



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química



03088

4

# $\beta$ -GALACTOSIDASA EN REACCIONES DE ALCOHÓLISIS

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

TESIS que para obtener el grado de

Doctor en Biotecnología

presenta:

M. en C. José Mariano García Garibay

Asesor: Dr. Eduardo Bárzana García

México D.F. 2001



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.

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

## **Comité Tutorial**

Dr. Eduardo Bárzana García (Asesor)

Dr. Alberto Darzon Israel

Dr. Agustín López-Munguía Canales

## **Jurado de Examen**

Presidente	Dr. Armando Gómez Puyou
Vocal	Dr. Miguel Costas Basín
Vocal	Dr. Sergio Revah Moiseev
Vocal	Dr. Agustín López-Munguía Canales
Secretaria	Dra. Rosario A. Muñoz Clares
Suplente	Dr. Froylán Gómez Lagunas
Suplente	Dr. Roberto Martínez

# Capítulo 0

## Dedicatorias y agradecimientos

### 0.1. A Lorena, Leonor y Mariana

*“El amor es una forma de locura químicamente inducida”*

*Dra. Feggy Ostosky Sheht-Solís*

A lo largo de los nueve años que tardé en realizar esta tesis, la influencia de Lorena fue hermosamente omnipresente por múltiples razones. Hemos compartido ya 25 años de proyecto de vida y de proyecto académico; ésta es realmente la primera tesis que no hacemos formalmente juntos, pero sin su ayuda no hubiera podido realizarla; ella no sólo me alentó siempre para realizar el doctorado, sino que permitió que nuestras hijas, nuestra casa, nuestro laboratorio en la UAM, todo en nuestras vidas, y la misma tesis crecieran, se fortalecieran y siguieran floreciendo. Realizó sacrificios importantes para que, incluso a pesar mío, el proyecto de doctorado avanzara. Me enseñó y explicó innumerables veces enzimología, y discutimos y analizamos juntos algunos temas, porque como es bien sabido, ella es y será siempre mejor enzimóloga que yo. Muchos tendrán el orgullo y satisfacción de realizar una tesis doctoral, pero no todos tendrán la suerte y la felicidad de compartirla paso a paso con una extraordinaria mujer, que es además la mujer amada. Por eso esta tesis la dedico principalmente y antes que a nadie a Lorena, mi esposa, mi amiga.

El principal fruto de mi vida compartida con Lorena son nuestras hijas: Leonor y Mariana. Cuando nació Leonor, recibí el ofrecimiento de trabajar en la UAM, lo cuál ha sido para mi vida académica lo más relevante. Cuando nació Mariana recibí el ofrecimiento de incorporarme al proyecto que dio origen a esta tesis doctoral, lo cuál ha resultado ahora en el complemento indispensable de mi trayectoria académica. Estos hechos simultáneos son casualidades muy afortunadas que han enriquecido mi vida en todos los aspectos; así, mis hijas han

sido aliciente y motivación perfectos para mi desarrollo profesional. A lo largo de estos nueve años de doctorado, las he visto crecer y convertirse en dos niñas maravillosas. A nueve años del inicio del doctorado, Leonor está muy cerca de dejar la infancia, y Mariana continuará en ella pocos años más, pero he disfrutado su compañía, su desarrollo, su alegría y en general sus pequeñas vidas al máximo, aún a costa de prolongar el doctorado y haberlo realizarlo en nueve años. ¡Valió la pena! Para ellas todo mi amor.

Como extensión de mi familia quiero reconocer y agradecer a Claudia, quién en forma muy importante ha contribuido a este proyecto de vida familiar.

## **0.2. A mis Padres y Hermanas**

Durante el desarrollo del doctorado falleció mi padre, quién bien a bien nunca entendió la necesidad que alguien puede tener de hacer un doctorado, pero que indirectamente y de muchas maneras influyó para que yo estudiara química, ciencia de alimentos, e incluso biotecnología, aunque para él era irrelevante usar estas cosas para algo más que hacer quesos. Dedico a Su Memoria esta tesis.

A mi madre, quién ha sido siempre más comprensiva de la necesidad de hacer un doctorado. Ella siempre me apoyó, desde que cuando niño manifesté mi gusto por la química, comprensión que surgió en parte de su amor de madre extraordinaria y en parte por su naturaleza de mujer siempre inteligente y moderna. Su firmeza de carácter, su vocación por el trabajo, su interés por la cultura y el conocimiento, complementados con su disposición hacia sus hijos y su ternura fueron fundamentales para mi vida. Para ella mi admiración y mi cariño.

Para mis hermanas, mujeres inteligentes y profesionales exitosas, mi cariño de siempre. Haber compartido mi infancia con dos niñas lindas fue parte de mi felicidad; ahora el destino me ha colocado nuevamente compartiendo y amando en mi vida adulta a dos niñas lindas en un venturoso *déjà vu*. A mis hermanas les deseo que sean siempre el ejemplo y fortaleza de sus hijos Juan Carlos, Graciela, José Antonio, Eduardo y Pablo, mis sobrinos a quienes también dedico esta tesis.

## **0.3. A mi familia política**

A mis suegros (extraordinarios hombre, mujer y pareja), a mis cuñados, Carlos y Carlos, María Emilia, José Adolfo y a la Memoria de Leonor (a quién he conocido a través de Lorena), y mis sobrinos políticos, Michel, Mary Tere y Alejandra. Sea esta tesis un abrazo filial y fraternal.

#### **0.4. Al Dr. Eduardo Bárzana García**

Un excelente amigo, profesor y científico que hace más de 20 años me indujo (nos indujo... incluida Lorena) a la biotecnología, la cuál hemos adoptado como *modus vivendi*. Para Lalo, mi admiración y mi agradecimiento eternos. Gracias en particular por compartir algo de su sabiduría y brillante inteligencia, dirigiendo pacientemente un proyecto que duró, un poco inesperadamente (tal vez no tanto) tantos años.

#### **0.5. Al Dr. Agustín López-Munguía Canales**

También excelente amigo, profesor y científico, con quién he compartido éste y otros proyectos de los cuales he aprendido mucho.

#### **0.6. A mis colegas y amigos de la UAM**

Desde mi ingreso a la UAM como profesor de tiempo completo en 1988 he conocido a muchos colegas y estudiantes que han pasado por mi laboratorio; algunos en estancias muy cortas y otras con vínculos permanentes; de todos he aprendido y los recuerdo con afecto. Pero dedico en especial esta tesis a con quiénes he integrado un maravilloso equipo de trabajo: en los años que me ausenté (con estancias intermitentes) para realizar el doctorado, el laboratorio se ha consolidado gracias a la presencia, el trabajo e inteligencia de Lorena (otra vez Lorena), Alma, Judith y Gaby; a ellas, con quienes además se ha tejido una red de sana complicidad y profunda amistad mi reconocimiento por haber hecho mi estancia dispensable, mi agradecimiento por su ayuda constante y sincera, y mi afecto y admiración por su inteligencia y profesionalismo. Esta red amable abraza también a Alma Rosa y a Julieta (y por extensión natural a Toño y Samantha), y a

muchos otros que han ocupado un lugar especial (académico y afectivo) en el laboratorio.

A la Universidad Autónoma Metropolitana, mi institución, que me becó para realizar mis estudios de doctorado. A lo largo de los nueve años pasaron por la Unidad Iztapalapa diversas autoridades entre Rectores de Unidad, Directores de la División y Jefes del Departamento de Biotecnología; todos ellos me brindaron su apoyo por lo cuál expreso aquí mi agradecimiento, pero quiero en particular reconocerle al Dr. Julio Rubio Oca que durante su gestión como Rector de la Unidad puso toda su voluntad, y me apoyó más allá de lo solicitado para que este proyecto llegara a feliz término.

Muchos colegas del Departamento de Biotecnología y de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud contribuyeron a hacer este período placentero y eficiente. Por el constante aliento e impulso moral que me dieron agradezco en particular a Gustavo Viniegra y a Gerardo Saucedo. Por el apoyo siempre desinteresado y efectivo en diversas gestiones administrativas, a Esther Morán, Olga Santillán, Angélica Valencia y Dolores Valencia.

## **0.7. A mis compañeros y amigos del laboratorio y del Departamento en la UNAM**

Mi profunda gratitud en especial para Sandra, compañera y amiga del laboratorio en la Facultad de Química, quién mucho contribuyó a que el trabajo de mi tesis fluyera con eficiencia y al mismo tiempo compartimos “La Jornada” y momentos agradables. A Lupita (al inicio de mi estancia en el laboratorio), a Mónica, a Sandra N., a Bety, y a todos con quienes compartí el espacio del laboratorio durante distintos períodos, y por supuesto a Pedro. Y fuera del laboratorio a mis amigas de siempre: Carmen, Amelia y Amanda, y a todos mis compañeros y amigos del Departamento de Alimentos y Biotecnología.

## **0.8. A mi comité tutorial y jurado.**

Agradezco a ellos, cuyos nombres aparecen en una página precedente, el haber invertido su valioso tiempo para discutir conmigo este proyecto, sin más

interés o recompensa que su vocación por el quehacer universitario, y con esto haber fortalecido académicamente este trabajo, en el entendido que las fallas que pudiera tener son imputables sólo a mí y en ninguna medida a ellos.

## **0.9. Epílogo**

Nueve años es quizá un período largo para hacer un doctorado; pero en mi caso viví esta experiencia mezclada con muchos proyectos, académicos y de mi vida personal, y todo junto, simultáneo, vivido y apoyado con y por las personas que aquí he nombrado y otras cuya mención de sus nombres específicos no aparece fue muy enriquecedora. Si pudiera iniciar nuevamente el doctorado, seguiría seguramente el mismo camino.



## INDICE

Resumen.....	1
Abstract.....	3
<b>Capítulo 1. Introducción</b>	
1.1 Antecedentes y justificación.....	5
1.2 Hipótesis.....	8
1.3 Objetivo.....	8
1.4 Generalidades de las reacciones de alcoholólisis	
1.4.1 Definiciones y desarrollo.....	9
1.4.2 Papel de las enzimas, sustratos y Aceptores.....	17
1.4.3 Limitaciones y estrategias.....	22
1.4.4 Papel del agua.....	28
1.4.5 Potencial biotecnológico.....	39
<b>Capítulo 2. Resultados y discusión</b>	
2.1 Efecto de la hidratación de la $\beta$ -galactosidasa en la reacción de alcoholólisis en sistemas de una fase orgánica líquida (Effect of $\beta$ -Galactosidase Hydration on Alcohololysis Reaction in Organic One-Phase Liquid Systems).....	43
2.2 Reacciones de alcoholólisis e hidrólisis inversa en sistema de una fase orgánica con una $\beta$ -glicosidasa hipertermofílica (Alcohololysis and Reverse Hydrolysis Reactions in Organic One-Phase System with a Hyperthermophilic $\beta$ -Glycosidase).....	62
<b>Capítulo 3. Conclusiones generales y recomendaciones.....</b>	<b>78</b>
Bibliografía General.....	81

## Resumen

La alcoholólisis es un caso particular de las reacciones de transglicosidación, en las cuales el ataque nucleofílico a un disacárido es efectuado por el grupo hidroxilo de un alcohol resultando en la formación de un alquilglicósido. El presente trabajo consistió en estudiar la reacción de alcoholólisis de lactosa en un sistema de una sola fase orgánica líquida, formada por el alcohol aceptor (1-heptanol) saturada con agua, y utilizando  $\beta$ -galactosidasa como biocatalizador de la reacción.

En una primera etapa del proyecto se efectuaron reacciones de alcoholólisis con  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli*. La velocidad de la reacción fue altamente dependiente de la cantidad de agua solubilizada en 1-heptanol. En un sistema de dos fases líquidas, la velocidad de alcoholólisis fue 73% más rápida que en el sistema orgánico de una fase. Sin embargo, en el sistema de una fase no se observó hidrólisis ni del substrato (lactosa) ni del producto (heptil-galactósido), dentro de las primeras 20 horas de la reacción. La solubilidad de la lactosa aumentó a medida que se incrementaba el contenido de agua en el sistema incrementando la concentración la velocidad de la reacción, siguiendo el modelo de Michaelis-Menten. La actividad de agua ( $a_w$ ) fue estimada para el sistema de una fase con diferentes contenidos de agua utilizando un modelo publicado previamente. La actividad enzimática de la  $\beta$ -galactosidasa en la alcoholólisis resultó ser una función de la cantidad de agua adsorbida, en forma análoga al comportamiento reportado para la lisozima en ambientes de bajo contenido de agua. Se concluyó que la contribución del agua a la hidratación de la enzima es el factor que domina la velocidad de la reacción de alcoholólisis, mientras que el efecto en la solubilización de la lactosa es mucho menos importante.

Pese a que una de las bondades de las reacciones enzimáticas en sistemas orgánicos es la posibilidad de incrementar considerablemente la temperatura, la  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli* en este sistema de reacción mostró una muy pobre estabilidad térmica; de ahí que, en la segunda etapa del proyecto, se decidió explorar el uso de una  $\beta$ -glicosidasa hipertermofílica con actividad de lactasa buscando incrementar la velocidad de la reacción, y además incrementar la cantidad de lactosa disponible en forma soluble en el sistema de una fase. Cuando la reacción de alcoholólisis de la lactosa se efectuó a 37°C con la  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli*, la velocidad inicial fue de 14 nmol/ml min, pero cuando la

reacción se efectuó a 90°C con la  $\beta$ -glicosidasa hipertermofílica, la velocidad fue 3.14 veces mayor; en este caso se logró una solubilidad 6.4 veces mayor de la lactosa en el 1-heptanol saturado con agua. La  $\beta$ -glicosidasa hipertermofílica fue también capaz de realizar reacción de hidrólisis inversa utilizando tanto glucosa como galactosa como sustrato. Como consecuencia, cuando la lactosa fue utilizada como sustrato, se formó en una primera etapa el heptil- $\beta$ -galactósido como consecuencia de la reacción de alcoholísis, subsecuentemente la glucosa liberada fue consumida en la reacción de hidrólisis inversa formando el heptil- $\beta$ -glucósido. Ambas reacciones se ajustaron al modelo cinético de Michaelis-Menten. Ni la lactosa ni los heptil-glicósidos fueron hidrolizados por esta enzima en el heptanol saturado con agua. La conversión de los azúcares en heptil-glicósidos fue limitada por una fuerte inhibición por producto y la formación de oligosacáridos.

Este trabajo de tesis representa una contribución importante a la "ingeniería de solvente" en reacciones de alcoholísis y en sistemas verdaderamente orgánicos. Los resultados obtenidos permiten esclarecer el papel del agua y el mínimo grado de hidratación requerido para que la enzima tenga actividad catalítica. Específicamente establece un claro precedente en cuanto al control que el grado de hidratación de la enzima ejerce sobre la reacción, y abre la perspectiva de reacciones a altas temperaturas mediante el uso de una enzima novedosa, la cual además de permitir la reacción a un mínimo de 90°C con las ventajas que ello implica, permite realizar simultáneamente la reacción de transglicosidación e hidrólisis inversa.

## Abstract

Alcoholysis reaction is a particular case of transglycosidation reactions, in which the nucleophilic attack of the carbohydrate, catalyzed by a hydrolytic enzyme, is substituted by an alcohol leading to the formation of an alkyl-glycoside. In the current work the possibility to carry on the alcoholysis reaction of lactose using  $\beta$ -galactosidase as biocatalyst, and water saturated 1-heptanol in a one-phase system was studied.

During the first part of the study, alcoholysis reactions were performed in organic one-phase liquid systems with *E. coli*  $\beta$ -galactosidase, to produce heptyl- $\beta$ -galactoside from lactose and 1-heptanol. The reaction rate was strongly dependent on the amount of water solubilized in the alcohol. A larger amount of water led to a system of two liquid phases in which the alcoholysis rate was 73% faster than in the one-phase system. No hydrolysis reaction of either lactose or product was observed in one-phase systems up to 20 h independently of the water content. Solubility of lactose in the organic phase increased with the water content in the system and the reaction followed the Michaelis-Menten model. Water activity ( $a_w$ ) was estimated for heptanol containing different amounts of water and the obtained values were used to estimate the hydration of  $\beta$ -galactosidase from known models. Enzyme activity correlated with sorbed water, in similarity with the behavior reported for lysozyme in low water environments. It is concluded that water contribution to enzyme hydration dominates the rate of reaction compared to its effect on lactose solubilization.

In spite that one of the advantages of enzymatic reactions in organic systems is the possibility to perform reactions at higher temperatures, the  $\beta$ -galactosidase from *E. coli* in this alcoholysis reaction system had a very poor thermal stability. Consequently, in the second part of the project a hyperthermophilic  $\beta$ -glycosidase with lactase activity was studied, aiming to increase the solubility of lactose in the one-phase system and to improve the rate of reaction. When alcoholysis reaction of lactose was performed at 37°C with  $\beta$ -galactosidase from *E. coli*, the initial rate was 14 nmol/ml min, and the limiting factors were the poor solubility of the substrate in 1-heptanol and a low thermal stability of the enzyme. When a hyperthermophilic  $\beta$ -glycosidase was used at 90°C, the rate was 3.14 folds higher; in this case a concentration 6.4 folds higher of soluble lactose was available for the enzyme in the water-saturated heptanol, due to the higher temperature. The hyperthermophilic  $\beta$ -

glycosidase was also able to use glucose and galactose as substrates to achieve the reverse hydrolysis reaction. As a consequence, when lactose was used as substrate, heptyl- $\beta$ -galactoside was formed by alcoholysis, while the released glucose moiety was used in a secondary reverse hydrolysis reaction to produce heptyl- $\beta$ -glucoside. Both reactions followed Michaelis-Menten kinetics behavior. Neither lactose nor heptyl-glycosides were hydrolyzed by this enzyme in water saturated heptanol. The conversion was limited by a strong product inhibition and the formation of oligosaccharides.

This thesis work represents an important and original contribution to the “solvent engineering” concept in alcoholysis reactions in a truly organic system. It establishes the contribution of water and the minimal hydration level needed for catalytic activity of enzymes. Specifically for alcoholysis reactions, this work contributes to the knowledge on the importance of water as the main controlling factor of the reaction, and demonstrates the possibility to conduct the reactions at higher temperatures (above 90°C) using a novel enzyme. It also allows to use more efficiently the substrate by simultaneous transglycosidation and reverse hydrolysis reactions.

# Capítulo 1

## Introducción

### 1.1. Antecedentes y justificación

La alcoholólisis es un caso particular de las reacciones de transglucosidación, en las cuales el ataque nucleofílico a un disacárido es efectuado por el grupo hidroxilo de un alcohol. Un ejemplo de alcoholólisis es el que se describe en la Figura 1, donde la lactosa en presencia de heptanol, y mediante la catálisis enzimática de la  $\beta$ -galactosidasa (E.C. 3.2.1.23), es transformada en glucosa y heptil-galactósido. Esta reacción, utilizando estos mismos ingredientes tal y como se describe en el esquema de la Figura 1, es el tema central de esta tesis.

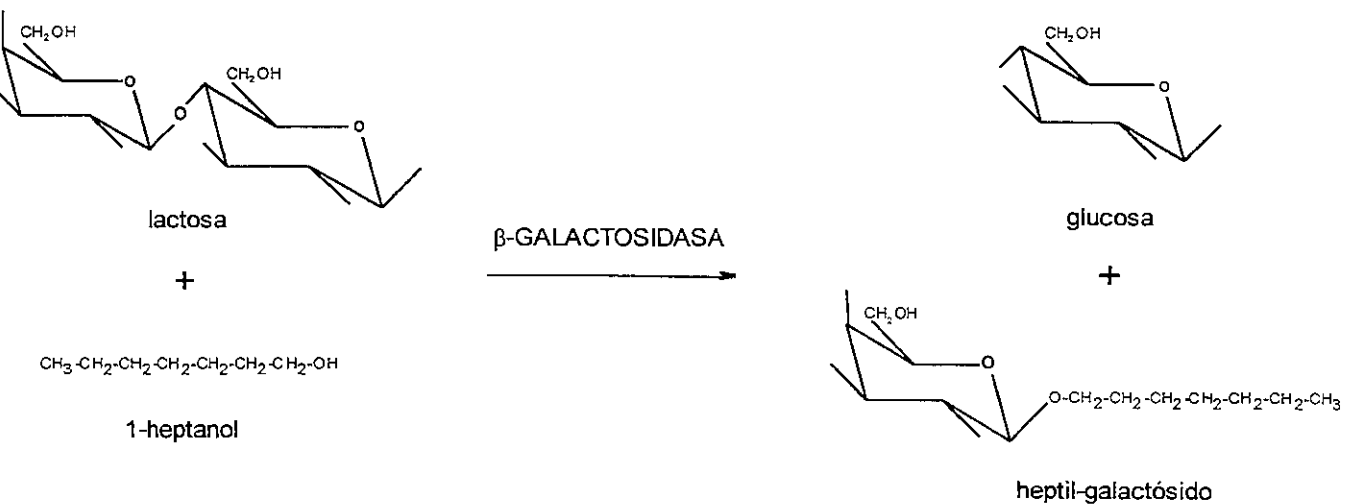


Figura 1. Reacción de alcoholólisis de lactosa con 1-heptanol como agente nucleofílico, catalizada por  $\beta$ -galactosidasa.

La reacción de alcoholólisis, precisamente con la  $\beta$ -galactosidasa, fue descrita por primera vez en 1912 (Wallenfels y Malhorta 1961). A diferencia de la reacción de hidrólisis normalmente catalizada por esta enzima en medio acuoso, el agua en la alcoholólisis es

substituida por un alcohol, dando como resultado la formación de un alquil-glicósido. Este fenómeno parece ser un comportamiento general para las enzimas hidrolíticas (Wallenfels y Weil 1972; Shinoyama y Yasui, 1988), y en los últimos 10 años o poco más ha habido un gran interés en este tipo de reacciones de transglicosidación, demostrándose que la reacción es de carácter general en lo que corresponde a diferentes enzimas hidrolíticas y sus respectivos substratos, así como a una gran diversidad de alcoholes. El interés en la síntesis de alquil-glicósidos mediadas con enzimas hidrolíticas ha sido motivado por la posibilidad que representa para la síntesis de compuestos con características surfactantes, así como de glicoconjugados de interés bioquímico y/o con actividad fisiológica, o bien para ser utilizados como aditivos en alimentos y medicamentos.

La gran mayoría de los trabajos publicados sobre reacciones de alcoholisis, incluidos los más recientes, son puramente descriptivos en términos de las posibilidades de realizarlas con diversas enzimas, substratos y alcoholes, pero muy poco han aportado en términos de los parámetros cinéticos y las condiciones que controlan la reacción. La mayoría de los artículos se limitan a reportar los rendimientos en la conversión del carbohidrato al respectivo alquil-glicósido. La limitación más importante en estos sistemas es la insolubilidad del substrato en el alcohol, particularmente si se pretende utilizar un alcohol con una larga cadena hidrocarbonada como agente nucleofílico. Esto ha llevado a que los estudios se realicen en sistemas de dos fases, donde el substrato (generalmente un carbohidrato) se solubiliza en agua para conformar la fase acuosa, y la fase orgánica es constituida por el alcohol hidrofóbico. Sin embargo, el llevar a cabo reacciones de alcoholisis en dos fases tiene el inconveniente de la presencia de un exceso de agua, lo cual promueve una competencia entre la reacción de alcoholisis y la de hidrólisis (Shinoyama y Yasui 1988; Shinoyama et al 1988; Vulfson et al. 1990a,b); por otra parte, el mismo alquil-glicósido puede ser hidrolizado por la misma actividad enzimática, disminuyendo los rendimientos de la reacción (Selisko et al. 1990; Vulfson et al. 1990a,b).

En el presente trabajo de tesis se exploró la posibilidad de llevar a cabo la reacción de alcoholisis con  $\beta$ -galactosidasa en un sistema de una fase, cosa que algunos autores habrían reportado como no factible (Tricone et al. 1991; Chahid et al. 1992). Dentro de esto, fueron considerados dos aspectos fundamentales: 1) el papel de la actividad de agua y su relación con la hidratación de la enzima, y 2) la mejora de la reacción mediante el incremento de la

solubilidad del sustrato como resultado del aumento de la temperatura, lo cual al mismo tiempo eleva la velocidad de reacción. El capítulo central de esta tesis, está integrado por dos artículos publicados en *Biotechnology and Bioengineering* en el año 2000 (García-Garibay et al. 2000a,b), los que se relacionan con estos dos aspectos centrales. En el primero se realizó un análisis detallado del papel del agua en la reacción de alcoholólisis, particularmente a través del parámetro termodinámico actividad de agua ( $a_w$ ), y en el segundo se trabajó con una enzima hipertermofílica que permitió realizar la reacción de alcoholólisis a una temperatura tan alta como 90°C, permitiendo así evaluar la capacidad del sistema para solubilizar mayores cantidades de agua y de sustrato. Es relevante mencionar que el estudio representa la primera vez que dicha enzima es empleada en reacciones de alcoholólisis.

La pretensión de este trabajo fue demostrar la posibilidad de realizar la reacción de alcoholólisis en sistemas monofásicos, como una alternativa para contrarrestar los problemas de hidrólisis de sustrato y producto, pero al mismo tiempo investigar el papel que tiene el agua sobre el control cinético de la reacción en función de la hidratación de la enzima y la solubilidad del sustrato, y también la posibilidad de mejorar la solubilidad de éste último a través de incrementos de la temperatura para aumentar la velocidad de reacción.

