Hansson y Adlercreutz, 2002). En principio, los procedimientos enzimáticos para la producción de alquilglicósidos, dada su selectividad, pueden reemplazar los procesos químicos. Sin embargo, el uso de enzimas en estas reacciones no ha sido ampliamente explotado y su producción está limitada a nivel de laboratorio.

En los últimos años se han reportado diversos trabajos (Vic y Thomas, 1995; Panintrarux y Adachi, 1995; Vic y Crout, 1997; Ismail *et al.*, 1999; Hansson y Adlercreutz, 2002; García-Garibay *et al.*, 2000) que abordan la síntesis enzimática de alquilglicósidos y emplean diversas estrategias para el uso de β -glicosidasas en medio orgánico. En estos trabajos se ha demostrado el desplazamiento del equilibrio termodinámico de una reacción hidrolítica hacia la reacción de síntesis (Vic y Crout, 1997) y casi siempre la termoestabilidad de la enzima se ve mejorada.

Entre las estrategias usadas se puede mencionar el uso de co-disolventes miscibles en agua para solubilizar los azúcares, como son la dimetilformamida y el

acetonitrilo (Otto *et al.*, 1998), medios monofásicos donde las conversiones son bajas debido al manejo de pequeñas concentraciones de sustrato dada su escasa solubilidad en el medio orgánico y por lo general, los tiempos de reacción son largos (Ismail *et al.*, 1999; García-Garibay *et al.*, 2000) y sistemas bifásicos donde el disolvente inmiscible en agua es además el sustrato. En estos sistemas la partición de los componentes del sistema y la solubilidad del alcohol en la fase acuosa juegan un papel importante en la producción de alquilglicósidos (Hansson y Adlercreutz, 2002).

En particular, nuestro grupo de investigación ha trabajado con una β -glicosidasa hipertermófila comercial (Gly-001-02, Diversa Co. USA) para sintetizar heptilglicósidos en un medio orgánico con bajo contenido de agua (heptanol:agua 93:7% v/v) abriendo la posibilidad de operar a altas temperaturas con las ventajas adicionales de poder solubilizar mayores cantidades de azúcar en agua y agua en heptanol. No obstante, la principal limitante ha sido la baja productividad ocasionada aparentemente por una fuerte inhibición por producto y la formación de oligosacáridos (García-Garibay *et al.*, 2000).

Los parámetros cinéticos de la β -glicosidasa termoestable en el sistema orgánico, son: $K_m = 4.04$ mM, $V_{max} = 0.157$ $\mu\text{mol ml}^{-1} \text{min}^{-1}$ y $K_m = 4.19$ mM, $V_{max} = 0.048$ $\mu\text{mol ml}^{-1} \text{min}^{-1}$ empleando lactosa y glucosa respectivamente (García-Garibay *et al.*, 2000 y García-Antuñano, 2002).

Los aspectos abordados por los trabajos de García-Garibay y García-Antuñano analizan la factibilidad y condiciones de la reacción, temperatura, concentración de sustrato y enzima y contenido de agua. Este trabajo pretende mostrar un análisis fisicoquímico del sistema de reacción enzimático propuesto por García-Garibay y colaboradores con la finalidad de comprender las variables que influyen en la producción de heptilglicósidos en medios orgánicos a 90°C.

OBJETIVO

Estudiar las características fisicoquímicas del sistema enzimático compuesto por heptanol:agua (93:7) y lactosa para la producción de heptilgalactósido a 90°C, así como las causas que limitan el progreso de la reacción.

METAS

- Evaluar la partición de la lactosa, glucosa y octilglucósido adicionado en el sistema heptanol:agua (93:7%, v/v) a 90°C con agitación magnética simulando las condiciones de reacción.
- Evaluar la reacción de transglucosidación mediante la cuantificación del producto tanto en el centro como en el fondo del reactor.
- Estudiar la dispersión del agua en heptanol usando octilglucósido y dodecil sulfato de sodio (SDS) como surfactantes y acetato de etilo como co-disolvente.
- Evaluar la estabilidad de la dispersión del agua en el heptanol en función de la agitación mecánica y su efecto en la segregación de los componentes del sistema
- Investigar la probable la ocurrencia de la reacción de Maillard y su posible efecto sobre la catálisis enzimática.

I. GENERALIDADES

I.1. Biocatálisis en medio orgánico.

El agua es el medio natural y tradicional de la biocatálisis. Sin embargo, a partir de la década de los 80's los disolventes orgánicos han constituido el medio no convencional mas comúnmente usado para la catálisis enzimática con fines tecnológicos. Estos medios se emplean regularmente para desplazar el equilibrio de las reacciones catalizadas por enzimas hidrolíticas, o bien para incrementar la solubilidad de los compuestos hidrofóbicos (Klibanov, 1997).

La ausencia de agua en el medio de reacción conduce regularmente a reacciones que son imposibles de llevar a cabo en medios acuosos. En agua, numerosas lipasas, esterasas y proteasas catalizan la hidrólisis de ésteres a los correspondientes ácidos y alcoholes, mientras que en disolventes anhidros esta reacción no ocurre. El empleo de nucleófilos alternativos, como alcoholes, aminas y tioles, conducen a reacciones de transesterificación y tiotransesterificación, que no se llevan a cabo en solución acuosa. La síntesis de ésteres a partir de ácidos y alcoholes (hidrólisis inversa) es termodinámicamente favorable (Klibanov, 2001).

La especificidad enzimática en medios no acuosos no sólo es diferente con respecto a la correspondiente en agua, sino que además puede ser controlada por el disolvente orgánico. Sin embargo, para aprovechar las oportunidades que ofrece la enzimología en medios no acuosos, es necesario comprender las características del sistema enzimático de reacción como son: la cantidad de agua requerida para la catálisis, los parámetros catalíticos y la estabilidad conformacional de las enzimas en el medio orgánico

Otra ventaja de los medios orgánicos sobre los acuosos es que la enzima, al estar en un estado de hidratación de monocapa dispersa en el medio, se encuentra directamente expuesta al disolvente y por lo tanto exhiben algunas propiedades distintas a las que presentan en medios acuosos, por ejemplo incrementa su

estabilidad térmica, ya que mantienen la rigidez conformacional (Zacks y Klibanov, 1984).

En medios orgánicos se ha demostrado que las enzimas tienen una "memoria de pH", lo que significa que la actividad catalítica de la enzima refleja el pH de la última solución acuosa a la cual estuvo expuesta (Zaks y Klibanov, 1988). Este fenómeno se debe a que los grupos ionogénicos de la proteína conservan su última ionización durante su deshidratación y su posterior colocación en el disolvente orgánico. Por consiguiente, la actividad enzimática en tales medios puede mantenerse si la enzima se liofiliza a partir de disoluciones acuosas al pH óptimo para la catálisis (Zaks y Klibanov, 1988; Xu y Klibanov, 1996).

Un problema que presenta la biocatálisis en medios no acuosos es la disminución de la actividad enzimática que se debe a la reducción de la flexibilidad estructural de la enzima. Las enzimas exhiben actividad catalítica significativa en disolventes orgánicos debido al agua que está fuertemente enlazada a la enzima, manteniendo algo de actividad aún en disolventes anhidros. La rigidez de la enzima en medio orgánico se puede disminuir al agregar el agua suficiente para mantener la movilidad de la enzima, incrementando, de este modo, la actividad catalítica varios órdenes de magnitud (Klibanov, 1997).

La biocatálisis en medios orgánicos ha encontrado una aplicación directa en la industria farmacéutica. Actualmente industrias químicas como BASF, DSM y Lonza han desarrollado procesos enzimáticos que permiten llevar a cabo reacciones de manera específica y eficiente, además de incrementar significativamente el número y sofisticación de los procesos usados en sus operaciones de síntesis. Por ejemplo BASF ha desarrollado sistemas biocatalíticos donde las lipasas son empleadas de manera exitosa en la síntesis de alcoholes enantioméricamente puros y aminas quirales (Figura 2).

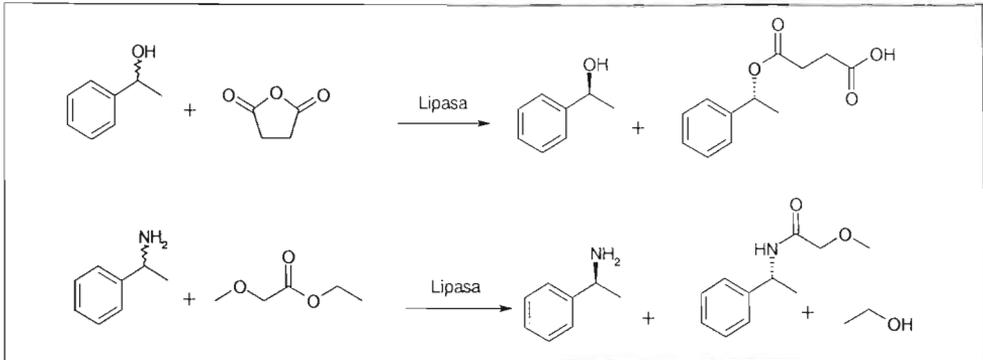


Fig. 2. Sistemas biocatalíticos desarrollados por BASF

1.2. Organismos extremófilos

Los organismos extremófilos son formas de vida que se han adaptado a ambientes extremos para su crecimiento: altas (55 a 121°C) o bajas (-2 a 20 °C) temperaturas, altas concentraciones de sales (2-5M de NaCl), condiciones extremas de acidez (pH<4) o alcalinidad (pH >8), bajas concentraciones de nutrientes o poca disponibilidad de agua. También se pueden encontrar en ambientes con una combinación de condiciones extremas, tales como alta temperatura y acidez, o presión y baja temperatura (Eichler, 2001) .

Las enzimas que han sido extraídas de organismos extremófilos se denominan extremozimas, ya que son proteínas que muestran características únicas y requieren condiciones muy específicas para mantener su actividad y estabilidad. Las extremozimas que más se han investigado son las tolerantes a altas temperaturas. Estas enzimas sirven como excelentes modelos para entender la termoestabilidad y termoactividad de las proteínas, además de poseer un alto potencial biotecnológico e industrial relacionado con procesos a altas temperaturas. Por ejemplo, en reacciones químicas que involucran disolventes orgánicos.

Las ventajas del uso de extremoenzimas en aplicaciones industriales son su gran estabilidad, los reducidos riesgos de contaminación bacteriana, mayor solubilidad

del sustrato al poder usar altas temperaturas o en disolventes orgánicos y mayores tiempos de vida media a temperaturas normales de almacenamiento (Querol *et al.*1996).

Un gran número de enzimas como las degradadoras de polisacáridos (celulasas, amilasas, pululanasa, xilanasas y pectinasas), proteasas, lipasas, estererasas y fitasas han sido caracterizadas de organismos hipertermófilos y son requeridas por las industrias de detergentes, de alimentos, del almidón, la industria textil, de la piel, del papel y la farmacéutica que son los mayores consumidores de enzimas (Gomes y Steiner, 2004).

La industria del almidón es uno de los mayores consumidores de enzimas amilolíticas termoestables (e.j. α -amilasas, glucoamilasas e isoamilasas o pululanasa) para la hidrólisis y modificación de almidón para producir glucosa y otros productos. Las enzimas celulolíticas son usadas en la eliminación de sustancias polifenólicas de jugos, en detergentes para mantener el color, brillo y suavidad de los textiles y en la industria del papel.

Las lipasas también se usan en varios procesos, como por ejemplo en la hidrólisis de grasas, esterificaciones, transesterificaciones, interesterificaciones y biosíntesis orgánicas. Otras aplicaciones de las lipasas incluyen la hidrólisis de la grasa de la leche, la eliminación de grasa subcutánea en la industria de la piel y la manufactura de fármacos.

Las fitasas termoestables son adicionadas al alimento para animales con la finalidad de hidrolizar el ácido fítico que es un compuesto quelante de los minerales presentes en los cereales y las semillas (Gomes y Steiner, 2004).

Las enzimas que catalizan la síntesis de carbohidratos, como las glicosidasas hipertermófilas están disponible comercialmente como CLONEZYMEs™, se usan

para catalizar la formación de enlaces glucosídicos, incluyendo Gal β (1-4), Gal β (1-6), Gal α (1-6), D-Fuc β (1-3) y D-Fuc β (1-5).

I. 3. Glicosidasas

Las glicosidasas (EC 3.2.1) son un grupo de enzimas que hidrolizan varias conformaciones estereoquímicas de enlaces glucosídicos en carbohidratos. Estas enzimas se encuentran en todos los organismos y tienen diferentes funciones biológicas, que van desde la hidrólisis de la celobiosa, un producto de degradación de la celulosa, hasta la síntesis de glucósidos en el cerebro de mamíferos.

De acuerdo al mecanismo con el que actúan, las glicosidasas se dividen en dos grupos: aquellas que hidrolizan el enlace glicósido con retención de la configuración del carbono anomérico y aquellas que lo hacen invirtiendo su configuración (Rye y Withers, 2000). Ambos mecanismos involucran un ion oxocarbenio como estado de transición y un par de ácidos carboxílicos en el sitio activo. Ejemplos del primer grupo son la β -galactosidasa, la invertasa y la lisozima, mientras que la trehalasa y β -amilasa pertenecen al segundo grupo.

En general, las glicosidasas muestran alta especificidad por el enlace glicósido y una especificidad pequeña por el nucleófilo. Por ejemplo disacáridos, alquil-, aril-, tioalquilglicósidos se han usado como sustratos para la β -galactosidasa de *E. coli*.

En la β -galactosidasa de *Escherichia coli* (Figura 3) el sitio activo contiene dos residuos de ácido glutámico de los cuales el primero (537) favorece la salida del (oligo)-sacárido por la transferencia de un protón al oxígeno del carbono anomérico del carbohidrato, posteriormente el segundo residuo de ácido glutámico (461) formándose el intermediario enzima-sustrato. El carboxilo que está desprotonado estabiliza el intermediario. En el siguiente paso un nucleófilo se adiciona a la misma cara del intermediario donde el grupo saliente es expulsado, conservándose la configuración neta del centro anomérico. La adición del

nucleófilo es asistido por el primer carboxilato que en este paso se convierte nuevamente en ácido carboxílico (van Rantwijk y Woundenberg, 1999).

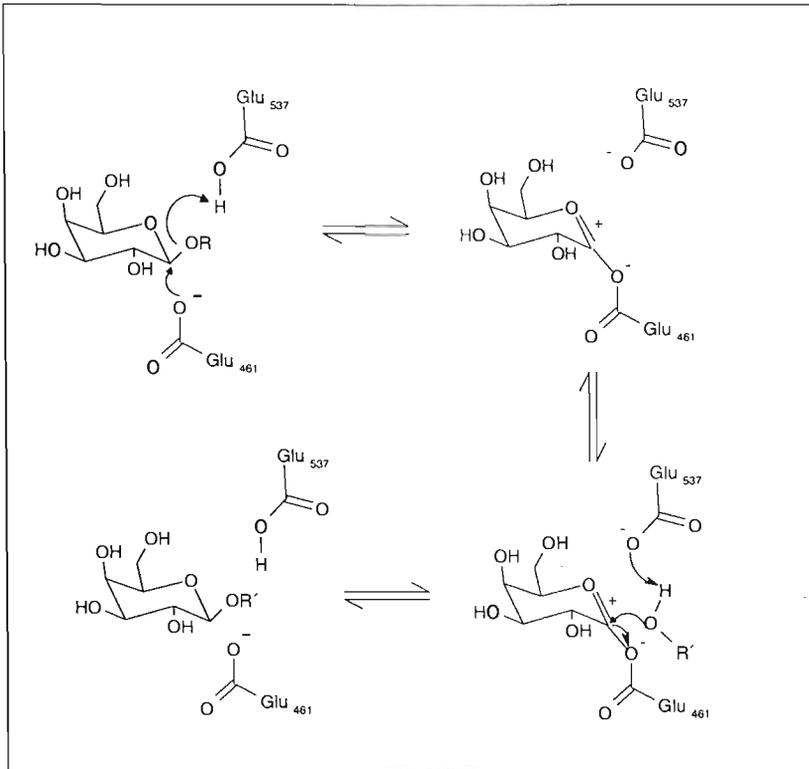


Fig. 3 Mecanismo de reacción de la β -galactosidasa de *E. coli*

En la reacción de hidrólisis el grupo saliente es un sacárido y el nucleófilo es agua. Sin embargo, un alcohol o un monosacárido también pueden actuar como un glicosilo aceptor, llevándose a cabo la reacción de condensación o de transglicosidación.

