

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

**Diseño y optimización de biocatalizadores para su aplicación en la
síntesis de carbohidratos en condiciones sostenibles**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Sara Gómez Quevedo

Directora

María José Hernáiz Gómez-Dégano

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

PROGRAMA DE DOCTORADO EN FARMACIA



**DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN DE BIOCATALIZADORES PARA SU
APLICACIÓN EN LA SÍNTESIS DE CARBOHIDRATOS EN
CONDICIONES SOSTENIBLES.**

Memoria que para optar al Grado de

DOCTOR EN FARMACIA

presenta

SARA GÓMEZ QUEVEDO



La Prof. Dra. D^a María José Hernáiz Gómez-Dégano, Prof. Titular del Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, como **TUTOR** y **DIRECTORA**.

HACE CONSTAR:

Que el Trabajo Experimental titulado

**DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN DE BIOCATALIZADORES PARA SU
APLICACIÓN EN LA SÍNTESIS DE CARBOHIDRATOS EN CONDICIONES
SOSTENIBLES.**

presentado por Dña. Sara Gómez Quevedo presenta la calidad suficiente para ser defendido como Trabajo Original de Investigación.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmamos la presente en Madrid, a 21 de Noviembre de 2014.

Fdo. Prof. Hernáiz

I. INTRODUCCIÓN	7
I.1. Importancia biológica de las glicoestructuras	8
I.1.1. Oligosacáridos y glicoconjugados	8
I.2. Enzimas útiles en la síntesis de oligosacáridos y glicoestructuras.....	11
I.2.1. Síntesis de oligosacáridos utilizando glicosidasas	13
I.2.1.1. β -Galactosidasa β -Gal-3 de <i>Bacillus circulans</i> ATCC 31382.....	17
I.2.1.2. -Galactosidasa de <i>Bacillus circulans</i> : Biolacta No 5 (Daiwa kasei)..	19
I.2.1.3. Glicosidasas de <i>Sulfolobus sulfataricus</i> P2.....	22
I.2.1.4. Síntesis de glicoconjugados utilizando lipasas	23
I.2.2. Procesos de inmovilización y estabilización de enzimas.....	29
I.2.2.1. Inmovilización de células enteras por retención física o encapsulamiento	30
I.2.2.2. Inmovilización covalente por unión a un soporte	34
I.2.2.3. Síntesis de oligosacáridos y glicoconjugados utilizando enzimas inmovilizadas.....	37
I.3. Glicosidasas en disolventes sostenibles	39
I.3.1. Los Principios de la Química Sostenible	40
I.3.2. Disolventes Sostenibles.....	41
El agua.....	42
Disolventes orgánicos obtenidos de fuentes renovables	43
Disolventes orgánicos fluorados	44
Líquidos iónicos (LIs)	45
I.3.3. Galactosidasas en disolventes sostenibles.....	47
I.3.4. Lipasas en disolventes verdes	48
I.3.5. Influencia de los disolventes sostenibles en la estructura terciaria de las enzimas	50
I.3.5.1. Espectroscopia de Fluorescencia	51
I.3.5.2. Herramientas de Bioinformática	51
I.4. Estudios de interacciones moleculares entre glicoestructuras y ligandos.....	54

I.4.1. Resonancia de plasmón de superficie (SPR)	54
Análisis de los datos obtenidos por SPR.....	57
II. OBJETIVOS	63
III. MATERIALES Y MÉTODOS	66
III.1. Materiales	67
III.1.1. Reactivos y disolventes	67
General	67
Azúcares	67
Electroforesis.....	67
Resonancia de plasmón de superficie	68
Disolventes derivados de biomasa	68
Líquidos Iónicos (LI)	69
Soportes para inmovilización.....	69
Glicopéptidos	70
III.1.2. Microorganismos.....	70
III.1.3. Enzimas	70
III.2. Procedimientos generales.....	71
III.2.1. Métodos microbiológicos.....	71
III.2.1.1. Medios de cultivo.....	71
III.2.1.2. Revitalización y mantenimiento de la colección BTG.....	73
III.2.1.3. Crecimiento de microorganismos	74
III.2.1.4. Inducción y caracterización de cultivos celulares.....	75
III.2.1.5. Expresión de proteínas recombinantes en <i>E. coli</i>	78
III.2.1.6. Rotura de microorganismos	79
III.2.2. Manipulación de proteínas	79
III.2.2.1. Cuantificación de Proteínas	79
III.2.2.2. Electroforesis de proteínas	80
III.2.2.3. Semipurificación de β -galactosida de <i>B. circulans</i>	81
III.2.2.4. Purificación de proteínas mediante cromatografía de afinidad.....	83