Las razones por las cuales se seleccionó a la  $\beta$ -galactosidasa con su respectivo sustrato lactosa fueron las siguientes: se ha demostrado que es una enzima capaz de realizar la alcoholólisis incluso con alcoholes hidrofóbicos, y en general su participación en reacciones de transglicosidación ha sido ampliamente estudiada (Prenosil et al. 1987a,b; García-Garibay y Gómez-Ruiz 1996); la enzima (particularmente la de *E. coli*) ha sido ampliamente estudiada y se conocen a fondo muchas de sus características bioquímicas y moleculares; por otra parte, hay muchas fuentes microbianas de esta enzima con diversidad en propiedades y cualidades como termoestabilidad, proclividad a la transglicosidación, peso molecular, pH óptimo, etc. (Wasserman 1984; Gekas y López-Leiva 1985; García-Garibay y Gómez-Ruiz 1996); existen varias  $\beta$ -galactosidasas comerciales ampliamente disponibles y bien caracterizadas; y finalmente, por el hecho de que la lactosa es un sustrato altamente disponible y relativamente barato a través del suero de leche, subproducto de la elaboración de queso (García-Garibay et al. 1993).



Independientemente del modelo adoptado en esta tesis, el aportar elementos que permitan entender el control cinético de las reacciones de alcoholólisis es un avance importante en este campo, pasando de un terreno meramente descriptivo a otro que permita explorar lo que ha dado en llamarse ingeniería del medio en reacciones enzimáticas y en las reacciones de alcoholólisis en particular o las de transglicosidación en general. Con certeza esto permitirá sacar mayor provecho de las enzimas hidrolíticas para su utilización en reacciones de síntesis.

## 1.2. Hipótesis

Se planteó como hipótesis del presente trabajo que la reacción de alcoholólisis puede ser efectuada en un sistema monofásico si la enzima mantiene un grado de hidratación suficiente para tener actividad catalítica. Una reducida cantidad de agua en el sistema limitará las reacciones de hidrólisis de lactosa y producto (heptilgalactósido) y conferirá mayor estabilidad térmica a la enzima.

## 1.3. Objetivo

El objetivo del presente trabajo fue estudiar a la  $\beta$ -galactosidasa en reacciones de alcoholólisis de lactosa con un alcohol hidrofóbico (1-heptanol) para la obtención de un alquilgalactósido con características de surfactante.

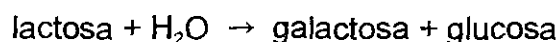
Para lograr este objetivo en principio fue seleccionada la enzima de *Escherichia coli* pero con la posibilidad de explorar otras fuentes con mayor estabilidad intrínseca. A través del conocimiento de los factores cinéticos y bioquímicos implicados en la reacción de alcoholólisis descrita en la Figura 1, se pretendió establecer condiciones adecuadas en términos de rendimiento para la síntesis enzimática de alquil-galactósidos con potencial biotecnológico. Para esto se realizó el estudio de la alcoholólisis en sistemas con baja actividad de agua, donde el objetivo fue conocer cual es la influencia de los distintos componentes (agua, alcohol, concentración de sustrato) en la factibilidad, velocidad y rendimiento de la reacción.

## 1.4. Generalidades de las reacciones de alcoholólisis

### 1.4.1. Definiciones y desarrollo

La mayor cantidad de aplicaciones de la tecnología enzimática está basada en el uso de hidrolasas para reacciones de degradación. En contraposición, las reacciones de síntesis han estado muy limitadas en aplicaciones tecnológicas, fundamentalmente porque la mayoría de las enzimas que naturalmente intervienen en ellas requieren fuentes bioquímicas de energía. Por ello no son viables fuera de la célula ante la imposibilidad de producir y regenerar cofactores en forma económicamente viable (Bárzana y López-Munguía Canales 1993). En los últimos años, la posibilidad de utilizar hidrolasas en reacciones de síntesis ha despertado gran interés en la biotecnología: lipasas, proteasas y carbohidrasas pueden efectuar reacciones "inversas" mediante la manipulación de factores que inviertan el equilibrio termodinámico (Zaks et al. 1988; Riva y Secundo 1990; Vulfson 1993). Una estrategia importante en este sentido ha sido el uso de reacciones enzimáticas en medios orgánicos o con bajo contenido de agua (Zaks et al. 1988; McEvily y Zaks 1991; Vulfson 1993), y en el marco de este panorama general se han desarrollado y estudiado con gran interés las reacciones de alcoholólisis (Vulfson 1993).

En las reacciones de hidrólisis de carbohidratos catalizadas por enzimas (llamadas carbohidrasas o glicosidasas), está implícito un ataque nucleofílico del oxígeno del agua, la cual actúa como aceptor del carbohidrato reconocido por el sitio activo de la enzima (Wallenfels y Weil 1972; Toone et al. 1989). La siguiente reacción representa la hidrólisis de la lactosa:



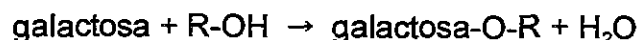
Por otra parte, el ataque nucleofílico puede llevarse a cabo por un compuesto hidroxilado distinto al agua, pudiendo ser un carbohidrato o un alcohol; estas reacciones en general reciben el nombre de transglicosidaciones (Toone et al. 1989; Cote y Tao 1990). Para el caso de la  $\beta$ -galactosidasa, este fenómeno se conoce desde hace muchos años (Pazur 1953; Wallenfels y Malhotra 1961). La reacción de alcoholólisis es un caso particular

de las transglicosidaciones, donde el aceptor es un alcohol. La alcoholólisis de la lactosa se ilustra con la siguiente reacción (ver también la Figura 1):



Las transglicosidaciones que ocurren cuando el agente nucleofílico es un carbohidrato han sido ampliamente estudiadas. En el caso de la alcoholólisis los estudios se han realizado prácticamente en su totalidad durante los últimos 13 años a pesar de que el fenómeno se reportó por primera vez en 1912 (Vulfson et al. 1990a). Eventualmente la función de aceptor del alcohol puede ser realizada por un tiol, como el mercaptoetanol, lográndose la formación de un glicósido con un enlace tioéter (Dintinger et al. 1994).

Otro fenómeno relacionado que presentan las carbohidrasas es el de las reacciones de síntesis por "hidrólisis inversa" o condensación (Toone et al. 1989; Cote y Tao 1990; Nilsson 1991). En estos casos el monosacárido actúa como sustrato y es reconocido por el sitio activo, donde la enzima lo une a un aglicón o aceptor, el cual puede ser otra molécula de azúcar o un alcohol. Estas reacciones han sido estudiadas en paralelo a las reacciones de transglicosidación y alcoholólisis desde que se reportaron los primeros resultados de estos fenómenos (Wallenfels y Weil 1972; Cote y Tao 1990). En 1912 se publicó la síntesis de alquil-glicósidos con  $\beta$ -galactosidasa (Wallenfels y Malhotra 1961), partiendo de galactosa como sustrato y etanol o propanol como aceptores (aglicones). La siguiente reacción ejemplifica la "hidrólisis inversa":



Para los propósitos de este proyecto, se considerarán reacciones de alcoholólisis tanto aquellas que ocurran por transglicosidación, como las reacciones de "hidrólisis inversa" siempre que el aceptor sea un alcohol.

La Tabla 1 enlista enzimas, sustratos y condiciones que han sido utilizados en reacciones de alcoholólisis (incluida la hidrólisis inversa) en diversos trabajos publicados en la última década y un poco antes. Los estudios en su mayoría, incluyendo informes recientes se han hecho a nivel exploratorio, es decir, para estudiar la factibilidad de la reacción con

diferentes enzimas, substratos, aceptores y condiciones. Como puede verse en la Tabla 1 las enzimas que más han sido estudiadas son la  $\beta$ -glucosidasa y la  $\beta$ -galactosidasa.

Tabla 1. Enzimas utilizadas en reacciones de alcoholisis.

ENZIMA	FUENTE	SUBSTRATO	ACEPTOR	CONDICIONES	REFERENCIA
$\alpha$ -glucosidasa	arroz	maltosa	alcoholes C1-C8, alcohol bencílico, ciclohexanol	37°C, pH 4.0, sin agitación	Shinoyama y Yasui 1988
$\alpha$ -glucosidasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	maltosa	alcoholes C1-C8, alcohol bencílico, ciclohexanol	37°C, pH 6.8, sin agitación	Shinoyama y Yasui 1988
$\alpha$ -glucosidasa	<i>S. cerevisiae</i>	maltosa	l-mentol	45°C, pH 5.5	Nakagawa et al. 1996; 1998
$\beta$ -glucosidasa	almendra	celobiosa	alcoholes C1-C8, alcohol bencílico, ciclohexanol	37°C, pH 5.0, sin agitación	Shinoyama y Yasui 1988
$\beta$ -glucosidasa	almendra	glucosa	alcoholes C5-C12, primarios	37 y 60°C	Vulfson et al. 1990a
$\beta$ -glucosidasa	almendra	metil- $\beta$ -glucósido	alcoholes C5-C8, primarios	38°C, agitación a 150 rpm	Vulfson et al. 1990b
$\beta$ -glucosidasa	almendra	glucosa o celobiosa	alcoholes 1, 2 y 3 hidroxibencílicos	40°C, con cosolventes	Vic y Thomas 1992; Vic et al. 1995
$\beta$ -glucosidasa	almendra	glucosa	alcohol 2-hidroxibencílico, octanol	40 o 45°C, con cosolvente (tert-butanol)	Vic et al 1997
$\beta$ -glucosidasa	almendra	glucosa	propanol, hexanol, octanol	60°C, en incubadora agitada	Chahid et al. 1992
$\beta$ -glucosidasa	almendra	glucosa	mono y di alcoholes C2-C6	40°C con agitación	Laroute y Willemot 1992
$\beta$ -glucosidasa	almendra	glucosa	alcoholes alifáticos C6-C12 primarios, secundarios y terciarios	50 o 60°C con agitación vigorosa	Panintrarux et al. 1995; 1997
$\beta$ -glucosidasa	almendra	glucosa	octanol	50°C, agitación 150 rpm	Ljunger et al. 1994
$\beta$ -glucosidasa	almendra	glucosa o pNP- $\beta$ -glucosa	$\beta$ -mercapto-etanol	25°C	Dintinger et al. 1994
$\beta$ -glucosidasa	almendra	glucosa o fenil- $\beta$ -glucósido	cis y trans 2-(4-metoxibencil-1-ciclohexanol	50 o 65°C, calentamiento con microondas	Zarevúcka et al. 1999

Tabla 1. Continuación

$\beta$ -glucosidasa	almendra	glucosa	hexanol, octanol	50°C, pH 5.6, enzima y glucosa en fase acuosa confinada en cápsulas poliméricas suspendidas en la fase orgánica	Yi et al. 1998
$\beta$ -glucosidasa	almendra	glucosa o celobiosa	etilenglicoles, dioles C3-C6	30°C, pH 5.2, en soluciones sobresaturadas metaestables de carbohidratos	Millqvist-Fureby et al. 1998
$\beta$ -glucosidasa	almendra	fucosa	hexanol, heptanol, octanol	50°C, pH 5.5, con agitación vigorosa	Kobayashi et al. 1999
$\beta$ -glucosidasa	<i>Aspergillus niger</i>	celobiosa	alcoholes C1-C8, alcohol bencílico, ciclohexanol	37°C, pH 5.0, sin agitación	Shinoyama y Yasui 1988
$\beta$ -glucosidasa	<i>A. niger</i>	celobiosa	metanol, etanol	50°C, pH 5.0	Yan y Liao 1998
$\beta$ -glucosidasa	homogenizado celular de <i>Sulfolobus solfataricus</i>	fenil- $\beta$ -glucósido	alcoholes C1-C8, primarios, secundarios y terciarios, alifáticos y aromáticos	75°C	Trincone et al. 1991
$\beta$ -glucosidasa	<i>Trichoderma viride</i>	celobiosa	heptanol, octanol	30°C, agitación 180 rpm	Shinoyama et al. 1991a
$\beta$ -glucosidasa y $\beta$ -galactosidasa combinadas	almendra y <i>A. oryzae</i>	lactosa	octanol	60°C, en incubadora agitada	Chahid et al. 1994
$\alpha$ -galactosidasa	café	rafinosa	L-serina protegida en amino y carboxilo	30°C, pH 6.5	Cantacuzene y Attal 1991
$\beta$ -galactosidasa	<i>Aspergillus oryzae</i>	lactosa	alcoholes C1-C8, alcohol bencílico, ciclohexanol	37°C, pH 4.0, sin agitación	Shinoyama y Yasui 1988
$\beta$ -galactosidasa	<i>A. oryzae</i>	lactosa	butanol	30-70°C, pH 4.5	Ismail et al. 1999

Tabla 1. Continuación

$\beta$ -galactosidasa	<i>A. oryzae</i>	galactosa o lactosa	etilenglicoles, dioles C3-C6	30°C, pH 5.2 en soluciones sobresaturadas metaestables de carbohidratos	Millqvist-Fureb et al. 1998
$\beta$ -galactosidasa	<i>A. oryzae</i>	lactosa o galactosa	L-serina y L-treonina protegidas en amino	35°C, pH 5.0	Nilsson y Scigelova 1994
$\beta$ -galactosidasa modificada químicamente con polietilenglicol	<i>A. niger</i>	metil- $\beta$ -galactósido	hexanol	37°C, con cosolventes	Beecher et al. 1990
$\beta$ -galactosidasa	<i>Escherichia coli</i> o <i>A. oryzae</i>	oNP- $\beta$ -galactosa	alcoholes C3-C8 secundarios mono y dioles, 1-feniletanol	30°C	Matsumura et al. 1997
$\beta$ -galactosidasa	<i>E. coli</i>	lactosa	alcoholes C1-C8, alcohol bencílico, ciclohexanol	37°C, pH 7.3, sin agitación	Shinoyama y Yasui 1988
$\beta$ -galactosidasa	<i>E. coli</i>	lactosa	mono y di oles C3-C4	25°C, pH 7.3	Crout et al. 1990
$\beta$ -galactosidasa	<i>E. coli</i>	lactosa	L-serina protegida en amino y carboxilo	30°C, pH 7.8	Cantacuzene y Attal 1991
$\beta$ -galactosidasa	<i>E. coli</i>	oNP- $\beta$ -galactosa o lactosa	C8 y C10 mono y dioles	30°C	Matsumura et al. 1991
$\beta$ -galactosidasa	<i>E. coli</i>	oNP- $\beta$ -galactosa o lactosa	butanol	37°C, pH 7.0 en sistema de micelas inversas	Moreno-Beltrán et al. 1999
$\beta$ -galactosidasa	<i>E. coli</i>	galactosa o fenil- $\beta$ -galactósido	cis y trans 2-(4-metoxibencil-1-ciclohexanol	50 o 65°C, calentamiento con microondas	Zarevúcka et al. 1999
(His) <sub>6</sub> - $\beta$ -galactosidasa	<i>E. coli</i> modificada por ingeniería genética para su fácil inmovilización	lactosa	alcohol alílico		Piesecki et al. 1993

Tabla 1. Continuación

$\beta$ -galactosidasa	<i>Kluyveromyces marxianus</i> o <i>K. lactis</i>	lactosa	mono y di oles C1-C6, glicerol, alcohol bencílico	40°C	Stevenson et al. 1993
$\beta$ -galactosidasa encapsulada en cubierta de lípido	<i>Bacillus circulans</i>	oNP- $\beta$ -galactosa	5-fenilpentan-1-ol	en CO <sub>2</sub> supercrítico a 40°C, 150 atm.	Mori y Okahata 1988
$\beta$ -galactosidasa	<i>Streptococcus thermophilus</i>	lactosa	etanol, 2-flouroetanol	40°C, pH 7.0	Stevenson y Furneaux 1996
$\beta$ -galactosidasa	homogenizado celular de <i>S. solfataricus</i>	fenil- $\beta$ -galactósido y lactosa	alcoholes C1-C8, primarios, secundarios y terciarios, alifáticos, cíclicos y aromáticos	75°C	Trincone et al. 1991
$\beta$ -glicosidasa con actividad $\beta$ -galactosidasa	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	pNP- $\beta$ -galactosa	2-hidroxietyl metacrilato	60-85°C	Santin et al. 1996
$\beta$ -glicosidasa con actividad $\beta$ -galactosidasa	<i>Caldocellum saccharolyticum</i>	lactosa o celobiosa	metanol, etanol, glicerol	65°C, pH 6.3	Stevenson et al. 1996
$\beta$ -glicosidasa con actividad $\beta$ -galactosidasa	jugo gástrico de la serpiente <i>Achatina achatina</i>	lactosa	derivados protegidos de serina, treonina e hidroxiprolina	37°C, pH 5.0	Leparoux et al. 1994
invertasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	sacarosa o fructosa	alcoholes C1-C3	25°C, pH 5.0	Selisko et al. 1990
invertasa	<i>S. cerevisiae</i>	sacarosa	alcaloides del ergot	33°C, pH 4.8-6.0	Kren 1992
invertasa	<i>S. cerevisiae</i>	sacarosa	metanol	40°C, pH 4.6	Rodríguez et al. 1996; 1997
invertasa	<i>S. cerevisiae</i>	sacarosa	etilenglicoles, dioles C3-C6	30°C, pH 5.2 en soluciones sobresaturadas metaestables de carbohidratos	Millqvist-Fureby et al. 1998
$\beta$ -xilosidasa	<i>A. niger</i>	xilobiosa	alcoholes C1-C8, primarios, secundarios y terciarios, alcohol bencílico, ciclohexanol	30°C, pH 4.0, sin agitación	Shinoyama et al. 1988; Shinoyama y Yasui 1988



Tabla 1. Continuación

$\beta$ -xilosidasa	<i>Trichoderma reesei</i>	xilosa o metil- $\beta$ -D-xilanopiranososa	alcoholes alifáticos C2-C8 primarios y secundarios, alcohol bencílico	40°C, agitación 200 rpm	Drouet et al. 1994
$\alpha$ -manosidasa	haba	manosa	D y L-serina, D y L-treonina	35 y 55°C, pH 4.3	Johansson et al. 1991
$\alpha$ -manosidasa	haba	manosa o pNP- $\alpha$ -manosa	L-serina y L-treonina protegidas en amino	25°C, pH 5.0	Nilsson y Scigelova 1994
$\alpha$ -manosidasa	haba	manosa o pNP- $\alpha$ -manosa	$\beta$ -mercapto-etanol	25°C	Dintinger et al. 1994
$\alpha$ -manosidasa	haba	manosa o pNP- $\alpha$ -manosa	alcaloides del ergot	35°C, pH 5.0	Scigelová et al. 1994
$\beta$ -manosidasa	<i>Rhizopus niveus</i>	manobiosa	alcoholes C1-C4, etilenglicol, alcohol bencílico	37°C, pH 5.0	Fujimoto et al. 1997
glucoamilasa	<i>Rhizopus oryzae</i>	glucosa	mono y di alcoholes C2-C6	40°C, con agitación	Laroute y Willemot 1992
glucoamilasa	<i>Rhizopus</i> sp.	almidón	alcoholes o, m, p-hidroxi-bencílicos	45°C, pH 5.0	Shin et al. 2000
$\alpha$ -amilasa	<i>A. niger</i> o <i>A. oryzae</i>	almidón o maltodextrinas	metanol	50, 60 y 70°C, pH 3.0, 4.0 y 5.0	Santamaría et al. 1999
$\alpha$ -amilasa mutada en Ala-289	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	almidón	metanol	60°C, pH 6.0	Saab-Rincón et al. 1999
exogalactanasa	<i>A. niger</i> var. <i>aculeatus</i>	galactano	alcoholes C1-C4, serina, treonina, cisteína	40°C, pH 7.0	Bonnin et al. 1999
exo- $\beta$ -D-gluco-saminidase	<i>Penicillium funiculosum</i>	quitosano	alcoholes alifáticos C1-C8, alcohol bencílico	30°C, pH 4.0	Matsumura et al. 1999
$\alpha$ -N-acetil galacto-saminidasa	hígado de bovino	N-acetilgalactosamina	D y L-serina, D y L-treonina	25°C, pH 4.3	Johansson et al. 1991
$\alpha$ -N-acetil galacto-saminidasa	<i>A. niger</i>	N-acetilgalactosamina	L-serina	45°C, pH 2.7-5.1	Naundorf y Ajisaka 1999

#### 1.4.2. Papel de las enzimas, sustratos y aceptores

De acuerdo a los informes recopilados en la Tabla 1, se puede establecer que las reacciones de alcoholólisis son un fenómeno general, al menos en las disacaridasas ya que hay pocos estudios con polisacaridasas. Sin embargo, la enzima, el aceptor y el sustrato juegan papeles importantes en la factibilidad, velocidad y rendimiento de la reacción, como puede corroborarse en muchos de los estudios presentados en la Tabla 1 donde se han estudiado más de uno de estos elementos para la mayoría de las enzimas.

En un estudio con diferentes enzimas, Shinoyama y Yasui (1988) mostraron que la  $\beta$ -xilosidasa de *Aspergillus niger* es muy superior a las otras probadas en reacciones de alcoholólisis. De acuerdo a los resultados mostrados por estos autores, esta enzima utiliza algunos alcoholes como aceptores preferentemente sobre el agua, obteniéndose en algunos casos conversiones del 100% (es decir, la totalidad del sustrato fue convertido en alquilglicósido). Ninguna otra enzima de las que han sido estudiadas presenta esta altísima preferencia por las reacciones de alcoholólisis.

Johansson et al. (1991) utilizaron treonina y serina como aceptores y encontraron que algunas disacaridasas fueron capaces de realizar la alcoholólisis mientras que otras no. La  $\alpha$ -N-acetilgalactosaminasa, con N-acetilgalactosamina como sustrato, y la  $\alpha$ -manosidasa con manosa fueron capaces de formar productos en reacciones de hidrólisis inversa utilizando como aceptores ambos aminoácidos en sus formas L y D; sin embargo, no hubo reacción cuando se utilizaron como sustratos monosacáridos con aglicón (reacción de transglicosidación). Las enzimas  $\beta$ -galactosidasa,  $\beta$ -xilosidasa y  $\alpha$ -galactosidasa fueron incapaces de utilizar los aminoácidos como aceptores dando resultados negativos tanto en reacciones de hidrólisis inversa como en la reacción de transferencia. Sin embargo, estudios posteriores de otros autores mostraron la factibilidad de utilizar L-serina como aceptor de la reacciones con  $\alpha$ -galactosidasa y  $\beta$ -galactosidasa (Cantacuzene y Attal 1991), L-serina y L-treonina con  $\beta$ -galactosidasa (Nilsson y Scigelova 1994), y con  $\beta$ -glicosidasa con actividad de  $\beta$ -galactosidasa (Leparoux et al. 1994), a condición de que estos aminoácidos estén protegidos al menos en su grupo amino.

Diferentes enzimas, o la misma enzima de diferentes fuentes, muestran diferencias en la especificidad del aceptor (Wallenfels y Malhotra 1961; Shinoyama y Yasui 1988). Estudios

con diferentes  $\beta$ -galactosidasas ejemplifican claramente las diferencias encontradas con distintos aceptores. Se ha publicado para  $\beta$ -galactosidasas de origen vegetal la imposibilidad de utilizar lactato y malato como aceptores (Wallenfels y Malhotra 1961). Johansson et al. (1991) encontraron que la  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli* fue incapaz de utilizar la serina como aceptor. Sin embargo, Cantacuzene y Attal (1991) obtuvieron resultados positivos con la misma enzima y serina como aceptor, pero sólo cuando bloqueaban químicamente los grupos amino y carboxilo del aminoácido. Estos autores también encontraron resultados positivos con análogos, aunque con menor efectividad al utilizar  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus* y de levadura. Podría especularse de estos datos que la  $\beta$ -galactosidasa es incapaz de utilizar como aceptores moléculas con grupos carboxílicos, pero establecer si esto es un fenómeno general requerirá de mayores evidencias. Por otra parte, un trabajo posterior (Nilsson y Scigelova 1994) reportó la posibilidad de realizar la reacción de alcoholisis con  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* usando L-treonina y L-serina protegidas solamente en el grupo amino, mas no en el carboxilo lo que contradice esta hipótesis.

Los estudios iniciales más completos sobre aceptores fueron realizados por Shinoyama y colaboradores (Shinoyama y Yasui 1988; Shinoyama et al. 1988), quienes probaron una amplia gama de alcoholes, desde solubles en agua hasta alcoholes de alto peso molecular, alcoholes primarios, secundarios y terciarios, así como alifáticos y aromáticos. Para la  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli* y la de *A. oryzae*, estos autores encontraron diferencias en los rendimientos con los diferentes aceptores entre así como con otras enzimas. Las  $\beta$ -galactosidasas mostraron ser eficientes con alcoholes solubles pero incapaces de utilizar como aceptores alcoholes insolubles alifáticos. Este hecho ha sido posteriormente contradicho por muchos trabajos utilizando  $\beta$ -galactosidasas de las mismas fuentes y alcoholes insolubles como aceptores (ver Tabla 1); muy probablemente el resultado fallido de estos autores se debió a que utilizaron un sistema de reacción sin agitación, y bajo esa condición solamente las enzimas muy proclives a la alcoholisis y bajo condiciones altamente favorables dieron resultados positivos.