La mayoría de las glicosidasas hipertermófilas presentan estructuras conformacionales similares a sus contrapartes mesófilas; homotetrámeros entre 200 y 240 kDa (Kelly *et al.*, 1992; Chi y Martínez-Cruz, 1999; D'Auria *et al.*, 1999)

además de presentar actividad variable como glucosidasa, fucosidasa, galactosidasa, manosidasa y xilosidasa.

Las enzimas hipertermófilas presentan mayor actividad a temperaturas más altas que la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo del cual fueron obtenidas, en algunos casos superiores a 100°C. El estudio de Aguilar y colaboradores (1997) con la β -glucosidasa de *Sulfolobus solfataricus* (aislado del cráter de Solfatara en Nápoles) revela que esta enzima es un homotetrámero de peso molecular entre 220 y 240 kDa. Estos autores proponen que las diferencias entre las enzimas termófilas con sus contrapartes mesófilas se debe a una gran proporción de pares iónicos en la superficie de la enzima, involucrados en redes que entrecruzan secuencialmente estructuras separadas de la superficie de la proteína y a un gran número de moléculas de disolvente atrapadas en las cavidades hidrofílicas internas. Esto lleva a sugerir que la estabilidad de algunas enzimas termófilas, como es el caso de la β -glucosidasa hipertermófila de *Sulfolobus solfataricus*, es proporcionada por la elasticidad en su estructura en lugar de la rigidez estructural. (Aguilar *et al.* 1997).

Actualmente, como resultado de las técnicas de manipulación genética, la compañía Diversa Corporation. (San Diego, CA. USA) produce glicosidasas termo-resistentes para su uso en la hidrólisis de sacáridos, para estudios estructurales en función de la termoresistencia y en la glicosidación de lípidos. Esta compañía cuenta con un catálogo de glicosidasas (Glycosidase CloneZyme™ library) que incluye diferentes enzimas con una gran variedad de actividades y que son potencialmente aplicables en un amplio espectro de reacciones de hidrólisis y síntesis de moléculas que contienen residuos de carbohidratos.

La enzima empleada en este trabajo pertenece a la colección CloneZyme (GLY-001-02) y fue escogida debido a su baja especificidad por el sustrato. Esta enzima actúa sobre los enlaces β de varios azúcares, incluyendo β -celobiosa, β -D-

galactósido, β -D-glucósido, β -D-fucósido, β -D-xilósido, β -D-lactosa y, en menor grado β -D-manosa.

I.4. Alquilglucósidos

Los alquilglucósidos son compuestos que poseen una estructura anfifílica y excelente capacidad tensoactiva. La estructura anfifílica de un tensoactivo típico presenta una región hidrofílica y una región hidrofóbica (Figura 4). El reto por muchos años ha sido incorporar carbohidratos a un alcohol alifático como parte de su estructura, dado que estas moléculas presentan una región hidrofílica atractiva al contener numerosos grupos hidroxilo. Algunos azúcares como la sacarosa obtenida de la remolacha o de la caña de azúcar, la glucosa derivada del almidón y el sorbitol, cumplen con el criterio de precio, calidad y disponibilidad para ser aceptados como materia prima en un proceso industrial.

Los alquilglucósidos son usados principalmente en la fabricación de cosméticos y detergentes (Hill y Rhode,1999). En comparación con otros detergentes industriales como los sulfonatos, los alquilglucósidos son tensoactivos fácilmente metabolizados por microorganismos, por lo que no son nocivos para el medio ambiente.

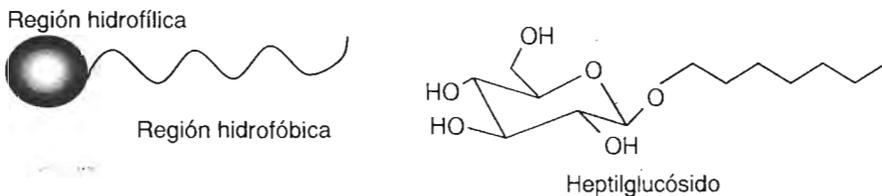


Fig. 4. Representación esquemática de un surfactantes y como ejemplo la estructura del heptilglucósido

Tradicionalmente, los alquilglicósidos se obtienen por procesos químicos, lo que resulta en una mezcla de productos. Para obtener compuestos químicamente puros o definidos se requieren varios pasos de protección-desprotección de grupos hidroxilo reactivos, así como la activación del carbono anómero de los azúcares.

Un método alternativo para la producción de alquilglicósidos es la síntesis enzimática. Este es un método sencillo que se realiza bajo condiciones de reacción no severas. Además, es posible la obtención de un producto de alta pureza enantiomérica.

La síntesis enzimática de alquilglicósidos puede efectuarse mediante dos rutas de reacción: la condensación, o hidrólisis inversa, y la transglicosidación.

Hidrólisis inversa o condensación

Es una síntesis en la cual el equilibrio termodinámico de la reacción que normalmente favorece la hidrólisis en medio acuoso, es desplazado hacia la síntesis del alquilglicósido (Vic y Thomas, 1992). Este procedimiento emplea monosacáridos libres como sustratos. (Figura 5).

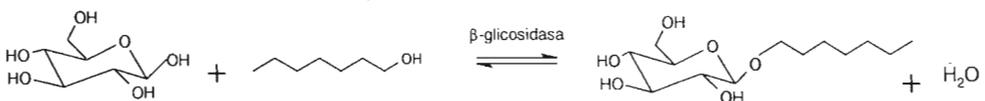


Figura 5. Hidrólisis inversa. Reacción termodinámicamente controlada

La hidrólisis inversa fue desarrollada para sintetizar oligosacáridos. Dado que la constante de equilibrio en agua tiende fuertemente hacia la hidrólisis del sustrato, se emplean altas concentraciones de monosacáridos y nucleófilos (carbohidratos o alcoholes) para desplazar el equilibrio hacia la síntesis del alquilglicósido (Vulson *et al.*, 1990). Los rendimientos de reacción son generalmente bajos (Figura 6. ruta A; Faber, 2000).

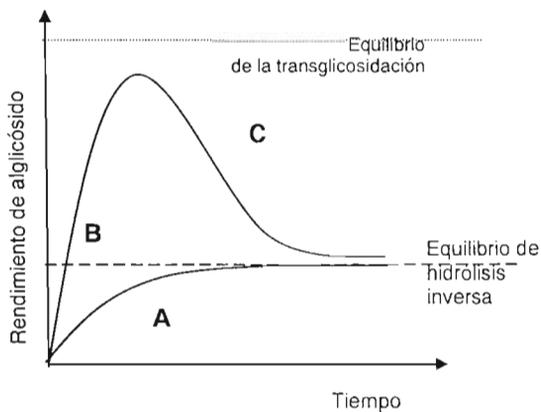


Figura 6. Rendimiento de los alquilglicósidos en las reacciones cinética y termodinámicamente controlada de la glicosidación enzimática **A.** Hidrólisis inversa. **B.** Transglicosidación. **C.** Hidrólisis del glucósido.

Transglicosidación

La transglicosidación es una reacción que utiliza un donador de acilo activado como un éster, amida, o un enlace glucosídico, el cual es atacado nucleofílicamente por la enzima; el intermediario enzima-glicósido es entonces enlazado por un nucleófilo distinto al agua para proporcionar el nuevo glicósido (Figura 7).

Para que una reacción de transglicosidación se lleve a cabo es necesario que la velocidad de reacción sea mayor a la de la hidrólisis.

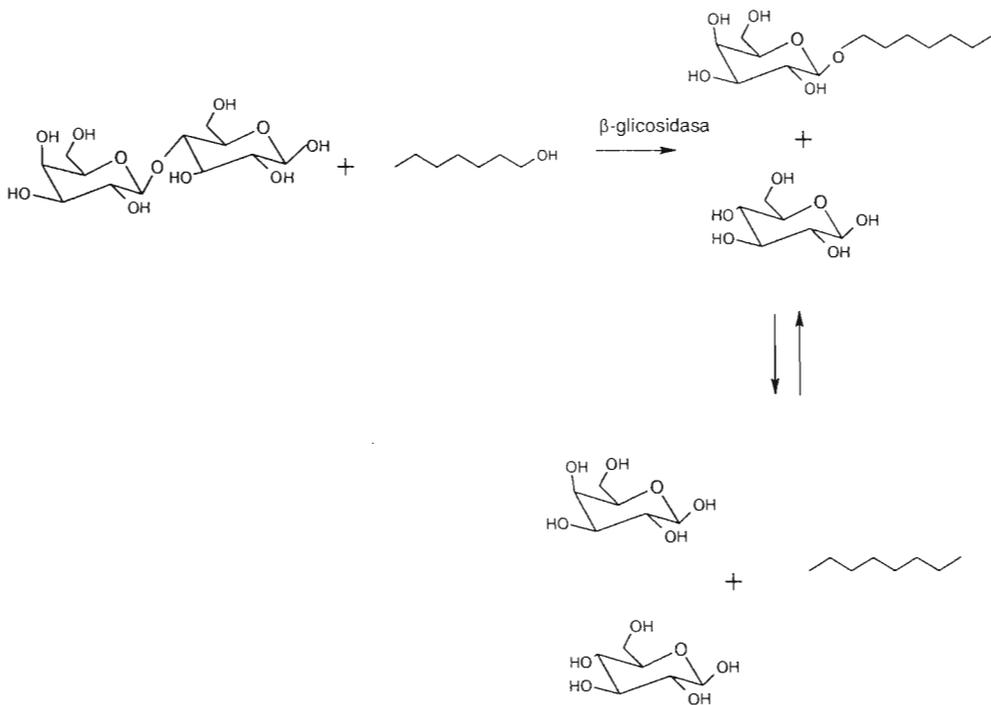


Figura 7. Transglucosidación. Reacción cinéticamente controlada “

La transglucosidación proporciona altos rendimientos comparados con la hidrólisis inversa (figura 6, ruta B) y por lo regular es el método de preferencia. A tiempos muy largos de reacción el rendimiento alcanza finalmente el equilibrio termodinámico (figura 6, ruta C). Una vez que el glicósido es producido, es también un sustrato para la enzima en la hidrólisis. Esto sucede cuando se utilizan alcoholes solubles en agua, donde el sistema es una mezcla de alcohol y agua en distintas proporciones, debido a que el agua actúa como un nucleófilo que compite con el alcohol y causa la hidrólisis del producto y del sustrato (van Rantwijk *et al.*, 1999). Por lo tanto, es conveniente elegir enzimas con alta actividad frente al donador acilo activado y una baja actividad hidrolítica frente al producto

de interés, además de elegir la proporción alcohol-agua en el sistema adecuadamente.

Cuando se utilizan alcoholes hidrofóbicos como aceptores y disolventes, las reacciones ocurren en dos fases y dado que el producto se solubiliza en el propio alcohol, se minimiza el problema de hidrólisis del alquilglicósido (Shinoyama *et al.*, 1988; Shinoyama y Yasui, 1988).

En los sistemas bifásicos existe un claro efecto de partición del sustrato entre el medio de reacción y el sitio activo de la enzima (Kobayashi *et al.*, 2000). Esta partición está necesariamente regulada por la polaridad del medio y la hidrofiliidad del sitio activo. Así los sustratos polares como los carbohidratos tenderán a mostrar mayor afinidad por el sitio activo de la enzima a medida que el medio de reacción sea menos polar (Bell *et al.*, 1995).

Un factor fundamental en la competencia entre la hidrólisis y la alcoholólisis, en reacciones de glicosidación en medio bifásico, es la concentración de agua en el sistema. A bajos contenidos de agua la reacción de alcoholólisis es favorecida, mientras que a altos niveles el equilibrio se desplaza hacia la hidrólisis. Sin embargo, el contenido de agua óptimo requerido depende de algunos factores tales como: el origen de la enzima, la longitud de cadena del alcohol y la naturaleza del donador glicosídico (Ismail *et al.*, 1999; Hansson y Adlecreutz, 2001).

La síntesis de los alquilglicósidos está limitada por la baja solubilidad de los carbohidratos en medio orgánico. El uso de disolventes como dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO) o piridina, que favorecen la solubilidad de los carbohidratos, queda descartado cuando el producto de interés es destinado a productos alimenticios y de cuidado personal. Además que estos disolventes a ciertas concentraciones son capaces de desestabilizar la estructura de la enzima provocando su inactivación. Una alternativa es el uso de enzimas hipertermófilas

con alta actividad y estabilidad a altas temperaturas, lo cual hace posible incrementar la solubilidad del carbohidrato en el medio orgánico y con ello incrementar la disponibilidad del sustrato.

Diversos estudios reportan el uso de β -glicosidasas de organismos mesófilos para sintetizar alquilglicósidos a partir de lactosa en diferentes medios (Crout y Vic, 1998; Ismail *et al.*, 1999; Stevenson *et al.*, 1993; Papanikolaou, 2001). Sin embargo, los reportes que emplean β -glicosidasas hipertermófilas son escasos (Tricone, 1991; García-Garibay, 2000; Hansson, 2002). Estos reportes se limitan únicamente a estudiar la factibilidad de producción de alquilglicósidos y las mejores condiciones de reacción, sin considerar las reacciones laterales que ocurren en el medio, como es el caso de la reacción de Maillard. Esta reacción es una consecuencia de la alta temperatura del sistema, del bajo contenido de agua y de la presencia de grupos reductores capaces de reaccionar con grupos amino libres de la enzima (sección 1.6).

1. 5 Importancia del agua en la catálisis enzimática

El agua es un componente esencial para la catálisis enzimática, aun si se encuentra en cantidades pequeñas, ya que permite a la enzima mantener la movilidad indispensable para su actividad. Esto implica que la enzima en ausencia casi total de agua adopta una estructura rígida incapaz de realizar los movimientos conformacionales indispensables para la catálisis (Tuena de Gomez-Puyou y Gómez-Puyou, 1998). Se ha demostrado que las enzimas pueden requerir muy poca agua; y por lo tanto, un mínimo de agua de hidratación en la enzima permite su actividad catalítica.

Existe una relación entre el nivel de hidratación de una enzima con su movilidad y su actividad enzimática. Esta relación depende de la composición de la proteína en términos de la polaridad de las cadenas laterales de sus aminoácidos (Ling, 1972). De este modo hay enzimas que son capaces de realizar reacciones con

cantidades de agua inferiores a los necesarios para otras. Por tanto, diferentes enzimas tienen diferentes requerimientos de agua asociada para mantener una actividad catalítica apreciable en un medio orgánico.

La polaridad del disolvente que rodea a la enzima establece una determinada capacidad de eliminar agua de la enzima y por lo tanto también influye en su hidratación (Bell *et al.*, 1997). Las enzimas tienen la capacidad de ligar fuertemente una cierta cantidad de agua, la cual no es siempre eliminada por los disolventes (Halling, 1990); el agua que se encuentra fuertemente ligada a la proteína y cuando se encuentra en un medio orgánico ésta agua no es intercambiable con el agua menos ligada o el agua libre. Es el agua que mantiene la conformación catalítica. Como consecuencia, el grado de hidratación de la enzima, su movilidad y actividad no dependen de la cantidad de agua total del sistema, sino de la cantidad de agua fuertemente ligada a la enzima (Tuena de Gomez-Puyou y Gómez-Puyou, 1998). La mejor forma de establecer el nivel de hidratación de una enzima es a través del parámetro termodinámico conocido como actividad acuosa (a_w).

Por definición la actividad acuosa (a_w) determina el equilibrio de la distribución del agua entre los componentes del sistema (Bell *et al.*, 1997). Este parámetro permite analizar las interacciones entre los requerimientos de agua y otros factores tales como la identidad del disolvente o material de soporte de la enzima.

La relación entre la a_w y el nivel de hidratación para una enzima en particular se puede establecer mediante su isoterma de adsorción. Las isotermas de adsorción típicas de las proteínas tienen formas sigmoidales (Figura 8), que pueden dividirse en tres regiones correspondientes a estados relativos de unión con el agua:

Región I. Agua estructural. Esta región corresponde a los niveles más bajos de hidratación (0-60 moles de H_2O/g de proteína). El agua está ligada fuertemente a

la proteína por interacciones con los grupos cargados de las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos formando parte de su estructura y no puede ser eliminada por disolventes; esta agua no particiona hacia el disolvente y tampoco se intercambia con el agua menos ligada de los niveles superiores de hidratación cuando la enzima se encuentra en un disolvente orgánico. Al llegar a un nivel de hidratación de 60 moles de H_2O , el arreglo del agua en la superficie es muy estable y se comporta como parte de la proteína, en esta región se encuentra la monocapa de BET, que corresponde a la cantidad de agua absorbida necesaria para completar la primera etapa de hidratación

Región II. Agua en transición. En esta etapa (60-220 moles de H_2O / g de proteína) se forman y crecen agregados de moléculas de agua hasta cubrir por completo los grupos superficiales de la proteína, la movilidad de la proteína aumenta conforme el grado de hidratación se incrementa,

Región III. Hidratación completa (220-300 moles de H_2O / g de proteína). Durante esta etapa el agua se sigue condensando en las regiones menos interactivas de la superficie de la proteína, la cual es menos ligada y la movilidad de la proteína sigue en aumento en forma paralela a su actividad enzimática. A un nivel de hidratación de 300 moles de H_2O /g de proteína, el agua cubre completamente la superficie de la proteína; a partir de este nivel ocurre la hidratación completa y la movilidad de la proteína es total.