III.2.3. Ensayos enzimáticos.....	86
III.2.3.1. Determinación de la actividad enzimática de glicosidasas.....	86
III.2.3.2. Reacciones de transglicosidación	91
III.2.4. Purificación de compuestos.....	95
III.2.4.1. Cromatografía en columna de carbono-celite.....	95
III.2.4.2. Cromatografía en capa fina (TLC)	96
III.2.4.3. Cromatografía en columna de sílica gel	96
III.2.4.4. Liofilización	96
III.2.5. Inmovilización de células enteras.....	97
III.2.5.1. Inmovilización en agar y agarosa	97
III.2.5.2. Inmovilización en acrilamida	97
III.2.6. Inmovilización de la enzimas	98
III.2.6.1. Proceso de funcionalización e inmovilización en nanofibras	98
III.2.6.2. Proceso de inmovilización en polímeros fenólicos	101
III.2.6.3. Proceso de inmovilización en soporte de glioxil agarosa.....	102
III.2.6.4. Proceso de inmovilización en celite	102
III.2.6.5. Estabilización frente a pH de la enzima β -Gal-3 inmovilizada.....	103
III.2.6.6. Reacciones de desacetilación con lipasas inmovilizadas en nanofibra	103
III.2.6.7. Reacción de transglicosidación con β -gal-3 inmovilizada	104
III.2.6.8. Termoestabilidad de la enzima β -Gal-3 inmovilizada.....	105
III.2.6.9. Termoestabilidad de la enzima PSL inmovilizada en celite.....	105
III.2.6.10. Reutilización de la enzima β -Gal-3 inmovilizada en nanofibras y agarosas-TEA	105
III.2.7. Técnicas Analíticas.....	106
III.2.7.1. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	106
III.2.7.2. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN).....	107
III.2.7.3. Espectroscopía de Fluorescencia.....	107
III.2.7.4. Resonancia de Plasmón de superficie (SPR).....	108
III.2.8. Herramientas informáticas	111
III.2.8.1. Programas bioinformáticos.....	111

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	113
IV.1. Capítulo 1. Búsqueda de glicosidasas aplicadas a la síntesis de oligosacáridos.....	114
IV.1.1. Selección de organismos mesófilos productores de glicosidasas	114
IV.1.1.1. Selección de microorganismos mesófilos productores de glicosidasas de la colección BTG	116
IV.1.1.2. Reacciones de transglicosidación con células de organismos mesófilos	117
IV.1.1.3. Estudio de la actividad glicosidasa de la cepa <i>Bacillus circulans</i> USA	123
IV.2. Capítulo 2: Síntesis de glicoconjugados de interés biológico mediante el empleo de glicosidasas	133
IV.2.1. Síntesis de glicoconjugados catalizada por la β -Galactosidasa comercial de Biolacta.....	134
IV.2.1.1. Caracterización y purificaciones de la enzima comercial.....	135
IV.2.2. Producción y purificación de la β -Gal-3 de <i>B. circulans</i> ATCC 31382	144
IV.2.3. Inmovilización de la enzima β -Gal-3 de <i>B. circulans</i> ATCC 31382... ..	145
IV.2.3.1. Inmovilización de β -Gal-3 de <i>B. circulans</i> ATCC 31382 en glioxil agarosas	146
IV.2.3.2. Inmovilización de β -Gal-3 de <i>B. circulans</i> ATCC 31382 en nanofibras de carbono	154
IV.2.3.3. Inmovilización de β -Gal-3 de <i>B. circulans</i> ATCC 31382 en polímeros fenólicos	161
IV.2.4. Producción y purificación de la α -fucosidasa de <i>S. sulfataricus</i>	166
IV.2.4.2. Reacciones de transglicosidación con la α - Fuc en presencia de LIs	172
IV.2.5. Estudio del efecto del disolvente en la estructura terciaria de la enzima α -Fuc de <i>S. sulfotaricus</i> por espectroscopía de fluorescencia.....	174
IV.2.6. Síntesis de glicoconjugados con lipasas	177