En estos mismos reportes de Shinoyama y colaboradores (Shinoyama y Yasui 1988; Shinoyama et al. 1988) en que la  $\beta$ -xilosidasa mostró ser una enzima excelente para las reacciones de alcoholisis, se obtuvieron resultados más pobres a medida que se incrementó el peso molecular del aceptor con alcoholes alifáticos. Este efecto es un fenómeno general

de la alcoholólisis ya que ha sido ampliamente corroborado por muchos autores con varias enzimas (Vulfson et al 1990a; Chahid et al. 1992; Laroute y Willemot 1992; Drouet et al. 1994; Vic et al. 19915; Panintrarux et al. 1995, 1997; Yi et al. 1998; Kobayashi et al. 1999; Matsumura et al. 1999), aunque la razón de ser no ha sido demostrada, pudiéndose simplemente especular que a menor solubilidad del alcohol en agua, menor disponibilidad para el sitio activo de la enzima, ya sea por problemas de hidrofobicidad o de impedimento estérico. Vulfson y colaboradores (Vulfson et al. 1990a,b) encontraron para la  $\beta$ -glucosidasa que la velocidad y el rendimiento disminuyen a medida que se aumenta el tamaño de la cadena utilizando como aceptores alcoholes alifáticos primarios; este efecto lo atribuyen a una mayor hidrofobicidad del alcohol y por lo tanto mayor dificultad para acceder a la fase acuosa donde se encuentran el carbohidrato y la enzima. Pero esta hipótesis no explica satisfactoriamente los resultados de Shinoyama y colaboradores (Shinoyama y Yasui 1988; Shinoyama et al 1988), quienes encontraron diferencias en las disponibilidades de los aceptores independientemente de su solubilidad. Los resultados reportados por Shinoyama y colaboradores empeoraron para la  $\beta$ -xilosidasa cuando se utilizaron alcoholes secundarios, y más aún con terciarios. Trincone et al. (1991) trabajando con  $\beta$ -glicosidasa de *Sulfolobus solfataricus* encontraron que los rendimientos de producto disminuyeron a medida que se incrementó el tamaño del aceptor entre pentanol y octanol, pero las diferencias entre alcoholes primarios y secundarios no fueron muy claras. Crout et al. (1990) demostraron la selectividad de la  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli* por el hidroxilo primario sobre el secundario al utilizar dioles como aceptores; resultados similares fueron reportados por Trincone et al. (1991) para propanodiol. Esta tendencia a utilizar más favorablemente los alcoholes primarios que los secundarios, y éstos mejor que los terciarios, ha sido ampliamente demostrada en reportes posteriores (Stevenson et al. 1993; Drouet et al. 1994; Vic et al. 1995; Panintrarux et al. 1995, 1997; Matsumura et al. 1999). La razón de este fenómeno se ha especulado entre que si se trata de un problema de impedimento estérico, o un problema de solubilidad del alcohol en agua (Stevenson et al 1993), pero tampoco se han aportado evidencias que expliquen este fenómeno.

Por otro lado son sorprendentes los resultados que se han obtenido con alcoholes aromáticos: para todas las enzimas probadas por Shinoyama y colaboradores, incluyendo las  $\beta$ -galactosidasas, se obtuvieron resultados positivos en casi todos los casos con alcohol

bencílico (Shinoyama y Yasui 1988). Para la  $\beta$ -xilosidasa los rendimientos fueron del 100% cuando se utilizaron alcohol bencílico y alcohol  $\beta$ -feniletílico (Shinoyama et al. 1988). La alcoholólisis con  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli* utilizando fenol como aceptor fue demostrada hace varios años por Pridham y Wallenfels (1964). También otros autores han reportado mejores resultados con alcoholes aromáticos como aceptores, que con alcoholes alifáticos (Vic et al. 1995, 1997; Matsumura et al. 1999). Según Wallenfels y Malhotra (1961), la velocidad de síntesis de un R-O-galactósido por la  $\beta$ -galactosidasa en una reacción de transglucosidación es proporcional a la velocidad con que se hidroliza el mismo, de lo cual asumen que R ocupa la misma posición en la molécula de la enzima en ambas reacciones. Esto, extrapolado a la alcoholólisis utilizando como aceptores alcoholes aromáticos, resulta congruente entre lo reportado por Shinoyama y Yasui (1988) y el hecho de que las  $\beta$ -galactosidasas de diferentes microorganismos tienen menores  $K_m$  (mayores afinidades) por sustratos como *p*- y *o*-nitrofenil- $\beta$ -galactósido, o en general por aril- $\beta$ -galactósidos, que por la lactosa (Wallenfels y Malhotra 1961). Congruente con esto, Matsumura et al. (1991) demostraron que el rendimiento y la velocidad de reacción son mejores cuando se utiliza *o*-nitrofenil- $\beta$ -galactósido (ONPG) que cuando se utiliza lactosa para la síntesis de 8-hidroxiocetil- $\beta$ -galactósido con  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli*. Stevenson et al. (1993) atribuyen la superioridad del fenil-galactósido sobre la lactosa al carácter amfifílico del primero.

Moléculas de gran tamaño han sido también utilizadas como aceptores: Pan (1970) utilizó esteroides como aceptores en reacciones de alcoholólisis con  $\alpha$ -glucosidasa con maltosa como sustrato y logró la síntesis de estriol 16- $\alpha$ -D-glucósido. Ooi et al. (1984) utilizaron la  $\beta$ -galactosidasa de *A. niger* para glicosilar geninas utilizando fenil- $\beta$ -galactósido como sustrato. En trabajos más recientes se ha reportado la glicosilación de alcaloides de ergot con invertasa para fructosilar (Kren 1992) o con  $\alpha$ -manosidasa para manosilar (Scigelová et al. 1994). Nakagawa et al. (1996; 1998) reportaron la glucosilación del *l*-mentol utilizando  $\alpha$ -glucosidasa, y maltosa como sustrato. Zarevúcka et al. (1999) reportaron por su parte la glucosilación y galactosilación de juvenógenos (isómeros *cis* y *trans* del 2-(4-metoxibencil-1-ciclohexanol) con  $\beta$ -glucosidasa y  $\beta$ -galactosidasa respectivamente. Todos estos experimentos de reacciones de alcoholólisis usando como aceptores estas moléculas grandes, así como aminoácidos, tienen como objetivo explorar la posibilidad de glicosilar compuestos para generar o modificar alguna actividad biológica particular, lo cual se discute

posteriormente, pero por otro lado establecen la factibilidad de reacciones de alcoholisis con aceptores de gran tamaño, lo que es evidencia de que no necesariamente existe un impedimento estérico para que el aceptor tenga acceso al sitio activo, como sugiere el hecho de que a mayor tamaño de cadena del alcohol se obtenga una menor efectividad en la reacción de alcoholisis. Esto implicaría que muy probablemente la posibilidad de que un aceptor actúe como tal está en función de su afinidad al sitio activo de la enzima, lo cual permitirá el acoplamiento con el sustrato.

En cuanto a la enantioselectividad del aceptor, Crout et al. (1990) encontraron una ligera preferencia de la  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli* por el enantiómero *R* trabajando con alcoholes quirales secundarios, mientras que Matsumura et al. (1997) encontraron una alta enantioselectividad con varios alcoholes secundarios usando la misma enzima, y encontrando hasta 98% de selectividad por el enantiómero *R* cuando el aceptor fue 1-feniletanol. Estos autores también encontraron que el enantiómero *R* del 1-fenil- $\beta$ -galactósido se hidroliza mucho más rápido que el *S*, lo cual refuerza la hipótesis de que la velocidad de síntesis de un alquil-galactósido es proporcional a su velocidad de hidrólisis (Wallenfels y Malhotra 1961). Para  $\beta$ -glicosidasas de *S. solfataricus* Trincone et al. (1991) encontraron una preferencia de 95:5 del enantiómero *S* sobre el *R* cuando el aceptor fue el hidroxilo secundario del propano-1,2-diol en la transferencia de un galactósido. Por su parte, Vic et al. (1995) encontraron una alta selectividad por el isómero *R* trabajando con  $\beta$ -glucosidasa de almendra en hidrólisis inversa de glucosa y 1-fenil-etanol. Ellos suponen que esto se debe a una enantioselectividad parcial inducida por interacciones hidrofóbicas con puntos aromáticos del sitio activo de la enzima. Más allá de la especulación de estos autores, estos ejemplos de enantioselectividad refuerzan la hipótesis de que es muy importante una interacción o afinidad adecuada entre el sitio activo de la enzima y el aceptor para que se efectúe la reacción de alcoholisis.

Con relación al uso de polisacaridasas en reacciones de alcoholisis, los trabajos publicados son muy pocos, y es difícil establecer si como en el caso de las disacaridasas, se trata también de un comportamiento generalizado de estas enzimas hidrolíticas. Estos trabajos incluyen a amilasas (glucoamilasa y  $\alpha$ -amilasa), exogalactanasa y exoquitosanasa. Con excepción de la  $\alpha$ -amilasa, estas enzimas transfieren un monosacárido terminal del polisacárido, por lo cual su producto en la reacción de alcoholisis (alquil-glicósido) no difiere

de los obtenidos con las disacaridasas. De ahí que el único caso verdaderamente distinto sea el reportado para la  $\alpha$ -amilasa (Saab-Rincón et al. 1999; Santamaría et al. 1999), la cual por ser una endoenzima, transfiere oligosacáridos hasta de 7 unidades de glucosa a un alcohol aceptor (metanol). Estos autores encontraron que sólo las  $\alpha$ -amilasas de *Aspergillus niger* y *A. oryzae* son capaces de efectuar la reacción de alcoholólisis (Santamaría et al. 1999), mientras que la de *Bacillus stearothermophilus* efectuó esta función sólo cuando se mutó la alanina 289 por fenilalanina o tirosina.

Un trabajo recientemente publicado por Saab-Rincón et al. (1999) con la  $\alpha$ -amilasa mutada de *B. stearothermophilus* aporta evidencias fundamentales de la importancia de la interacción del aceptor con el sitio activo de la enzima para que se efectúen las reacciones de alcoholólisis, y en general de transglicosidación. En este trabajo pionero se demuestra que la sustitución de un aminoácido no polar y pequeño (alanina) en el sitio activo, por otro con un grupo aromático (fenilalanina) o aromático y polar (tirosina) produce cambios en la hidrofobicidad, geometría y efectos electrostáticos del sitio activo lo que incrementa la afinidad por aceptores menos polares que el agua como el metanol y grupos glicosílicos, haciendo posible que esta enzima catalice reacciones de alcoholólisis o transglicosidación, las cuales no pueden ser efectuadas por la enzima nativa. Las  $\alpha$ -amilasas nativas de otras fuentes como *A. niger* y *A. oryzae* son capaces de efectuar reacciones de alcoholólisis debido a que su sitio activo contiene tirosina o fenilalanina en lugar de los aminoácidos más pequeños (alanina, valina o serina) que tienen las  $\alpha$ -amilasas bacterianas, mismas que en su estado nativo no efectúan la reacción de alcoholólisis (Santamaría et al. 1999). Este trabajo es el primero en aportar evidencias claras sobre la influencia que tiene la hidrofobicidad y otros aspectos relacionados del sitio activo en la mayor tendencia de la enzima hacia la transglicosidación o alcoholólisis o hacia la hidrólisis como resultado de su afinidad por los aceptores (agua, alcohol o grupos glicosílicos). La afinidad variable de los sitios activos de distintas enzimas hacia aceptores de diferente polaridad (desde agua hasta alcoholes aromáticos o alifáticos de baja polaridad) puede explicar las diferencias en la efectividad de la alcoholólisis discutidas arriba para diferentes enzimas y aceptores.

#### 1.4.3. Limitaciones y estrategias

En las reacciones de alcoholólisis, en donde necesariamente coexisten el agua y el alcohol, se establece una competencia con la hidrólisis; adicionalmente, el alquil-glicósido es utilizado también como sustrato por la enzima para hidrolizarlo (Selisko et al. 1990; Ljunger et al. 1994). Esto sucede claramente cuando se utilizan alcoholes solubles en agua, donde el sistema es una mezcla de alcohol y agua en distintas proporciones. Cuando se utilizan alcoholes hidrofóbicos como aceptores, las reacciones ocurren necesariamente en sistemas de dos fases, y dado que el producto se solubiliza en el propio alcohol se minimiza el problema de hidrólisis del alquil-glicósido (Shinoyama et al. 1988; Vulfson et al. 1990a,b; Ljunger et al. 1994). Es evidente, de acuerdo a la que se comentó antes, que otra limitación en las reacciones de alcoholólisis puede ser la incompatibilidad entre el aceptor y la enzima, es decir, no todas las enzimas utilizan como aceptores a todos los alcoholes. Los mecanismos que intervienen en este fenómeno son poco claros.

Con relación a la competencia entre la alcoholólisis y la hidrólisis, los resultados reportados en sistemas de dos fases y en fase acuosa muestran que ésta ocurre con mayor o menor intensidad dependiendo de la enzima (Shinoyama y Yasui 1988; Shinoyama et al. 1988). Las razones en estos casos no se conocen y podrían ser consecuencia de distintas causas; sin embargo, es claro a la luz del trabajo de Saab-Rincón et al. (1999) y por lo discutido arriba, que la polaridad del sitio activo y su afinidad hacia los aceptores juega un papel fundamental en esta relación entre hidrólisis y alcoholólisis. Por otro lado, existe un claro efecto de partición del sustrato entre el medio de reacción y el sitio activo de la enzima (Bell et al. 1995; Torres et al. 1998); esta partición está necesariamente regulada por la polaridad del medio y la hidrofobicidad del sitio activo, de manera que 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). Esta afinidad aparente hacia el sustrato pudiera también afectar la relación hidrólisis-alcoholólisis.

Otro factor fundamental en la competencia entre hidrólisis y alcoholólisis en estas reacciones es la concentración de agua en el sistema. En los trabajos reportados por Vulfson y colaboradores (Vulfson et al. 1990a,b) la concentración de agua presente en el sistema es muy baja, lo cual podría favorecer la alcoholólisis. Chahid et al. (1992) demostraron que a medida que se incrementa el contenido de agua en una reacción de alcoholólisis con  $\beta$ -glucosidasa de almendra, el rendimiento disminuye como consecuencia del incremento de la



hidrólisis. Sin embargo, Shinoyama y colaboradores (Shinoyama y Yasui 1988; Shinoyama et al. 1988; Shinoyama et al. 1991a) utilizaron sistemas de reacción donde el alcohol ocupó entre el 25% y el 50% del volumen de reacción, y para algunas enzimas la alcoholólisis ocurrió preferentemente a la hidrólisis a pesar del alto contenido de agua; en otros casos, como con la  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli*, se encontró una clara competencia entre las dos reacciones mientras que para la  $\beta$ -galactosidasa de *A. oryzae* no se detectó reacción de hidrólisis. Los datos presentados por estos autores son muy escasos y no se proponen hipótesis, por lo cual el fenómeno requiere de mayor estudio para entender claramente los factores implicados, aunque por las diferencias presentadas por distintas enzimas independientemente de que en el sistema hubiera un alto contenido de agua, indican que esta tendencia hacia la hidrólisis o alcoholólisis está altamente relacionada con las características de la enzima discutidas arriba, y no depende solamente del contenido de agua en el sistema. Esto puede inferirse también desde estudios de transglucosidación con  $\beta$ -galactosidasas de diferentes fuentes, las cuales muestran distintas tendencias a la formación de oligosacáridos durante la hidrólisis de lactosa en sistema acuoso, pese a que las condiciones (substrato, medio acuoso, etc.) son las mismas (Prenosil et al. 1987a,b; García Garibay y Gómez-Ruiz 1996). No obstante, estudiar como variable simplemente la concentración de agua en el sistema, es una visión que puede resultar muy limitada; por eso algunos autores han propuesto que la variable realmente importante es el parámetro termodinámico actividad de agua ( $a_w$ ) (Ljunger et al. 1994; Bell et al. 1995). Sin embargo muy pocos estudios han sido enfocados desde ésta perspectiva. Considerar simplemente la concentración de agua en el sistema no aporta mucha información sobre el verdadero estado de hidratación de los componentes, ya que esta agua puede distribuirse y establecer interacciones diversas con los componentes del medio, dependiendo de la polaridad de alcohol, el substrato y la enzima (Bell et al. 1997; Vic et al 1997). Ljunger et al. (1994) y Vic et al. (1997) han realizado los únicos estudios detallados que hasta ahora han sido publicados donde se muestra el efecto de la  $a_w$  en la reacción de alcoholólisis. Trabajando con  $\beta$ -glucosidasa de almendra, con glucosa como substrato y octanol como aceptor, Ljunger et al. (1994) encontraron que a mayor  $a_w$  la velocidad de reacción aumenta pero disminuye el rendimiento, y viceversa; esto se debe por una parte a la mayor hidratación de la enzima a mayores  $a_w$ , y al equilibrio entre la reacción de síntesis del octil-glucósido y su hidrólisis. Po

lo tanto, un mayor rendimiento se obtiene reduciendo la  $a_w$ . Esta misma conclusión y resultados similares fueron obtenidos por Vic et al. (1997) trabajando con la misma enzima. Una revisión más detallada de la interacción entre enzima y agua se hace más adelante.

Una limitante importante para las reacciones de alcoholólisis en algunos sistemas es la estabilidad de la enzima frente al alcohol aceptor; esto ocurre particularmente cuando se utilizan alcoholes solubles en agua (Stevenson et al. 1993). Selisko et al. (1990) trabajando en fase acuosa con alcoholes solubles, encontraron que a medida que se incrementa la concentración del alcohol la velocidad de conversión decreció debido a la desnaturalización de la enzima. También a medida que se incrementó el tamaño del alcohol (entre metanol y n-propanol) fue mayor la pérdida de actividad de la enzima. Shinoyama y Yasui (1988) encontraron que la  $\alpha$ -glucosidasa se inactivó en presencia de alcoholes solubles, en cambio la  $\beta$ -xilosidasa resultó ser muy estable a estos compuestos. Rodríguez et al. (1997) y Santamaría et al. (1999) reportaron también la baja estabilidad de la invertasa y la  $\alpha$ -amilasa respectivamente frente al metanol utilizado como aceptor. Por otra parte no hay reportes que indiquen problemas de baja estabilidad en enzimas bajo condiciones de alcoholólisis cuando se utilizan alcoholes insolubles en agua en sistemas de dos fases. La única excepción fue reportada por Stevenson et al. (1993), quienes encontraron que en un sistema con alcohol hidrofóbico (bencílico) en presencia de un cosolvente se produce la desnaturalización de la enzima atribuyendo esta pérdida al alcohol aceptor, si bien no mencionan la posible responsabilidad del cosolvente. En los resultados reportados para sistemas de dos fases por Shinoyama y colaboradores (Shinoyama y Yasui 1988; Shinoyama et al 1988; Shinoyama et al 1991a) y Vulfson y colaboradores (Vulfson et al 1990a,b) no se encontraron problemas de desnaturalización, a menos que se utilizaran cosolventes como el dimetilsulfóxido (DMSO) (Beecher et al 1990), en cuyo caso, se utilizó una  $\beta$ -galactosidasa modificada químicamente por enlace covalente con polímeros de polietilenglicol, obteniéndose una enzima más estable.

La inestabilidad de las enzimas en reacciones de alcoholólisis frente a alcoholes solubles como el metanol, se ve agravada por la temperatura (Santamaría et al. 1999). Evidentemente, la temperatura por arriba de la óptima es un factor de inestabilidad de las enzimas; pero por otra parte, uno de los grandes atractivos y potenciales de las reacciones enzimáticas en sistemas no acuosos es la alta estabilidad térmica de las enzimas (Zaks y

Klivanov 1984; Vulfson 1993; Tuena de Gómez-Puyou y Gómez-Puyou 1998; Turner y Vulfson 2000). A pesar de ello, y dado que en las reacciones de alcoholólisis se puede limitar el contenido de agua en la mezcla de reacción, el uso de temperaturas altas en reacciones de alcoholólisis no ha sido prácticamente explorado, como puede verse en la Tabla 1, donde se observa que generalmente se utilizan las temperaturas óptimas de las enzimas. En algunos casos se han propuesto el uso de enzimas termofílicas e hipertermofílicas para reacciones de alcoholólisis a altas temperaturas (Trinconé et al. 1991; Santin et al. 1996; Stevenson et al. 1996; Yan y Liao 1998), lo que finalmente implica operar a la temperatura óptima de la enzima. Para que una enzima sea estable a altas temperaturas en un medio acuoso, la cantidad de agua en el sistema debe ser muy baja; considerando que la gran mayoría de las reacciones de alcoholólisis se han realizado en sistemas de dos fases, donde hay un exceso de agua, es tal vez comprensible que la posibilidad de trabajar a altas temperaturas, por arriba de las óptimas de la enzima, no se haya explorado en las reacciones de alcoholólisis.

El uso de solventes orgánicos con bajas concentraciones de agua limita la cantidad de sustrato (carbohidrato) disponible para la reacción, ya que éste es insoluble en los alcoholes hidrofóbicos. Debido a esto, Beecher et al. (1990) propusieron un sistema con cosolventes, donde solubilizaron el carbohidrato en dimetilsulfóxido (DMSO) y el alcohol hidrofóbico en tricloroetano. La enzima modificada químicamente como se comentó arriba, resultó ser soluble en solventes no polares y su estabilidad ante la presencia del cosolvente mejoró con relación a la enzima nativa. Otros autores han propuesto también el uso de cosolventes, lo cual les ha permitido mejorar los rendimientos de la reacción de alcoholólisis (Vic y Thomas 1992; Stevenson et al. 1993; Vic et al. 1995, 1997). En ocasiones el uso de cosolventes permite que a pesar de tener un sistema de alcohol hidrofóbico y fase acuosa, se logre trabajar en un sistema de una sola fase como el reportado por Stevenson et al. (1993), que utilizaron alcohol bencílico como aceptor. Los cosolventes en general, de acuerdo a lo que se ha reportado, provocan inactivación de las enzimas (Stevenson et al. 1993). Cosolventes empleados en altas concentraciones inducen la desnaturalización de la enzima, como el caso reportado por Vic et al. (1997) para la  $\beta$ -glucosidasa de almendra en presencia de 90% de DMSO o dimetilformamida, mientras que otros cosolventes mostraron ser poco agresivos con la misma enzima a la misma alta concentración de 90%, como el tert-

butanol, la acetona y el acetonitrilo; curiosamente, cuando la concentración de los cosolventes se redujo a 30% su efecto desnaturante se invirtió, siendo los dos primeros poco agresivos, mientras que los tres últimos resultaron altamente desnaturantes; este fenómeno es asociado por los autores con la polaridad de los solventes. Inevitablemente el uso de cosolventes modifica sustancialmente la  $a_w$  del sistema, con lo cual se vuelve muy complicado diferenciar el efecto del cosolvente en el rendimiento de la reacción en virtud de su contribución a la solubilización del sustrato, la desnaturación de la enzima y la modificación de la  $a_w$ , como ocurre en el estudio de Vic et al. (1997). Mientras que los cosolventes afectan considerablemente la  $a_w$  (Stevenson et al. 1993; Vic et al. 1997), los carbohidratos utilizados como sustratos no la deprimen considerablemente (Stevenson et al. 1993; Ljunger et al. 1994).

Un sistema interesante que prácticamente no ha sido explorado en las reacciones de alcoholólisis es el de las micelas inversas. En este tipo de sistemas la enzima se encuentra dentro de una microgota de agua rodeada de una monocapa de surfactante en un medio orgánico; manteniendo constante la concentración de surfactante, la poza de agua en el interior de la micela se puede controlar en función de la cantidad de agua introducida al sistema. Por su parte, el sustrato, si es soluble en agua, se encuentra también dentro de micelas, y la reacción enzimática ocurre cuando las micelas de sustrato y enzima colisionan intercambiando sus contenidos en un mecanismo que es más rápido que la reacción catalítica, y que por lo tanto no suele ser el paso limitante de la reacción (Tuena de Gómez-Puyou y Gómez-Puyou 1998). El sistema de micelas inversas aplicado a la reacción de alcoholólisis podría tener algunas ventajas sobre otros sistemas de reacción como el de dos fases o el uso de cosolventes, ya que en la micela inversa la enzima puede tener suficiente agua para desplegar su actividad catalítica sin que esta agua interaccione con los otros componentes del sistema, y al mismo tiempo se tiene una interface agua-alcohol hidrofóbico más alta que la que se puede lograr en el sistema de dos fases; finalmente, el producto hidrofóbico migrará al medio orgánico evitando ser hidrolizado por la enzima. Sólo existe un reporte en la literatura donde se aplica el sistema de micelas inversas a la reacción de alcoholólisis (Moreno-Beltrán et al. 1999) utilizando la  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli* con lactosa u oNPG como sustrato y octano-butanol como medio orgánico donde el alcohol actuó como aceptor. En este trabajo se demostró la factibilidad de efectuar reacciones de alcoholólisis en

sistema de micelas inversas sin que ocurriera la reacción de hidrólisis aún cuando se manejaron concentraciones de agua dentro de la micela tan altas como hasta de 40%; con altas concentraciones de agua en la micela se obtuvieron altas velocidades de reacción y alto rendimiento; el butil-galactósido formado migró hacia la fase orgánica continua, mientras que la lactosa (substrato) y la glucosa (producto de la reacción) permanecieron en la fase acuosa dentro de las micelas; se demostró además que la enzima fue más estable que en el sistema de dos fases.

Otra estrategia de “compartimentalización” de la enzima que podría ofrecer ventajas similares a las descritas para el sistema de micelas inversas, fue reportada por Yi et al. (1998) para la  $\beta$ -glucosidasa de almendra, la cual se confinó junto con la glucosa en cápsulas poliméricas permeables que se suspendieron en la fase orgánica constituida de hexanol u octanol, el cual a su vez actúa como alcohol aceptor en la reacción de hidrólisis inversa para formar el correspondiente alquil-glucósido. En este caso se obtuvieron mejores resultados en términos de velocidad de reacción y rendimiento en comparación con el sistema convencional de dos fases para la misma reacción. A partir de este sistema de inmovilización se diseñó un reactor que permitió el uso repetido de la enzima microencapsulada, una vez que las cápsulas eran recargadas con glucosa, suspendiéndolas en una mezcla de n-hexanol y solución de agua saturada con glucosa. El solvente era bombeado del reactor a una columna de alúmina para separar el producto, y nuevamente regresado al reactor previa saturación con agua.

Un aspecto importante de los sistemas de dos fases en la reacción de alcoholisis es que la separación del producto se facilita considerablemente debido a que emigra hacia la fase del alcohol. Shinoyama et al. (1988) recuperaron el hexil- $\beta$ -xilósido formado por acción de la  $\beta$ -xilosidasa, precipitándolo con acetona del hexanol. Vulfson et al. (1990a,b) recuperaron el hexil- $\beta$ -glucósido evaporando el hexanol a presión reducida. Shinoyama et al. (1991a) propusieron un sistema de recuperación de heptil- $\beta$ -glucósido por adsorción en carbón activado, con la posterior elución con propanol.