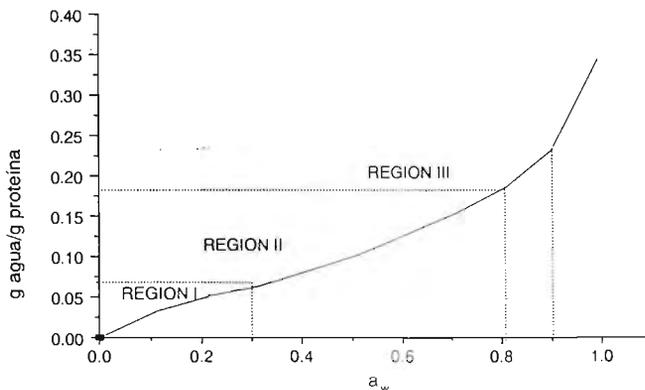


Fig. 8. Isoterma de adsorción de la lisozima (Ling, 1972)

El disolvente influye en el nivel de hidratación de la enzima de acuerdo a sus propiedades, así los disolventes no polares incrementan la cantidad de agua ligada a la enzima, mientras que disolventes polares la reducen para un mismo valor de a_w . El agua afectada en este caso corresponde a la región III donde se encuentran las capas secundarias de hidratación, más allá de la monocapa.

Cuando la enzima está rígida por el bajo nivel de hidratación que tiene en disolventes orgánicos, la presencia de sustancias desnaturizantes flexibilizan los movimientos de la enzima permitiendo el despliegue de cierta actividad enzimática; este mismo efecto es atribuible a disolventes orgánicos usados como codisolventes (Tuena de Gómez-Puyou y Gómez Puyou, 1998), los cuales en exceso pueden provocar la desnaturización de la enzima.

IV. 6. Reacción de Maillard

La reacción de Maillard es una reacción de oscurecimiento no enzimático, causada por la condensación entre un azúcar reductor y un grupo amino. Esta reacción fue descrita por primera vez por Louis Maillard en 1912. Es una reacción que depende fuertemente de la temperatura, el pH y la cantidad de agua. En las proteínas el principal aminoácido que interviene en la reacción es el grupo ϵ -amino de la lisina (Bruins *et al.*, 2003). Sin embargo, el grupo α -amino terminal de las proteínas también pueden reaccionar.

La variedad y la complejidad de los productos de la reacción de Maillard ha llevado a clasificarlos en términos de productos iniciales, avanzados y finales. Un esquema de la reacción se muestra en la figura 9 y está basado en el esquema de Hodge (Ames, 1988).

El indicador comúnmente usado para evaluar la reacción de Maillard, es la medición espectrofotométrica a 278, 280 y 294nm para las pirazinas, compuestos

sin color precursores de la reacción de Maillard, y a 420-490 nm para los compuestos coloridos producto de la etapa final de la reacción (Lerici *et al.*, 1990).

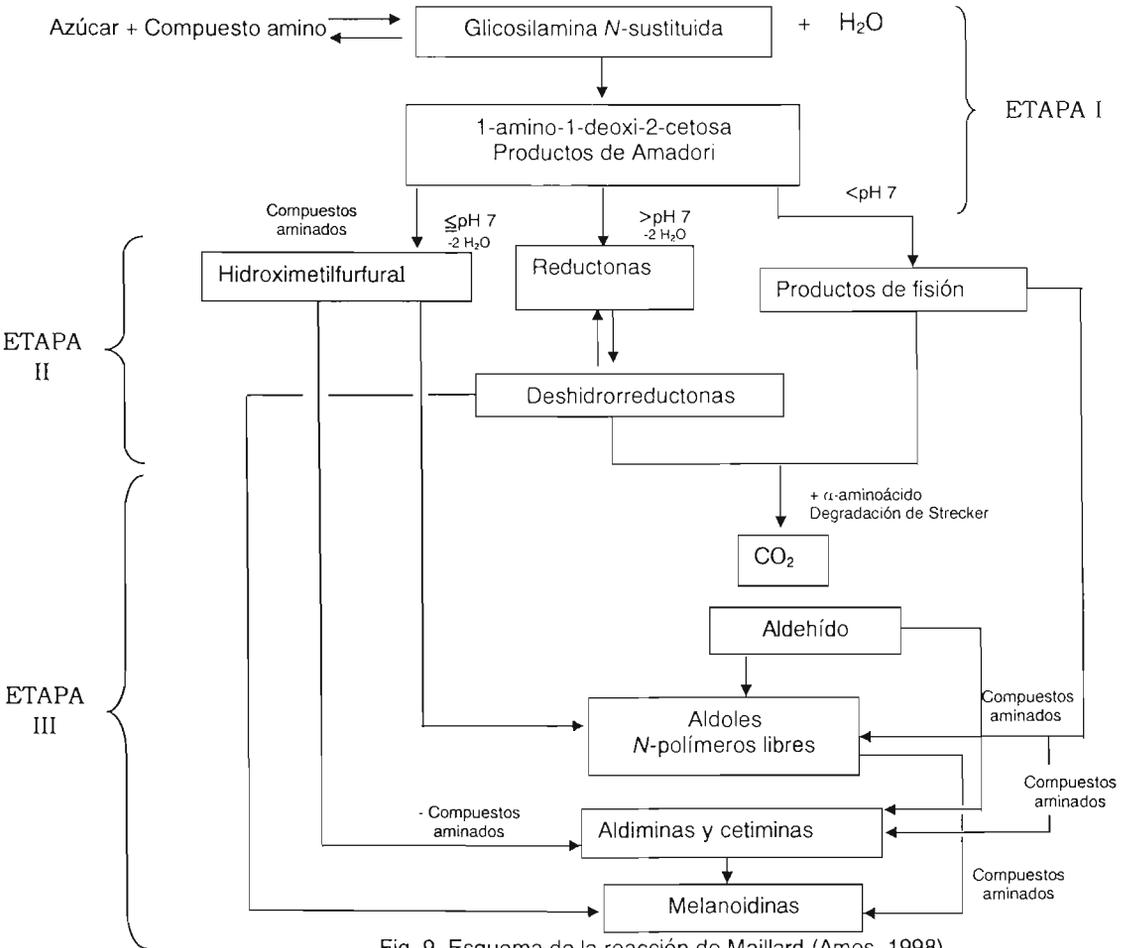


Fig. 9 Esquema de la reacción de Maillard (Ames, 1998).

Etapa I. Etapa inicial (productos sin color)

- A. Condensación azúcar-amina
- B. Formación de los productos de Amadori (1-amino-1-desoxi-2-cetosa)

Esta primera etapa se puede medir a través de la disminución de la lisina en la proteína.

Etapa II. Etapa avanzada (productos de color amarillo con fuerte absorción en el UV cercano)

- C. Deshidratación de azúcares
- D. Fragmentación de azúcares
- E. Degradación de aminoácidos

La degradación de los productos de Amadori depende del pH del sistema. A valores de pH inferiores a 7 se favorece la 1,2-enolización con la formación de furfural cuando intervienen pentosas o hidroximetilfurfural (HMF) en presencia de hexosas.

A valores de pH superiores a 7, la degradación de los compuestos de Amadori involucra la 2,3 enolización en la cual se forman una variedad de productos de fisión, incluyendo acetol y piruvaldehído, que son altamente reactivos y toman parte en las reacciones siguientes.

Etapa III. Etapa final (productos altamente coloridos)

- F. Condensación aldólica
- G. Polimerización aldehído-amina
- H. Formación de compuestos nitrogenados heterocíclicos (pirroles, imidazoles, piridinas y pirazinas).

En esta etapa los grupos carbonilo condensan con los grupos amino libres que incorporan el nitrógeno en los productos de reacción, mientras que los compuestos dicarbonílicos presentes en el sistema reaccionan con los aminoácidos para formar aldehídos y α -aminocetonas. Esta reacción es conocida como la degradación de Strecker (Martins *et al.*, 2001).

En una etapa más avanzada se producen reacciones que incluyen ciclizaciones, deshidrataciones, isomerizaciones y condensaciones, que en la etapa final de la reacción son causantes de la formación de polímeros y co-polímeros nitrogenados coloridos, conocidos como melanoidinas (Ames, 1998).

A los compuestos producidos durante la última etapa de la reacción de Maillard también se les conocen como productos finales de glicosidación avanzada (AGEs por sus siglas en inglés). Estos compuestos son entrecruzantes proteínicos capaces de modificar la función de las proteínas a través de cambios estructurales (Miller *et al.*, 2002).

Algunas estructuras de los entrecruzantes incluyen estructuras heterocíclicas y α -carbonilos (Figura 10) y son el resultado de la reacción de compuestos carbonílicos con las proteínas. Estos compuestos pueden generarse a partir de la degradación de los productos de Amadori y compuestos como el glioxal y el metilglioxal que son producidos por la degradación de Strecker a partir de un intermediario que se forma inicialmente con la reacción entre glucosa y grupos amino de la proteína (Meade *et al.*, 2002).

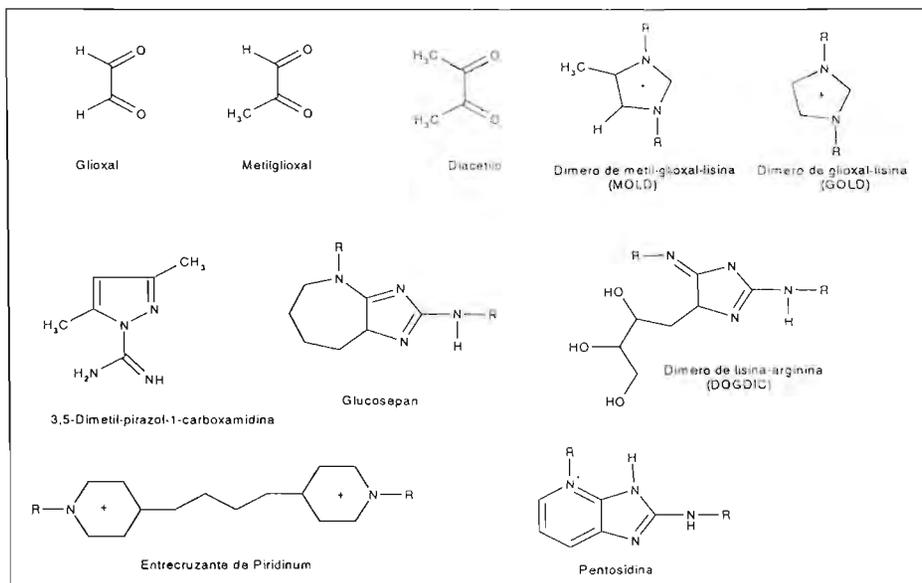


Fig. 10. Estructuras de los compuestos entrecruzantes formados durante la reacción de Maillard

II. MATERIALES Y MÉTODOS

La enzima β -Glicosidasa hipertermófila CloneZyme Gly –001-02 empleada en este proyecto fue un obsequio de los laboratorios Diversa, Sharon Hill Pa., USA. Los sustratos lactosa, heptanol y los patrones β -D-glucosa heptil- y octilglucósido, todos de una pureza superior al 98%, fueron marca Sigma. Los disolventes usados tanto para realizar la reacción como para el análisis de los alquilglucósidos (acetato de etilo, metanol y acetonitrilo grado HPLC) fueron marca Aldrich. También se uso agua grado Millipore, dodecil-sulfato de sodio (SDS), albúmina sérica bovina marca Sigma, reactivos para el analizador de agua Karl Fischer libres de piridina y amortiguador de acetatos 1M, pH 5.5 0.

II. 1. MÉTODOS

II.1.1 Preparación de la enzima

Cada 85 mg de β -glicosidasa hipertermófila liofilizada se rehidrataron con 5 mL de amortiguador de acetatos (0.1 M, pH 5.5) para obtener una concentración final de 17 mg de enzima/mL.

II. 1.2 Determinación de proteína

La concentración total de proteína se determinó por el método de Lowry modificado (Peterson, 1977) usando albúmina sérica bovina como patrón.

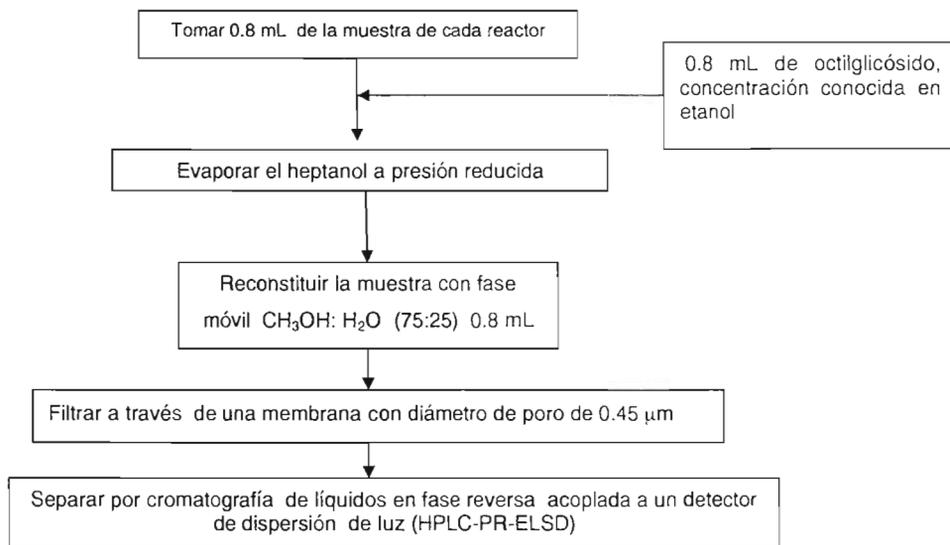
II. 1.3 Síntesis enzimática de heptilglucósidos

La síntesis de heptilglucósido vía la reacción de la transglicosidación de la lactosa y heptanol se llevó a cabo en reactores enchaquetados de 50 mL, en un volumen total de 40 mL donde el 93% (v/v) lo constituyo el heptanol y el 7% (v/v) restante agua, con una concentración de lactosa de 40 mM y 2.16 mg de β -glicosidasa hipertermófila, a una temperatura de $90^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$, con agitación magnética y sellados

con un *septum* que permitió tomar la muestra (1 mL) sin necesidad de abrir el reactor, para evitar la evaporación del agua. Una vez tomadas, las muestras introdujeron en hielo para detener la reacción para detener la reacción. La reacción se inició al momento de agregar la solución enzimática. Todos los experimentos se realizaron por duplicado y el error obtenido fue menor al 5%.

II.1.4 Cuantificación de heptilglicósidos por cromatografía de líquidos

La cuantificación del producto de la reacción se llevó a cabo mediante la técnica de cromatografía de líquidos a alta presión. El procedimiento empleado, se muestra en el siguiente esquema de trabajo (esquema 1):



Esquema 1. Procedimiento de análisis de heptilglicósidos por HPLC

La finalidad de agregar octilglicósido como estándar interno de concentración conocida en etanol a la muestra a evaporar es cuantificar la posible pérdida de los alquilglicósidos, durante la evaporación del heptanol, y por lo tanto de manera simultánea la de heptilglicósido producido.

