



GLICOSILACIÓN ENZIMÁTICA DE COMPUESTOS HIDROFÓBICOS POR GLICOSILTRANSFERASAS ACTIVAS EN SOLVENTES ORGÁNICOS.

Arlette Mena, Agustín López-Munguía, Edmundo Castillo.

Depto. de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, UNAM,

Apdo. postal 510-3, Cuernavaca, Mor., CP 62250, México. Fax: (777) 311 4903, arlette@ibt.unam.mx

Palabras clave: glicosiltransferasa, glicósidos de fenoles, solvente orgánico.

Introducción. Los glicósidos son compuestos formados por un residuo azúcar y una molécula de naturaleza química diferente (aglicona) unidas covalentemente. Uno de los métodos para la síntesis de glicósidos de interés industrial es por la vía enzimática aprovechando la alta especificidad que caracteriza a las enzimas, ya que lo hacen en un número reducido de etapas de proceso y evitando subproductos no deseados. Las glicosiltransferasas son enzimas que naturalmente catalizan la transferencia de un residuo glicosilo, algunas de ellas utilizando a la sacarosa como sustrato donador del residuo (glucosa o fructosa) hacia una molécula aceptora, ya sea un polímero en crecimiento (polimerización) u otro compuesto añadido al sistema (reacción de aceptor). Estas enzimas también pueden utilizar como aceptor al agua y resultar en la hidrólisis la sacarosa; sin embargo, esta reacción lateral se puede eliminar mediante diferentes estrategias como son la adición de solventes orgánicos miscibles en agua o el aumento en la concentración de sustratos. En nuestro grupo se ha demostrado la estabilidad de algunas glicosiltransferasas en solventes orgánicos, lo cual favorece la reacción de transferencia, disminuyendo considerablemente la hidrólisis (1). Este hecho abre la posibilidad de emplear glicosiltransferasas en la glicosilación de moléculas hidrofóbicas a la vez que se favorece la reacción de transferencia.

El presente trabajo tuvo como objetivo estudiar la glicosilación de compuestos hidrofóbicos de interés en la industria farmacéutica (como los polifenoles) empleando glicosiltransferasas activas en solventes orgánicos.

Metodología. Se evaluaron diferentes sistemas enzimáticos: 2 fructosiltransferasas y 1 glucosiltransferasa microbianas. Las reacciones de glicosilación de sustratos hidrofóbicos se llevaron a cabo utilizando concentraciones equimolares de Sacarosa y Aceptor (400 mM) en medio acuoso. En algunos casos se emplearon mezclas con solvente orgánico 2-metil-2-propanol (2M2P). Las reacciones se analizaron por cromatografía de capa fina (TLC). Los productos de reacción se purificaron por cromatografía en columna y se analizaron por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

Resultados y discusión. Para determinar si la presencia de solvente orgánico favorece la reacción de aceptor, se probaron maltosa y lactosa como aceptores empleando BS-LVS y se encontró que, a pesar de que a mayor concentración de 2M2P se reduce la hidrólisis, la cantidad de fructósidos producidos fue constante e independiente de la concentración de 2M2P, favoreciéndose únicamente la transferencia hacia polímero.

Por otro lado se evaluaron 5 alcoholes aromáticos, y entre ellos resultó de particular interés el alcohol bencílico (BnOH), cuyo glucósido se ha probado para aliviar tensión

causada por estrés en ratas. Entre las enzimas probadas, únicamente BS-LVS fue activa (78% de la actividad sin aceptor) a altas concentraciones de sustrato (400 mM) mientras que las otras sufren inactivación. Por lo tanto se empleó a BS-LVS en las reacciones de aceptor con sustratos hidrofóbicos en medio acuoso y en mezclas con solvente con el fin de mejorar la solubilidad del aceptor y evaluar el efecto sobre la glicosilación. Si bien el sistema mostró un nivel bajo de hidrólisis, el porcentaje de glicosilación no mejoró. Al evaluar aceptores fenólicos en un sistema acuoso (fig.1) se encontró mayor producción de fructósidos que con alcoholes primarios (como BnOH), principalmente en los casos en que el aceptor posee un segundo grupo electrodonador como $-OH$, $-OCH_3$ ó $-NH_2$. Esto es debido al incremento en la nucleofilicidad del aceptor, característica requerida para formar el enlace glicosídico. Para comprobar esta hipótesis se evaluó el caso contrario, es decir, el de un fenol con un grupo electrotractor ($-NO_2$) y se encontró que la enzima no es capaz de emplearlo como aceptor, debido probablemente a la reducción de su nucleofilicidad.

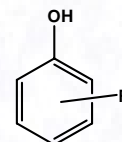


Fig. 1. Estructura general de sustratos fenólicos evaluados en reacciones de aceptor. R = -H, -OH, -OCH₃ o -NH₂, NO₂.

En total, de veintidós sustratos hidrofóbicos evaluados, diez de ellos actuaron como aceptores para la reacción con BS-LVS, siete de los cuales poseen hidroxilos fenólicos (fig. 1) y tres con alcoholes primarios. Se encontró que algunos compuestos con estructuras potencialmente reactivas no fueron sustrato para BS-LVS en las condiciones evaluadas, por lo que se sugiere que el éxito de la glicosilación no sólo depende de la reactividad del aceptor sino también de las características propias de la enzima.

Conclusiones. Se demostró la capacidad de la enzima BS-LVS para glicosilar moléculas hidrofóbicas como BnOH en alta concentración sin sufrir inactivación considerable; asimismo, se encontró que la enzima puede utilizar compuestos fenólicos como aceptores, lo cual está determinado tanto por la reactividad del aceptor como por la selectividad que da la propia estructura de la enzima.

Agradecimiento. Los autores agradecen a Fernando González e Ignacio Regla por el apoyo técnico.

Bibliografía.

1. Castillo, E. y López-Munguía, A. (2004). Synthesis of levain in water-miscible organic solvents. *J. Biotech.* 114: 209-217.