#### 1.4.4. Papel del agua

El agua, aún en bajas cantidades, es un ingrediente esencial para la catálisis enzimática: permite a la enzima desplegar movimientos conformacionales indispensables para la actividad enzimática (Klibanov 1997). Ante la idea de que las enzimas actuaban exclusivamente en sistemas acuosos, la investigación y desarrollo en tecnología enzimática se desarrollaron hasta los años 1980s fundamentalmente en soluciones acuosas, principalmente en aplicaciones de la industria alimentaria, con tan sólo aisladas exploraciones de sistemas de reacción con solventes orgánicos (Klibanov et al. 1977). A partir de la publicación de los trabajos de Zaks y Klibanov (1984; 1985) las reacciones enzimáticas en sistemas no acuosos despertaron gran interés, y hoy en día la biocatálisis no acuosa es una área de investigación consolidada. Las reacciones en sistemas no acuosos involucran medios con solventes orgánicos tanto solubles como insolubles con diferentes proporciones de agua, y la extensión del concepto a sustratos en fase gas (Bárzana et al. 1987; 1989) y a fluidos supercríticos (Hammond et al. 1985; Randolph et al. 1985). Los primeros sistemas estudiados con solventes orgánicos estaban constituidos por mezclas de agua con solventes hidrofílicos (Ingalls et al. 1975), o con solventes hidrofóbicos para formar sistemas de dos fases líquidas (Klibanov et al. 1977). No fue sino hasta la publicación del trabajo clásico de Zaks y Klibanov (1984) cuando se estableció claramente la posibilidad de efectuar una reacción enzimática con lipasa pancreática en un medio orgánico verdaderamente no acuoso: la reacción de transesterificación de tributirina con 1-heptanol, donde la primera funcionaba simultáneamente como medio de reacción y sustrato; la enzima fue adicionada como polvo, y la única cantidad de agua en el sistema era la adsorbida en la enzima. Este descubrimiento es un verdadero parteaguas en la tecnología enzimática, y estableció aspectos muy relevantes en el entendimiento de la funcionalidad de las enzimas: primero, que aunque las reacciones enzimáticas pueden realizarse en sistemas no acuosos, hay un mínimo de agua indispensable para que la enzima mantenga su actividad catalítica. Esto implica que la enzima en ausencia total de agua adopta una estructura rígida incapaz de realizar los movimientos conformacionales indispensables para la catálisis (Klibanov 1997; Tuena de Gómez-Puyou y Gómez-Puyou 1998), y por lo tanto, al menos un mínimo de agua de hidratación en la enzima permite que ésta despliegue su actividad catalítica. El segundo hecho relevante de este trabajo, relacionado con la rigidización de la estructura de la enzima en ausencia de agua, fue la posibilidad de llevar a

cabo la reacción a 100°C sin que se desnaturalizara, lo cual es factible por el hecho de que una enzima prácticamente libre de agua, o con muy bajos niveles de hidratación, se encuentra rígida, y al reducir su movilidad se incrementa su termoestabilidad en solventes orgánicos. Incluso recientemente se demostró que enzimas que requieren muy poca agua para mantener su actividad catalítica, pueden ser activas a temperaturas cercanas a 200°C (Turner y Vulfson 2000); así, a medida que se incrementa la cantidad de agua de la enzima su actividad aumenta y su termoestabilidad decrece (Tuena de Gómez-Puyou y Gómez-Puyou 1998).

Existe una clara relación entre el nivel de hidratación de una enzima, su movilidad y su actividad enzimática (Tuena de Gómez-Puyou y Gómez-Puyou 1998). El nivel de hidratación de una enzima y su relación con la movilidad y por lo tanto la actividad enzimática dependen de la composición de la proteína en términos de la polaridad de las cadenas laterales de los aminoácidos (Ling 1972), de manera que hay enzimas que son capaces de llevar a cabo reacciones enzimáticas con cantidades de agua inferiores a los necesarios para otras, es decir, diferentes enzimas tienen diferentes requerimientos de agua asociada para mantener una actividad catalítica apreciable en un medio orgánico (Tuena de Gómez-Puyou y Gómez-Puyou 1998; Turner y Vulfson 2000). La polaridad del solvente que rodea a la enzima establece una determinada capacidad de eliminar agua de la enzima, y por lo tanto influye también en la hidratación de ésta (Bell et al. 1997; Tuena de Gómez-Puyou y Gómez-Puyou 1998). Aunque por otra parte, las enzimas tienen la capacidad de ligar fuertemente una cierta cantidad de agua, la cual no es removida por los solventes (Halling 1990); esta agua fuertemente ligada a la proteína cuando ésta se encuentra en un medio orgánico no es intercambiable con el agua menos ligada o el agua libre, y es el agua que mantiene la conformación catalítica de la enzima (Lee et al. 1998). Así, como consecuencia lógica, el grado de hidratación de una enzima, y por lo tanto su movilidad y actividad no dependen de la cantidad de agua total en el sistema, sino de la cantidad de agua ligada a la enzima (Tuena de Gómez-Puyou y Gómez-Puyou 1998). De ahí que la mejor forma de establecer el nivel de hidratación de una enzima sea a través del parámetro termodinámico actividad de agua ( $a_w$ ) (Halling 1994; Bell et al. 1995) y no como contenido total de agua en el sistema, ya que esto no conduce a una interpretación real del grado de hidratación de la enzima y por lo tanto a la predicción de su actividad enzimática (Valivety et al. 1992; Ljunger et al. 1994). Por

definición la  $a_w$  determina el equilibrio de la distribución de agua entre los componentes del sistema (Bell et al 1995, 1997). También la termoestabilidad de una enzima es fuertemente dependiente de su nivel de hidratación correlacionado claramente con el valor de  $a_w$  (Turner y Vulfson 2000). Esto refuerza el hecho de que el nivel de hidratación de una enzima es altamente dependiente de su capacidad de ligar agua de acuerdo a la composición de las cadenas laterales de los aminoácidos expuestos en la superficie de la proteína, y el mejor parámetro para conocer el nivel de hidratación es la  $a_w$ . La relación entre la  $a_w$  y el nivel de hidratación se puede establecer para una proteína en particular mediante su isoterma de adsorción, como la que se muestra en la Figura 2.

La correlación entre  $a_w$  (o sus parámetros asociados presión parcial de vapor o humedad relativa) y cantidad de agua adsorbida en la proteína como se muestra en la Figura 2, ha sido establecida para diferentes proteínas desde hace muchos años (Bull 1944), y probablemente la enzima que más se ha estudiado en términos de su hidratación es la lisozima (Ling 1972; Rupley et al. 1983). Las isotermas de adsorción típicas de las proteínas tienen formas sigmoidales, que pueden dividirse claramente en tres regiones, que corresponden a estados relativos de ligamiento de agua. En la primera región (primera porción de curva ascendente a la izquierda en la Figura 2) el agua está fuertemente ligada a la proteína, en la segunda región (parte más horizontal de la curva) el agua está ligada más débilmente, y finalmente en la tercera región (línea ascendente de la derecha) el agua se comporta como agua libre o agua en exceso (Asbi y Baianu 1986). Una descripción más detallada de los niveles de hidratación de la lisozima de acuerdo a Fennema (1996) se presenta en la Tabla 2.



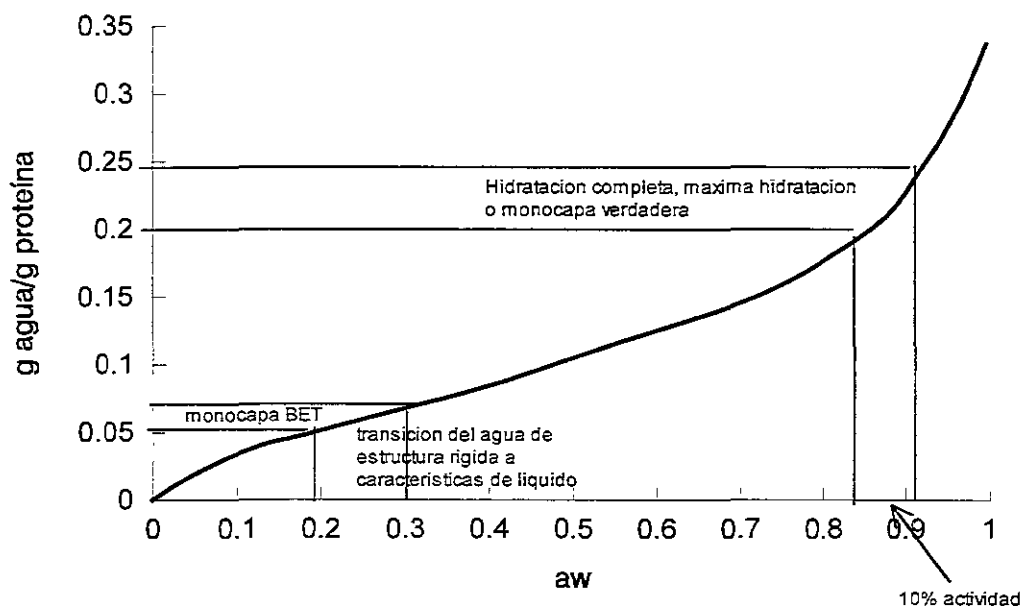


Figura 2. Isotherma de adsorción de la lisozima (basada en datos de Ling 1972).

En estudios muy detallados del nivel de hidratación de la lisozima y otras proteínas globulares utilizando diversas técnicas fisicoquímicas y moleculares, Rupley et al. (1983) establecieron que en la primera región de la curva, que corresponde a los niveles de hidratación más bajos (de 0 a 0.07 gH<sub>2</sub>O/g proteína, o 0 a 60 moles de H<sub>2</sub>O/mol de proteína) el agua está fuertemente ligada a la proteína por interacciones con los grupos cargados de las cadenas laterales de los aminoácidos; la movilidad del agua es 100 veces menor que el agua libre; no existe en esta etapa actividad enzimática. Esta agua está fuertemente ligada a la proteína, de manera que no puede ser eliminada por solventes, ni aún por los más polares como el etanol (Halling 1990); esta agua no particiona hacia el solvente y tampoco se intercambia con el agua menos ligada de los niveles superiores de hidratación cuando la enzima está en un solvente orgánico (Lee et al. 1998). A medida que se incrementa el nivel de hidratación, la movilidad del agua aumenta; al llegar al nivel superior de hidratación en esta etapa (0.07 gH<sub>2</sub>O/g proteína) el arreglo del agua en la superficie de la proteína empieza a cambiar de una estructura rígida ("sólida") a una estructura de mayor movilidad (menos ordenada) característica de los líquidos (Rupley et al. 1983). En esta región se encuentra la llamada monocapa de B.E.T. (ver Figura 2), que de acuerdo a las interpretaciones que se han hecho de este parámetro termodinámico para la hidratación de las proteínas (Bull 1944) corresponde a la cantidad de agua adsorbida necesaria para completar la primera etapa de

hidratación, y a partir de ésta se produce un cambio importante en el calor específico de adsorción del agua ( $\Delta H$ ) con relación a la siguiente etapa. De acuerdo al estudio de Rupley et al. (1983) en la segunda etapa de hidratación (que corresponde a la región de 0.07 a 0.25 gH<sub>2</sub>O/g proteína, o de 60 a 220 moles de H<sub>2</sub>O/mol de proteína), se forman y crecen agregados de moléculas de agua hasta cubrir por completo los grupos polares de las cadenas de aminoácidos de la superficie de la proteína. En esta región la movilidad de la proteína aumenta con el grado de hidratación, y para la lisozima la actividad enzimática empieza a manifestarse a partir de un nivel de hidratación de 0.20 gH<sub>2</sub>O/g proteína, que corresponde a los niveles más altos de esta etapa. A partir de 0.25 gH<sub>2</sub>O/g proteína el agua condensada rodea a las regiones no polares de la superficie de la proteína. En la tercera etapa de hidratación (de 0.25 a 0.38 gH<sub>2</sub>O/g proteína, o de 220 a 300 moles de H<sub>2</sub>O/mol de proteína) se sigue condensando agua en las regiones menos interactivas de la superficie de la proteína, la cual es agua menos ligada, y la movilidad de la proteína va en aumento a medida que aumenta el grado de hidratación en forma paralela a la actividad enzimática. A un nivel de hidratación de 0.38 gH<sub>2</sub>O/g proteína se forma una monocapa verdadera de agua que cubre la superficie completa de la proteína; a partir de este nivel ocurre la hidratación máxima o completa, el agua va adquiriendo configuración idéntica a la del agua libre al igual que su capacidad calorífica, y la movilidad de la proteína es total, es decir, despliega movimientos de dominios los cuales son cruciales para la actividad de la enzima mediante eventos que originan fuerzas fluctuantes entre la proteína y el sustrato; la lisozima presenta en este nivel de hidratación 1/10 de la actividad enzimática de la enzima diluida (Figura 2).

Tabla 2. Descripción y parámetros de niveles de hidratación de una proteína según Fennema (1996), basado principalmente en la lisozima.

hidratación en gH <sub>2</sub> O/g proteína	hidratación en moles H <sub>2</sub> O /mol proteína	hidratación en % H <sub>2</sub> O (p/p)	a <sub>w</sub>	comentarios
<0.01	<8	1	<0.02	Agua estructural. Parte crítica de la estructura de la proteína
0.01-0.07	8-56	1-6.5	0.02-0.2	Transición de agua en la superficie de ordenada a desordenada. Ligada a grupos polares. No disponible como solvente
0.07-0.25	56-200	6.5-20	0.2-0.75	Aglomeración del agua alrededor de grupos polares, dependiente de la composición de cadenas de aminoácidos. Muchas enzimas manifiestan actividad.
0.25-0.38	200-304	20-27.5	0.75-0.85	Formación de monocapa verdadera y posterior formación de multicapas. Actividad de lisozima 10% de enzima diluida
>0.38	>304	>27.5	>0.85	Agua libre (no ligada)

Los estudios reportados por Rupley et al. (1983), y en general los estudios de hidratación de proteínas reportados antes de la década de los 1990s (Asbi y Baianu 1986; Fennema 1996) están basados en estudios de hidratación de las proteínas rodeadas de medio gaseoso (aire). Sin embargo, Halling (1990) ha establecido que la evolución del proceso de hidratación de una enzima en un medio orgánico es igual al que ocurre en aire, y que el parámetro termodinámico  $a_w$  predice en ambos casos el nivel de hidratación con valores iguales para una misma cantidad de agua adsorbida. En un estudio reciente de subtilisina en tetrahidrofurano mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear, Lee et al. (1998) establecieron que existen tres estados del agua de acuerdo a su fuerza de ligamiento con la proteína: fuertemente ligada, débilmente ligada y libre. Estos tres estados evidentemente corresponden a lo que aquí se ha descrito más arriba, que no necesariamente ha sido estudiado en solventes orgánicos. De acuerdo a este estudio el agua fuertemente ligada es relativamente rígida e inmóvil, y no se intercambia con el agua de los niveles superiores de hidratación ni con el agua del medio como ocurre en un medio totalmente acuoso, donde las moléculas del agua fuertemente ligada a la proteína se intercambian con el agua libre con frecuencia de milisegundos. En contraste, el agua débilmente ligada y el agua libre si se intercambian en la proteína en medio orgánico. De acuerdo a estos autores, la capacidad catalítica de la enzima se incrementa con el nivel de hidratación en el medio orgánico no sólo por incremento de la flexibilidad de la proteína sino también por un aumento en la polaridad del sitio activo (Lee et al. 1998).

Diferentes enzimas tienen diferentes isoterms de adsorción, de manera que la relación entre  $a_w$  y nivel de hidratación es particular para cada caso (Bull 1944; Halling 1990). Por otra parte, el solvente influye en el nivel de hidratación de la enzima de acuerdo a sus características, pero sólo a los niveles altos de  $a_w$  (más allá de la zona donde el agua está fuertemente ligada a la enzima, donde el solvente es incapaz de removerla); así, los solventes no polares incrementan la cantidad de agua ligada a la enzima, mientras que solventes polares la reducen para un mismo valor de  $a_w$ ; el agua afectada en este caso corresponde a las capas secundarias de hidratación, más allá de la monocapa de B.E.T. (Halling 1990).

Cuando la enzima está rígida por un bajo nivel de hidratación en solventes 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 solventes orgánicos usados como cosolventes (Tuena de Gómez-Puyou y Gómez-Puyou 1998), los cuales en exceso pueden provocar la desnaturalización de la enzima (Vic et al. 1997).

El agua en el medio de reacción tiende a equilibrarse, no sólo entre la enzima y el medio continuo, sino con todos los componentes del sistema y el vapor de agua en la fase gaseosa que rodea al sistema (espacio de cabeza), de manera que todos los componentes del sistema alcanzarán la misma  $a_w$  (Halling 1994; Bell et al. 1995). Esta idea se representa en el diagrama de la Figura 3, tomada de Halling (1994). La competencia por el agua entre la enzima y los otros componentes del sistema y su efecto sobre la actividad catalítica pueden ser explicados mediante la  $a_w$  (Halling 1994; Bell et al. 1997). De este modo la cantidad de agua ligada a una enzima en un medio orgánico está determinada por la  $a_w$  en cualquier solvente, mientras que la actividad catalítica de la enzima está determinada por el agua ligada a la enzima independientemente del solvente. La capacidad del sistema de solvatar a otras especies químicas, como por ejemplo el substrato, también varía con la  $a_w$  (Bell et al. 1997).

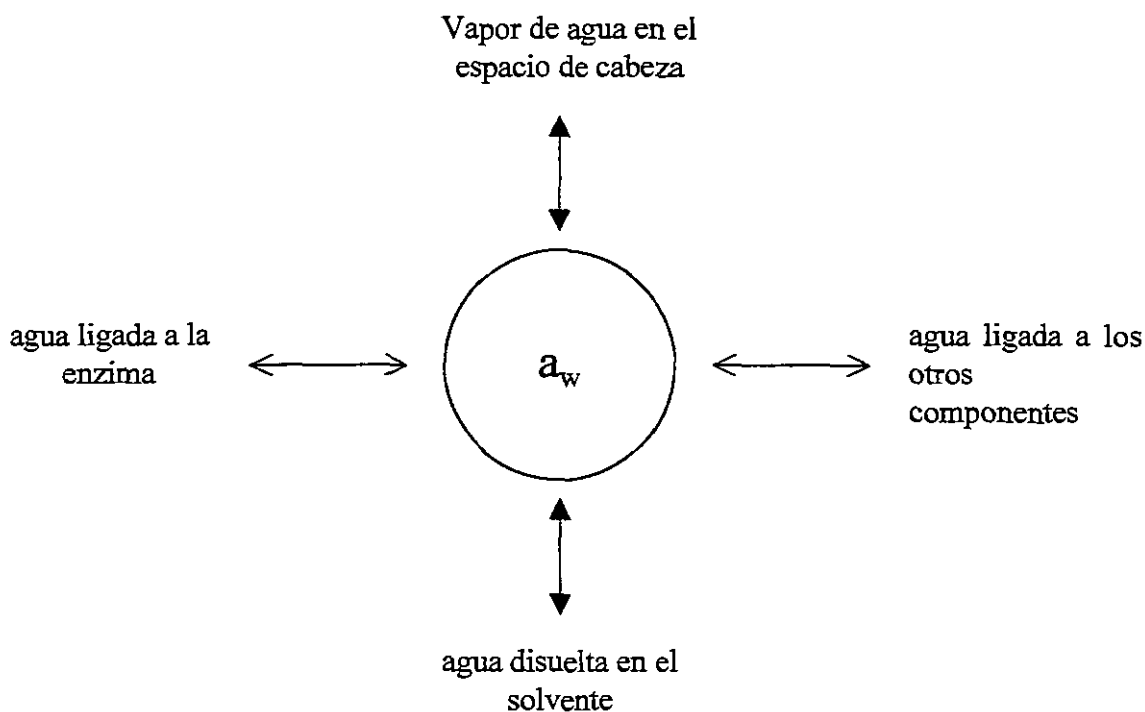


Figura 3. Esquema del equilibrio de la actividad de agua entre la enzima y el sistema en medio no acuoso (tomado de Halling 1994).

En las reacciones de alcoholólisis, como se describió arriba, se han utilizado tradicionalmente los sistemas de dos fases, lo cual implica que estos sistemas se han mantenido prácticamente en la primera etapa del desarrollo de la enzimología con solventes orgánicos, donde por lo general hay un exceso de agua y la enzima tiene por lo tanto un alto nivel de hidratación, sobretodo porque al ser las enzimas solubles en agua, particionarán preferentemente a la fase acuosa. El primer trabajo realizado en reacciones de alcoholólisis donde se intentó estudiar el papel de la  $a_w$  es el reportado por Chahid et al. (1992). Al emplear  $\beta$ -glucosidasa de almendra y glucosa como sustrato establecieron que utilizando propanol, hexanol u octanol como solvente y alcohol aceptor, en ausencia de agua adicionada se obtuvieron valores de  $a_w$  de 0.22, y bajo esa circunstancia no hubo reacción enzimática; este valor es evidentemente muy bajo de acuerdo a lo expuesto en la Tabla 2, la Figura 2 y la discusión planteada sobre los niveles de hidratación de las enzimas. En este estudio cuando se agregaron cantidades de agua suficientes para generar sistemas de dos fases, se efectuó la reacción de alcoholólisis. Estos autores midieron la  $a_w$  en los sistemas de dos fases estableciendo que a medida que aumentaba el tamaño de cadena del alcohol se obtenían valores más altos de  $a_w$  para la misma cantidad de agua adicionada; sin embargo, es difícil suponer que en un sistema de dos fases (orgánica y acuosa) la  $a_w$  sea la misma en ambas pues existe una capacidad de hidratación limitada de la fase orgánica y una cantidad de agua libre en exceso en la fase acuosa. Es cuestionable si el valor de  $a_w$  medido para el sistema realmente refleja el equilibrio de la distribución de agua y representa por lo tanto el verdadero estado de hidratación de la enzima.

Estudios de alcoholólisis donde se determinó la  $a_w$  bajo condiciones de equilibrio y medición más creíbles, son los reportados por Ljunger et al. (1994) y Vic et al. (1997), los que parecen ser hasta ahora los únicos estudios de alcoholólisis donde se ha explorado confiablemente el efecto de este parámetro termodinámico. Ambos estudios fueron realizados para la  $\beta$ -glucosidasa de almendra en la reacción de hidrólisis inversa con glucosa como sustrato. Ljunger et al. (1994) establecieron, utilizando octanol como solvente y aceptor, que se requiere una  $a_w$  mínima de 0.67 para efectuar la reacción. Por su parte, Vic et al. (1997) encontraron que se requiere al menos una  $a_w$  de 0.62 para tener actividad enzimática, y valores por encima de 0.82 favorecen la hidrólisis del producto reduciendo el rendimiento de la reacción. De acuerdo a los valores de la Figura 2 y la Tabla 2, valores de

$a_w$  de 0.62-0.67 se encuentran en la región donde el agua forma agregados de moléculas que van cubriendo por completo los grupos polares de las cadenas de aminoácidos y la movilidad de la proteína va en aumento, de ahí que muchas enzimas empiecen a desplegar actividad en esta región. Por otra parte, valores de  $a_w$  superiores a 0.85 están por arriba de la monocapa verdadera y el agua en exceso se encuentra como agua libre, lo cual explica que se dé con facilidad la hidrólisis del producto en este nivel de hidratación según Vic et al. (1997). En ambos trabajos la velocidad de la reacción enzimática aumenta a medida que aumenta la  $a_w$ . Es de esperarse que para un mismo valor de  $a_w$  los perfiles cinéticos de la reacción sean iguales independientemente del solvente, sin embargo, esto no ha sido demostrado en reacciones de alcoholisis como se ha hecho en otras reacciones en medios orgánicos (Bell et al. 1995, 1997). Esto es un claro indicio para reforzar la hipótesis de que en el artículo de Chahid et al. (1992) los valores de  $a_w$  reportados son erróneos, ya que concluyen, con la misma enzima ( $\beta$ -glucosidasa de almendra), que a medida que aumenta el tamaño de la cadena del alcohol (habiendo usado propanol, hexanol y octanol) la  $a_w$  óptima para obtener el mayor rendimiento del alquil-glucósido correspondiente se incrementa, y que finalmente se obtienen mejores resultados adicionando la misma cantidad de agua en cada alcohol, independientemente del valor de  $a_w$  resultante. Además reportan que para el caso del propanol, la  $a_w$  óptima para la reacción es 0.43, valor por debajo del mínimo reportado por los otros autores, y al cual es dudoso que pueda haber actividad enzimática por lo antes expuesto en cuanto a la hidratación de las enzimas.

De acuerdo a lo antes discutido, referente al trabajo de Saab-Rincón et al. (1999) sobre la posible relación que la polaridad del sitio activo pudiera ejercer sobre la afinidad de los alcoholes aceptores en la relación entre hidrólisis y alcoholisis, y considerando además que existe un claro efecto de partición del substrato entre el medio de reacción y el sitio activo de la enzima (Bell et al. 1995; Torres et al. 1998), debe obligadamente considerarse que la hidratación de la enzima modifica la polaridad del sitio activo (Lee et al. 1998), y por lo tanto que el nivel de hidratación o la  $a_w$  de la enzima debe influir decididamente en la tendencia o relación entre las reacciones de hidrólisis y alcoholisis. Dadas las diferencias en la composición del sitio activo de diferentes enzimas, la  $a_w$  deberá tener distintos efectos para cada una de éstas.

#### 1.4.5. Potencial biotecnológico

La tecnología enzimática se ha desarrollado tradicionalmente en el uso de hidrolasas para reacciones de degradación. En oposición, las reacciones de síntesis mediante catálisis enzimática han estado muy limitadas en aplicaciones tecnológicas, fundamentalmente porque la mayoría de las enzimas que intervienen en ellas naturalmente requieren fuentes bioquímicas de energía, y por ello no son viables fuera de la célula ante la imposibilidad de producir y regenerar cofactores en forma económicamente viable (Bárzana y López-Munguía Canales 1993). Sin embargo, a partir del desarrollo de la enzimología en medios no acuosos la posibilidad de utilizar hidrolasas en reacciones de síntesis ha despertado gran interés en la biotecnología: lipasas, proteasas y carbohidrasas pueden efectuar reacciones "inversas" mediante la manipulación de factores que inviertan el equilibrio termodinámico, típicamente el uso de reacciones enzimáticas en medios orgánicos (Zaks et al. 1988; Riva y Secundo 1990; McEvily y Zaks 1991). Particularmente para las carbohidrasas, donde se incluyen las reacciones de alcoholólisis, hay un gran potencial en síntesis enzimáticas, permitiendo reacciones más específicas en contraposición a las reacciones químicas, donde los productos obtenidos tendrán características dependientes del azúcar utilizado como sustrato y del alcohol aceptor.