El análisis para determinar la concentración de heptilglicósido en cada muestra, una vez evaporado el heptanol, se realizó por medio de HPLC bajo las siguientes condiciones:

Columna	ODS Symmetry Water C ₁₈ (150 x 3.9 mm, 5 μm)
Precolumna	ODS Symmetry Water C ₁₈ (2.0 x 3.9 mm, 5μm)
Fase móvil	MeOH: H ₂ O (75:25)
Flujo	0.8 mL/min
Volumen de inyección	10 μL

Para el análisis de carbohidratos (lactosa y glucosa) las condiciones de cuantificación fueron las siguientes:

Columna	Hypersyl propilamino (250 x 4.6 mm, 5 μm)
Fase móvil	MeOH: ACN:H ₂ O (60:22.5:17.5)
Flujo	0.8 mL/min
Volumen de inyección	10 μL

Para ambos tipos de análisis se empleó un detector de dispersión de luz (HPLC-PR-ELSD)

Las condiciones de trabajo fueron:

Temperatura del evaporador	100°C
Temperatura del nebulizador	70°C
Temperatura de salida	56°C

En la figura 11 se muestran los perfiles de elución en cada columna

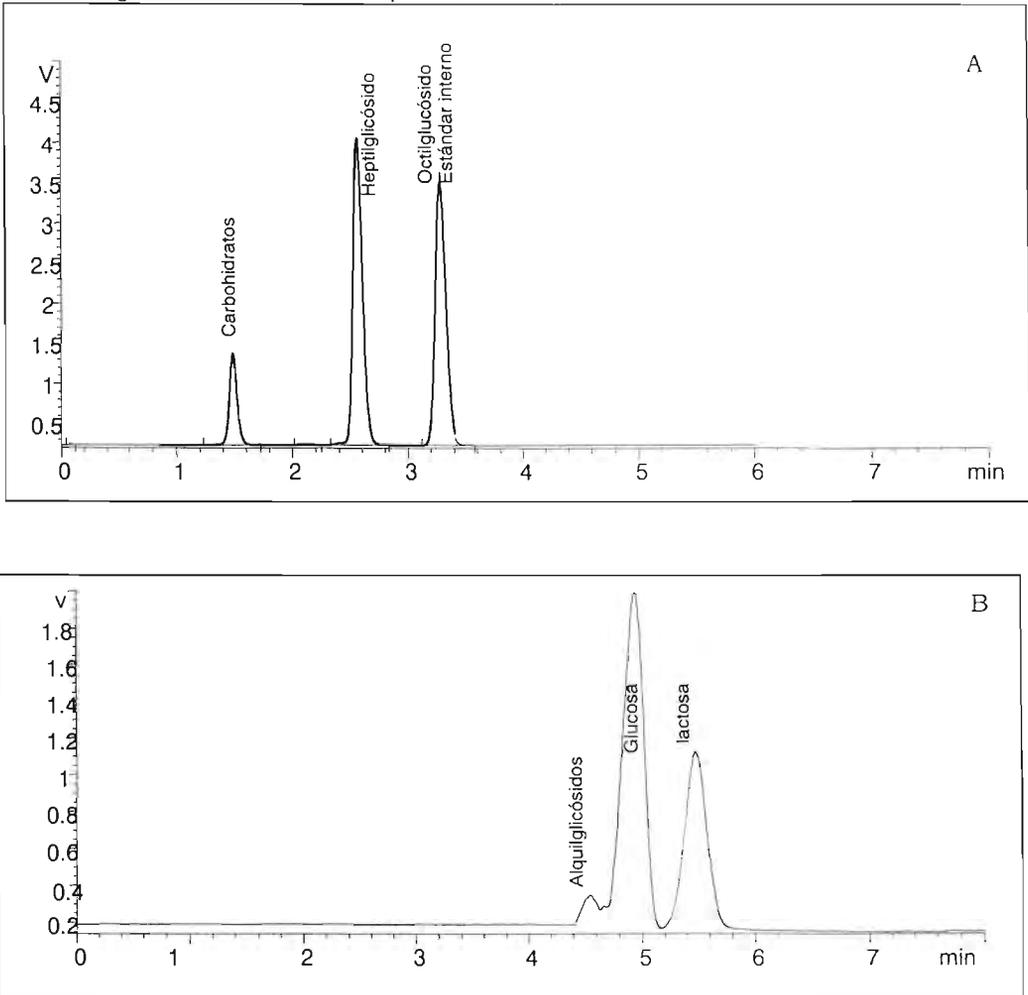
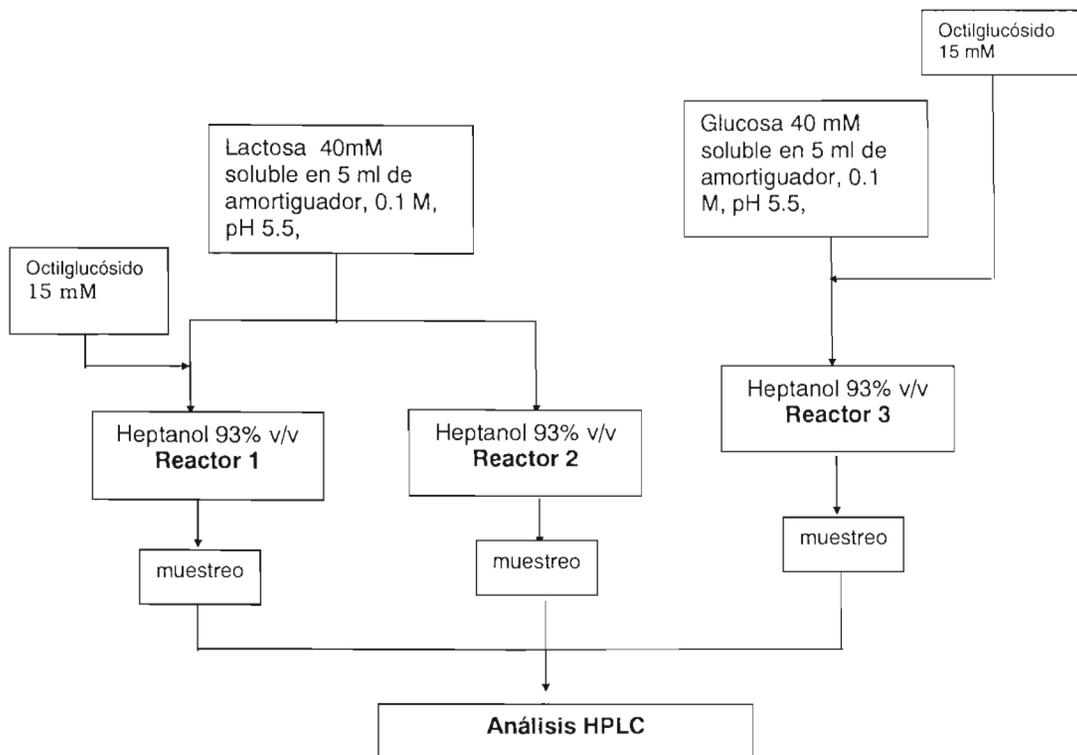


Fig. 11. Perfil de elución de los componentes del sistema. A). Perfil de elución usando una columna ODS C₁₈. B) Perfil de elución empleando una columna Hypersyl propilamino.

II.1.5 Evaluación de la partición del sistema

Para conocer las concentraciones de carbohidratos y alquilglucósido presentes en el centro del reactor, se simularon las condiciones de reacción (sistema sin reacción enzimática) bajo el siguiente esquema de trabajo (Esquema 2):



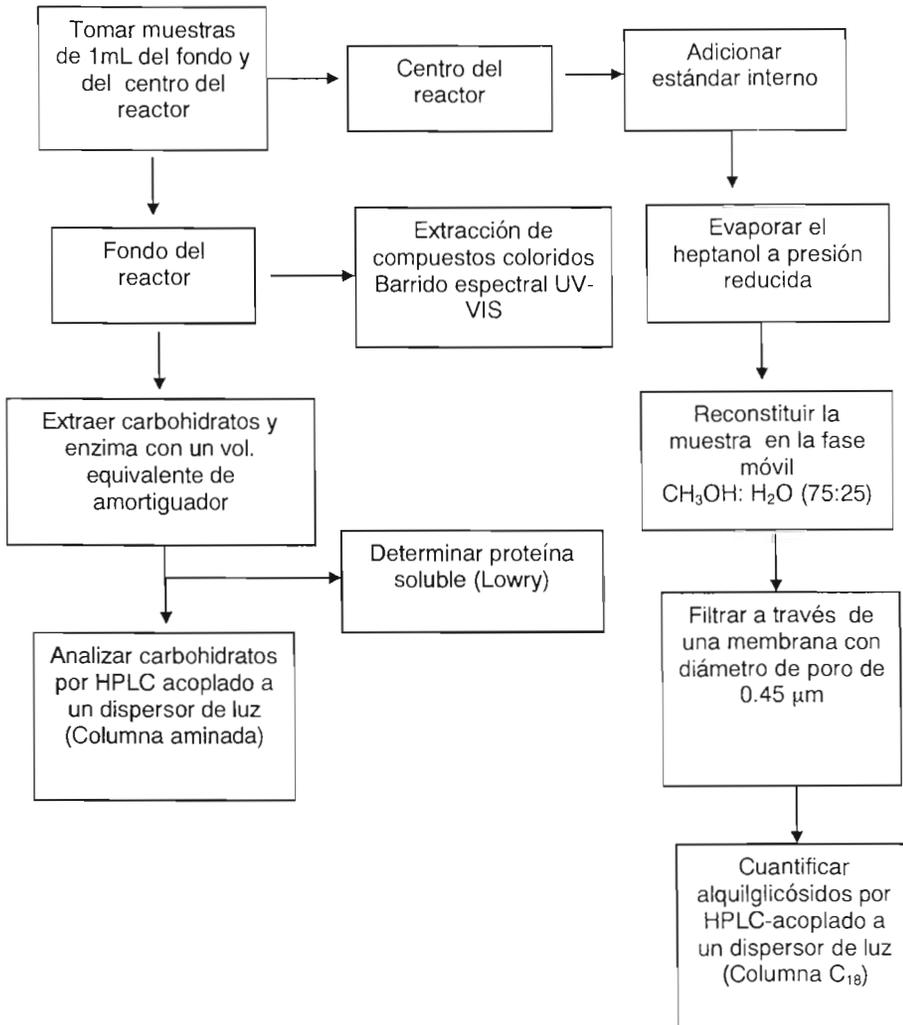
Esquema 2. Evaluación de la partición del sistema

El sistema se agitó durante 8 horas y se dejó en reposo por 24 horas, para que se alcanzara el equilibrio, posteriormente se tomaron muestras de 1 mL de cada reactor a los siguientes tiempos: 0, 0.5, 1, 2, 4, 6 y 8 h. Todo el procedimiento se realizó a 90°C.

Una vez determinada la partición en un sistema modelo, se determinó en el sistema con reacción enzimática tanto en la parte central como en la parte baja del

reactor. La reacción se efectuó por un intervalo de tiempo de 4 horas con las siguientes condiciones: 40 mM de lactosa, 7% amortiguador, 93% heptanol, 400 μ L de solución enzimática y 90°C.

El método que se siguió para la determinación de la partición del sistema con reacción se muestra en el esquema 3.



Esquema 3. Evaluación de la partición del sistema con reacción

II.1.6. Dispersión acuosa y contenido de agua en el heptanol.

Para observar el comportamiento del agua no disuelta en el heptanol al dispersarse en el interior del reactor, se empleó un colorante vegetal naranja marca comercial (1 mg/mL) capaz de disolverse únicamente en el amortiguador. El comportamiento del agua dentro del reactor se evaluó de forma visual por cuatro horas.

Las condiciones bajo las que se realizó el ensayo se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 1. Condiciones de reacción que se siguieron para la evaluación de la dispersión del agua. NA= No aplica

	Reactor 1	Reactor 2	Reactor 3	Reactor 4
Lactosa	40 mM	40 mM	40 mM	40 mM
Heptanol	88%	93%	93 %	93%
Amortiguador	7%	7%	7%	7%
Acetato de etilo	5 %	NA	NA	NA
SDS	NA	NA	20 mM	NA
Octilglucósido	NA	NA	NA	20 mM
Volumen total	40 ml	40 ml	40 ml	40 ml
Temperatura de operación	90°C			

La determinación de la cantidad de agua soluble en el heptanol en presencia de dos tensoactivos (iónico y no iónico) y acetato de etilo como codisolvente, se llevó a cabo bajo las mismas condiciones con las que se evaluó cualitativamente la dispersión. Una vez alcanzada la temperatura de 90°C se inició la agitación y se mantuvo por treinta minutos, para posteriormente tomar muestras de 15 μ l a diferentes intervalos de tiempo, principalmente en los primeros minutos de reposo, se inyectaron en el detector de agua Karl Fischer aquatest.

II.1.7 Efecto del octilglicósido y acetato de etilo sobre la producción de heptilglicósido

La reacción se inició con la adición de 400 μ L de solución enzimática bajo las condiciones con las que se determinó el contenido de agua. El tratamiento y análisis de las muestras se realizó de acuerdo al método descrito en la página 28. Las muestras se tomaron a los 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60 y 120 minutos, con la finalidad de determinar la velocidad inicial de reacción del heptilglicósido en cada sistema.

II.1.8 Oscurecimiento no enzimático

Para determinar si el oscurecimiento no enzimático presente en el sistema de reacción se debe a la reacción de Maillard, o bien a la caramelización, que es la degradación térmica de los azúcares dando como resultado productos de color café similares al de los productos de la reacción de Maillard, se realizaron cuatro experimentos sustituyendo los componentes de la reacción por un tiempo de seis horas, la muestra de la fase acuosa se tomó al finalizar el experimento. Las condiciones se presentan en la tabla 2.

Tabla 2. Condiciones de reacción para determinar el oscurecimiento no enzimático.

NA= No aplica.

Reactor	Heptanol (g)	Lactosa (g)	Enzima (μ L)	Amortiguador (mL)	Acetato de etilo (ml)
A	30.4556	0.4575	400	2.4	NA
B	28.8180	NA	400	2.4	2
C	30.4556	0.4572	NA	2.4	NA
D	30.4556	NA	400	2.4	NA

La reacción se detuvo introduciendo los reactores en hielo. Con el objetivo de favorecer la separación de fases, cada sistema se dejó reposar 48 horas y posteriormente se extrajo la fase acuosa a la que se le realizó un barrido espectral en un intervalo de longitud de onda de 200 a 700 nm para evaluar la formación de compuestos coloridos y sus precursores.

II.1.9 Efecto del contenido de agua sobre el oscurecimiento no enzimático y la producción de heptilglicósido.

La reacción de transglicosidación de la lactosa se llevó a cabo variando el contenido de agua, 3, 5, 7, 9, 12 y 14% (v/v), manteniendo constante la concentración del carbohidrato, de la enzima, la agitación y la temperatura.

Para obtener las velocidades iniciales de reacción a cada condición se determinó la concentración de heptilglicósido producida tomando muestras del centro del reactor a tiempos cortos (0, 10, 20, 30 y 60 minutos).

El oscurecimiento no enzimático se evaluó como se describe en la sección II.1.8 para cada contenido de agua, con la finalidad de observar el efecto del agua sobre la reacción de Maillard y la producción del heptilglicósido.

II.1.10 Efecto de la agitación.

Para conocer el efecto de la velocidad de agitación y la forma del agitador sobre la reacción para promover una dispersión de agua estable, aumentando el área superficial de las gotas, se usaron diferentes velocidades de la parrilla de agitación (200-800 rpm) y agitadores de diferentes formas (ovoide, cruz, semiesférico) como únicas variables, conservando las condiciones de reacción (temperatura 90°C, heptanol 93% (v/v), amortiguador 7% (v/v), 40 mM de lactosa).

No se usó una propela como otro tipo de agitación, porque la temperatura del sistema (90°C) hubiese implicado la posible evaporación del agua.

II.1.11. Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE)

La electroforesis en condiciones desnaturalizantes se realizó de acuerdo al método de Laemmli (1970), usando SDS al 10% en gel de dimensiones de 100 mm ancho, 80 mm de largo 1.5 mm de espesor, con una composición del gel: acrilamida (T%) de 7% y una entrecruzante (C%) de 5%, la corrida se realizó a una diferencia de potencial de 10 volts/cm. Se aplicaron las muestras de la enzima en solución como control y la enzima después de cuatro horas de reacción en los sistemas con un contenido de agua del 5 y 7 % v/v.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III. 1 Síntesis enzimática de heptilglicósidos

La primera estrategia que se siguió para conocer el sistema de reacción enzimática, fue realizar la reacción bajo las condiciones usadas por García-Garibay y colaboradores (2001). En esta primera aproximación la muestra se tomó del centro del reactor y se analizó como se describe en la sección II.1.4.

La cinética de la transglicosidación de la lactosa empleando la β -glicosidasa hipertermófila como catalizador, se muestra en la figura 12. La concentración de heptilglicósido se incrementó hasta alcanzar una concentración constante a las tres horas de reacción, la glucosa, el otro producto de reacción a diferencia del heptilglicósido a las dos horas de reacción, empezó a disminuir. García-Garibay y colaboradores (2000) atribuyeron este comportamiento a la reacción de hidrólisis inversa o condensación entre la glucosa y el heptanol debido a que la enzima tiene la capacidad de catalizar esta reacción.