IV.2.6.1. Caracterización de las lipasas utilizadas	178
IV.2.6.2. Inmovilización de lipasas en nanofibras de carbono.....	180
IV.2.6.3. Inmovilización de lipasas en celite	185
IV.3. Capítulo 3. Estudio de las interacciones proteína-heparina y proteína-heparan sulfato	189
IV.3.1.1. Análisis de interacción mediante SPR	190
V. CONCLUSIONES.....	195
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	203
VII. ABSTRACT.....	232

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Importancia biológica de las glicoestructuras

I.1.1. Oligosacáridos y glicoconjugados

Es bien conocido que los oligosacáridos presentes en las superficies de las membranas celulares juegan un importante papel en el proceso de reconocimiento y comunicación celular, mediante la interacción de los mismos con diversas proteínas (como por ejemplo las lectinas), actuando como mediadores en procesos como la adhesión o la señalización celular, y desencadenando con ello una respuesta.¹⁻³ Y es así como células, toxinas, bacterias, virus y otros microorganismos interaccionan con receptores de la superficie celular, los cuales en muchos casos son glicoconjugados (glicolípidos, glicoproteínas o proteoglicanos, Figura 1. Representación de algunas de las interacciones moleculares que ocurren en la membrana celular donde participan glicoconjugados. (Imagen obtenida de la página <http://www.ncnr.nist.gov/programs/reflect/cnbt>.), participando con ello en la mediación de multitud de fenómenos biológicos, tales como la inflamación, procesos tumorales, defensa inmune e infecciones víricas y microbianas.⁴⁻⁶

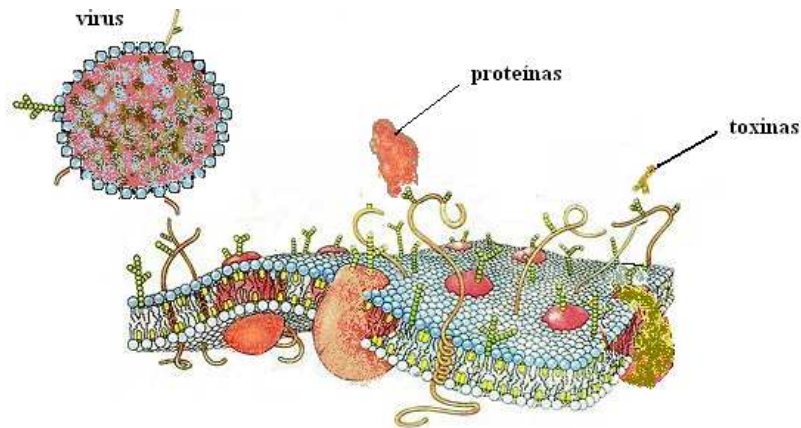


Figura 1. Representación de algunas de las interacciones moleculares que ocurren en la membrana celular donde participan glicoconjugados. (Imagen obtenida de la página <http://www.ncnr.nist.gov/programs/reflect/cnbt>).