En las reacciones de alcoholólisis típicas (la mayoría de las descritas en la Tabla 1), se generan alquil-glicósido compuestos de un monosacárido y una cadena hidrocarbonada de tamaño mediano o grande. Desde el punto de vista industrial, existe potencial para estos compuestos como surfactantes y tensoactivos si los alcoholes usados como aceptores son suficientemente hidrofóbicos. Estas moléculas resultan interesantes desde el punto de vista industrial, entre otras cosas por ser biodegradables y no tóxicas (Nilsson et al. 1998). Compuestos formados por carbohidratos y cadenas hidrocarbonadas son utilizados como biosurfactantes en la industria petrolera, en la industria química, en bioremediación (Van Dyke et al. 1991), y en las industrias alimentaria, farmacéutica y de cosméticos (McEvily y Zaks 1991; Van Dyke et al. 1991). Algunos alquil-glicósidos son utilizados en estudios bioquímicos de membranas celulares (Shinoyama et al. 1991a,b), y se manejan como productos químicos especializados de alto costo; por ejemplo, el octil-glucósido es un agente solubilizante de proteínas de membrana (Rosevear et al. 1980).



Los ésteres de ácidos grasos de sacarosa u otros azúcares han tenido un gran auge como emulsificantes en alimentos para lo cual se ha invertido un gran capital en investigación y desarrollo que ha conducido a una fuerte expansión del mercado (Krog 1990; Vulfson 1993). Estos se sintetizan por reacciones de transestrificación química en dimetilformamida, lo cual, aunado a la formación de subproductos, limitan sus aplicaciones (Krog 1990; McEvily y Zaks 1991). Una alternativa para evitar estos problemas y la falta de selectividad es la síntesis enzimática, opción que se ha explorado a través de transesterificaciones con lipasas en medios orgánicos (McEvily y Zaks 1991; Vulfson 1993). Adicionalmente, los alquil-glicósidos sintetizados con carbohidrasas son otra alternativa para la síntesis de compuestos con la misma aplicación, aunque el uso de lipasas en medios orgánicos ha recibido mayor atención que el uso de glicosidasas para la síntesis de emulsificantes (McEvily and Zaks 1991; Vulfson 1993; Ljunger et al. 1994). Sin embargo, los alquil-glicósidos tienen algunas ventajas sobre los ésteres de azúcares, como ser más estables en condiciones alcalinas (Ljunger et al. 1994).

Las características surfactantes y tensoactivas de estas moléculas surgen de las características anfifílicas dadas por el carbohidrato que provee una cabeza hidrofílica, y la cadena hidrocarbonada del alcohol que constituye la cola hidrofóbica. En la gran mayoría de los casos la porción del carbohidrato está constituida por un monosacárido, aunque hay trabajos donde el carbohidrato involucrado es un oligosacárido (Saab-Rincón et al. 1999; Santamaría et al. 1999). Es evidente que algunas características específicas dependerán de estos dos elementos; en el caso del carbohidrato no hay estudios que describan como se afectan las características tensoactivas u otras propiedades del alquil-glicósido cuando en lugar de un monosacárido la molécula está integrada por un oligosacárido. En cuanto a las características de la cadena hidrocarbonada, las variantes son prácticamente infinitas en cuanto a longitud y estructura, y obviamente tienen una influencia muy importante sobre las características de la molécula. Comparando cadenas hidrocarbonadas rectas con cadenas ramificadas constituidas por el mismo número de carbonos se ha encontrado que estas últimas tienen menor capacidad de formación de espuma, y que hay diferencias en la forma de agregarse o empaquetarse (Nilsson et al. 1998). Comparando cadenas hidrocarbonadas de similar tamaño unidas a distintos monosacáridos, no se han encontrado diferencias substanciales en la actividad surfactante. Por ejemplo, Shinoyama et al. (1991b) evaluaron

las propiedades surfactantes del heptil- $\beta$ -xilósido, encontrándolas similares a las del octil- $\beta$ -glucósido. Por otra parte, el enlace glicosídico en los alquil-glicósidos puede ser  $\alpha$  o  $\beta$  dependiendo de la especificidad de la enzima que catalice su formación; esta característica no es irrelevante desde el punto de vista de su aplicación como tensoactivo, ya que algunas propiedades fisicoquímicas como la concentración micelar crítica, la estructura de los agregados, la formación de cristales o estructuras amorfas, etc., varían entre los dos enantiómeros (Nilsson et al. 1998).

Más allá de la aplicación de los alquil-glicósidos como tensoactivos, las reacciones de alcoholólisis tienen un gran potencial en la formación de glicoconjugados con actividades biológicas. En estos casos, en lugar de un alcohol simple, el aceptor es una molécula compleja o con estructura específica que confiere alguna determinada función biológica al producto resultante, bajo la condición de que tenga un hiroxilo que actúe como aceptor en sustitución del alcohol. Esta clase de glicoconjugados pueden tener muy diversas funciones biológicas como: propiedades terapéuticas, inmunológicas, herramientas de diagnóstico, adhesión celular, comunicación inter e intracelular, etc. (Dintinger et al. 1994; Bonnin et al. 1999), y tienen tal importancia que su estudio y aplicación pertenecen a una rama de la ciencia para la cual se ha acuñado el término de glicobiología. La gran ventaja de utilizar la reacción enzimática de alcoholólisis para la síntesis de estos compuestos es que es estereoselectiva y pueden obtenerse productos de alta pureza enantiomérica, en contraposición a la síntesis química, donde además se vuelve necesario proteger grupos reactivos que no se desea que intervengan en la reacción (Zarevúcka et al. 1999). Adicionalmente, las condiciones de las reacciones enzimáticas son moderadas y con esto se minimiza la posibilidad de obtener subproductos indeseables (Scigelová et al. 1994).

Dentro de las moléculas con actividades biológicas se encuentran las glicoproteínas, en las cuales el carbohidrato actúa como receptor específico para células y proteínas *in vivo* en diferentes procesos, y dan a la proteína mayor estabilidad (Cantacuzene y Attal 1991; Nilsson y Scigelova 1994). El carbohidrato se une generalmente a serina o treonina, de ahí que muchos estudios de alcoholólisis han tenido como objetivo unir distintos azúcares a estos aminoácidos utilizando diferentes glicosidasas que permiten una síntesis enantioselectiva ( $\alpha$  o  $\beta$ ) (Cantacuzene y Attal 1991; Johansson et al. 1991; Leparoux et al. 1994; Nilsson y Scigelova 1994; Bonnin et al. 1999; Naudorf y Ajisaka 1999).

Existen glicósidos de terpenoides y esteroides con actividad fisiológica, los cuales pueden ser sintetizados por reacciones de alcoholisis como ha sido demostrado por Par (1970) y Ooi et al (1984). La actividad fisiológica y biodisponibilidad de estos compuestos dependen del tipo y posición del azúcar unido, de ahí que reacciones de glicosilación pueden tener una importante aplicación en el diseño de estas sustancias con actividad farmacéutica (Ooi et al. 1984).

Se ha reportado también la fructosilación y la manosilación de alcaloides del ergo mediante reacciones de alcoholisis; estas sustancias tienen importantes aplicaciones farmacéuticas, como el tratamiento de migraña, hipertensión y mal de Parkinson, así como actividad inmunomoduladora (Kren 1992; Scigelová et al. 1994).

Nakagawa et al. (1996; 1998) reportaron la glucosilación del l-mentol utilizando  $\alpha$ -glucosidasa, y maltosa como substrato para obtener mentil- $\alpha$ -glucósido ( $\alpha$ -MenG). Esta transformación permite obtener un compuesto más soluble en agua y menos volátil, lo que permite mantener el sabor refrescante del mentol por tiempos más largos, mejorando su utilidad como aditivo alimentario. El enantiómero  $\beta$ -MenG, aunque se encuentra naturalmente en las hojas de la menta, tiene un sabor ligeramente amargo y sabor menos dulce y refrescante que el  $\alpha$ -MenG; de ahí que estos autores hayan buscado la síntesis específica del enantiómero  $\alpha$  mediante el uso de la  $\alpha$ -glucosidasa (Nakagawa et al. 1998).

Zarevúcka et al. (1999) reportaron la glucosilación y galactosilación de juvenógenos análogos biológicamente activos de hormonas juveniles de insecto, los cuales tienen aplicación potencial en el control de pestes de insectos.

## Capítulo 2

### Resultados y discusión

#### 2.1. Efecto de la hidratación de la $\beta$ -galactosidasa en la reacción de alcoholísis en sistemas de una fase orgánica líquida

Esta etapa del proyecto describe reacciones de alcoholísis con  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli*, en sistemas monofásicos, y con fines de comparación en un sistema de dos fases líquidas. La velocidad de la reacción fue altamente dependiente de la cantidad de agua solubilizada en 1-heptanol. Cuando una cantidad de agua superior a la necesaria para saturar el alcohol se agregaba al sistema, éste resultaba en un sistema de dos fases líquidas, con una velocidad de alcoholísis 73% más rápida que en el sistema orgánico de una fase. Sin embargo, en el sistema de una fase no se observó hidrólisis ni del sustrato (lactosa) ni del producto (heptilgalactósido), dentro de las primeras 20 horas de la reacción, lo cual ocurre comúnmente en sistemas de dos fases, de acuerdo a lo reportado en la literatura. Una limitante importante en el sistema de una fase fue la solubilidad de la lactosa, la cual, sin embargo, aumentó a medida que se incrementaba el contenido de agua en el sistema dentro de los límites de saturación; al incrementar la concentración de lactosa en el medio se incrementaba la velocidad de la reacción, siguiendo el modelo de Michaelis-Menten. La actividad de agua ( $a_w$ ), parámetro termodinámico característico, fue estimada para el sistema de una fase con diferentes contenidos de agua utilizando un modelo publicado previamente para reacciones enzimáticas en medios orgánicos. A partir de los valores de  $a_w$  obtenidos se estimaron los niveles de hidratación de la  $\beta$ -galactosidasa. La actividad enzimática de la  $\beta$ -galactosidasa en la alcoholísis resultó ser una función de la cantidad de agua adsorbida, en forma análoga al comportamiento reportado para la lisozima en ambientes de bajo contenido de agua. De esta parte del trabajo se concluyó que la contribución del agua a la hidratación de la enzima es el factor que domina la velocidad de la reacción de alcoholísis, mientras que el efecto en la solubilización de la lactosa es mucho menos importante. Este trabajo es una contribución importante a la "ingeniería del solvente" en reacciones de alcoholísis. Los resultados establecen el papel del agua y el mínimo grado de hidratación requerido para que la enzima tenga actividad catalítica.

Effect of  $\beta$ -galactosidase hydration on alcoholysis  
reaction in organic one-phase liquid systems  
(Artículo publicado en: Biotechnology and  
Bioengineering 70(6), 647-653; 2000)

Mariano García-Garibay<sup>1,2</sup>

Agustín López-Munguía<sup>3</sup>

Eduardo Barzana<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 04510, México.

<sup>2</sup>Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, México D.F. 09340, México.

<sup>3</sup>Departamento de Bioingeniería, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca Mor. 62210 México.

Correspondence to: Eduardo Barzana

telephone: +(52)5622-5310; fax +(52)5622-5345; e-mail: ebg@servidor.unam.mx

**Running title:** Effect of enzyme hydration on alcoholysis reaction

**Abstract:** Alcoholysis reactions were performed in organic one-phase liquid systems with *E. coli*  $\beta$ -galactosidase, to produce heptyl- $\beta$ -galactoside from lactose and 1-heptanol. The reaction rate was highly dependent on the amount of water solubilized in the alcohol. A larger amount of water led to a system of two liquid phases in which the alcoholysis rate was 73% faster than in the one-phase system. No hydrolysis reaction of either lactose or product was observed in one-phase liquid systems up to 20 h independently of the water content. Solubility of lactose in the organic phase increased with the water content in the system and the reaction followed the Michaelis-Menten model. Water activity was calculated for heptanol containing different amounts of water and the obtained values were used to estimate the hydration of  $\beta$ -galactosidase from known models. Enzyme activity correlated with sorbed water, in similarity with the behavior reported for lysozyme in low water environments. It is concluded that water contribution to enzyme hydration dominates the rate of reaction compared to its effect on lactose solubilization.

**Keywords:** alcoholysis,  $\beta$ -galactosidase, glycoside synthesis, water activity, enzyme hydration.

## INTRODUCTION

$\beta$ -Galactosidase (E.C. 3.2.1.23), a glycolytic enzyme, catalyzes the hydrolysis of lactose in water to yield glucose and galactose. When the water is substituted for an alcohol, an alkyl-galactoside is obtained and glucose is released as by-product. This is an example of an alcoholysis reaction. A similar reaction is the reverse hydrolysis in which an enzyme promotes the condensation between a monosaccharide and an alcohol leading also to the formation of an alkyl-glycoside with the release of water. An alcoholysis reaction catalyzed by  $\beta$ -galactosidase was first described in 1912 (Wallenfels and Malhotra, 1961). Since then, it has been widely proved that glycosidases catalyze the synthesis of alkyl-glycosides under conditions enabling either alcoholysis or reverse hydrolysis reactions. These evidences have been an incentive to use hydrolytic enzymes for the synthesis of compounds with surfactant properties and stable even under alkaline conditions (Ljunger et al., 1994).

Many reports on enzymatic synthesis of glycosides have been published recently. However, most of them are purely descriptive in terms of using different combinations of enzymes, substrates or alcohols. Also, the general strategy has relied upon the use of a

system with two liquid phases made up of a hydrophobic alcohol and water that maintains the sugar and the enzyme in solution. No attempts have been reported concerning the determination of kinetic parameters, the conditions that control alcohol mediated reactions, or the key competitive hydrolysis of sugar substrates or products. To minimize these side and undesirable reactions, organic one-phase liquid systems have been attempted. However, Trincone et al. (1991) and Chahid et al. (1992), could not detect glycoside synthesis in an alcohol phase with no water, while the reaction was possible when enough water was present to form a distinct aqueous phase.

This paper demonstrates that the alcoholysis reaction of 1-heptanol and lactose is feasible in an organic one-phase liquid system as long as enough water is available to the enzyme. A description of the interactions of water with the rest of the components, and the effects on the rate, is also presented.

## **MATERIALS AND METHODS**

### ***Chemicals***

$\beta$ -Galactosidase from *Escherichia coli* (lyophilized grade VIII) was used after rehydrating 5,000 units of lactase (nominal activity from the supplier) with 5 ml phosphate buffer (0.1 M, pH 7.0); this working enzyme solution was added to the reaction mixture as specified. Heptanol was used both as solvent and as the nucleophilic alcohol and  $\beta$ -D-lactose was used as sugar substrate. 1-Heptyl- $\beta$ -glucoside was used as standard for TLC and spectrophotometric determinations. All reagents were from Sigma Chemical Co., (St. Louis, MO).

### ***Solubility of Water in Heptanol***

To determine the saturation level of water in 1-heptanol at 37°C, equal amounts of heptanol and water were magnetically stirred for 5 min in a flask maintained in a water bath at the temperature. The phases were allowed to separate for 1 h and a sample from the heptanol phase was withdrawn with a syringe and injected into the Karl Fisher titrator. This stirring and resting procedure proved to be sufficient to reach equilibrium as measured by Karl Fisher method and amounted to 5.8% water in 1-heptanol at 37°C.

## **Reactions**

The reaction was performed in 50 ml Erlenmeyer flasks sealed with screw caps. Every flask contained 20 ml of 1-heptanol supplemented with specified amounts of distilled water. Lactose was added in as a solid either exceeding the solubility limits in heptanol (0.15 g equivalent to 0.44 mmoles) or at the indicated amounts achieving totally dissolved lactose conditions.

The reaction was started by adding 0.1 ml of working enzyme solution (equivalent to 100 units of lactase and 0.099 mg protein) to the flask, and incubated in a controlled temperature bath at  $37\pm 1^\circ\text{C}$  (Haake E52, Berlin). The additional 0.1 ml water was taken into consideration in the reported water contents. To prevent the formation of a second water phase, for reactions at water saturated conditions, 1.06 ml distilled water was added to 20 ml heptanol before addition of 0.1 ml enzyme solution (i.e. 5.8% total water). With such procedure there was no enzyme precipitation. Once the enzyme solution was added, a clear, stable, and homogeneous alcohol liquid phase was obtained that remained stable during reaction. This was true for all cases except when lactose in excess was used since it implied handling an intrinsically turbid solution. Agitation was provided with a magnetic stirrer placed under the water bath. For the two liquid phases reaction experiments, 1.6 ml of water and 0.15 g of lactose were added to 20 ml of heptanol; other conditions were kept unchanged.

## **Analyses**

Water content in heptanol was determined with a Karl-Fisher coulometric titrator (Aquatest 8, Photovolt, Indianapolis).

To monitor the reaction, 1 ml samples were withdrawn from the flasks at time intervals, mixed twice in vortex with 0.5 ml water, to extract remaining lactose or glucose from the heptanol, and heated 5 min in a boiling water bath to stop the enzymatic reaction. The resulting mixture was centrifuged (5000 rpm, 15 min) in a clinical centrifuge (International Equipment Company, Needham, MA) to separate the phases. Heptyl-galactoside remained totally in the heptanol phase and was free from sugars (by TLC) after water extraction, as Shinoyama et al. (1988) and Vulfson et al. (1990a) established previously for hexyl-glycosides. Then, heptyl-galactoside soluble in heptanol was determined by the cuproammonium technique as reported by Vulfson et al. (1990a). Remaining glucose extracted into the aqueous phase was determined with a glucose oxidase-peroxidase (GOP)



kit (Spinreact, Gerona, Spain). Lactose solubility in heptanol was also determined by the cuproammonium technique. A Perkin Elmer Lambda 2 UV/VIS spectrophotometer (Ueberlingen, Germany) was used for both cuproammonium and GOP methods. The relative presence of heptyl-glycosides and lactose, glucose or galactose in both heptanol and water phases was established by TLC on 5x10 cm silica gel sheets (Sigma Chemicals, St. Louis) as reported by Shinoyama et al. (1988).

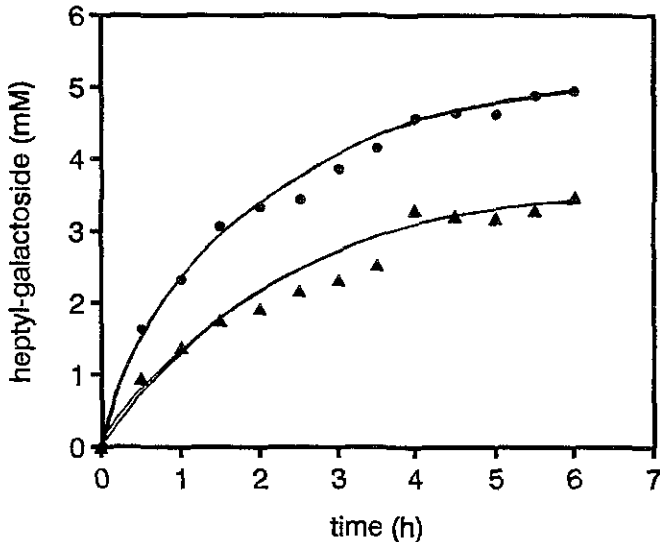
## RESULTS AND DISCUSSION

### *Alcoholysis Reactions*

When heptanol saturated with water (5.8%) was used as one phase reaction medium, heptyl galactoside was detected after only 0.5 h of reaction and accumulated steadily during the length of the experiment. This is shown in Figure. 1 and demonstrates that alcoholysis is possible in an organic system with one liquid phase provided that enough water is available to activate the enzyme. For comparison, the reaction was also conducted with an excess of water to conform a two-phase system, but with the rest of conditions constant including 0.14 g of lactose. It was observed that the system with two liquid phases promotes higher initial rate and final product concentration, though the differences are not dramatic. However, no studies were conducted at this stage on the development of undesirable hydrolytic reactions especially at long reaction times.

Several authors have demonstrated the possibility to perform the alcoholysis and reverse hydrolysis reactions in systems with two liquid phases using water-insoluble alcohols (Beecher et al., 1990; Chaid et al., 1994; Drouet et al., 1994; Stevenson et al., 1993; Trincone et al., 1991; Vulfson et al., 1990a,b). For  $\beta$ -galactosidase, Shinoyama and Yasuda (1988) reported that enzymes from *E. coli* and *Aspergillus niger* were unable to synthesize the respective alkyl-galactosides from lactose and either 1-hexanol or 1-octanol even when using a two-phase liquid system. Their results clearly dissent with our observations very likely because these authors maintained their system unstirred. Our preliminary experiments showed that stirring was beneficial for the alcoholysis reaction to proceed; otherwise alcoholysis is retarded and lactose hydrolysis predominates after long reaction times with low yield of glycoside. Other reports mention that alcoholysis was not detected in one-phase non-hydrated, liquid organic systems (Chahid et al., 1992; Trincone et al., 1991). Clear-

prehydrating heptanol within the limits of saturation and conducting the reaction in a stirred system promotes the alcoholysis reaction.

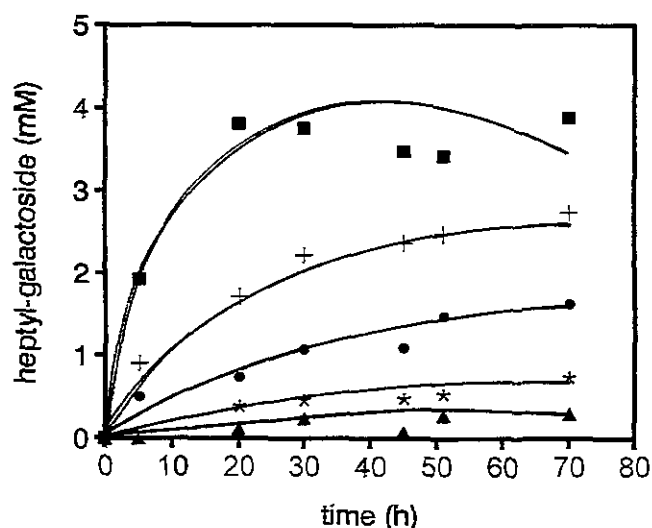


**Figure 1.** Comparison between one liquid phase (▲) and two liquid phases (●) systems for alcoholysis reaction with *E. coli*  $\beta$ -galactosidase at 37°C. The amount of lactose in both systems was 0.15 g and the enzyme concentration was  $8.75 \times 10^{-6}$  mmol/l in a total reaction volume of 20 ml.

Figure 2 shows that the initial rate increases with water content at values below the saturation level. Indeed, when no or very little water was present (0.5%) the reaction was nil or marginal. This explains the lack of reaction observed by Trincone et al. (1991) and Chahid et al. (1992), as well as the higher rate observed in Figure 1 when an excess water formed a distinguishable second phase. It is also consistent with reports for other enzymes acting in one liquid phase organic systems (Dordick, 1992; Halling, 1994; Monot et al., 1991; Tuena de Gomez-Puyou and Gomez-Puyou, 1998; Valivety et al., 1992). Although a higher rate and yield were observed when water in excess is present to develop a second phase, the study of the system with a single phase was of interest to further understand the role of water in the reaction. Also, it represents a promising mean to inhibit or reduce lactose and product hydrolysis in long term production runs.

For the experiments shown in Figure 2, no hydrolysis (lactose or glycoside) was detected up to 20 h, at any water content. However, for the run at 5.8% water (saturation), product concentration reached a maximum and started to decrease between 20 and 50 h. This result suggested that product loss was due to enzymatic hydrolysis. This proved to be

the case when TLC analysis showed the appearance of galactose after 20 h for all reactions for experiments with water above 3.2%. This appearance matched the time of product drop shown in Figure 2. Probably, the product concentration for the low water levels was not sufficient for its hydrolysis to occur. It seems then that product hydrolysis is dependent on the product to lactose ratio. Similar results were reported by Drouet et al. (1994) when working with  $\beta$ -xylosidase mediated alcoholysis. They found that product hydrolysis took place after several hours of reaction when higher amounts of product had accumulated. Other authors working with almond  $\beta$ -glucosidase have reported that hydrolysis of alkyl-glycoside takes place when high water activities are present in the medium (Ljunger et al., 1994; Vic et al. 1997), though the substrate is resistant to hydrolysis.

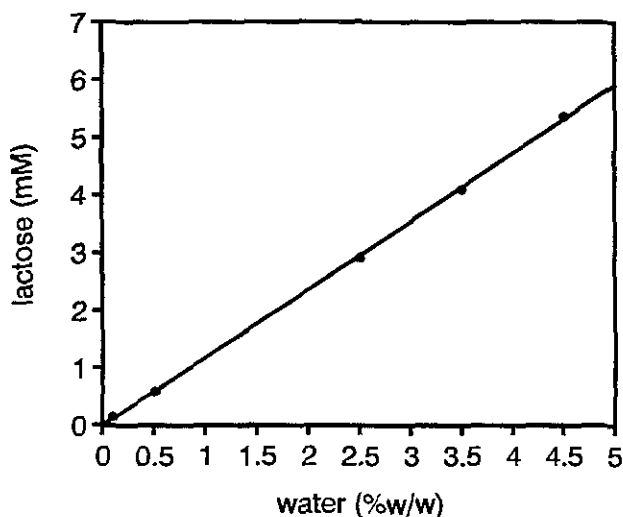


**Figure 2.** Effect of water concentration on alcoholysis reaction with *E. coli*  $\beta$ -galactosidase ( $8.75 \times 10^{-6}$  mmol/l) in one liquid phase systems at 37°C. Lactose was added in excess (0.15 g) in all cases in a total reaction volume of 20 ml. Added water was: 5.8% (■); 4.6% (+); 3.2% (●); 1.9% (★) and 0.5% (▲).