A la media hora de reacción, las concentraciones de heptilglicósido y glucosa producidos son similares (6.20 y 6.95 mM respectivamente), lo que indica que a 90°C, 93% (v/v) heptanol y 7% (v/v) amortiguador únicamente se realiza la reacción de transglicosidación de la lactosa. Por cada mol de lactosa en el sistema se produce un mol de heptilgalactósido y un mol de glucosa. Sin embargo a la hora de reacción la concentración de glucosa disminuye (2.13 mM). A pesar de esta notable pérdida no se observó un incremento en la concentración de heptilglicósido en el medio. Para cuantificar los carbohidratos y el heptilglicósido fue necesario evaporar a presión reducida el heptanol en presencia de un patrón interno, octilglicósido, que permitió determinar el porcentaje de recuperación del producto durante la evaporación, que en promedio fue del 90%.

Otro fenómeno observado fué la disminución drástica de la lactosa de 40 mM a 2 mM en los primeros minutos de reacción, cambio que no se vió reflejado en la producción del heptilgalactósido y de la glucosa. Este cambio podría ser resultado de la posible coalescencia del agua y por tanto la reacción podría estarse llevando a cabo en un sistema bifásico. Es necesario enfatizar que a simple vista durante el tiempo de reacción se observó un sistema homogéneo.

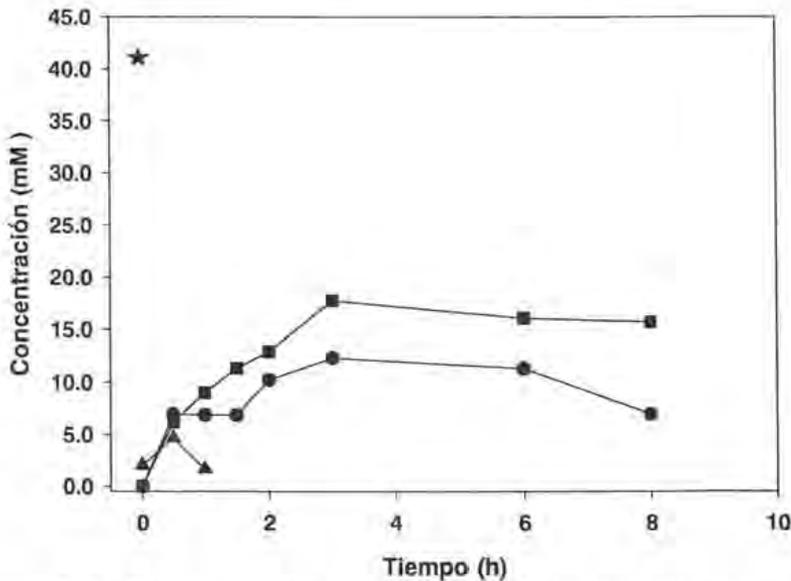


Fig. 12. Curso en el tiempo de la reacción de transglucosidación de la lactosa a 90°C en el centro del reactor. ▲Lactosa, ●Glucosa, ■ Heptilgalactósido ★ Concentración de lactosa inicial 40 mM, 93% (v/v) heptanol, 7% (v/v) agua

III. 2 Evaluación de la partición del sistema

Una estrategia para conocer la distribución de los componentes en el sistema (carbohidratos y heptilgalactósido), fue evaluar la partición de cada uno de ellos en el en el centro del reactor. Para este experimento se emplearon las condiciones de

reacción sin el uso de la enzima, en un primer reactor, las condiciones de reacción (93% heptanol, 7% amortiguador, 37.5 mM de lactosa, y 15 mM de octilglucósido, que es un análogo del heptilgalactósido producido en la reacción a 90°C). En un segundo reactor, la lactosa fue sustituida por glucosa con una concentración equimolar a la de la lactosa, con la finalidad de observar el posible comportamiento de la glucosa una vez producida durante la reacción, y finalmente en un tercer reactor únicamente se evaluó a la lactosa, para comprobar si el octilglucósido tiene un efecto sobre la solubilidad de ésta. El experimento se llevó a cabo por 8 horas y se tomaron muestras del centro del reactor a las 0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 horas. Para tomar cada muestra fue necesario detener la agitación del reactor.

Los resultados obtenidos (Figura 13) muestran una clara afinidad del octilglucósido por el heptanol, ya que el 97% de la concentración inicial se detectó en el centro del reactor. El 3% faltante se debe a la pérdida del compuesto durante el proceso de tratamiento de la muestra. Por el contrario, la cantidad de lactosa detectada en el centro del reactor fue de 2 mM, lo que es una concentración muy baja comparada con la concentración que debe existir en todo el reactor (37.5 mM). La concentración de glucosa detectada fue de 15.4 mM, casi la mitad de la concentración inicial (37.5 mM), estos resultados nos llevan a la conclusión de que el 7% (v/v) de amortiguador nunca se disolvió en su totalidad en el heptanol.

El agua no disuelta en el heptanol no se observó a simple vista hasta después de 8 horas, una vez que la agitación de los reactores se detuvo la separación de las fases resultó evidente. Los resultados demuestran una posible coalescencia del agua que aumenta el tamaño de las gotas presentes y que por efecto de la densidad comienza a formar una fase inferior en los primeros minutos de agitación al no detectar la concentración inicial real de lactosa en el centro del reactor. Esto se debe a que el agua en su caída arrastra a la lactosa, a la glucosa y también a la enzima. Al parecer la glucosa, por su propiedad de solubilidad superior a la de la lactosa, 5.56 g/mL y 0.59 g/mL respectivamente, es capaz de disolverse en mayor

cantidad en el amortiguador disuelto en el heptanol, y al avanzar la separación de fases, la glucosa también tiende a disminuir en el centro del reactor.

Los resultados sugieren que la cantidad de heptilgalactósido producido tiende a permanecer en el heptanol y la cantidad detectada en el centro del reactor, es la cantidad total capaz de producirse en nuestras condiciones experimentales. A pesar de que en el medio aun existe una gran cantidad de sustrato, la inestabilidad del sistema con el tiempo limita el contacto de la enzima con el heptanol, que es uno de los sustratos. Por tanto, el fenómeno de coalescencia podría ser el causante de que la producción de alquilglucósido sea invariable después de dos horas de reacción. Si este fuese el caso la enzima mantendría su actividad, pero no se observa reacción debido a una baja disponibilidad de los sustratos.

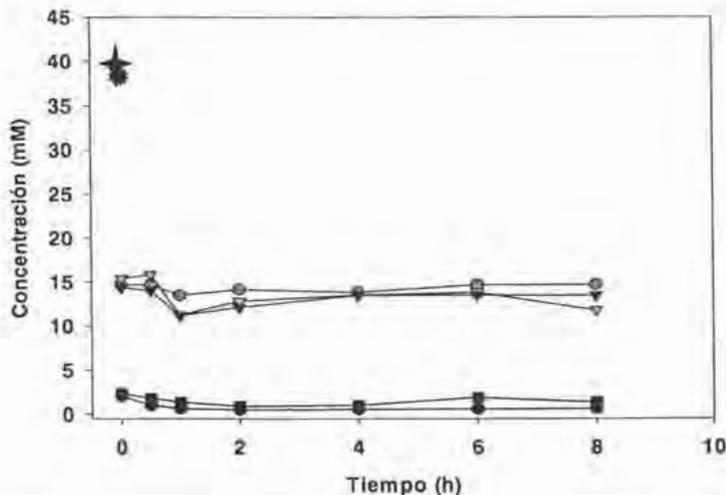


Fig. 13. Separación de los componentes del sistema., 93% (v/v) heptanol 7% (v/v) agua, \star Lactosa inicial 37.5mM, \dagger Glucosa inicial 38.7mM, \bullet Lactosa (R_{lac+octil}) \odot Octilglucósido(R_{lac+octil}), \blacktriangledown Glucosa (R_{glu+octil}), \blacktriangledown Octilglucósido(R_{glu+octil}), \blacksquare Lactosa

Una vez conocido el comportamiento de los componentes del sistema se estudió la partición de los componentes y se evaluó su concentración en el sistema ya reaccionante, se tomaron muestras del centro y fondo del reactor, manteniendo las mismas condiciones de temperatura, concentración de sustratos, enzima y amortiguador que en los ensayos anteriores. Se analizó la evolución de la concentración de la lactosa, la glucosa, el heptilglicósido mediante HPLC y la concentración de enzima por el método de Lowry.

La comparación de la cinética de reacción tanto en el centro como en el fondo del reactor se muestra en las figuras 14 y 15. En este experimento a diferencia de resultados anteriores, donde la concentración de heptilglicósido alcanzada fue 16 mM, la producción de heptilglicósido en el centro del reactor, disminuyó en un 50% posiblemente debido a la eliminación de agua necesaria para la catálisis enzimática que se realizó al tomar las muestras del fondo del reactor; al tomar la muestra del fondo, cierta cantidad de agua fue removida y por lo tanto, si el agua tiende a sedimentarse, la probabilidad de extraer agua y carbohidratos del medio es alta, disminuyendo la cantidad de carbohidratos y de la enzima en el medio para la transformación de la lactosa.

La cinética de la síntesis del heptilgalactósido en el centro y en el fondo del reactor en una hora mostró un comportamiento similar, pero conforme la coalescencia y la separación del agua en el fondo del reactor se incrementan, la hidrólisis de la lactosa predomina sobre la transglicosidación, efecto que se muestra en la Figura 15, al aumentar la concentración de glucosa en el fondo y disminuir la concentración de la lactosa. En la reacción de hidrólisis, el agua compete con el heptanol y los carbohidratos por el sitio activo de la enzima, predominando el agua sobre los demás sustratos y favoreciendo la hidrólisis, debido a su alta concentración en el fondo del reactor. Sin embargo, la concentración de carbohidratos permitió que se llevara a cabo también la reacción de transglicosidación para formar oligosacáridos (Figuras 16 y 17), la figura 17 sólo muestra el perfil de la cinética de uno de los oligómeros formados, la señal de HPLC no se cuantificó ya que se desconoce el tipo de compuesto formado.

En el centro del reactor se observó únicamente la reacción de transglucosidación de lactosa (heptilglucósido: glucosa, 1:1). De acuerdo a estos resultados, y a los obtenidos de la partición en este sistema, la síntesis de alquilglucósidos se lleva a cabo tanto en el centro como en el fondo del reactor siempre y cuando haya agua disponible en el medio y el agua se encuentre dispersa en todo el sistema.

Una reacción adicional que se presentó, paralelo a las reacciones de hidrólisis y transglucosidación que ocurren en el fondo del reactor, fue la de un oscurecimiento gradual del fondo del reactor y que puede ser ocasionado por la degradación de carbohidratos por caramelización o bien debido a la reacción de Maillard. Este oscurecimiento se hace visible a las 2 horas de reacción.

La figura 18 muestra las reacciones que ocurren en este sistema. En la fase del heptanol únicamente se observa la síntesis del heptilglucósido debido que la concentración de agua en el heptanol (2% v/v), no es suficiente para promover la reacción de hidrólisis y, por tanto, la transglucosidación se ve favorecida. La síntesis de oligosacáridos no se detectó. En la fase acuosa, la síntesis del heptilgalactósido compite con la hidrólisis de la lactosa. En esta fase, la hidrólisis se ve favorecida sobre las otras reacciones debido al exceso de agua. Cuando la concentración de monosacáridos se incrementa, la síntesis de los oligosacáridos puede favorecerse sobre la glicosidación del heptanol.

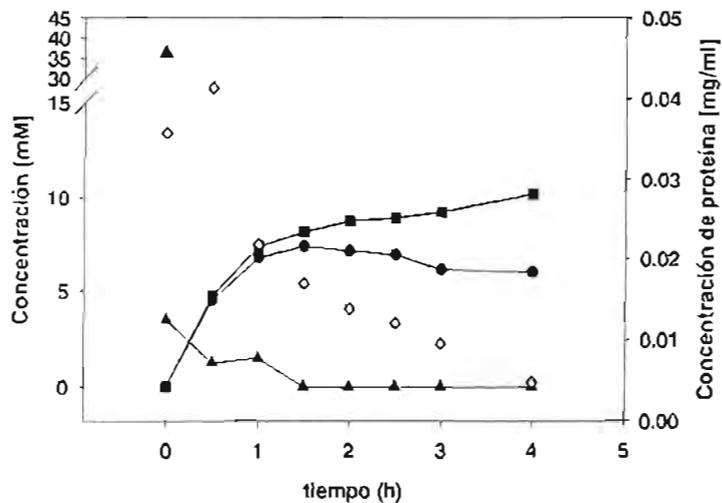


Fig. 14. Comportamiento de la reacción de transglucosidación en el centro del reactor. (■)heptilglicósido, (▲) lactosa, (●) glucosa, (◇) β-glicosidasa. ▲ Concentración inicial de lactosa 40 mM, 93%(v/v) heptanol 7%(v/v) agua, 90°C β-glicosidasa HT 0.056mg/ml.

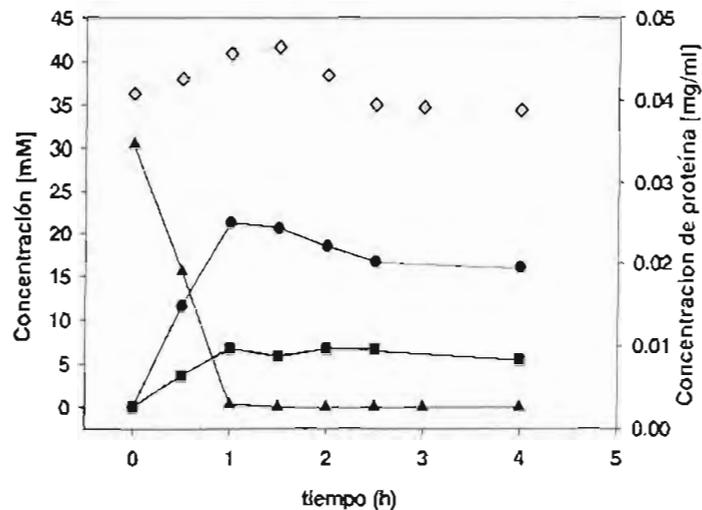


Fig. 15. Comportamiento de la reacción de transglucosidación en el fondo del reactor. (■)heptilglicósido, (▲) lactosa, (●) glucosa, (◇) β-glicosidasa, 93%(v/v) heptanol 7%(v/v) agua, 90°C β-

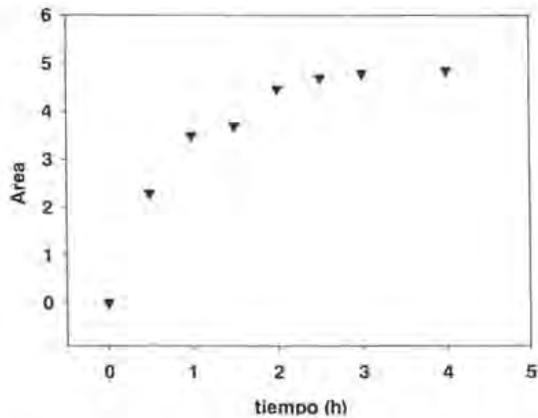


Fig. 16. Formación de oligosacáridos en fase acuosa. La señal analizada fue la de un tiempo de retención de 6.452 min (señal de mayor intensidad) en la columna propilamino.

