

GLICOSILACIÓN ENZIMÁTICA DE MOLÉCULAS FENÓLICAS USANDO MUTANTES DE LEVANSACARASA DE *Bacillus subtilis*.

Arlette Mena, Agustín López-Munguía, Edmundo Castillo. Instituto de Biotecnología, UNAM, Apdo. postal 510-3, Cuernavaca, Mor., CP 62250, México. Fax: (777) 3114903, arlette@ibt.unam.mx.

Palabras clave: fructosiltransferasa, glicosilación, fructósidos.

Introducción. La glicosilación es una estrategia que ha sido utilizada para la modificación de propiedades farmacocinéticas de las moléculas, tales como volatilidad, solubilidad o estabilidad⁽¹⁾. Un método alternativo para la síntesis de glicósidos es la vía enzimática aprovechando la alta especificidad de las enzimas, que permite realizar la síntesis en un número reducido de etapas de proceso y evita subproductos no deseados. Las fructosiltransferasas (FTF's) naturalmente catalizan la transferencia de un residuo fructosilo a partir de la sacarosa hacia una molécula aceptora, la cual puede ser una cadena de fructano (polimerización), agua (hidrólisis) u otro compuesto añadido al sistema (reacción de aceptor).

El presente trabajo tuvo como objetivo estudiar la optimización de la reacción de glicosilación de compuestos fenólicos, usando hidroquinona como sustrato modelo, empleando mutantes de la levansacarasa de *Bacillus subtilis* (BS-LVS).

Metodología. Se evaluaron cinco mutantes de BS-LVS: S164A, I342V, R433A, H243L y Y429N, las cuales se seleccionaron por su capacidad para transferir fructosa hacia otros aceptores, su estabilidad ($t_{1/2}$) o su cambio en relación hidrólisis/polimerización⁽²⁾. El medio de reacción para la glicosilación de hidroquinona (Hq) consistió en 0.4M de Sacarosa, 0.5M de Hq en amortiguador de fosfatos 50mM, pH 6.0 y 5 U/mL de enzima. El fructósido de Hq (FHq) se purificó por cromatografía en columna y las reacciones se analizaron por HPLC y TLC.

Resultados y discusión. Se determinó la concentración óptima de aceptor Hq en la reacción con BS-LVS, encontrándose una mayor producción de FHq a concentraciones elevadas de aceptor (0.5M). Cabe señalar que otras FTF's se inactivan por la presencia de Hq. En las condiciones optimizadas (0.5M Hq), todas las mutantes de BS-LVS resultaron activas y sintetizaron FHq, pero sólo la mutante Y429N mejoró el rendimiento respecto a la silvestre (de 7 a 10% con base en la conversión de sacarosa) (Fig.1).

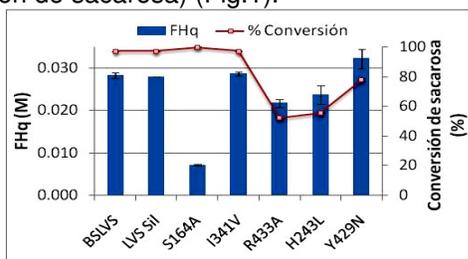


Fig. 1. Producción de F-Hq con mutantes de *B. subtilis*.

Por otra parte, al observar la cinética de reacción con BS-LVS y con Y429N, se encontró una considerable reducción en la velocidad de producción de FHq alrededor de las 4 horas de reacción, tiempo en el cual se ha consumido $\frac{3}{4}$ de la sacarosa inicial. Puesto que se determinó que BS-LVS puede hidrolizar FHq y que la velocidad de hidrólisis se reduce en presencia de sacarosa, se evaluó la reacción manteniendo una concentración constante de sacarosa (reacción en lote alimentado) con BS-LVS y Y429N. En estas condiciones, se encontró que la producción de FHq continúa en aumento aún después de las 4 horas de reacción, incrementando la producción total de fructósido respecto a la reacción sin alimentación de sacarosa (Fig. 2). Es importante notar que la masa total de FHq producida en lote alimentado fue mayor en la reacción con Y429N que con la enzima silvestre. Puesto que la mutante prácticamente no sintetiza polímero ($\approx 5\%$) a diferencia de la silvestre ($\approx 55\%$), es probable que la mayor producción de fructósido se deba en buena medida a que no se sintetizan otros fructanos que compitan con Hq como aceptores del residuo fructosilo.

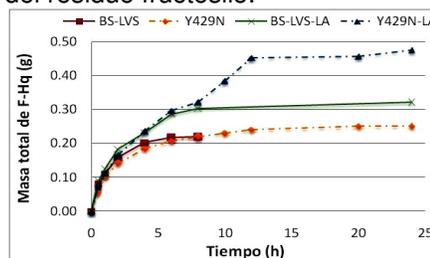


Fig. 2. Producción de F-Hq en lote alimentado (LA).

Conclusiones. Las mutantes evaluadas de BS-LVS fueron activas en presencia de alta concentración de Hq y capaces de fructosilar dicho sustrato.

La mutante Y429N fue más eficiente que la silvestre en la reacción de fructosilación de Hq, eficiencia que se hizo más evidente al realizar la síntesis en reacciones en lote alimentado.

Agradecimiento. Financiamiento otorgado por PAPIIT-UNAM con número IN226706-3 y beca CONACYT con No. de registro 169648.

Bibliografía.

- van Rantwijk, F.; Woudenberg-Van Oosterom, M; Sheldon, R.A. (1999). Glycosidase-catalysed synthesis of alkyl glycosides. *J. Mol. Catal. B-Enz.*, 6, (6), 511-532.
- Ortiz-Soto, M.E.; Rivera, M; Rudiño-Piñera, E; Olvera, C; López-Munguía, A. (2008). Selected mutations in *Bacillus subtilis* levansucrase semi-conserved regions affecting its biochemical properties. *Prot. Eng., Des. Select.* 21 (10), 589-595.