### **Lactose Solubility**

Previous reports have established that water affects the rate and yield of a variety of alcoholysis reactions with sugars (Beecher et al., 1990; Ljunger et al., 1994; Vulfson et al. 1990a). However, water content affects also lactose (or sugar substrate) solubility and hence may influence the rate in proportion to the amount of available substrate to the enzyme. We first investigated the variations in lactose solubility as a function of soluble water in heptanol at 37°C. To that end, heptanol was hydrated with precise amount of water and lactose i

excess was added. After stirring at 37°C for 20 min and allowing the solid lactose to settle, samples of heptanol were analyzed. The results for the working range (0 to 4.5% water) are shown in Figure 3. It is observed that solution of lactose in pure heptanol increases linearly as the water level reaches saturation. This could explain why no reaction occurs when anhydrous heptanol is used, as reported by other authors. In all the one liquid phase systems (Figure 2), a part of the added lactose remained insoluble, since a solid suspension of the sugar was clearly observed in the flasks. Only after water was solubilized, lactose was continuously transferred into the organic phase to replenish the amount converted to product. It is then clear that an important limitation of this system is the solubility of lactose. In contrast, for the two phase system (Figure 1) all the 0.15 g of lactose were completely solubilized in the aqueous phase, and alcoholysis proceeded very probably via the transfer of heptanol molecules into this phase.

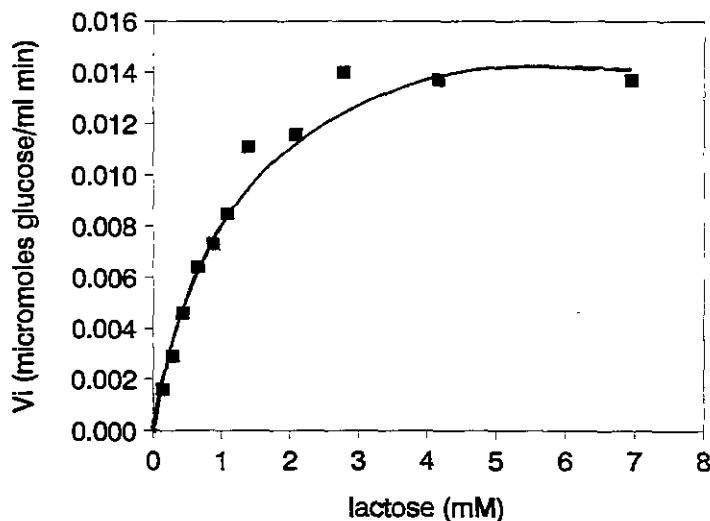


**Figure 3.** Lactose solubility as function of water content in heptanol in one liquid phase system at 37°C.

### ***Effect of Lactose Concentration on Alcoholysis Reaction***

Reaction kinetics at 37°C was established in a system at constant water (5.8%) and varying amounts of soluble lactose (0.15 to 6.85 mM). Since no lactose hydrolysis occurs at this condition and limited by the low sensitivity of the cuproammonium method for heptyl-galactoside, the reaction was monitored by released glucose with the GOP kit. The results are shown in Figure 4. It can be concluded that the reaction follows the Michaelis-Menten

model. A non-linear regression was applied to data presented in Figure 4 resulting in the following kinetic data:  $K_m = 0.7$  mM and  $V_{max} = 13.95$  nmoles/ml-min (2.79 nmoles/unit-min). Clearly,  $V_{max}$  was easily attained since the maximum soluble lactose during alcoholysis was 6.85. A  $K_m$  of 10.4 mM has been reported for the hydrolysis of  $\beta$ -lactose by *E. coli*  $\beta$ -galactosidase in water (Wallenfels and Malhotra, 1961), suggesting an apparent higher enzyme affinity for  $\beta$ -lactose during alcoholysis than for hydrolysis. Bell *et al.* (1995) have recognized that polar substrates (like lactose) tend to present a larger  $K_m$  in polar solvents than in non polar media. Accordingly, in our system, and as a response to the low water available, lactose partitions preferentially into the hydrated enzyme surface. The validity of this substrate partition concept has also been proved for peroxidases acting in mixtures of water and hydrophilic organic solvents using a thermodynamic approach (Torres *et al.*, 1998)



**Figure 4.** Kinetics of alcoholysis reaction with *E. coli*  $\beta$ -galactosidase in water saturated heptanol (5.8% water) in one liquid phase system at 37°C.

To clarify the "intrinsic" role of water as an enzyme activator (vs. the indirect effect as a reagent for lactose solubilization) experiments were conducted at several combinations of substrate and water and the results are shown in Table I. It can be appreciated that water dominated reaction rate performance. For instance, for a lactose concentration of 5.43 mM but only 4.6% water, the rate was slower than the rate obtained at lower lactose concentrations (i.e. 4.17, 2.78 or 2.09 mM) but at higher water level (5.8%). Also, the onset of the reaction was evident even at small lactose levels (0.44 mM) when heptanol was saturated with water (5.8%); however, no reaction occurred at 0.5% water and a comparable amount

available lactose (0.58 mM). It was then proposed that the level of hydration of the enzyme controls the reaction rate, and that once hydrated the enzyme saturates at fairly low substrate concentrations.

**Table I.** Initial rate of *E. coli*  $\beta$ -galactosidase at 37°C as a function of water and soluble lactose concentrations in one liquid phase heptanol system

Water content	lactose mM	$V_i$ nmoles/ml min
5.8%	6.85	14
5.8%	4.17	14
5.8%	2.78	14
5.8%	2.09	12
5.8%	0.44	5
4.6%	5.43	10
3.2%	3.78	6
1.9%	2.24	2
0.5%	0.58	0

The fact that lactose and water were intimately related during alcoholysis, led us to estimate the molar ratios for a qualitative comparison with other reported systems. Holsinger (1997) has reported lactose solubility values from which a 60.32 ratio of  $n_{\text{water}} / n_{\text{lactose}}$  can be derived for a saturated solution of lactose in distilled water at 37°C. We then calculated similar ratios for the results presented in Figures 1 and 2 in which the total amount of lactose was 0.15 g (0.44 mmoles). To that end, lactose concentration in heptanol was calculated from equation 1, obtained from solubility data presented in Figure 3.

$$L = 1.1824w - 0.007 \quad (1)$$

where L is the concentration of soluble lactose (mM) and w is the water content (% w/w)

Table II shows the calculated molar ratios and the corresponding solubility condition for lactose as noted by visual observation. Clearly, the molar ratio for the system with two phases was well above the value for the saturated solution, resulting in a complete lactose solubilization. Similarly, for the one-phase systems at water concentrations above 3.2%, the molar ratios were also above the saturation limit, predicting complete lactose solubilization. However, on the contrary, insoluble lactose was observed as indicated in Table II. It can then be concluded that other components in the system compete with lactose for hydration potential. Since the amount of enzyme was very small (99  $\mu$ g of protein) for any significant

contribution, the participation of heptanol as water trap was estimated based on its predominant presence in the system (>95%). Water activities ( $a_w$ ) were then predicted for water-heptanol assuming that the contribution of the remainder components in the mixture was inconsequential.

**Table II.** Molar ratios of water to soluble lactose in heptanol-water systems shown in Figures 1 and 2.

System, added water	$n_{\text{water}}/n_{\text{lactose}}$	lactose appearance
two liquid phases system	217.39	soluble
one liquid phase, 5.8%	133.33	insoluble
one liquid phase, 4.6%	100	insoluble
one liquid phase, 3.2%	67.11	insoluble
one liquid phase, 1.9%	32.79	insoluble
one liquid phase, 0.5%	12.77	insoluble
saturated solution of lactose in water at 37°C*	60.32	soluble

\*Value reported by Holsinger (1997).

### **Estimation of Water Activity**

As stated previously, a significant interaction between water and heptanol can be suspected to explain the poor solubility of lactose. Furthermore, lactose has a limited capacity to decrease  $a_w$  (Miracco et al., 1981); even for a saturated solution of lactose in water the  $a_w$  value is quite high (0.981) compared to an  $a_w$  of 0.78 for a saturated solution of glucose as reported by Ljunger et al. (1994). In consequence, the effect of lactose on  $a_w$  for our one-phase liquid system should be negligible.

The  $a_w$  values resulting from heptanol-water mixtures were calculated using the equations previously reported by Bell et al. (1997) and updated by one of the authors (Halling, P. J., personal communication).

The Wilson coefficients for 1-heptanol have not been reported and were calculated extrapolating from figures reported by Bell et al. (1997) for primary linear alcohols. Plotting the carbon numbers in primary linear alcohols vs.  $\ln(\lambda_{sw} - \lambda_{ss})$  a linear regression was

obtained with  $r = 0.99$  leading to equation 2; while plotting carbon number in primary alcohols vs.  $\lambda_{sw} - \lambda_{ww}$  the equation 3 was obtained with  $r = 0.98$ .

$$\ln(\lambda_{sw} - \lambda_{ss}) = 1.644N + 3.4677 \quad (2)$$

$$\lambda_{sw} - \lambda_{ww} = 1.319N + 1191 \quad (3)$$

where  $N$  is the carbon number in primary linear alcohols, and  $\lambda_{sw}$ ,  $\lambda_{ss}$ ,  $\lambda_{sw}$  and  $\lambda_{ww}$  are the Wilson coefficients for water and solvent interactions. The resulting values for 1-heptanol were the following:

$$\lambda_{sw} - \lambda_{ss} = 3.190534 \times 10^6 \text{ J mol}^{-1}$$

$$\lambda_{sw} - \lambda_{ww} = 1.0426 \times 10^4 \text{ J mol}^{-1}.$$

Using these Wilson coefficients, the intermediate values were calculated as reported by Bell et al. (1997) but using the revised equations 4 and 5 (Halling, P. J. personal communication):

$$\Lambda_{ws} = \frac{V_s}{V_w} e^{\frac{-(\lambda_{sw} - \lambda_{ss})}{RT}} \quad (4)$$

$$\Lambda_{sw} = \frac{V_w}{V_s} e^{\frac{-(\lambda_{sw} - \lambda_{ww})}{RT}} \quad (5)$$

where the molar volumes were  $V_w = 18 \text{ ml/mol}$  for water and  $V_s = 141.02 \text{ ml/mol}$  for heptanol;  $\Lambda_{ws}$  and  $\Lambda_{sw}$  are the revised Wilson parameters,  $R$  is the gas constant ( $8.314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ) and  $T$  the temperature (K).

The resulting values for heptanol were  $\Lambda_{ws} = 0.11607$  and  $\Lambda_{sw} = 0.00223$ . Equation 6 was used to calculate the activity coefficient for water ( $\gamma_w$ ):

$$\ln \gamma_w = -\ln(X_w + \Lambda_{ws} X_s) + X_s \left( \frac{\Lambda_{ws}}{X_w + \Lambda_{ws} X_s} - \frac{\Lambda_{sw}}{\Lambda_{sw} X_w + X_s} \right) \quad (6)$$

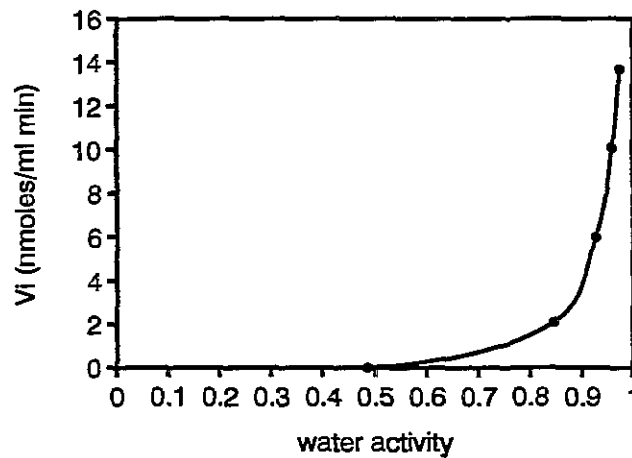
Finally,  $a_w$  values for the water-heptanol mixtures were calculated using equation 7.

$$a_w = \gamma_w X_w \quad (7)$$

Figure 5 shows the graphic relationship between the enzymatic initial rate and  $a_w$  values calculated from equation 7. The profile of this graph is very similar to the one for lacase in different solvents reported by Bell et al. (1997) and also agrees with a system



reported by Ljunger et al. (1994) for the synthesis of octyl- $\beta$ -glucoside with almond  $\beta$ -glucosidase.



**Figure 5.** Dependence of initial rate of alcoholysis on water activity for *E. coli*  $\beta$ -galactosidase in one liquid phase system at 37°C.

### **Prediction of Hydration Level of the Enzyme**

Most previous work to study the role of water on the behavior of enzymes in organic solvents for a glycosidase mediated alcoholysis or reverse hydrolysis reactions have been carried out considering the total water content (%w/w). The thermodynamic parameter  $a_w$  has been proposed as a more adequate descriptor (Bell et al., 1995; Halling, 1994; Valivety et al. 1992). It is possible to predict the water bound to the enzyme, improving interpretation and prediction of enzyme performance (Bell et al., 1995).

The sorption isotherm is very helpful to determine water bound to an enzyme (Halling 1990). The isotherm for  $\beta$ -galactosidase from *E. coli* was not found in the literature. Hence the following assumptions were made.

According to Ling (1972), the water sorption level at  $a_w = 0.92$  for any protein may be calculated using equation 8:

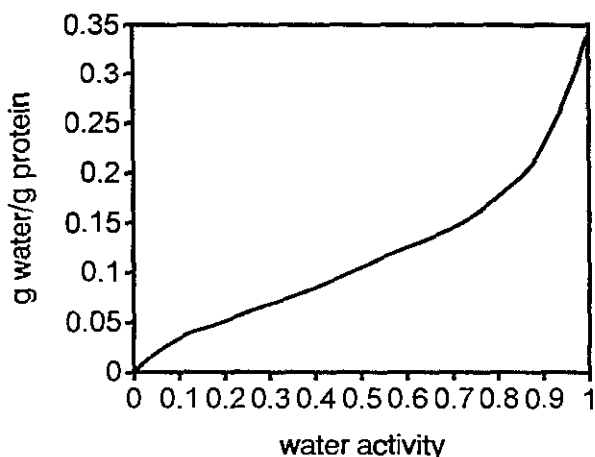
$$Y = -0.97 \times 10^{-3} + 6.77X_1 - 7.63X_2 \quad (8)$$

where  $Y$  is moles of water bound per g of protein;  $X_1$  is the sum of the moles of hydroxy carboxyl, and basic groups per g of protein;  $X_2$  is the moles of side chains amide groups per g of protein. The values of  $X_1$  and  $X_2$  for *E. coli*  $\beta$ -galactosidase were calculated from its amino acid composition obtained from Genebank. The total hydration value ( $Y$ ) was 0.012

moles H<sub>2</sub>O/g protein, equivalent to 0.23 g H<sub>2</sub>O/g protein. This value is very similar to the one for lysozyme (0.0138 moles H<sub>2</sub>O/g protein) reported by Ling (1972). This is relevant since lysozyme has probably been the most studied enzyme in terms of hydration. In addition, our results show that the reaction rate for β-galactosidase at a<sub>w</sub>=0.925 (3.2% water), was 18% compared to the rate for the two liquid phases system (33 nmoles/ml min), whereas the activity of lysozyme at a<sub>w</sub>=0.92 is 10% of the one observed in a diluted solution (Ling, 1972; Rupley et al., 1983). These results are points of coincidence between *E. coli* β-galactosidase and lysozyme under conditions of limited hydration. Based on this, the sorption isotherm for *E. coli* β-galactosidase was calculated assuming complete similarity to lysozyme in terms of water sorption properties by means of equation 9 reported by Asbi and Baianu (1986). The resulting isotherm is shown in Figure 6.

$$n = n_1 + Ca_w + Aa_w^B \quad (9)$$

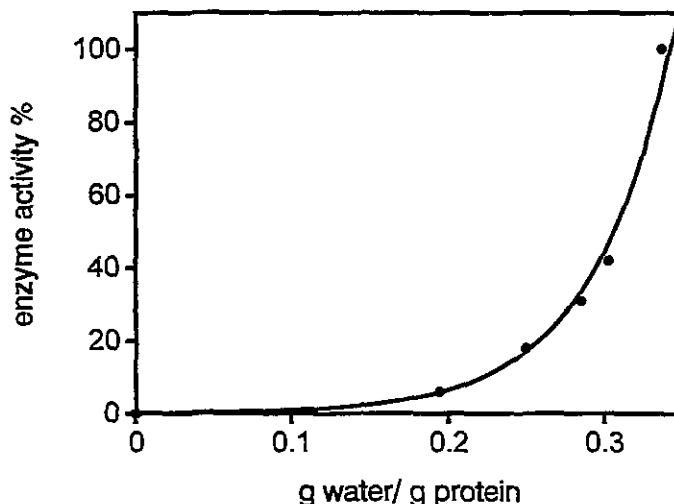
where n is g H<sub>2</sub>O / 100 g protein; n<sub>1</sub>, C, A, and B are constants. Values for lysozyme are n<sub>1</sub> = 1.6, C = 17.6, A = 15.3 and B = 9.837.



**Figure 6.** Predicted sorption isotherm for *E. coli* β-galactosidase in heptanol at 37°C (according to model proposed by Asbi and Baianu, 1986).

Matching the calculated hydration levels of the enzyme with the observed catalytic activities for all a<sub>w</sub> values reported in Figures 5 and 6 resulted in the curve shown in Figure 7. It is observed that the onset of the reaction occurs at 0.1 g water/g protein, equivalent to a<sub>w</sub> = 0.45 and that the activity increases rapidly as enzyme hydration progresses. A similar pattern was presented for a reverse hydrolysis reaction with β-glucosidase (Ljunger et al., 1994),

indicating the close correlation between water sorbed and activity for this type of enzymes. This is also consistent with the models proposed by Rupley et al. (1983) in terms of dynamics of domains in proteins and its promotion of enzymatic activity.



**Figure 7.** Relative alcoholysis activity of *E. coli*  $\beta$ -galactosidase in one liquid phase heptanol system at 37°C as a function of enzyme hydration level (100% activity refers to the system with two liquid phases).

## CONCLUSIONS

$\beta$ -Galactosidase catalyzed the synthesis of heptyl- $\beta$ -galactoside in an organic liquid of one phase provided that sufficient soluble water is available in the system. The reaction followed the Michaelis-Menten model and the enzyme showed higher activity for alcoholysis than hydrolysis of the lactose substrate. The most important factor controlling the reaction is the hydration level of the protein, whereas solubility of lactose has a minimal influence. Calculated  $a_w$  values correlated with the enzymatic rate and the maximum product concentration obtained was 4.94 mM in 25 hours, representing a yield of 22.5%, contrasting with the two liquid phases system in which higher concentrations and yields were observed. Enzyme hydration and its effect on the rate followed known models for lysozyme.

## References

Asbi BA, Baianu IC. 1986. An equation for fitting moisture sorption isotherm of food proteins. *J Agric Food Chem* 34:494-496.

- Beecher JE, Andrews AT, Vulfson EN. 1990. Glycosidases in organic solvents: II. Transgalactosylation catalysed by polyethylene glycol-modified  $\beta$ -galactosidase. *Enzyme Microb Technol* 12:955-959.
- Bell G, Halling PJ, Moore BD, Partridge J, Rees DG. 1995. Biocatalyst behavior in low-water systems. *Trends Biotechnol* 13:468-473.
- Bell G, Janssen AEM, Halling PJ. 1997. Water activity fails to predict critical hydration level for enzyme activity in polar organic solvents: interconversion of water concentrations and activities. *Enzyme Microb Technol* 20:471-477.
- Chahid Z, Montet D, Pina M, Graille J. 1992. Effect of water activity on enzymatic synthesis of alkylglycosides. *Biotechnol Lett* 14:281-284.
- Chahid Z, Montet D, Pina M, Bonnot F, Graille J. 1994. Biocatalyzed octylglycoside synthesis from a disaccharide. *Biotechnol Lett* 16:795-800.
- Dordick JS. 1992. Designing enzymes for use in organic solvents. *Biotechnol Prog* 8:259-267.
- Drouet P, Zhang M, Legoy MD. 1994. Enzymatic synthesis of alkyl  $\beta$ -D-xylosides by transxylosylation and reverse hydrolysis. *Biotechnol Bioeng* 43:1075-1080.
- Halling PJ. 1990. High-affinity binding of water by proteins is similar in air and in organic solvents. *Biochim Biophys Acta* 1040:225-228.
- Halling PJ. 1994. Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventional media: theory, tests, and recommendations for experimental design and analysis. *Enzyme Microb Technol* 16:178-206.
- Holsinger VH. 1997. Physical and chemical properties of lactose. In: Fox PF, editor. *Advanced Dairy Chemistry Vol. 3*. London: Chapman & Hall. p 1-38.
- Ling GN. 1972. Hydration of macromolecules. In: Horne RA, editor. *Water and Aqueous Solutions*. New York: Wiley-Interscience. p 663-700.
- Ljunger G, Adlercreutz P, Mattiasson B. 1994. Enzymatic synthesis of octyl- $\beta$ -glucoside in octanol at controlled water activity. *Enzyme Microb Technol* 16:751-755.
- Miracco JL, Alzamora SM, Chirife J, Ferro-Fontán C. 1981. On the water activity of lactose solutions. *J Food Sci* 46:1612-1613.

- Monot F, Borzeix F, Bardin M, Vandecasteele JP. 1991. Enzymatic esterification in organic media: role of water and organic solvent in kinetics and yield of butyl butyrate synthesis. *Appl Microbiol Biotechnol* 35:759-765.
- Rupley JA, Gratton E, Careri G. 1983. Water and globular proteins. *Trends Biochem Sci* 8:18-22.
- Shinoyama H, Yasui T. 1988. Superiority of *Aspergillus niger*  $\beta$ -xylosidase for the enzymatic synthesis of alkyl  $\beta$ -xylosides in the presence of a variety of alcohols. *Agric Biol Chem* 52:2375-2377.
- Shinoyama H, Kamiyama Y, Yasui T. 1988. Enzymatic synthesis of alkyl  $\beta$ -xylosides from xylobiose by application of the transxylosyl reaction of *Aspergillus niger*  $\beta$ -xylosidase. *Agric Biol Chem* 52:2197-2202.
- Stevenson DE, Stanley RA, Furneaux RH. 1993. Optimization of alkyl  $\beta$ -D-galactopyranoside synthesis from lactose using commercially available  $\beta$ -galactosidases. *Biotechnol Bioeng* 42:657-666.
- Torres E, Siminovich B, Barzana E, Vazquez-Duhalt R. 1998. Thermodynamic hydrophobicity of aqueous mixtures of water-miscible organic solvents predicts peroxidase activity. *J Mol Catalysis: Enzymatic* 4:155-159.
- Trincone A, Nicolaus B, Lama L, Morzillo P, De Rosa M, Gambacorta A. 1991. Enzyme-catalyzed synthesis of alkyl  $\beta$ -D-glycosides with crude homogenate of *Sulfolobus solfataricus*. *Biotechnol Lett* 13:235-240.
- Tuena de Gomez-Puyou M, Gomez-Puyou A. 1998. Enzymes in low water systems. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 33:53-89.
- Valivety RH, Halling PJ, Macrae AR. 1992. Reaction rate with suspended lipase catalyzed shows similar dependence on water activity in different organic solvents. *Biochim Biophys Acta* 1118:218-222.
- Vic G, Thomas D, Crout DHG. 1997. Solvent effect on enzyme-catalyzed synthesis of  $\beta$ -D-glucosides using the reverse hydrolysis method: application to the preparative-scale synthesis of 2-hydroxybenzyl and octyl  $\beta$ -D-glucopyranosides. *Enzyme Microb Technol* 20:597-603.

- Vulfson EN, Patel R, Beecher JE, Andrews AT, Law BA. 1990a. Glycosidases in organic solvents: I. Alkyl- $\beta$ -glucoside synthesis in a water-organic two-phase system. *Enzyme Microb Technol* 12:950-954.
- Vulfson EN, Patel R, Law BA. 1990b. Alkyl- $\beta$ -glucoside synthesis in a water-organic two-phase system. *Biotechnol Lett* 12:397-402.
- Wallenfels K, Malhotra OP. 1961. Galactosidases. *Adv Carbohydr Chem* 16:239-298.

## 2.2. Reacciones de alcoholólisis e hidrólisis inversa en sistema de una fase orgánica con una $\beta$ -glicosidasa hipertermofílica

En esta etapa del proyecto, se exploró el uso de una  $\beta$ -glicosidasa hipertermofílica con actividad de lactasa buscando incrementar la velocidad de la reacción, y además incrementar la cantidad de lactosa disponible en forma soluble en el sistema de una fase orgánica. Cuando la reacción de alcoholólisis de la lactosa se efectuó a 37°C con la  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli*, la velocidad inicial fue de 14 nmol/ml min, pero cuando la reacción se efectuó a 90°C con la  $\beta$ -glicosidasa hipertermofílica, la velocidad fue 3.14 veces mayor; en este caso se logró una solubilidad 6.4 veces mayor de la lactosa en el 1-heptanol saturado con agua. La  $\beta$ -glicosidasa hipertermofílica fue también capaz de realizar la reacción de hidrólisis inversa utilizando tanto glucosa como galactosa como sustratos; como consecuencia, cuando la lactosa fue utilizada como sustrato, se formó en una primera etapa el heptil-galactósido como consecuencia de la reacción de alcoholólisis, y subsecuentemente la glucosa liberada fue consumida en la reacción de hidrólisis inversa formando el 1-heptil-glucósido. Ambas reacciones se ajustaron al modelo cinético de Michaelis-Menten. Ni la lactosa ni los heptil-glicósidos fueron hidrolizados a 90°C por esta enzima en el heptanol saturado con agua. De cualquier manera, la conversión de los azúcares en heptil-glicósidos fue limitada por una fuerte inhibición por producto y la formación de oligosacáridos, especialmente a altas concentraciones de sustrato, reduciendo el rendimiento de la reacción. Este trabajo abre la perspectiva de reacciones a altas temperaturas mediante el uso de una enzima novedosa, la cual además de permitir la reacción a un mínimo de 90°C con las ventajas que ello implica, permite realizar simultáneamente la reacción de transglicosidación e hidrólisis inversa.