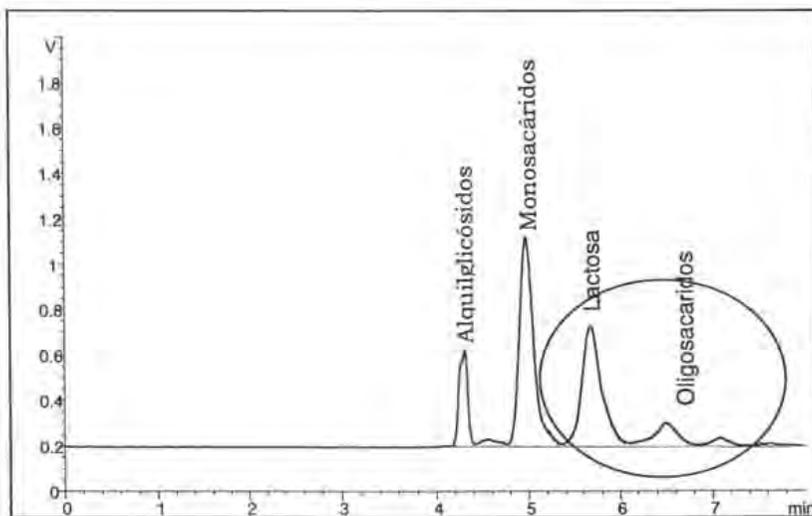


Fig 17. Cromatograma de una muestra tomada del fondo del reactor a las 0.5 horas de reacción y analizada en una columna propilamino

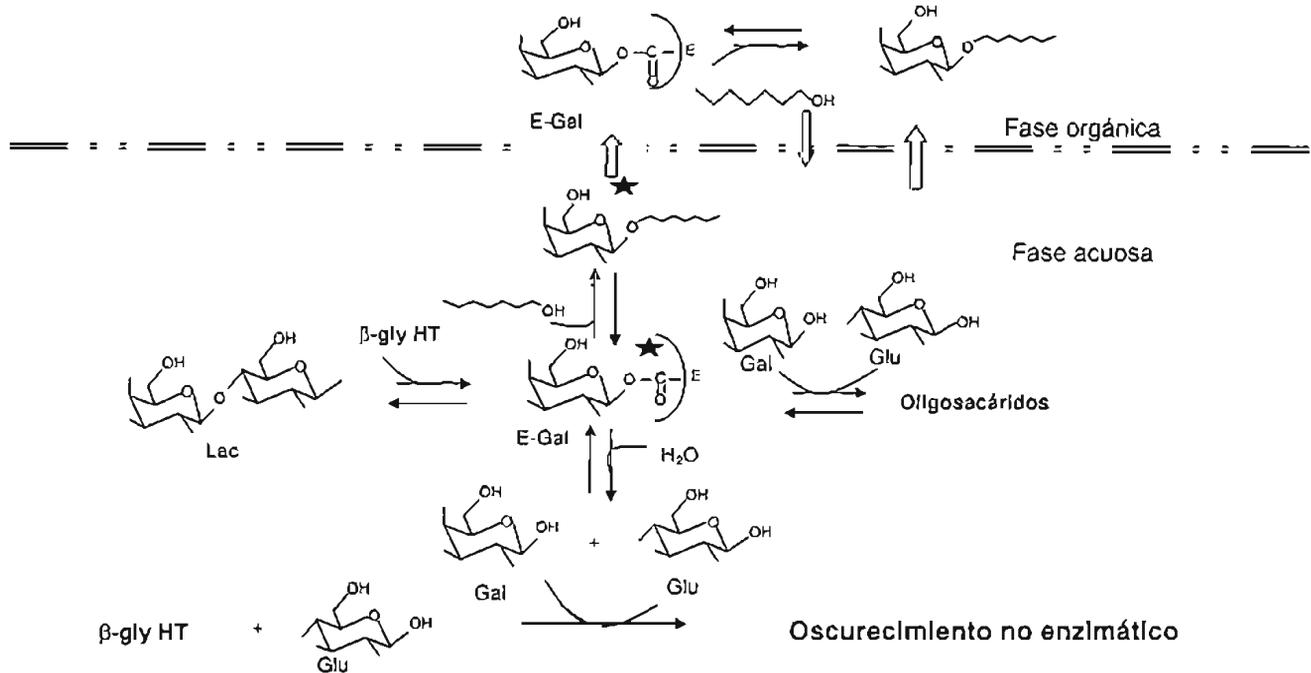


Fig 10 Esquema de las reacciones que tienen lugar en el sistema heptanol-agua (93:7% v/v) a 90° Lac= lactosa; Glu= glucosa; Gal= galactosa; E-Gal =complejo enzima-galactosa β -gly HT= β -glicosidasa hipotermófila. ★ Ismail *et al.* (1999). Proponen que la formación del complejo enzima sustrato se origina en la fase acuosa.

III. 3 Dispersión acuosa y contenido de agua.

Para observar el comportamiento del agua dentro del reactor, se adicionó al amortiguador un colorante vegetal hidrosoluble. El sistema se mantuvo bajo las mismas condiciones: 90°C, 93% heptanol, 40 mM de lactosa y 7% de amortiguador con colorante. La agitación se mantuvo por cuatro horas y la evaluación fue visual.

Este experimento reveló que efectivamente el agua en el heptanol coexiste desde el contacto en formas de micro-gotas, que se agregan lentamente hasta formar un anillo con movimiento dinámico descendente que incrementa su tamaño y su peso por la unión con otras gotas. La formación del anillo se observa a las 1.5 horas y a un tiempo de cuatro horas el anillo se localiza en el fondo del reactor (Figura 19) y, dada su solubilidad, es predecible que los carbohidratos y la enzima sean segregados al cinturón de agua.

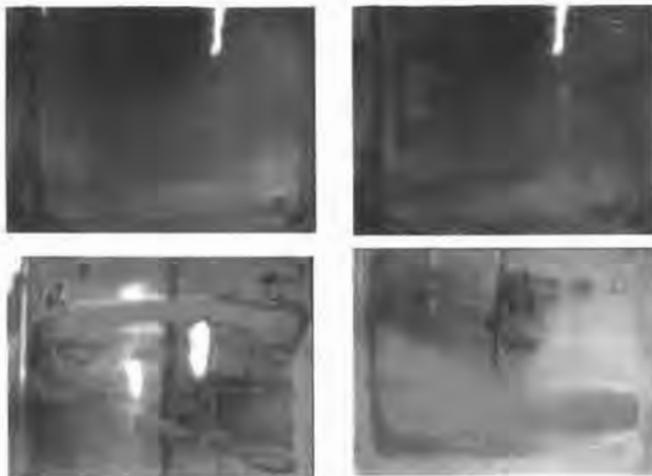


Fig. 19. Evolución de la coalescencia del agua. A) Heptanol 90°C;
B) Incorporación del amortiguador y carbohidratos; C) Coalescencia del agua a los 90 min; D)
Coalescencia a las 4 horas

Con el objeto de mantener por mayor tiempo el agua dispersa y aumentar el área de contacto dentro del reactor, se diseñaron tres nuevos sistemas que consisten en la presencia de un co-disolvente (acetato de etilo), un tensoactivo iónico (dodecil sulfato de sodio) y un tensoactivo no iónico (octilglucósido), además de la coloración del agua. La concentración de tensoactivo que se usó fue de 20 mM, concentración que simula la concentración máxima de heptilgalactósido producido en la reacción. Los tres nuevos sistemas, y un control sin co-disolvente ni tensoactivo, se agitaron a 90°C durante cuatro horas. El comportamiento de cada uno de los sistemas se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Comportamiento del agua usando acetato de etilo y tensoactivos, las marcas (+ gotas pequeñas hasta +++++ gotas grandes) indican el tamaño de las gotas.

Reactor	Tiempo de formación del anillo	Tamaño de gotas
Acetato de etilo 5% (v/v)	240 min	+++
Control	90 min	+++++
SDS 20 mM	No se forma el anillo; después de 4 horas se observó un precipitado.	+
Octilglucósido 20 mM	180 min	++

El sistema más estable se obtuvo en presencia de los tensoactivos SDS y octilglucósido. El SDS logra formar gotas de tamaño menor comparadas con el control, pero después de cuatro horas los carbohidratos precipitaron. En presencia de octilglucósido las micro-gotas se mantuvieron dispersas por un menor tiempo (3 horas). En estos sistemas donde el área superficial de las gotas es mayor, la producción de heptilglucósido puede verse favorecida debido a la existencia de una mayor área de contacto entre el agua y el heptanol antes de la formación del anillo.

El sistema con acetato de etilo, a pesar de que presentó un tamaño de gota más grande comparado con el observado en los sistemas con tensoactivos, presentó una mayor estabilidad durante las cuatro horas; la formación del anillo se hizo

evidente después de las cuatro horas, lo que podría verse reflejado también en el incremento en la producción del producto.

De acuerdo a los resultados obtenidos anteriormente, se hubiese esperado que la cantidad de agua presente en el heptanol aumentara. Sin embargo, contrario a lo observado, no hubo diferencia alguna en cuanto a la retención de agua en el sistema independientemente de la mejora en la dispersión del agua empleando tensoactivos y co-disolventes. Al analizar el contenido de agua en el centro del reactor por el método de Karl Fischer el comportamiento fue similar al reportado por García-Antuñano (2002), se presentó una caída drástica en el contenido de agua en los primeros minutos y posteriormente la cantidad de agua dispersa en el sistema desciende lentamente hasta lograr una separación de fases. Finalmente, alrededor de las 18 horas, se alcanza el equilibrio entre fases que corresponde a un contenido de agua de 2% (v/v) en el heptanol (Figura 20).

Estos resultados demuestran que a pesar del uso de un agente emulsificante como lo es el octilglucósido, las micro-gotas de agua coalescen lentamente cuando el sistema se mantiene en reposo.

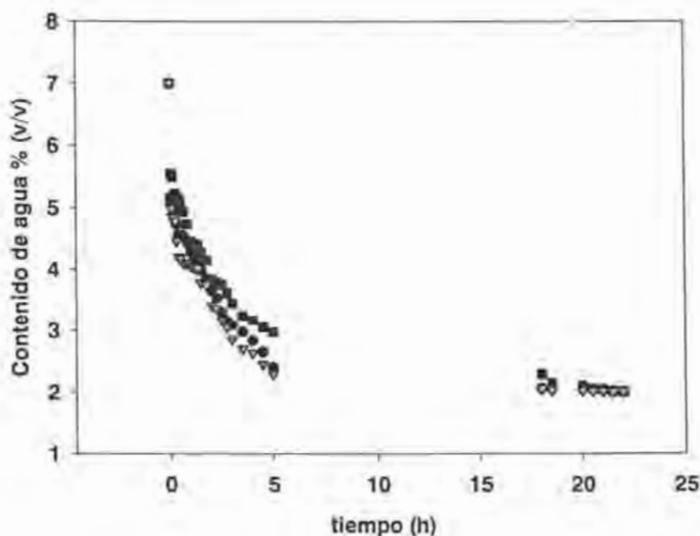


Fig. 20. Isotherma de separación a 90°C de las fases agua : heptanol en diferentes sistemas
 ■ Octilglucósido 20 mM, ● SDS 20 mM, ▼ Control

III.4 Efecto del octilglucósido y acetato de etilo sobre la producción de heptilgalactósido.

Una vez que se analizó la cantidad de agua presente en el centro del reactor y se observó que el empleo de agentes emulsificantes y co-disolvente no mejoraron la estabilidad del sistema, se decidió examinar el efecto de la adición de octilglucósido como tensoactivo y acetato de etilo como co-disolvente sobre la velocidad de transglucosidación. Estos agentes no mostraron un efecto positivo en la producción de heptilglucósido con respecto al control. Presumiblemente esto último se debe a que el agua que permanece dispersa en forma de micro gotas gracias a la agitación no logra alcanzar un área superficial lo suficientemente grande para que sea capaz de mejorar la interacción con el heptanol.

Los resultados obtenidos en cada sistema se muestran en la figura 21.

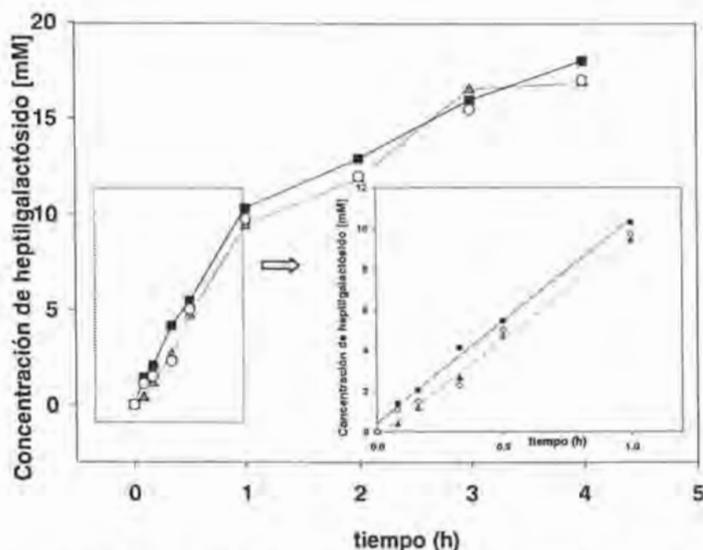


Fig 21. Cinética de transglucosidación de la lactosa a 90°C
 ○ Control, ▲ Acetato de etilo 5%, ■ Octilglucósido 20 mM
 $V_{\text{inicial}} =$ ○ 161.4 $\text{nmol mL}^{-1} \text{min}^{-1}$ ▲ 161.5 $\text{nmol mL}^{-1} \text{min}^{-1}$, ■ 167.3 $\text{nmol mL}^{-1} \text{min}^{-1}$

El octilglucósido, además de ser empleado como un surfactante, se usó como un posible agente inhibidor de la reacción de síntesis de heptilgalactósido a concentración de 20 mM, que es la concentración máxima producida en el sistema. Contrario a lo reportado por García-Garibay *et al.* (2000), donde el heptilglucósido inhibe fuertemente la reacción, se observó que la velocidad de reacción no se ve afectada por la presencia del octilglucósido (Figura 21). Este resultado puede explicarse con base en la partición de los componentes, ya que hay una fuerte afinidad de los alquilglucósidos por el heptanol. Una vez que el heptilgalactósido es sintetizado en el sitio activo de la enzima se particiona hacia la fase orgánica, impidiendo que el heptilgalactósido o el octilglucósido sean inhibidores competitivos de la reacción de síntesis.

III.5 Efecto de la agitación sobre la producción de heptilglicósido.

Con la finalidad de estudiar el efecto de la agitación sobre la reacción de transglicosidación, se determinó la velocidad de reacción a diferentes velocidades de agitación (300, 600 y 800 rpm) y diferentes tipos de agitador (ovoide, cruz, semicírculo), partiendo de la hipótesis de que a mayor velocidad de agitación el agua se podría mantener dispersa en forma de micro gotas por un mayor intervalo de tiempo, lo que se reflejaría en una mayor velocidad de reacción. Por otra parte, con el cambio en la forma del agitador se pretendió evitar la formación del anillo mediante el rompimiento de las gotas de mayor tamaño una vez formadas.

Los resultados no muestran diferencia en las velocidades iniciales (Figura 22). Sin embargo, a partir de las dos horas la coalescencia se ve afectada con relación al incremento del área superficial de las gotas y su contacto con el heptanol, retardando así la formación del anillo de agua

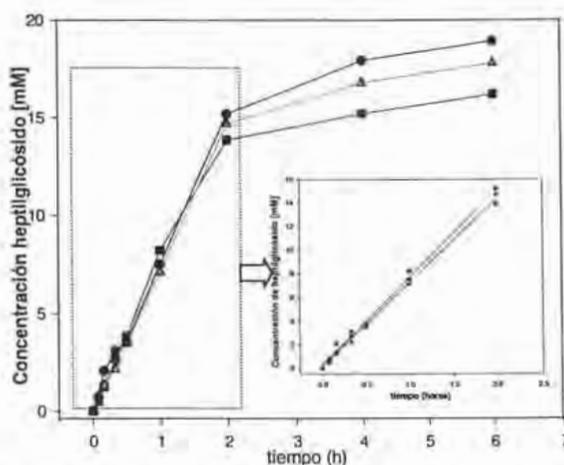


Fig. 22. Efecto de la velocidad de agitación sobre la reacción de transglicosidación,

■ 300, ▲ 600, ● 800 rpm.

$V_{inicial}$ ■ $133.14 \text{ nmol mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$, ▲ $121.42 \text{ nmol mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$, ● $123.33 \text{ nmol mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$,

La velocidad de reacción en las primeras dos horas se ve afectada significativamente por la forma del agitador (Figura 23), pero la agitación mecánica no es suficiente para mantener dispersa el agua por mayor tiempo, ya que a partir de las dos horas la producción del heptilglicósido se detiene.