Junto a lo anteriormente señalado, los glicoconjugados desempeñan otros papeles en los procesos celulares, como es su posible empleo como marcadores tumorales. El conocido antígeno Thomsen-Friedereich, abreviado como antígeno T representa un importante ejemplo de este tipo de carbohidrato. Está compuesto por la unión $\beta(1-3)$ de una molécula de galactosa con una *N*-acetil-galactosamina (disacárido llamado galacto-*N*-biosa), unida a su vez a una serina o treonina de una mucina de la superficie celular [Gal- $\beta(1-3)$ -GalNAc-Ser/Thr] (Figura 2A). Pertenece a la familia de los llamados antígenos de tipo carbohidrato asociados a tumores (TACA, del inglés Tumor-associated carbohydrate antigens), resultado de la glicosilación aberrante causada por los trastornos metabólicos que sufren las células al convertirse en cancerígenas.⁷ Este antígeno fue descubierto en 1930 sin demasiada trascendencia,⁸ sin embargo varias décadas después, ésta molécula y su precursor, el antígeno Tn (GalNAc-Ser/Thr, Figura 2B), se han asociado de manera inequívoca a tumores,⁹⁻¹⁰ llegando a ser expresiones inmunorreactivas del 85% de los carcinomas de pecho, colon, vejiga y próstata, que no aparecen en tejidos sanos.^{8,11} Las estrategias antitumorales desarrolladas en los últimos años tienen como base la obtención de anticuerpos frente a glicopéptidos sintéticos cubiertos de estos epítomos, alcanzando distintos niveles de éxito.⁷

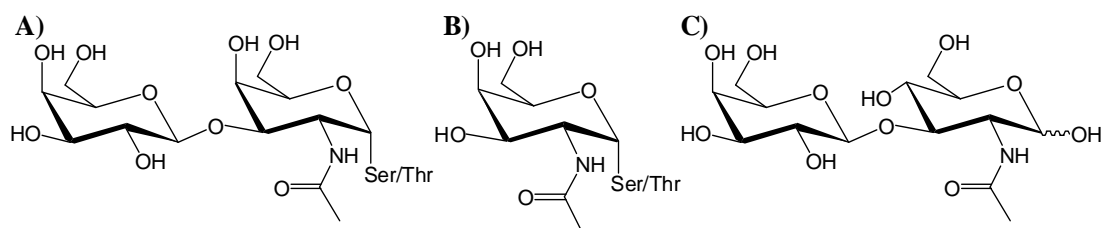


Figura 2. Estructura de algunos disacáridos y glicoconjugados involucrados en procesos de reconocimiento celular: **A)** Antígeno T (Gal- $\beta(1-3)$ -GalNAc-Ser/Thr); **B)** Antígeno Tn (GalNAc-Ser/Thr); **C)** Lacto-*N*-biosa (Gal- $\beta(1-3)$ -GlcNAc).

Los antígenos de Lewis de tipo I, en cuya estructura encontramos el disacárido formado por la unión $\beta(1-3)$ de galactosa con *N*-acetil-glucosamina [Gal- $\beta(1-3)$ -GlcNAc], también llamado lacto-*N*-biosa (Figura 2C), constituyen también un

importante ejemplo en este campo. Su expresión se encuentra localizada fundamentalmente en los fibroblastos y el lumen de células epitelias en los individuos sanos,¹²⁻¹³ participando en los procesos de extravasación.¹⁴ Debido al metabolismo modificado de las células tumorales, se han encontrado en la superficie de células de cáncer de pecho, colon, estómago, páncreas y melanoma.¹⁴⁻¹⁵ La sobreexpresión de estos antígenos favorece la metástasis de las células tumorales, debido a su participación en los ya citados procesos de extravasación.¹⁶ El tratamiento con anticuerpos frente a estos antígenos ha probado ser eficaz para inhibir la metástasis en cáncer de páncreas de ratones, lo que los convierte en interesantes dianas terapéuticas.¹⁷

La molécula de lacto-*N*-biosa es también un componente fundamental de la lacto-*N*-tetraosa [Gal-β(1-3)-GlcNAc-β(1-3)-Gal-β(1-4)-Glu], tetrasacárido presente en la leche humana al que se atribuyen cualidades prebióticas e inmunomoduladoras. (Figura 3)¹⁸