Alcoholysis and reverse hydrolysis reactions in  
organic one-phase system with a hyperthermophilic  $\beta$ -  
glycosidase

(Artículo publicado en: *Biotechnology and  
Bioengineering* 69(6), 627-632; 2000)

Mariano García-Garibay<sup>1,2</sup>

Agustín López-Munguía<sup>3</sup>

Eduardo Barzana<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 04510, México.

<sup>2</sup>Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, México D.F. 09340, México.

<sup>3</sup>Departamento de Bioingeniería, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca Mor. 62210 México.

Correspondence to: Eduardo Barzana

telephone: +(52)5622-5310; fax +(52)5622-5345; e-mail: ebg@servidor.unam.mx

**Running headline:** Alcoholysis reaction with hyperthermophilic  $\beta$ -glycosidase.



**Abstract:** Alcoholysis and reverse hydrolysis reactions were performed enzymatically in one-phase water-saturated 1-heptanol systems. Lactose or glucose was used as substrate to produce heptyl- $\beta$ -galactoside and/or heptyl- $\beta$ -glucoside respectively. When alcoholysis reaction of lactose was performed at 37°C with  $\beta$ -galactosidase from *E. coli*, the initial rate was 14 nmol/ml min, and the limiting factors were the poor solubility of the substrate in 1-heptanol and a low thermal stability of the enzyme. When a hyperthermophilic  $\beta$ -glycosidase was used at 90°C, the rate was 3.14 folds higher; in this case a higher concentration of soluble lactose in the water-saturated heptanol was available to the enzyme due to the higher temperature. The hyperthermophilic  $\beta$ -glycosidase was also able to use glucose and galactose as substrates to achieve the reverse hydrolysis reaction. As a consequence, when lactose was used as substrate, heptyl- $\beta$ -galactoside was formed by alcoholysis, while the released glucose moiety was used in a secondary reverse hydrolysis reaction to produce heptyl- $\beta$ -glucoside. Both reactions followed Michaelis-Menten kinetics behavior. Neither lactose nor heptyl-glycosides were hydrolyzed by this enzyme in water saturated heptanol. However, the conversion was limited by a strong product inhibition and the formation of oligosaccharides, especially at high substrate concentrations, reducing the final glycoside yield.

**Keywords:** alcoholysis, reverse hydrolysis, hyperthermophilic  $\beta$ -glycosidase, organic phase enzymatic reaction.

## INTRODUCTION

Alcoholysis reactions catalyzed by  $\beta$ -galactosidase (E.C. 3.2.1.23) were first described in 1912 (Wallenfels and Malhorta, 1961). In contrast to hydrolysis, an alcohol splits a disaccharide during alcoholysis forming a monosaccharide and a product resulting from the condensation of the glycosyl intermediate with the alcohol. A similar reaction is the reverse hydrolysis in which the enzyme promotes the direct condensation of a monosaccharide with an alcohol with no byproducts formed. Both reactions are particular cases of transglycosidation reactions, leading equally to the formation of an alkyl-glycoside. This behavior seems to be general for glycolytic enzymes (Wallenfels and Weil, 1972), but with diverse abilities (Shinoyama and Yasui, 1988). Therefore, these reactions bring the possibility

to use a hydrolytic enzyme to synthesize alkyl-glycosides as surface-active compounds of commercial interest (Matsumura et al., 1990; Shinoyama et al., 1991a, 1992b)

Several reports dealing with these reactions have been published over the last decade. One critical limitation in these systems is the poor solubility of the sugar substrate in the alcohol phase, especially when hydrophobic alcohols are used to obtain surfactants with a long hydrocarbon tail. Therefore, both alcoholysis and reverse hydrolysis have been studied mostly in two-phase systems of a water insoluble alcohol and water (that maintains the sugar substrate and the enzyme). Furthermore, Chahid et al. (1992) and Tricone et al. (1991), reported the impossibility to perform these reactions in simple monophasic organic systems and that 15% of water was the minimum needed to sustain the reaction. This proved to be incorrect when Panintrarux et al. (1997) achieved the reverse hydrolysis reaction of glucose with buffer-saturated C<sub>6</sub> to C<sub>8</sub> alcohols at 50°C in a monophasic system and using almond  $\beta$ -glucosidase. Furthermore, the reported yields were higher than those in the conventional two-phase system.

In the present paper transglycosidation reactions were successfully conducted in monophasic systems with sufficient water (soluble in the alcohol) to make the enzyme active. The reactions were carried in 1-heptanol (both as substrate and solvent) using a hyperthermophilic  $\beta$ -glycosidase. A mesophilic  $\beta$ -galactosidase from *E. coli* was also used for comparison.

## **MATERIALS AND METHODS**

### ***Enzymes and Chemicals***

A hyperthermophilic  $\beta$ -glycosidase was used (CloneZyme Gly-001-02 from Diversa, Sharon Hill PA., USA). The enzyme was rehydrated with phosphate buffer (0.1 M, pH 5.5) preparing a solution containing 2 mg/ml.  $\beta$ -Galactosidase from *Escherichia coli* (lyophilized grade VIII) was obtained from Sigma Chemical Co., St. Louis MO., USA. The enzyme was rehydrated with phosphate buffer (0.1 M, pH 7.0) adding 5 ml to 5,000 units of lactase (nominal activity from the supplier).

All chemicals were obtained from Sigma Chemical Co., St. Louis MO., USA with the highest purity available.

### ***Solubility of Water in Heptanol***

To determine the amount of water needed to saturate the heptanol at working temperatures, equal amounts of heptanol and water were mixed in a glass reactor (described later) and stirred during 5 min at the specified temperatures. The phases were allowed to separate for 1 h and a sample from the organic phase was analyzed in a Karl Fisher apparatus. The total water solubilized at equilibrium in heptanol was 5.8% and 7.8% at 37°C and 90°C respectively. Reactions conducted at those conditions retained the one-phase state.

### ***Reactions***

The reactions were performed in jacketed 50 ml glass reactors at constant temperature, stirred magnetically and sealed with screw caps. Each reactor contained 20 ml of 1-heptanol supplemented with the indicated amount of water. Either lactose, glucose or galactose was added as a solid in the specified amounts, and 0.1 ml of enzyme solution in buffer was added to start the reaction. With such procedure, the system can be considered of one phase since it was homogeneous, clear and transparent with no visual indication of a second phase (liquid or solid). Furthermore, since there was no evidence of turbidity formation during the reaction, it can be assumed that enzyme, water and carbohydrate substrate coexist as a fine microscopic dispersion in the organic liquid phase as long as the reactor was maintained at a constant temperature.

### ***Analyses***

Water content in heptanol was determined with a Karl-Fisher coulometric titration device (Aquatest 8, Photovolt, Indianapolis, Indiana USA).

To determine the reaction products, samples of 1 ml were withdrawn from the reactors at specified times. In the case of *E. coli*  $\beta$ -galactosidase reactions, the sample was mixed in vortex with 0.5 ml water twice to extract the sugars from the heptanol phase, and heated 5 min in a boiling water bath to stop the enzymatic reaction. In reactions with hyperthermophilic  $\beta$ -glycosidase, aliquots were mixed twice with 0.5 ml of a 12% TCA solution to stop the reaction. The resulting mixtures were centrifuged (5000 rpm, 15 min) to separate the phases. After TLC analysis, it was concluded that heptyl-glycosides remained in the heptanol phase following water or TCA extraction, as Shinoyama et al. (1988) and Vulfson et al. (1990a) have previously established for hexyl-glycosides. Then, heptyl-glycosides were quantitatively determined in this phase by the cuproammonium technique as reported by Vulfson et al.

(1990a). Glucose was quantified after extraction with water by means of a glucose oxidase-peroxidase (GOP) kit (Spinreact, Girona, Spain). A Perkin Elmer Lambda 2 UV/VIS spectrometer (Ueberlingen, Germany) was used for both cuproammonium and GOP techniques.

Heptyl-glycosides, lactose, glucose, galactose, and oligosaccharides were assessed in both heptanol and water phases by thin layer chromatography (TLC) on 5x10 cm silica gel sheets (Sigma Chemicals, St. Louis MO, USA) as reported by Shinoyama et al. (1988).

$^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectra were obtained for products soluble in the organic phase sampled from a 5.5 h reaction, and purified twice by water extraction previous to analysis.

### ***Enzyme Thermal Stability***

*E. coli*  $\beta$ -galactosidase solution was incubated in 20 ml 1-heptanol at different temperatures in test tubes in a controlled water bath (Heto AT110, Heto-Holten A/S, Allerod, Denmark) at 0, 2.7 and 5.8% water content. Samples of this mixture were taken every hour for a total of 6, and the residual enzyme activity was measured in a mixture of 2.7 ml of phosphate buffer (0.1 M, pH 7.0), 0.1 ml of the heptanolic suspension of the enzyme and 0.2 ml of a 0.068 M orto-nitrophenol- $\beta$ -galactoside solution as substrate (ONPG). The hydrolysis of the ONPG at 37°C was monitored constantly during 90 min at 410 nm with a Perkin Elmer Lambda 2 UV/VIS spectrometer (Ueberlingen, Germany).

### ***Inhibition Kinetics***

For inhibition assays of the hyperthermophilic  $\beta$ -glycosidase, 1-heptyl-glucoside was dissolved in heptanol in the specified amounts followed by the addition of water, glucose and the enzyme. Glucose concentration was varied in the range of 2.74 to 43.86 mM; reaction conditions and analysis were as described-

## **RESULTS AND DISCUSSION**

### ***Alcoholysis with E. coli $\beta$ -Galactosidase***

The possibility to perform the alcoholysis reaction in pre-hydrated monophasic systems with *E. coli*  $\beta$ -galactosidase was demonstrated at 37°C. Using 1.39 mM lactose as substrate, the initial rate was 14 nmol/ml min. In similarity with the results by Panintrarux et al. (1997) for  $\beta$ -glucosidase, the water added to saturate the heptanol enables the enzyme to convert the

substrates. A detailed study concerning the influence of enzyme hydration on the reaction is in preparation.

It is well known that an important advantage of enzymatic reactions in organic media is the possibility to perform the reaction at high temperatures due to enhanced thermostability acquired by the enzymes (Bell et al., 1995; Dordick, 1991; Klibanov, 1989). However, although the initial rate increased to 42 nm/ml min when the temperature was increased to 65°C, the reaction had a marginal progress after 1.5 h, suggesting a poor thermal stability.

The stability of the enzyme at 37°C as a function of the water content in the system is presented in Table I. It is observed that the stability is highly dependent on the hydration level, with a seven fold increase in thermoresistance when the enzyme is incubated in anhydrous heptanol as compared to pure water. However, the half-life dropped to 1.33 h at 45°C and 0.83h at 50°C, and it was only 0.22 h at 60°C. This is a major drawback of this enzyme, particularly considering the long time required for the alcoholysis reaction.

**Table I.** Half-life of *E. coli*  $\beta$ -galactosidase at 37°C in water and 1-heptanol with different contents of water.

<i>System</i>	in water	in saturated 1-heptanol (5.8% water)	in 1-heptanol with 2.7% water	in anhydrous 1-heptanol
Half life (h)	0.62	1.86	2.37	4.11
Std dev.	0.0001	0.01	0.01	0.61

Improvements in the thermal stability of *E. coli*  $\beta$ -galactosidase have been reported in aqueous systems by other authors; the half-life at 55°C in the presence of 0.1 M 2-mercaptoethanol and 0.01 MgCl<sub>2</sub> is 0.66 h, and without mercaptoethanol all activity is lost after 10 min (0.17 h) at the same temperature (Wallenfels and Weil, 1972); these data reveal a heat labile enzyme. Beecher et al. (1990) reported a half-life of 5 h at 37°C for a *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase chemically modified by covalent attachment to polyethylene glycol. Also, this enzyme from *A. oryzae* has an enhanced optimum temperature of 50-55°C (García-Garibay and Gómez-Ruiz, 1996). Though chemical modification of enzymes may render stable preparations for transglycosidation, it was decided to evaluate

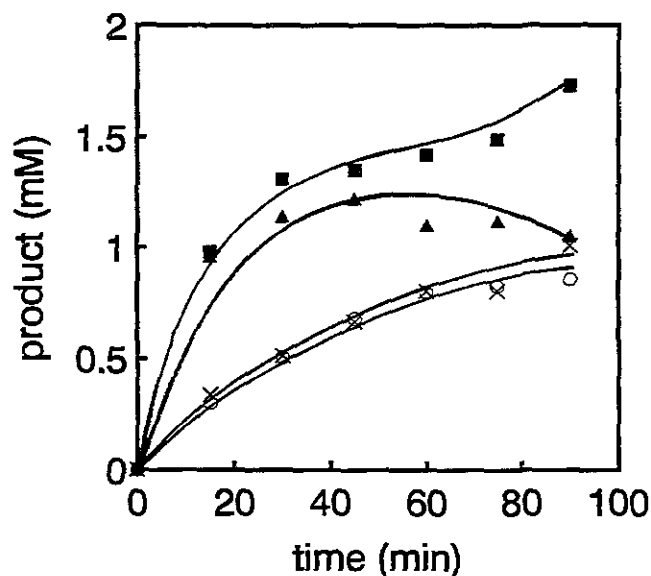
naturally resistant enzymes. This has been suggested by Beecher et al. (1990) and Ljunger et al. (1994) in their vision to explore enzymes from thermophiles.

### **Alcoholysis Reaction with Hyperthermophilic $\beta$ -Glycosidase**

A commercial hyperthermophilic  $\beta$ -glycosidase with high activity at 90°C was assessed in alcoholysis reactions. In Figure 1 both enzymes are compared at their optimal temperature in 1.39 mM lactose in heptanol. At this concentration, lactose is below the maximum solubility for both temperatures, condition that guarantees the same amount of available substrate to the enzymes. It was also estimated that the available water (in terms of water activity) was similar for both temperatures (results not shown), despite the different saturation levels (7.8% at 90°C and 5.8% at 37°C). Higher initial rate (44 nmol/ml min) and yield (more than 100% in 90 min) were obtained for the hyperthermophilic enzyme vs. *E. coli*  $\beta$ -galactosidase (13 nmol/ml min and 72.4%).

In Figure 1 it may also be observed that, as expected, in the case of the enzyme from *E. coli*, both products (glucose and heptyl-glycoside) were produced at the same molar rate along the reaction. In contrast, the hyperthermophilic enzyme shows an unexpected pattern, since equimolar formation of products occurs only during the first 18 min. Afterwards the glucose concentration tends to level off and even decrease after 50 min, whereas the glycoside reaches the theoretical 100% conversion at 35 min without stopping its production up to a 124% yield in 90 min. These results suggest the consumption of the accumulated glucose as substrate of the enzyme to produce heptyl-glucoside. According to the information available from the enzyme supplier, this enzyme is a non-specific  $\beta$ -glycosidase, which is able to react with either  $\beta$ -glucosides or  $\beta$ -galactosides, such as cellobiose, lactose, etc., and it is able to perform reverse hydrolysis reactions. Therefore, the production of both, heptyl- $\beta$ -galactoside and heptyl- $\beta$ -glucoside from lactose could be expected.

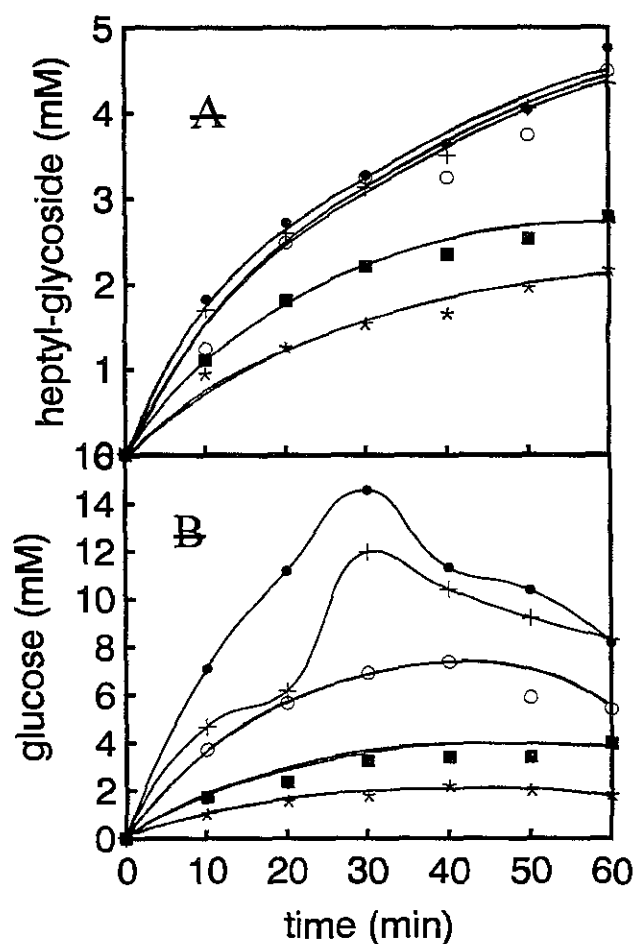
In order to further increase reaction rate and productivity, several reactions were conducted at 90°C and at varying lactose concentrations. Even at the highest concentration of lactose used (43.86 mM), all the sugar was maintained soluble along the reaction. These results are shown in Figure 2 where it may be observed that, as already shown, glucose produced from alcoholysis in the first step of the reaction is later (after 30 min) consumed to increase the total heptyl-glycoside produced. The higher the lactose concentration the higher the alcoholysis and reverse hydrolysis reaction rates.



**Figure 1.** Alcoholysis reactions with *E. coli*  $\beta$ -galactosidase at 37°C and hyperthermophilic  $\beta$ -glycosidase at 90°C using 1.39 mM lactose as substrate. Activity followed by heptyl-glycoside formation (× for *E. coli* enzyme, and ■ for hyperthermophilic enzyme), and glucose released (○ for *E. coli*  $\beta$ -galactosidase, and ▲ for the hyperthtrmophilic enzyme).

### ***Monosaccharides as Substrates of the Hyperthermophilic $\beta$ -Glycosidase***

The utilization of glucose and galactose as substrates to synthesize the corresponding heptyl-glycosides was demonstrated at 90°C and compared to the reaction with lactose (Figure 3). Kinetics studies showed that, in all cases, either alcoholysis (for lactose) or reverse hydrolysis (for the monosaccharides) reactions followed the Michaelis-Menten model. The kinetics parameters calculated from Lineweaver-Burk plots are shown in Table II, where it is interesting to observe the similar affinities to the three sugars, but the higher turnover with lactose. It may therefore be concluded that both reactions, alcoholysis and the condensation reaction, called also reverse hydrolysis (Vic et al., 1997; Vulfson et al., 1990a, 1990b) took place also with this enzyme. It was confirmed by NMR analysis of the product contained in the heptanol phase, that both heptyl-galactoside and heptyl-glucoside were present when lactose was used as substrate; heptyl-glucoside was only confirmed as the single product obtained by reverse hydrolysis from glucose.



**Figure 2.** Alcoholysis with the hyperthermophilic  $\beta$ -glycosidase at 90°C using different concentrations of soluble lactose followed by heptyl-glycoside production (A) and glucose released (B). Concentrations of lactose: ● 43.86 mM, + 21.93 mM, ○ 10.97 mM, ■ 5.48 mM, ★ 2.74 mM.

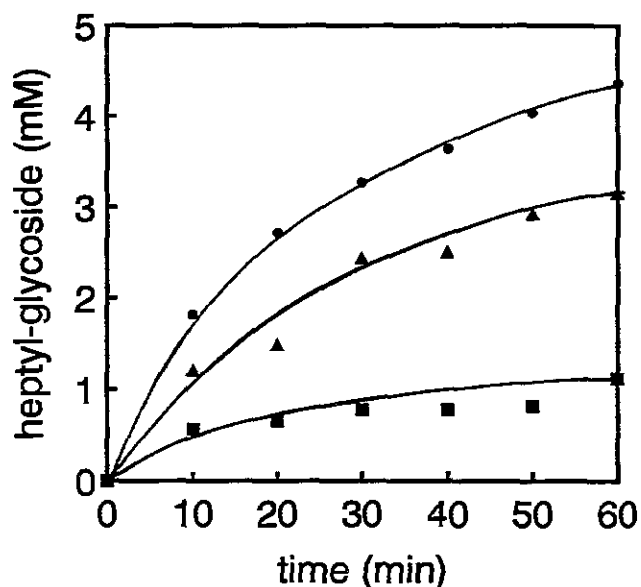
When 43.86 mM glucose was used as substrate, a yield of 7.2% was obtained in 1 h, equivalent to a product concentration of 3.16 mM (Figure 3). When the reaction proceeded for longer time (Figure 4) a 16.6% yield and a product concentration of 7.3 mM were obtained after 9 h. Almond  $\beta$ -glucosidase has been widely used for the synthesis of alkyl-glucosides by reverse hydrolysis (using glucose as substrate). Using a two-phase system, Vulfson et al. (1990b) obtained a final concentration of 40 mM hexyl-glucoside in 3 days with hexanol, and 28 mM heptyl-glucoside in 5 days with heptanol (with a yield calculated from data given by the authors of approximately 18% and considering a molar conversion of glucose to heptyl-glucoside). Vic et al. (1997) obtained a final yield in their best case of 8% after six days using



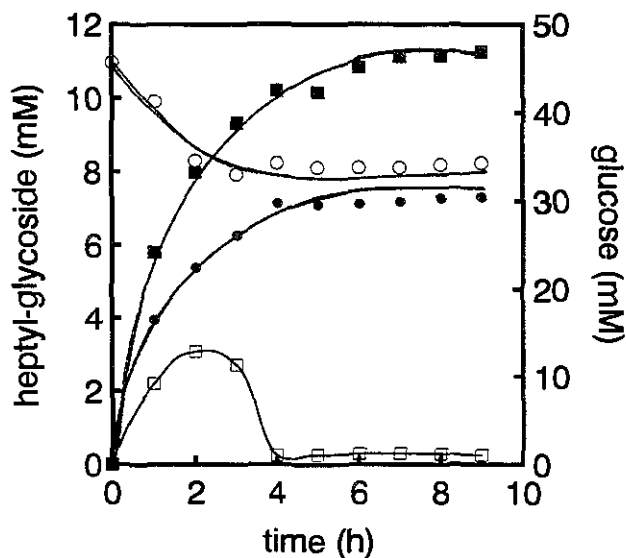
1-octanol. Panintrarux et al. (1995) obtained yields of approximately 20% in three days for hexyl-glucoside and 14% in four days for heptyl-glucoside.

Given the faster reactions reported here, it is then concluded that the use of enzymes that can act at high temperatures in monophasic alcohols represents an important advancement to the synthesis of alkyl-glycosides.

Chahid et al. (1994) proposed a reaction system in which both octyl- $\beta$ -glucoside and octyl- $\beta$ -galactoside were simultaneously synthesized improving yield and production of alkyl-glycosides, mediated by a combination of two enzymes ( $\beta$ -galactosidase from *A. oryzae* and  $\beta$ -glucosidase from almond meal). Using only one enzyme (hyperthermophilic  $\beta$ -glycosidase) proposed here, the mixture of glycosides was obtained with a yield of 79% in only one hour from 2.74 mM lactose (Figure 2). Chahid et al. (1994) reported a yield of 26% after 3 days of reaction. The combination of enzymes used by these authors requires 4 days for maximum conversion compared to 6 hours with the hyperthermophilic enzyme even with a higher lactose concentration (43.86 mM).



**Figure 3.** Alcoholysis and reverse hydrolysis with the hyperthermophilic  $\beta$ -glycosidase at 90°C with 43.86 mM of the following sugars: ● lactose, ▲ glucose, and ■ galactose.



**Figure 4.** Long term kinetics with the hyperthermophilic  $\beta$ -glycosidase at 90°C using either lactose or glucose as substrate. ■ Heptyl-glycoside from lactose, ● heptyl-glycoside from glucose, □ glucose release from the reaction with lactose, ○ glucose remaining as substrate from the reaction with glucose.

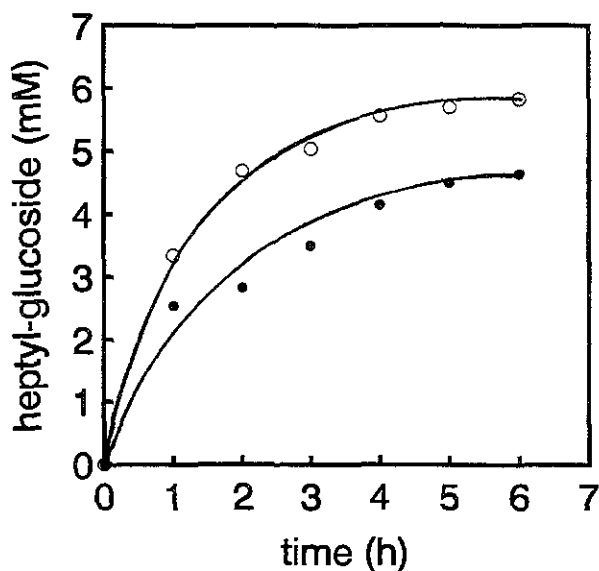
When mass balances were performed considering heptyl-glycosides produced and glucose released (Figure 2), it was clear that not all sugars were forming the desirable products. This discrepancy was explained by the formation of oligosaccharides, which were detected and semiquantitatively analyzed by TLC. Laroute and Willemont (1992) reported that oligosaccharides were formed during the synthesis of alkyl-glucosides with either glucoamylase or  $\beta$ -glucosidase in two-phase systems when high concentrations of sugar were used. In our case, it was also observed that the higher the initial lactose concentration the higher the amount of oligosaccharides produced, with a consequent decrease of heptyl-glycosides yield. As expected no formation of oligosaccharides occurred when either glucose or galactose was used as substrate.

