

ESTUDIO DE UNA β -GLICOSIDASA HIPERTERMOFILICA PARA LA PRODUCCION DE ALQUIL GLUCOSIDOS

Consuelo Vázquez Limón¹, Mariano García-Garibay², Eduardo Bárzana³ y Agustín López-Munguía¹

¹ Departamento de Bioingeniería, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México

Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, 62271, Morelos, MEXICO. Fax: (52-73) 172388, e-mail: limon@ibt.unam.mx

² Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, México D.F.

³ Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.

Palabras clave: beta glicosidasa, alquil glicosidos, enzimas hipertermofilicas

Introducción. La síntesis química de alquil glucósidos fue reportada hace más de 100 años y su uso en detergentes fue patentado a mediados del siglo XX. Los procedimientos enzimáticos son altamente selectivos, permitiendo obtener alquilglucósidos de alta pureza, por lo que en principio, la aplicación de enzimas puede reemplazar los complicados procesos químicos que requieren de numerosos pasos de protección y desprotección.

En un trabajo reciente realizado por García-Garibay et al. (2000) se emplea una β -glicosidasa hipertermofílica comercial de Diversa Corp. (β -gli HT) para sintetizar heptil glucósidos en un medio monofásico orgánico. La limitante en este trabajo es la baja productividad alcanzada, dada la escasa solubilidad de azúcar en el medio orgánico. También se reporta que la conversión está limitada por una fuerte inhibición por producto y la formación de oligosacáridos a concentraciones altas de sustrato.

En el presente trabajo se lleva a cabo un estudio detallado de la enzima, caracterizándola cinética y fisicoquímicamente en medio acuoso, evaluando también el efecto que los alquil-glucósidos tienen sobre la actividad de la enzima. Por último se analizan experimentalmente diversos sistemas de reacción para elevar la producción de heptil-glucósido.

Metodología.

Determinación de parámetros cinéticos. Se midió la velocidad inicial de la reacción de hidrólisis de varios glucósidos, (Sigma) a 90°C, pH 5.5. De manera análoga se evaluó el efecto de los alquil glucósidos en la reacción de hidrólisis de ONPGal.

Determinación de pureza por electroforesis. La electroforesis en condiciones nativas y desnaturizantes fue realizada de acuerdo al método Laemmli. Para determinar la actividad glicosidasa en los geles de electroforesis, se usó X-gal (Sigma) Síntesis de heptil glucósido. Las reacciones se llevan a cabo en medios monofásicos o bifásicos, donde los sustratos son glucosa o celobiosa y heptanol. Los productos se cuantifican por HPLC (Waters) usando un detector IR (Waters IR410), de acuerdo al método reportado por Bousquet, *et al.* (1998).

Resultados.

Caracterización cinética y fisicoquímica. Se estudió la pureza de la preparación enzimática por electroforesis en gel de poliacrilamida tanto en condiciones desnaturizantes como nativas. En cada caso analizó el patrón de proteína y el de actividad enzimática, determinando que se trata de una sola proteína con actividad tanto β -glicosidasa como β -galactosidasa. El peso molecular calculado de la enzima es de

aproximadamente 120 KDa, formada por al menos dos subunidades.

Tabla 1. Caracterización cinética de la β -gli HT a 90°C, pH 5.5, actuando sobre diferentes sustratos

Sustrato	Km [mM]	Kcat [min ⁻¹]	Kcat/Km [mM ⁻¹ min ⁻¹]
Celobiosa	10.0	313 000	31 300
Lactosa	125.0	633 400	5 060
ONPGlu	0.26	667 300	2 570 000
ONPGal	12	830 000	69 200
Heptil-glucósido	0.253	28 400	112 400
Hexil-glucósido	1.531	48 600	31 800

Efecto de alquil glucósidos en la actividad de la enzima. Los alquil-glucósidos se comportan como inhibidores competitivos para la reacción de hidrólisis de ONPG catalizada por la β -gli HT. Los valores de las constantes de inhibición calculados son: K_i (hexil glucósido) = 1.1435 mM, K_i (heptil glucósido) = 0.2627 mM, que corresponden al Km. Esto se debe a que siendo ambos sustratos de la enzima, uno actúa como inhibidor competitivo del otro

Síntesis de heptil glucósido. Se llevaron a cabo reacciones de alcoholisis y transesterificación en diferentes sistemas que incluyen medio monofásico, medio bifásico, así como con cosolventes. De los sistemas de reacción estudiados para la producción de heptil-glucósido, se encontró que la mayor productividad se obtiene cuando se lleva a cabo la reacción de condensación de glucosa con heptanol en un sistema bifásico en el que se disminuye la actividad de agua mediante elevadas concentraciones de glucosa en la fase acuosa.

Conclusiones.

Se caracterizó la enzima β -gli HT, determinando parámetros cinéticos, pureza y efecto de alquil glucósidos. Se estudiaron diversas estrategias para la producción de heptil glucósido, obteniendo mayores productividades que las reportadas, en un medio bifásico saturado de glucosa.

Agradecimientos.

Agradecemos al T.L.C. Fernando González por el soporte técnico y al CONACyT por el apoyo otorgado durante la realización de este proyecto.

Bibliografía.

García-Garibay, M; López-Munguía, A y Bárzana, E. (2000). *Biotechnol Bioeng.* 69 (6) 627-632.
Bousquet, M.P.; Willemot, R.M y Monsan, P. (1998). *Appl. Microbiol Biotechnol.* 50. 167-173.