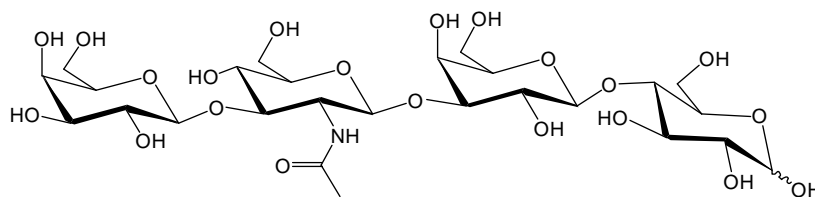


Figura 3. Estructura de la lacto-*N*-tetraosa (Gal-β(1-3)-GlcNAc-β(1-3)-Gal-β(1-4)-Glu)

En las actuales terapias disponibles para aquellas patologías relacionadas con la interacción y el reconocimiento de un patógeno, existe la problemática asociada de que no son totalmente curativas, y que suelen presentar problemas de eficacia a largo plazo debido a la aparición de resistencias. Todo ello justifica la actual búsqueda de terapias alternativas.¹⁹⁻²⁰ La búsqueda de posibles moléculas que actúen como inhibidores del desarrollo de los procesos de adhesión en los que están implicadas las interacciones carbohidrato-proteína se ha convertido en un objetivo prioritario para el desarrollo de nuevos sistemas terapéuticos contra los procesos patológicos que median en dichas interacciones.²¹⁻²⁶ Sin embargo, para poder evitar la citada

adhesión, resulta imprescindible entender a nivel molecular los procesos de interacciones específicas que tienen lugar entre las moléculas implicadas.

El proceso de aislamiento, purificación y caracterización asociado a estos epítomos ha supuesto sin embargo un impedimento al desarrollo de su investigación,¹⁰ si lo comparamos con el de otras biomoléculas como ácidos nucleicos o proteínas. En los últimos años se ha dado una creciente investigación para obtener glicoconjugados específicos en cantidades suficientes para llevar a cabo estudios que determinen su verdadera implicación en procesos tumorales o infectivos, así como miméticos que puedan ser utilizados en la lucha contra estas patologías. Alcanzar este objetivo requiere de la exploración de diversas metodologías de síntesis que permitan preparar estos carbohidratos específicos, y sus análogos, en gran cantidad y un alto nivel de pureza, así como el desarrollo de sistemas multivalentes que mimeticen los glicoconjugados presentes en las membranas celulares.^{10,27-31}

I.2. Enzimas útiles en la síntesis de oligosacáridos y glicoestructuras

Los oligosacáridos se localizan en las membranas celulares en forma de glicoconjugados, unidos a lípidos o proteínas para dar lugar a glicolípidos, glicoproteínas o proteoglicanos.³² Dadas sus diferentes implicaciones biológicas y patológicas, se ha incrementado la optimización de metodologías sintéticas para la obtención de moléculas que puedan reproducir los glicoconjugados presentes en los fenómenos de reconocimiento molecular, así como oligosacáridos ligados a otros fenómenos bioquímicos. Por ello se ha utilizado síntesis química,³³⁻³⁸ enzimática,³⁹⁻⁴⁵ o bien una mezcla de ambas (quimioenzimática).⁴⁶⁻⁵¹

El proceso de síntesis química de oligosacáridos se caracteriza por sucesivos pasos de protección y desprotección, siendo imprescindible la correcta activación y protección de la posición anomérica.⁵²⁻⁵⁴ Algunas de las metodologías clásicas para la activación

y modificación de carbohidratos fueron las descritas por Koenigs y Knorr,⁵⁵ Schmidt,^{27,56} así como Tietze.⁵⁷ Dada la importancia que presenta la regio y estereoselectividad requerida para obtener las moléculas de interés específico para cada finalidad se requieren numerosos pasos de protección y desprotección, lo que conlleva la búsqueda de métodos con la menor cantidad de reacciones intermedias para mejorar los rendimientos y disminuir la generación de subproductos y residuos, tratando de contribuir con ello a la sostenibilidad del proceso.⁵⁸⁻⁶⁰