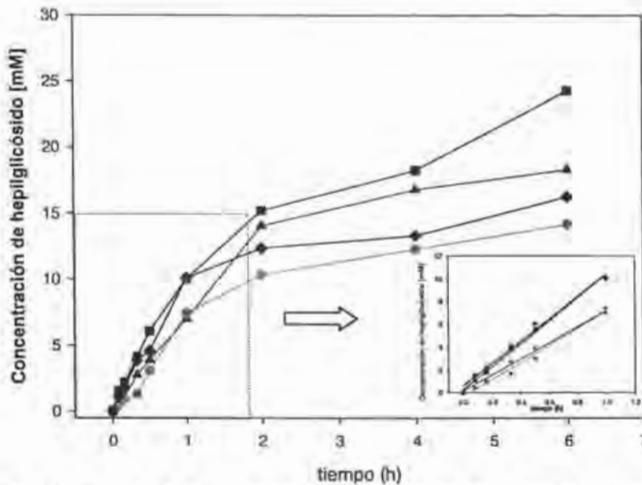


Fig. 23. Efecto de la forma del agitador sobre la reacción de transglucosidación, \blacktriangle control, \blacktriangle ovoide, \blacklozenge semicírculo, \blacksquare cruz \blacklozenge $V_{\text{inicial}} \blacktriangle 134.65 \text{ nmol mL}^{-1}\text{min}^{-1}$, $\blacklozenge 127.14 \text{ nmol mL}^{-1}\text{min}^{-1}$, $\blacksquare 176.8 \text{ nmol mL}^{-1}\text{min}^{-1}$, $\blacklozenge 163 \text{ nmol mL}^{-1}\text{min}^{-1}$,

III.6 Oscurecimiento no enzimático

Un fenómeno que se hizo patente en todos los ensayos a las dos horas de reacción fue el oscurecimiento en el fondo del reactor, ocasionado ya sea por la reacción de Maillard y/o por la caramelización de los carbohidratos. Para diferenciar la reacción de Maillard de la caramelización, o bien determinar el aporte de ésta al oscurecimiento, se realizaron cuatro experimentos que se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Condiciones de reacción para la evaluación del oscurecimiento no enzimático

REACTOR	CONDICIONES	OBJETIVO
A	Enzima+lactosa	Referencia para todos los sistemas
B	Enzima	Evaluar si la enzima por sí misma contribuye al oscurecimiento
C	Lactosa	Evaluar la caramelización
D	Enzima 25°C	Referencia para el sistema B que sólo contiene enzima a 90°C

Las reacciones se realizaron en presencia de 93% de heptanol y 7% de amortiguador a 90°C a excepción del reactor D cuya temperatura fue de 25°C

El oscurecimiento se hizo visible en el reactor A aproximadamente a las dos horas de reacción, mientras que en el reactor C el oscurecimiento se observó alrededor de las 6 horas. Al parecer, el reactor B (enzima) no sufrió cambios provocados por la interacción de la enzima con las impurezas presentes en el crudo enzimático. Esto indica que la reacción de Maillard predomina en las primeras horas y el aporte de caramelización es posterior.

Una manera de evaluar el avance de la reacción de Maillard consiste en la medición de la absorbancia de los compuestos coloridos producidos en esta reacción entre 420 y 490 nm (Bruins *et al.*, 2002). En este caso el espectro de absorbancia para las mezclas de reacción se midieron en un intervalo de 200 a 700 nm, mostrando un máximo en 420 nm (Figura 24). Este máximo es usado

para medir la etapa final de la reacción de Maillard, que se caracteriza por la formación de polímeros nitrogenados insaturados. En los barridos espectrales, además de observarse la etapa final de la reacción de Maillard, se muestra la etapa temprana de la reacción donde se forman compuestos no coloridos que absorben en la región UV como es el caso del hidroximetilfurfural (HMF) y de pirazinas, que absorben a una longitud de onda de 280 nm (Figura 25). Para observar los compuestos de la etapa temprana fue necesario diluir la muestra 16 veces para diluir el color y así resolver el espectro la región ultravioleta.

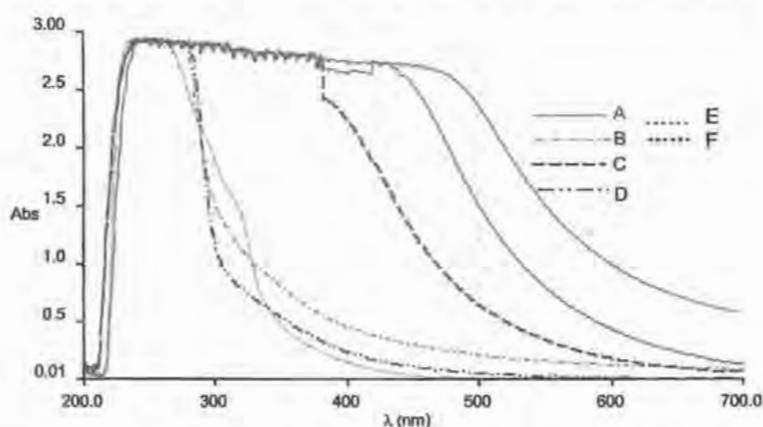


Fig. 24 Espectro de la reacción de Maillard, dilución 1:1, después de 6 horas de reacción reactor A (enzima-lactosa); B (Enzima); C (lactosa), D (enzima 25°C), E (lactosa a 2 h de reacción), F (enzima lactosa a 2 h de reacción).

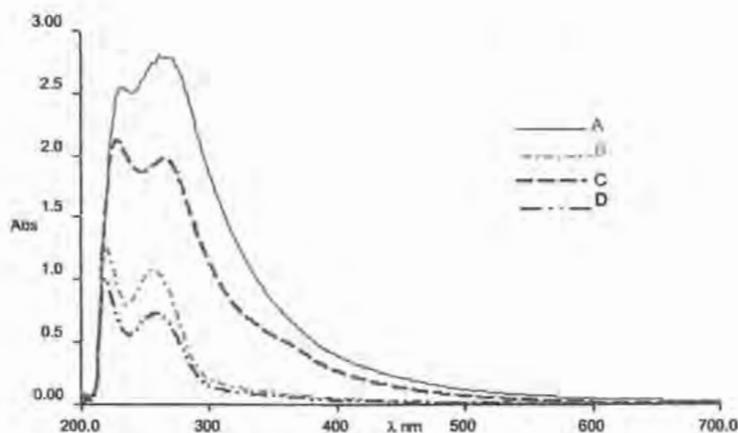


Fig. 25. Espectro de la reacción de Maillard. Dilución 1:16, después de 6 horas de reacción reactor A (enzima-lactosa); B (Enzima); C (lactosa), D (enzima 25°C).

III.7 Efecto del contenido de agua sobre el oscurecimiento no enzimático y la producción de heptilglicósido.

La influencia del agua sobre la concentración final del heptilglicósido está asociada a la concentración inicial de lactosa. A mayor concentración de agua existe una mayor solubilidad de la lactosa. Algunos autores han reportado que la principal limitante de la síntesis de los alquilglicósidos es la baja solubilidad de los carbohidratos en medios orgánicos (Vulson *et al.*, 1990; Bruins *et al.*, 2003).

El aumento de la concentración de lactosa soluble en el medio puede incrementar la velocidad de reacción así como minimizar la hidrólisis del producto debido a que la lactosa compite con el agua por el sitio activo de la enzima. Sin embargo, como se observa en la figura 26, se alcanzó una máxima producción de heptilglicósido a un contenido de agua de 12%. Esto indica que, hasta este punto, la galactosa producida a partir de lactosa fue transformada a heptilgalactósido. A niveles mayores de agua (14%) se observó una disminución en la producción de heptilgalactósido, lo que indica que la hidrólisis de la lactosa predomina sobre la síntesis de heptilglicósidos a causa del exceso de agua. Esto explica el bajo rendimiento de la síntesis obtenido a 14% de agua.

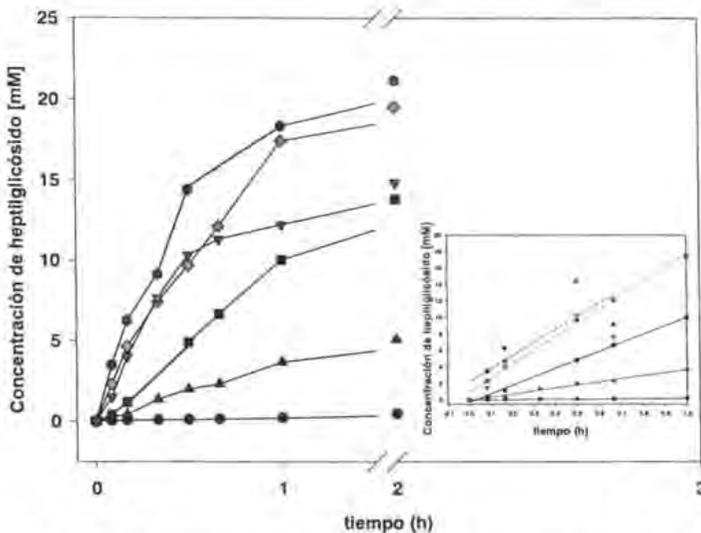


Fig. 26 . Efecto del contenido de agua sobre la producción de heptilgalactosido ● 3% ▲ 5%, ■ 7%, ◆ 9% ● 12%, ▼ 14% (v/v) agua

V_{inicia} ● 31.12 nmol min⁻¹ mL⁻¹, ▲ 61.9 nmol min⁻¹ mL⁻¹ ■ 171.8 nmol min⁻¹ mL⁻¹, ◆ 280 nmol min⁻¹ mL⁻¹, ● 451.7 nmol min⁻¹ mL⁻¹, ▼ 266.4 nmol min⁻¹ mL⁻¹

Al igual que la velocidad de la reacción enzimática, la reacción de Maillard también está influenciada por el contenido de agua, como se observa en la figura 27. El contenido de agua en el sistema se varió desde un 3% hasta un 14% (v/v). El oscurecimiento, indicador de la etapa final de la reacción de Maillard, es inversamente proporcional al contenido de agua. Esto se debe a que a un mayor contenido de agua los reactantes que participan en la reacción de Maillard tienden a diluirse y, por consecuencia la velocidad de estas reacciones disminuye.

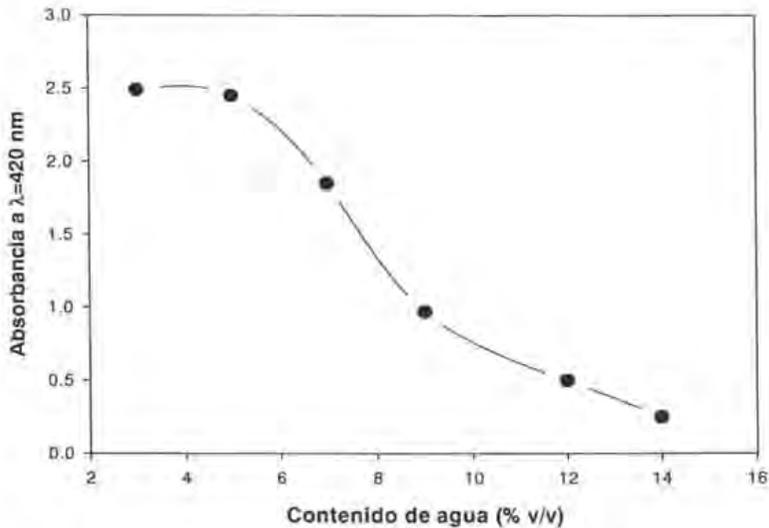


Fig. 27. Efecto del contenido de agua sobre la reacción de Maillard (4 horas de reacción)

El oscurecimiento observado a los diferentes contenidos de agua (3, 5, 7 y 9 % v/v) se presenta a partir de las dos horas (Figura. 28). Esto indica que la reacción de Maillard inicia al entrar en contacto la enzima con los carbohidratos, comenzando la inactivación de la enzima. Estudios previos (Hansson *et al.*, 2001; Bruins *et al.*, 2002; Hanson *et al.*, 2002), confirman que la enzima se inactiva debido a que la reacción de Maillard provocando cambios químicos en la estructura primaria de la proteína, o por polimerización de la proteína causada por compuestos entrecruzantes producidos en la etapa inicial de la reacción de Maillard.

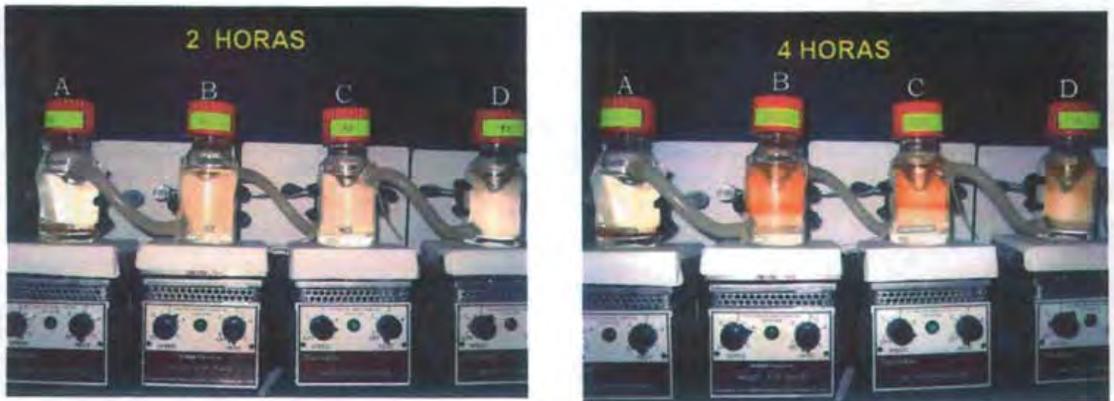


Fig. 28 Efecto del contenido de agua sobre la reacción de Maillard. A) 3%, B) 5%, C) 7%, D) 9% (v/v) de agua

Para evaluar, de manera cualitativa, la posible modificación química de la proteína causada por los productos de la reacción de Maillard, se llevó a cabo una electroforesis en gel bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) (sección II.1.11) de muestras incubadas por cuatro horas a dos diferentes contenidos de agua (5 y 7 % v/v) y de una muestra control de β -glicosidasa HT en disolución acuosa.

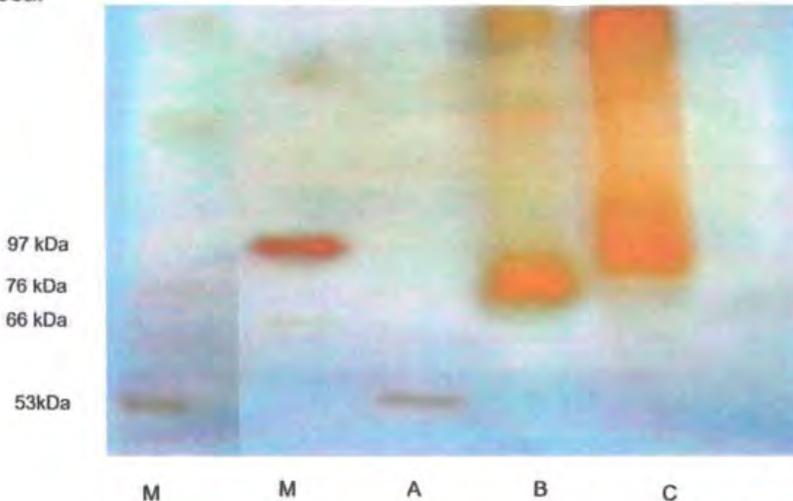


Fig. 29. Perfil electroforético de las muestras de β -glicosidasa HT (β -gly HT) incubadas a 90°C 4 horas, 40 mM lactosa, 5% y 7% (v/v) de agua. M= marcadores de peso molecular, A= β -gly HT nativa a 25°C (control), B= 7 % (v/v) agua, C= 5% (v/v) agua

Bajo estas condiciones se observó que la proteína sufre cambios drásticos mostrados en un incremento en su peso molecular (Figura 29). Al 5 % de agua se observó una mayor modificación comparada con el 7%.

Este cambio en el peso molecular nos lleva a suponer que la formación de compuestos α -dicarbonílicos y compuestos heterocíclicos productos de la reacción de Maillard son capaces de entrecruzar la enzima por medio de enlaces covalentes (Meade, *et al.*, 2002). Además, las melanoidinas producto de la reacción de Maillard, pueden reaccionar con los grupos amino libres de los residuos de lisina. Esto modifica masivamente a la proteína disminuyendo así su movilidad en el gel.

Un dato adicional que se pudo obtener de la electroforesis en gel fue la masa molecular del monómero de la enzima la cual es aproximadamente de 52 kDa.

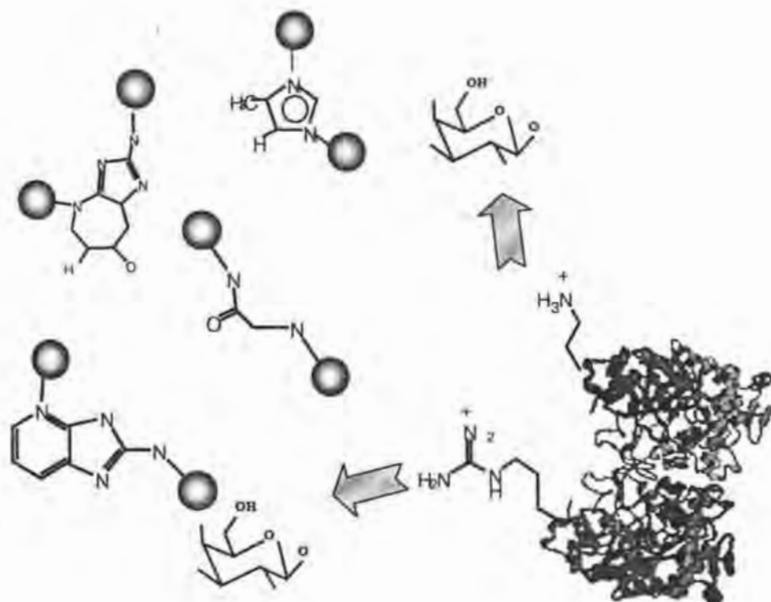


Fig. 30 Ilustración del entrecruzamiento de la proteína como resultado de la reacción entre la enzima y de productos de la reacción de Maillard.  = Enzima

III.8. Actividad residual de la β -glucosidasa HT

Para comprobar la pérdida de actividad de la enzima como consecuencia de la modificación en la enzima, se determinó la actividad residual de la enzima procedente del medio orgánico a través de la reacción de hidrólisis de lactosa en medio acuoso.