***Product Inhibition in Alcoholysis Reaction with Hyperthermophilic  $\beta$ -Glycosidase***

In the long term reactions (9 hr) with glucose and lactose (Figure 4) it was observed that the formation of heptyl-glycosides practically stopped after the 4th hour, even when high concentrations of substrates were still present. There was no evidence of lactose hydrolysis by the hyperthermophilic  $\beta$ -glycosidase under the conditions studied since galactose was not detected at any time during the reaction. It was also demonstrated that heptyl-glucoside could

not be hydrolyzed by this enzyme. To test this, 1 mM solution of this compound was incubated in water-saturated heptanol during 90 min at 90°C. After sampling every 30 min, neither the concentration of the heptyl-glucoside diminished nor glucose was released (glucose monitored by both GOP assay and TLC). Therefore, a product inhibition was suspected as the cause of the reaction arrest at the 4th hour.

To test the inhibition hypothesis, four reactors were operated during six hours at 90°C using glucose (43.86 mM) as substrate. Two reactors were monitored hourly, while the other two were kept undisturbed. At the end of the run, the undisturbed reactors were cooled down to room temperature and left on the bench until a distinct water phase was formed. The expelled water should correspond to the difference in maximum solubilities of water in heptanol at 20 and 90°C (see Materials and Methods). Assuming that most of the enzyme originally dispersed at 90°C partitions into the water phase formed at 20°C, the enzyme was recovered by centrifugation (20,000 rpm, 15 min at 20°C) followed by phase separation. This was confirmed since a large proportion of the initial activity was recovered (see below). The enzyme was then washed with 20 ml heptanol to eliminate any remaining glucoside, and recovered again by centrifugation. The water phase containing the enzyme was then added to 20 ml heptanol and poured back to an empty reactor. Additional water was added to replace the amount lost in the heptanol during centrifugation (it was calculated from an estimated solubility of 5.4 % at 20°C). The reactor temperature was raised to 90°C and the reaction was started by the addition of glucose (43.86 mM). The reaction was followed during 6 h, sampling every hour. The results obtained are shown in Figure 5. The initial rate for the first run was 56 nmoles/ml-min, while for the second run, once the enzyme was recovered from the reaction mixture, it was 42 nmoles/ml-min. Accordingly, 76% of the original activity was recovered which could be explained by a loss of enzyme during centrifugation or a diminished amount of water. However, the experiment demonstrates that the enzyme was not subjected to inhibition by the product and it recovered its active form when the heptyl-glucoside was removed. Kinetic experiments (not shown) suggest a competitive inhibition pattern with a  $K_i = 0.54$  mM. This value is one order of magnitude less than the  $K_m$ 's for the substrates shown in Table II, indicating a high inhibition capacity of the product (at least heptyl-glucoside).



**Figure 5.** Reutilization of the hyperthermophilic  $\beta$ -glycosidase with glucose as substrate. Second reaction was done with recovered enzyme. ○ First reaction, ● second reaction.

**Table II.** Kinetics parameters for the hyperthermophilic  $\beta$ -glycosidase.

Substrate	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ ( $\mu$ moles/ml min)
Lactose	4.04	0.157
Glucose	4.19	0.048
Galactose	4.41	0.029

## CONCLUSIONS

The synthesis of heptyl- $\beta$ -glycosides is possible in monophasic organic systems if enough water is present to activate the enzyme. For  $\beta$ -galactosidase from *E. coli* at 37°C the maximum product concentration obtained from lactose was 4.94 mM in 25 hours, representing a yield of 22.5%. The main limitations were the solubility of the lactose, and the poor thermal stability of the enzyme. To increase the availability of soluble lactose in the monophasic system, and hence the rate, a hyperthermophilic  $\beta$ -glycosidase was used at 90°C. For lactose, a concentration of up to 11.25 mM of heptyl-glycosides was obtained in few hours, representing a yield of 25.7%; higher yields (up to 124%) were obtained with lower concentrations of lactose. Therefore, moderate initial concentrations of lactose should be managed to prevent the formation of oligosaccharides.  $\beta$ -Glycosidase was also able to

perform the reverse hydrolysis reaction using the glucose moiety of the lactose liberated during alcoholysis; this was validated when pure glucose or galactose was the substrate. However, the enzyme was very sensitive to product inhibition. For lactose, in order to construct an efficient production strategy of alkyl- $\beta$ -glycosides with this enzyme operating at elevated temperatures, a system in which the product could be removed constantly from the reaction mixture must be proposed. Also, a continuous system operated at conditions that maintain low concentrations of product and lactose should improve greatly the productivity of the reaction.

## References

- Beecher JE, Andrews AT, Vulfson EN. 1990. Glycosidases in organic solvents: I. Transgalactosylation catalysed by polyethylene glycol-modified  $\beta$ -galactosidase. *Enzyme Microb Technol* 12:955-959.
- Bell G, Halling PJ, Moore BD, Partridge J, Rees DG. 1995. Biocatalyst behaviour in low-water systems. *Trends Biotechnol* 13:468-473.
- Chahid Z, Montet D, Pina M, Graille J. 1992. Effect of water activity on enzymatic synthesis of alkylglycosides. *Biotechnol Lett* 14:281-284.
- Chahid Z, Montet D, Pina M, Bonnot F, Graille J. 1994. Biocatalyzed octylglycoside synthesis from a disaccharide. *Biotechnol Lett* 16:795-800.
- Dordick JS. 1991. Non-aqueous enzymology. *Curr Opin Biotechnol* 2:401-407.
- García-Garibay M, Gómez-Ruiz L. 1996. Usos de  $\beta$ -galactosidasas microbianas para reducir el contenido de lactosa en leche y productos lácteos. *Rev Inv Clínica (Mex)* 48:51-61.
- Klibanov AM. 1989. Enzymatic catalysis in anhydrous organic solvents. *Trends Biochem Sci* 14:141-144.
- Laroute V, Willemot RM. 1992. Glucoside synthesis by glucoamylase or  $\beta$ -glucosidase in organic solvents. *Biotechnol Lett* 14:169-174.
- Ljunger G, Adlercreutz P, Mattiasson B. 1994. Enzymatic synthesis of octyl- $\beta$ -glucoside in octanol at controlled water activity. *Enzyme Microb Technol* 16:751-755.
- Matsumura S, Imai K, Yoshikawa S, Kawada K, Uchibori T. 1990. Surface activities, biodegradability and antimicrobial properties of n-alkyl glucosides, mannosides and galactosides. *J Am Oil Chem Soc* 67:996-1001.

- Panintrarux C, Adachi S, Araki Y, Kimura Y, Matsuno R. 1995. Equilibrium yield of n-alkyl- $\beta$ -D-glucoside through condensation of glucose and n-alcohol by  $\beta$ -glucosidase in a biphasic system. *Enzyme Microb Technol* 17:32-40.
- Panintrarux C, Adachi S, Matsuno R. 1997.  $\beta$ -Glucosidase-catalyzed condensation of glucose with 2-alcohols in buffer-saturated alcohols. *Biotechnol Lett* 19:899-902.
- Shinoyama H, Yasui T. 1988. Superiority of *Aspergillus niger*  $\beta$ -xylosidase for the enzymatic synthesis of alkyl  $\beta$ -xylosides in the presence of a variety of alcohols. *Agric Biol Chem* 52:2375-2377.
- Shinoyama H, Kamiyama Y, Yasui T. 1988. Enzymatic synthesis of alkyl  $\beta$ -xylosides from xylobiose by application of the transxylosyl reaction of *Aspergillus niger*  $\beta$ -xylosidase. *Agric Biol Chem* 52:2197-2202.
- Shinoyama H, Takei K, Ando A, Fujii T, Sasaki M, Doi Y, Yasui T. 1991a. Enzymatic synthesis of useful alkyl  $\beta$ -glucosides. *Agric Biol Chem* 55:1679-1681.
- Shinoyama H, Gama Y, Nakahara H, Ishigami Y, Yasui T. 1991b. Surface active properties of heptyl  $\beta$ -D-xyloside synthesized by utilizing the transxylosyl activity of  $\beta$ -xylosidase. *Bull Chem Soc Japan* 64:291-292.
- Tricone A, Nicolaus B, Lama L, Morzillo P, De Rosa M, Gambacorta A. 1991. Enzyme-catalyzed synthesis of alkyl  $\beta$ -D-glycosides with crude homogenate of *Suffolobus solfataricus*. *Biotechnol Lett* 13:235-240.
- Vic G, Thomas D, Crout DHG. 1997. Solvent effect on enzyme-catalyzed synthesis of  $\beta$ -D-glucosides using the reverse hydrolysis method: Application to the preparative-scale synthesis of 2-hydroxybenzyl and octyl  $\beta$ -D-glucopyranosides. *Enzyme Microb Technol* 20:597-603.
- Vulfson EN, Patel R, Beecher JE, Andrews AT, Law BA. 1990a. Glycosidases in organic solvents: I. Alkyl- $\beta$ -glucoside synthesis in a water-organic two-phase system. *Enzyme Microb Technol* 12:950-954.
- Vulfson EN, Patel R, Law BA. 1990b. Alkyl- $\beta$ -glucoside synthesis in a water-organic two-phase system. *Biotechnol Lett* 12:397-402.
- Wallenfels K, Malhotra OP. 1961. Galactosidases. *Adv Carbohydr Chem* 16:239-298.
- Wallenfels K, Weil R. 1972.  $\beta$ -Galactosidase. In: Boyer PD, editor. *The Enzymes* Vol. 7. London: Academic Press. p 617-663.

# Capítulo 3

## Conclusiones generales y recomendaciones

Si bien es cierto que las reacciones de alcoholólisis se circunscriben dentro de lo que se denomina enzimología en solventes orgánicos por la combinación de una fase acuosa con un alcohol hidrofóbico que forma una segunda fase y actúa como reactivo, la realidad es que en su inmensa mayoría estas reacciones se han quedado estancadas en las primeras etapas del desarrollo de la enzimología no acuosa. Con excepción de un par de trabajos que se discuten en la sección 1.4.4, las reacciones de alcoholólisis se han realizado y estudiado en sistemas donde la enzima se encuentra en una fase acuosa, y por lo tanto en un exceso de agua que conlleva desventajas como favorecer la hidrólisis del sustrato y del producto, así como no permitir la posibilidad de explorar temperaturas altas de reacción por arriba de la óptima de la enzima. Si bien en este trabajo no se pudo implementar la reacción de alcoholólisis a altas temperaturas utilizando la  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli*, el hecho de comprender el papel del agua en estas reacciones y poder controlar con precisión el nivel de hidratación de la enzima abre nuevas perspectivas que pueden llevar a diseñar sistemas donde la enzima trabaje en un medio en el cual la cantidad de agua permita establecer el compromiso necesario entre una suficiente flexibilidad para desplegar actividad catalítica y la rigidez suficiente para soportar mayores temperaturas de reacción. Por otro lado, dar cabida a una enzima hipertermofílica que además es lo suficientemente inespecífica para abrir su espectro de utilización de sustratos, es también una aportación importante que a fin de cuentas permitirá explorar distintas variables combinadas para lograr reacciones de alcoholólisis más eficientes.

El parámetro termodinámico actividad de agua ( $a_w$ ), ha sido reconocido como fundamental en las reacciones enzimáticas en medios no acuosos; sorprendentemente, y reforzando la idea de que las reacciones de alcoholólisis se han quedado en las primeras etapas de desarrollo de esta rama de la biotecnología, este parámetro paradójicamente ha sido casi ignorado en los trabajos de síntesis enzimática de alquil-glicósidos. En este sentido el primer trabajo que pretendió invocar la  $a_w$ , planteó una estrategia y metodología tan

de una fase. Sin embargo, en el sistema de dos fases se tiene el inconveniente de que la interface es limitada en comparación con las micelas inversas y la microencapsulación, y que el exceso de agua promueve reacciones de hidrólisis. En los reportes de reacciones de hidrólisis con enzimas confinadas en micelas inversas o por microencapsulación, discutidos en la sección 1.4.3, se obtuvieron muy buenos resultados, fundamentalmente debido a que la enzima está altamente hidratada al mantenerse en la fase acuosa, y a que la interface entre fase acuosa y orgánica es muy alta. Por otra parte, en el capítulo 2.2 se establece que a pesar del atractivo que ofrece el uso de la  $\beta$ -glucosidasa hipertermofílica, se presenta el problema de la inhibición por producto al cual la enzima resulta altamente sensible. Esto es un evidente inconveniente para obtener altos rendimientos en la reacción a pesar de que la enzima utiliza la lactosa como sustrato en forma muy eficiente, de que no se presentan problemas de hidrólisis ni de sustrato ni de producto, y de que la velocidad de la reacción se ve altamente incrementada por la temperatura y la mayor solubilidad de la lactosa. En este sentido también, dispersar la fase acuosa en la fase orgánica puede ser una mala estrategia, independientemente de si se trata de una o dos fases líquidas. En un sistema de compartimentalización podría evitarse la inhibición de la enzima por producto ya que éste sufre una partición favorable hacia el alcohol, alejándose de la enzima. Todo esto apunta a que sería muy conveniente, además de combinar las variables aquí estudiadas ( $a_w$ , temperatura, nuevas fuentes de enzimas), implementar un sistema de compartimentalización. Para el caso del sistema de micelas inversas se complicaría la separación del producto, por lo cual el candidato más viable parece ser la microencapsulación. En este sistema podrían manejarse altas concentraciones de sustrato, ya que éste no deprime en forma importante la  $a_w$ , y podría operarse a 90°C para tener mayor capacidad de solubilización de lactosa y mayor velocidad de reacción.



## Bibliografía General

- Asbj B.A. y Baianu I.C. 1986. An equation for fitting moisture sorption isotherms of food proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 34, 494-496.
- Bárcana E. y López-Munguía Canales A. 1993. Tecnología enzimática. En: *Biología Alimentaria*, García-Garibay M., Quintero R. y López-Munguía Canales A. (eds.), Limusa, México D.F. pp. 103-123.
- Bárcana E., Karel M. y Klivanov A.M. 1987. Enzyme catalyzed gas phase reactions. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 15, 25-34.
- Bárcana E., Karel M. y Klivanov A.M. 1989. Enzymatic oxidation of ethanol in the gaseous phase. *Biotechnology and Bioengineering* 34, 1178-1185.
- Beecher J.E., Andrews A.T. y Vulfson E.N. 1990. Glycosidases in organic solvents: II. Transgalactosylation catalysed by polyethylene glycol-modified  $\beta$ -galactosidase. *Enzyme and Microbial Technology* 12, 955-959.
- Bell G., Halling P.J., Moore B.D., Partridge J. y Rees D.G. 1995. Biocatalyst behaviour in low-water systems. *Trends in Biotechnology* 13, 468-473.
- Bell G., Janssen A.E.M. y Halling P.J. 1997. Water activity fails to predict critical hydration level for enzymes activity in polar organic solvents: Interconversion of water concentrations and activities. *Enzyme and Microbial Technology* 20, 471-477.
- Bonnin E., Vigouroux J., Lahaye M. y Thibault J.F. 1999. Regioselective synthesis of galactosyl-derivatives using wxo-(1,4)- $\beta$ -Dgalactanase, galactan, and nonsugar acceptors. *Enzyme and Microbial Technology* 25, 224-229.
- Bull H.B. 1944. Adsorption of water vapor by proteins. *Journal of the American Chemical Society* 66, 1499-1507.
- Cantacuzene D. y Attal S. 1991. Enzymic synthesis of galactopyranosyl-L-serine derivatives using galactosidases. *Carbohydrates Research* 211, 327-331.
- Chahid Z., Montet D., Pina M. y Graille J. 1992. Effect of water activity on enzymatic synthesis of alkylglycosides. *Biotechnology Letters* 14, 281-284.
- Chahid Z., Montet D., Pina M., Bonnot F. y Graille J. 1994. Biocatalyzed octylglycoside synthesis from a disaccharide. *Biotechnology Letters* 16, 795-800.

- Halling P.J. 1990. High-affinity binding of water by proteins is similar in air and in organic solvents. *Biochimica et Biophysica Acta* 1040, 225-228.
- Halling P.J. 1994. Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventional media: Theory, tests, and recommendations for experimental design and analysis. *Enzyme and Microbial Technology* 16, 178-206.
- Hammond D.A., Karel M., Klibanov A.M. y Krukonis V.J. 1985. Enzymatic reactions in supercritical gases. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 11, 393-400.
- Hsmall A., Linder M. y Ghoul M. 1999. Optimization of butylgalactoside synthesis by  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Enzyme and Microbial Technology* 25, 208-213.
- Johansson E., Hedbys L. y Larsson P.O. 1991. Enzymatic synthesis of monosaccharide-amino acid conjugates. *Enzyme and Microbial Technology* 13, 781-787.
- Klibanov A.M. 1997. Why are enzymes less active in organic solvents than in water? *Trends in Biotechnology* 15, 97-101.
- Klibanov A.M., Samokhin G.P., Martinek K., y Berezin I.V. 1977. A new approach to preparative enzymatic synthesis. *Biotechnology and Bioengineering* 19, 1351-1361.
- Kobayashi T., Adachi S. y Matsuno R. 1999. Synthesis of alkyl fucosides through  $\beta$ -glucosidase-catalyzed condensation of fucose and 1-alcohols. *Biotechnology Letters* 21, 105-109.
- Krog N.J. 1990. Food emulsifiers and their chemical and physical properties. En: *Food Emulsions 2nd Ed.* K. Larsson y S.E. Friberg (ed.). Marcel Dekker, New York pp. 127-180.
- Kren V. 1992. Fructosylation of ergot alkaloids by yeast invertase. *Biotechnology Letters* 14, 769-772.
- Laroute V. y Willemot R.M. 1992. Glucoside synthesis by glucoamylase or  $\beta$ -glucosidase in organic solvents. *Biotechnology Letters* 14, 169-174.
- Lee C.S., Ru M.T., Haake M., Dordick J.S., Reimer J.A. y Clark D.S. 1998. Multinuclear NMR study of enzyme hydration in an organic solvent. *Biotechnology and Bioengineering* 57, 686-693.

- Nakagawa H., Yoshiyama M., Shimura S., Kirimura K. y Usami S. 1996. Anomer selective formation of l-menthyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside by  $\alpha$ -glucosidase-catalyzed reaction. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 60, 1914-1915.
- Nakagawa H., Yoshiyama M., Shimura S., Kirimura K. y Usami S. 1998 Anomer-selective glucosylation of l-menthol by yeast  $\alpha$ -glucosidase. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 62, 1332-1336.
- Naundorf A. y Ajisaka K. 1999. Purification of  $\alpha$ -N-acetyl-galactosaminidase from *Aspergillus niger* and its use in the synthesis of GalNAc- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ O)-serine. *Enzyme and Microbial Technology* 25, 483-488.
- Nilsson K.G.I. 1991. Use of glycosidases and glycosyltransferases in the synthesis of complex oligosaccharides and their glycosides. En: *Enzymes in Carbohydrate Synthesis*. Bednarski M.D. y Simon E.S. (eds.) American Chemical Society, Washington D.C. pp. 51-62.
- Nilsson K.G.I. y Scigelova M. 1994. Synthesis of glycosylated serine and threonine derivatives employing glycosidases. *Biotechnology Letters* 16, 671-676.
- Nilsson F., Söderman O. y Johansson I. 1998. Four different C<sub>8</sub>G<sub>1</sub> alkylglucosides. Anomeric effects and the influence of straight vs branched hydrocarbon chains. *Journal of Colloid and Interface Science* 203, 131- 139.
- Ooi Y., Hashimoto T., Mitsuo N. y Satoh T. 1984. Enzymic synthesis of chemically unstable cardiac glycosides by  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Tetrahedron Letters* 25, 2241-2244.
- Pan S.C. 1970. Synthesis of estriol 16 $\alpha$ -( $\alpha$ -D glucoside) by enzymic transglucosylation. *Biochemistry* 9, 1833-1838.
- Panintrarux C., Adachi S., Araki, Y., Kimura, Y. y Matsuno, R. 1995. Equilibrium yield of n-alkyl- $\beta$ -D-glucoside through condensation of glucose and n-alcohol by  $\beta$ -glucosidase in a biphasic system. *Enzyme and Microbial Technology* 17, 32-40.
- Panintrarux C., Adachi S. y Matsuno R. 1997.  $\beta$ -Glucosidase-catalyzed condensation of glucose with 2-alcohols in buffer-saturated alcohols. *Biotechnology Letters* 19, 899-902.
- Pazur J.E. 1953. The mechanism of enzymatic synthesis of galactosyl oligosaccharides. *Journal of Biological Chemistry* 208, 439-444.

- Saab-Rincón G., del Río G., Santamaría R.I., López-Munguía A. y Soberón X. 1999. Introducing transglycosylation activity in a liquefying  $\alpha$ -amylase. *FEBS Letters* 453, 100-106.
- Santamaría R.I., Del Río G., Saab G., Rodríguez M.E., Soberón X. y López-Munguía A. 1999. Alcoholysis reactions from starch with  $\alpha$ -amylase. *FEBS Letters* 452, 346-350.
- Santin M., Rosso F., Sada A., Peluso G., Improta R. y Trincone A. 1996. Enzymatic synthesis of 2- $\beta$ -D-galactopyranosyloxy ethyl methacrylate (GalEMA) by the thermophilic archeon *Sulfolobus solfataricus*. *Biotechnology and Bioengineering* 49, 217-222.
- Scigelová M., Kren V. y Nilsson K.G.I. 1994. Synthesis of  $\alpha$ -mannosylated ergot alkaloids employing  $\alpha$ -mannosidase. *Biotechnology Letters* 16, 683-688.
- Selisko B., Ulbrich R., Schellenberger A. y Müller U. 1990. Invertase-catalyzed reaction in alcoholic solutions. *Biotechnology and Bioengineering* 35, 1006-1010.
- Shin H.K., Kong J.Y., Lee J.D. y Lee T.H. 2000. Syntheses of hydroxybenzyl- $\alpha$ -glucosides by amyloglucosidase-catalyzed transglycosylation. *Biotechnology Letters* 22, 321-325.
- Shinoyama H. y Yasui T. 1988. Superiority of *Aspergillus niger*  $\beta$ -xylosidase for the enzymatic synthesis of alkyl  $\beta$ -xylosides in the presence of a variety of alcohols. *Agricultural and Biological Chemistry* 52, 2197-2202.
- Shinoyama H., Kamiyama Y. y Yasui T. 1988. Enzymatic synthesis of alkyl  $\beta$ -xylosides from xylobiose by application of the transxylosyl reaction of *Aspergillus niger*  $\beta$ -xylosidase. *Agricultural and Biological Chemistry* 52, 2197-2202.
- Shinoyama H., Takei K., Ando A., Fujii T., Sasaki M., Doi Y. y Yasui T. 1991a. Enzymatic synthesis of useful alkyl  $\beta$ -glucosides. *Agricultural and Biological Chemistry* 55, 1679-1681.
- Shinoyama H., Gama Y., Nakahara H., Ishigami Y. y Yasui T. 1991b. Surface active properties of heptyl  $\beta$ -D-xyloside synthesized by utilizing the transxylosyl activity of  $\beta$ -xylosidase. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 64, 291-292.

- ic G., Biton J., Le Beller D., Michel J-M. y Thomas D. 1995. Enzymatic glucosylation of hydrophobic alcohols in organic medium by the reverse hydrolysis reaction using almond- $\beta$ -D-glucosidase. *Biotechnology Bioengineering* 46, 109-116.
- ic, G., Thomas, D. y Crout, D.H.G. 1997. Solvent effect on enzyme-catalyzed synthesis of  $\beta$ -D-glucosides using the reverse hydrolysis method: Application to the preparative-scale synthesis of 2-hydroxybenzyl and octyl  $\beta$ -D-glucopyranosides. *Enzyme and Microbial Technology* 20, 597-603.
- Vulfson E.N. 1993. Enzymatic synthesis of food ingredients in low-water media. *Trends in Food Science and Technology* 4, 209-215.
- Vulfson E.N., Patel R. y Law B.A. 1990a. Alkyl- $\beta$ -glucoside synthesis in a water-organic two-phase system. *Biotechnology Letters* 12, 397-402.
- Vulfson E.N., Patel R., Beecher J.E., Andrews A.T. y Law B.A. 1990b. Glycosidase in organic solvents: I. Alkyl- $\beta$ -glucoside synthesis in a water-organic two-phase system. *Enzyme and Microbial Technology* 12, 950-954.
- Wallenfels K. y Weil R. 1972.  $\beta$ -Galactosidase. En: *The Enzymes Vol 7, Third Edition*. Boyer P.D. (ed.) Academic Press, Londres pp. 617-663.
- Wallenfels K. y Malhotra O.P. 1961. Galactosidases. *Advances in Carbohydrate Chemistry* 16, 239-298.
- Wasserman B.P. 1984. Thermostable enzyme production. *Food Technology* 38(2), 78-89,98.
- Yan T-R. y Liao J.C. 1998. Synthesis of alkyl  $\beta$ -glucosides from cellobiose with *Aspergillus niger*  $\beta$ -glucosidase II. *Biotechnology Letters* 20, 653-657.
- Yi Q., Sarney D. B., Khan J. A. y Vulfson E. N. 1998. A novel approach to biotransformations in aqueous-organic two-phase systems: enzymatic synthesis of alkyl  $\beta$ -[D]-glucosides using microencapsulated  $\beta$ -glucosidase. *Biotechnology and Bioengineering* 60, 385-390.
- Zaks A. y Klivanov A.M. 1984. Enzymatic catalysis in organic media at 100°C. *Science* 224, 1249-1251.
- Zaks A. y Klivanov A.M. 1985. Enzymatic-catalyzed processes in organic solvents. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 82, 3192-3196.
- Zaks A., Empie M. y Gross A. 1988. Potentially commercial enzymatic processes for the fine and specialty chemical industries. *Trends in Biotechnology* 6, 272-275.