Así, la gran cantidad de residuos que se genera en la síntesis química se constituye como una de las más importantes desventajas de este tipo de aproximación, así como el uso de sustancias contaminantes como parte del medio de reacción, en muchos casos utilizando precursores ó disolventes halogenados,^{27,55-56} agentes oxidantes fuertes⁶¹ o sales de metales pesados con Hg (II) o Ag (I).^{27,55-56} Este hecho supone claramente una incompatibilidad entre el hecho del empleo de metodologías de síntesis química y las metodologías sostenibles, pues se contravienen los principios de: prevención, economía atómica, síntesis menos contaminantes (y/o tóxicas), disolventes y auxiliares más seguros y reducción de derivados, todos ellos principios básicos de la química sostenible.⁶²

Desde la aproximación planteada por la biocatálisis, se proponen procesos para la síntesis de compuestos en condiciones ambientalmente benignas, con condiciones de reacción moderadas, catalizadores biodegradables y ambientalmente aceptables (normalmente agua), donde además suelen transcurrir con alta regio-, quimio- y estereoselectividad. A estas ventajas se les suma el hecho de una menor generación de desechos debido a que son rutas sintéticas más cortas.⁶³⁻⁶⁴ Todos estos factores llevan a considerar la síntesis enzimática de oligosacáridos como procesos mucho más sostenibles comparados con los procesos químicos tradicionales. Además, se utilizan sustancias menos tóxicas, se disminuye el uso de reactivos auxiliares y muchas veces el disolvente es agua. Por otro lado, dependiendo del tipo de enzima utilizada las

condiciones de síntesis se realizan a temperatura y presión ambiente. Todo ello está en clara sintonía con varios de los principios de la química sostenible.⁶²

Las enzimas empleadas principalmente para llevar a cabo la síntesis enzimática se clasifican en tres tipos: 1) glicosidasas (E.C. 3.2.1.); 2) glicosiltransferasas (E.C. 2.4.); 3) glicosintasas (E.C. 3.2.1. glicosidasas),⁶⁵ siendo estas últimas un grupo derivado de las glicosidasas y unidas recientemente.

I.2.1. Síntesis de oligosacáridos utilizando glicosidasas

Las glicosidasas constituyen una gran familia de enzimas (E.C.3.2.x.y.) que se encuentran involucradas en la hidrólisis de enlaces glicosídicos. Están ampliamente distribuidas en la naturaleza y han sido aisladas de diferentes organismos, tanto eucariotas como procariotas.⁶⁶⁻⁶⁸

Gracias al avance de las actuales OMICs de los últimos años, el número de las secuencias y estructuras tridimensionales de las glicosidasas ha aumentado enormemente. Esto a su vez ha llevado a un incremento en la complejidad de la clasificación de estas enzimas, que se puede basar en múltiples aspectos como las similitudes de secuencia, la estructura tridimensional, la especificidad de sustrato o el mecanismo de reacción.^{67,69} Actualmente podemos encontrar que las más de 6300 secuencias de glicosidasas se han agrupado en 130 familias basadas en la secuencia aminoacídica. A su vez, estas familias se agrupan en función de su estructura tridimensional. Así, las encontramos en 14 clanes, organizados por orden alfabético desde GH-A hasta GH-N. La clasificación en familias aporta una importante información dado su carácter predictivo en cuanto a la especificidad por el sustrato, el mecanismo de acción o la posibilidad de que se formen productos secundarios en la reacción que catalizan.⁶⁹

La mayoría de estas enzimas son exo-glicosidasas, es decir, que hidrolizan únicamente residuos glicosídicos terminales, aunque también existen las endo-glicosidasas, que hidrolizan residuos glicosídicos de una cadena oligosacáridica,^{18,70-}