El ensayo se realizó después de 2.5 y 6 horas de reacción de transglucosidación en el sistema heptanol:agua (93:7% v/v). La enzima se extrajo del medio y se colocó en un medio acuoso (amortiguador de acetatos, pH 5.5) con una concentración de 40 mM de lactosa a 90°C. Se elaboraron dos controles, uno con enzima fresca y otro únicamente con lactosa; este último con la finalidad de evaluar la hidrólisis química que pudiera provocarse por las condiciones de pH y temperatura.

Cómo se puede observar en la figura 31, la actividad residual de la enzima se ve disminuida en un 81% con respecto a la actividad de la enzima no expuesta a la reacción de Maillard. Estos resultados confirman la pérdida de actividad enzimática debido a las modificaciones químicas que sufre la proteína

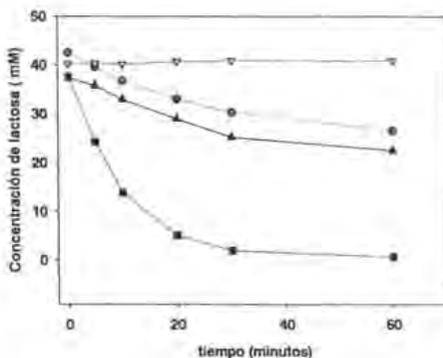


Tabla 6. Actividad residual de la β -glucosidasa

	Control Enzimática	Control químico	Enzima 2.5 h	Enzima 6 h
Actividad $\mu\text{mol lac mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$	38.18	—	8.87	7.63

Fig. 31. Actividad residual de la β -glucosidasa HT después de 2.5 y 6 horas de transglucosidación en medio orgánico ■ Control de hidrólisis enzimática en medio acuoso con enzima fresca; ▲ reacción de hidrólisis con enzima de 2.5 h de reacción, ● reacción de hidrólisis con enzima de 6 h de reacción, ▼ Control de hidrólisis química.

CONCLUSIONES

- El sistema de biocatálisis estudiado en el medio heptanol:agua (93:7% v/v) es inestable, debido a que el estado de dispersión del agua varía de manera importante dentro del reactor. Esta inestabilidad obedece a la coalescencia y posterior acumulación del agua en el fondo del reactor, formando dos fases que favoreció la partición de los componentes del sistema, afectando el rendimiento de la formación del heptilgalactósido y promoviendo las reacciones de hidrólisis y oscurecimiento no enzimático.
- El área superficial de la fase acuosa es un factor importante que afecta la producción de alquilgalactósido. Durante las dos primeras horas de reacción el área superficial total de las gotas presentes en el medio es lo suficientemente grande para permitir que se lleve a cabo la reacción enzimática con una velocidad inicial de $135 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mL}^{-1}$, que durante este tiempo no se ve afectada por la rapidez de agitación. Al disminuir dicha área, los problemas de transferencia de los sustratos de la fase acuosa a la orgánica y viceversa aumentan. La agitación mecánica contribuye a aumentar el área superficial de contacto después de las dos horas y por tanto la concentración de heptilgalactósido formado. Sin embargo, no se logró establecer una dispersión acuosa que retardara la coalescencia del agua.
- El uso de tensoactivos retarda la coalescencia del agua, manteniendo por un mayor tiempo la estabilidad de la dispersión de las gotas en el heptanol sin mostrar un efecto positivo en la velocidad de reacción. El empleo del octilglicósido, que también actúa como agente dispersante en el medio, demostró que los alquilglicósidos no son inhibidores competitivos para la reacción de transglicosidación.

- La enzima presenta inactivación como consecuencia de la reacción de la proteína con los productos de la reacción de Maillard. Esta reacción produce un aumento en el peso molecular aparente de la fracción proteínica del biocatalizador.

- La producción del heptilgalactósido se incrementa al aumentar el contenido de agua en el medio de reacción hasta un 12% y disminuye el oscurecimiento no enzimático, lo que parecería ser la concentración ideal de agua para la producción de alquilglicósidos. A contenidos de agua mayores, la velocidad de coalescencia se ve favorecida y por lo tanto las reacciones de hidrólisis llegarían a predominar.

- La separación del agua y sus solutos del heptanol, así como la inactivación de la enzima como consecuencia de su modificación química son los factores de mayor relevancia que explican por qué la formación del producto de interés se detiene en un intervalo de tiempo relativamente corto.

PERSPECTIVAS

- Para mantener una mayor área superficial y, en consecuencia, tener una mayor dispersión del agua en el medio, se pueden seguir dos estrategias mecánicas: 1) la implementación de una propela que impida la formación del anillo de agua y 2) el uso de un reactor con baffles que evitaría la coalescencia del agua en las paredes del reactor.

- Es factible considerar el uso de tensoactivos que permitan disolver una mayor cantidad de agua en el heptanol, aumentando el área superficial total de las gotas. Esto mejoraría el contacto entre el heptanol, el agua, los carbohidratos y la enzima. Es necesario evaluar las concentraciones y el tipo de tensoactivo para aumentar el área superficial y evitar la desnaturalización de la enzima.

- Es necesario evaluar la cinética de coalescencia en función a la cinética de producción de los alquilglicósidos y establecer un modelo que permita encontrar las condiciones óptimas de reacción.

- En cuanto al control de la reacción de Maillard, es necesario estudiar a la β -glucosidasa y conocer el mecanismo de glicosidación y agregación de ésta, para proponer posibles modificaciones en la enzima, o bien, mediante su inmovilización retardar la reacción de Maillard.

REFERENCIAS

Aguilar, C.F., Sanderson, I., Moracci, M. 1997. Crystal structure of the β -glycosidase from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. Resilience as a key factor in thermoestability. *J. Mol. Biol.* 271, 789-802.

Ahern, T.J., Klivanov, A. M., 1987. Analysis of processes causing thermal inactivation of enzymes. *Methods Biochem. Anal.* 33. 91-127.

Almarsson, Ö., Klivanov, A.M. 1996. Remarkable activation of enzymes in nonaqueous media by denaturing organic cosolvents. *Biotechnol. Bioeng.* 49,87-92.

Ames, M. 1988. The Maillard browning reaction an update. *Chem. Ind.* 5, 558-561.

Ames, M. 1998. Applications of the Maillard reaction in the food industry. *Food Chem.* 62, 431-439.

Becker, P., Abu, R. I., 1997. Determination of the kinetic parameters during continuous cultivation of the lipase-producing thermophile *Bacillus sp.* IH1-91 on olive oils. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48, 187-190.

Bell, G., Halling, P. 1995. Biocatalysis behavior in low-water systems. *Trends Biotechnol.* 13, 468-473.

Bell, G., Janssen, A., Halling, P., 1997. Water activity fails to predict critical hydration lever for enzyme activity in polar organic solvents: Interconversion of water concentrations and activities. *Enzyme Microbial. Technol.* 20,471-477.

Biermann, M., Lange, F. 1986. Surfactants in Consumer Products—Theory, Technology and Application. Ed. J. Falbe, Springer, Berlin, pp 99-105.

Bruins, M.E., Thewessen A., Janssen M., Boom R. 2002. Enzyme inactivation due to Maillard reactions during oligosaccharide synthesis by a hyperthermophilic glycosidase: Influence of enzyme immobilization. *J. Mol. Catalysis B: Enzymatic*. 758, 1-4.

Bruins, M.E., Hellemond, A., Janssen, M., Boom, R. 2002. Maillard Reactions and increased enzyme inactivation during oligosaccharides synthesis by a hyperthermophilic glycosidase. *Biotechnol. Bioeng.* 81, 546-552.

Chahid, Z., Monet, D. Pina, M. 1992. Effect of water activity on enzymatic synthesis of alkyl glycosides. *Biotechnol. Lett.* 14, 281-284.

Chi, Y.I., Martinez-Cruz, L.1999. Crystal structure of the β -glycosidase from hyperthermophile *Thermosphaera aggregans*: insights into its activity and thermostability. *FEBS Lett.* 445, 3 75-383.

Crout, D., Vic, G. 1998. Glycosidases and glycosyl transferases in glycoside and oligosaccharides synthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2, 98-111.

D'Auria S., Nucci R., Rossi M., Lokowicz J.R.1999. The β -glycosidase from hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*: enzyme activity and conformational dynamics at temperature above 100°C. *Biophys. Chem.* 81, 23-31.

Eichler J. 2001. Biotechnological uses of archaeal extremozymes. *Biotechnol. Adv.* 19, 261-278.

Faber, K. 2000. Biotransformation in organic chemistry. Ed. Springer, Berlin, pp 314-318.

García-Antuñano, M. 2002. Condiciones que afectan la síntesis enzimática del heptilglucósido a 90°C en medio orgánico. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM.

García-Garibay, M., López-Munguía, A., Bárcana, E. 2000. Alcoholysis and reverse hydrolysis reactions in organic one-phase system with a hyperthermophilic β -glycosidase. *Biotechnol. Bioeng.* 69, 627-632.

Gomes J., Steiner W. 2004. The biocatalytic potential of extremophiles and extremozymes. *Food Technol. Biotechnol.* 42, 223-235.

Halling, P. 1990. High affinity binding of water by proteins is similar in air and in organic solvents. *Biochim. Biophys Acta.* 1040, 225-228.

Hansson, T., Adlercreutz, P. 2001. Optimization of galactooligosaccharide production from lactose using β -glycosidases from hyperthermophiles. *Food Biotechnol.* 15, 79-97.

Hansson, T., Adlercreutz, P. 2002. Enzymatic Synthesis of Hexyl Glycosides from lactose at low water activity and high temperature using hyperthermostable β -glycosidase. *Biocatal. Biotransform.* 20, 167-178.

Hansson, T., Andersson, M., Wehtje, E., Adlercreutz, P. 2001. Influence of water activity on the competition between β -glycosidase-catalyzed transglycosylation and hydrolysis in aqueous hexanol. *Enzyme Microb. Technol.* 29, 527-534.

Hill, K. and Rhode, O. (1997). Sugar based surfactants for consumer products and technical applications. *Fett. Lipid* 101, 25-33.

Hough DW, Danson MJ. 1999. Extremozymes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3, 39-46.

Ismail A, Soultani S. 1999. Enzymatic-catalyzed synthesis of alkylglycosides in monophasic and biphasic systems. II The reverse hydrolysis reaction. *J. Biotechnol.* 69, 145-149.

Ismail, A., Soultani, S., Ghoul, M. 1999. Enzymatic-Catalyzed synthesis of alkylglycosides in monophasic and biphasic systems. I The transglycosidation reaction. *J. Biotechnol.* 69, 135-143.

Klibanov, A. M. 1997. Why are enzymes less active in organic solvents than in water? *Trends Biotechnol.* 15, 97-101.

Klibanov, A. M. 2001. Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature* 409, 241-246.

Kobayashi T., Adachi, S. 2000. Synthesis of alkyl glycosides through β -glycosidase-catalyzed condensation in an aqueous-organic biphasic system and estimation of the equilibrium constants in their formation. *J. Mol. Catalysis B: Enzymatic* 11, 13-21.

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* 227,680-685.

Lerici, C., Barbanti, D., Manzano, M. 1990. Early Indicators of chemical changes in foods due to enzymatic or non enzymatic browning reactions. Study on heat treated model system. *Lesbensm-Wis. Technol.* 23, 289-294.

- Li, J., Wang, P. G. 1997 Chemical and enzymatic synthesis of glycoconjugates 2. High yielding regioselective synthesis of *N*-acetylglucosamine by use of recombinant thermophilic glycosidases library. *Tetrahedron Lett.* 38, 7967-7970.
- Ling, G. 1972. Hydration of macromolecules. In: Horne RA, editor. Water and aqueous solutions. Wiley-Interscience. New York . pp 663-700.
- Martins, S., Jongen, W., van Boekel, M., 2001. A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modeling. *J. Food. Sci. Technol.* 11, 364-373.
- Meade, S., Miller, G., Gerrard, J. 2002 The role of dicarbonyl compounds in non-enzymatic crosslinking: A structure-Activity study. *Bioorg. Med. Chem.* 225- 235.
- Miller, G., Meade, S., Gerrard, J. 2002. New Insights into protein crosslinking via de Maillard reaction: Structural requirements, the effect on enzyme function, and predicted efficacy of crosslinking inhibitors as anti-ageing therapeutics. *Bioorg. Med. Chem.* 20, 250-260.
- Niehaus, F., Bertoldo, C. 1991. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Appl. Microb. Biotechnol.* 51, 711-721.
- Nilsson, G.I. 1988. Enzymatic synthesis of oligosaccharides. *Trends Biotechnol.* 6, 256-264.
- Panintrarux, C., Adachi, S. 1995. Equilibrium yield of *n*-alkyl- β -D-glucoside through condensation of glucose and *n*-alcohol by β -glycosidase in a biphasic system. *Enzyme Microb. Technol.* 17,32-40.
- Papanikolaou, S. 2001. Enzyme-Catalyzed synthesis of alkyl- β -glucosides in a water-alcohol two-phase system. *Bioresource Technol.* 77, 157-161.

-
- Peterson, G.L. 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83, 346-356.
- Querol E., Pérez-Ponds J., Mozo, V. 1996. Analysis of protein conformational characteristics related to thermostability. *Protein Eng.* 9, 255-271.
- Rybinsky, W., Hill, K. 1998. Alkyl polyglycosides properties and applications of a new class of surfactants. *Angew. Chem. Int.* 37, 1328-1345
- Rupley, J., Gratton, E., Careri, G. 1983. Water and globular proteins. *Trends Biochem Sci.* 8, 18-22.
- Rye, S.C., Withers, S.G. 2000. Glycosidase mechanism. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4, 573-580.
- Shinoyama, H., Yasui, T. 1988. Superiority of *Aspergillus Níger* β -xylosidase for the enzymatic synthesis of alkyl- β -xylosides in presence of a variety of alcohols. *Agric. Biol. Chem.* 52, 2375-2377.
- Shinoyama, H., Kamiyama, Y. T. 1988. Enzymatic synthesis of alkyl- β -xilosides from xylobiose by application of the transxylosyl reaction of *Aspergillus niger* β -xilosidase. *Agric. Biol. Chem.*,52, 2197-2202.
- Stevenson, D., Stanley, R., Furneaux, R. 1993. Optimisation of the alkyl- β -galactoside synthesis from lactose using commercially available β -galactoside. *Biotechnol. Bioeng.* 42, 657-666.
- Tuena de Gómez-Puyou M., Gómez Puyou A. 1998. Enzymes in low water systems. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 33, 53-89.

van Rantwijk, F., Woudenberg-van, M. 1999. Glycosidase-catalysed synthesis of alkyl glycosides. *J. Mol. Catalysis B: Enzymatic*. 6, 511-532.

Vic, G., Thomas, D. 1992. Enzyme-catalyzed synthesis of β -D-glucosides in organic media. *Tetrahedron Lett.* 33, 4567-4570.

Vic, G., Crout, T. 1997. Solvent effect on enzyme-catalyzed synthesis of β -D-glucosides using reverse hydrolysis method: Application to the preparative scale synthesis of 2-hydroxybenzyl and octal- β -D-glucopyranosides. *Enzyme Microb. Technol.* 20, 597-603.

Vulson, E., Patel, R., Law, B. 1990. Alkyl- β -glucoside synthesis in a water-organic two phase system. *Biotechnol. Lett.* 12, 397-402.

von Rybinski, W., Hill, K. 1998. Alkyl polyglycosides-Properties and Application of a new class of surfactants. *Angew. Chem. Int.* 37, 1328-1345.

Xu, K., Klivanov, A. M. 1996. pH control of the catalytic activity of cross-linked enzyme crystal in organic solvents. *J. Am. Chem. Soc.* 118, 9815-9819.

Zacks A. and Klivanov A..M., 1984. Enzymatic catalysis in organic media at 100°C. *Science* 224, 1249-1251

Zacks, A. and Klivanov, A. 1988. Enzymatic catalysis in non-aqueous solvents. *J. Biol. Chem.* 263, 3194-3201.