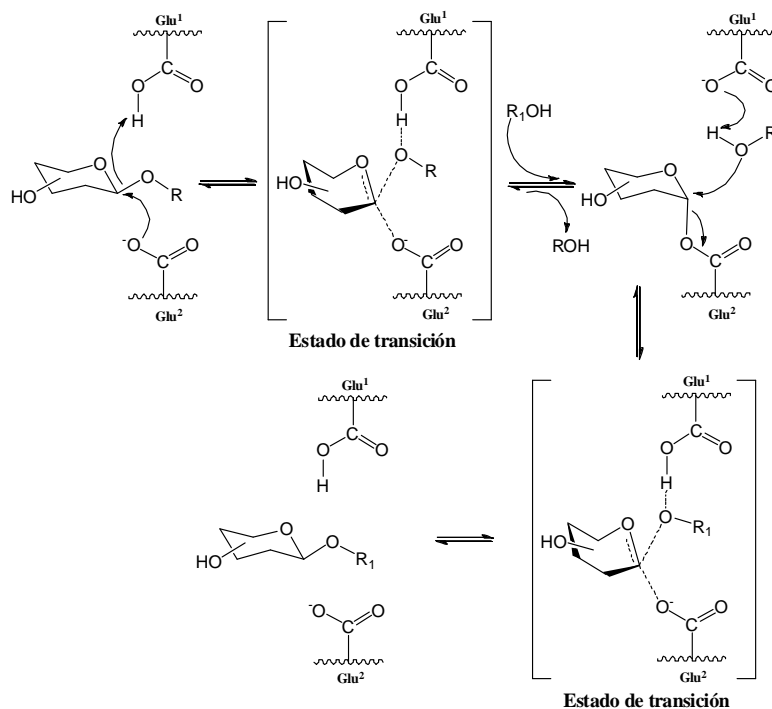
⁷¹ Las glicosidasas tienen la característica de no necesitar la intervención de ningún

cofactor y mostrar una elevada especificidad por el residuo glicosídico y la naturaleza del enlace glicosídico.^{48,72-74} En el año 1995, Withers y Aebersold⁷² propusieron el mecanismo de reacción en el centro activo de las glicosidasas, el cual se mantiene vigente hasta hoy (Esquema 1).

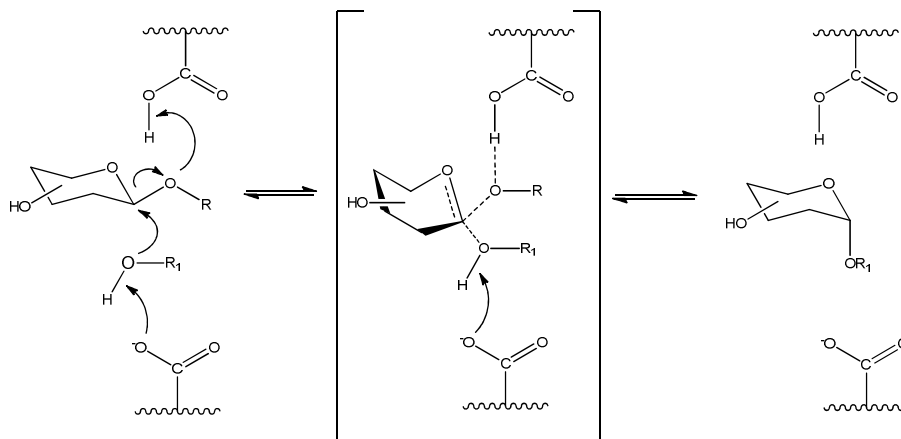
En las secuencias de las glicosidasas se apreciaba una enorme variabilidad. Sin embargo, se ha encontrado que el centro activo contiene dos residuos altamente conservados de ácido glutámico o aspártico (Glu¹ y Glu²), que pueden actuar como ácido o base respectivamente.⁷⁵ En el primer paso (Esquema 1), Glu¹ actúa como ácido, protonando el oxígeno anomérico del azúcar y convirtiéndolo en un buen grupo saliente, mientras que el residuo glicosilo se une a Glu² (llamado residuo nucleófilo) como ión oxonio. Entonces, el grupo saliente ROH se ve desplazado por la entrada en el centro activo de un compuesto nucleófilo (R₁OH), que en su medio natural es el agua.⁷² En el segundo paso, el compuesto nucleófilo (R₁OH) es desprotonado por Glu¹, y se une al carbono anomérico del glicosilo por el mismo lado por el cual se expulsó el grupo saliente, manteniéndose la configuración original.

Algunas glicosidasas presentan la posibilidad de invertir la configuración sobre el carbono anomérico (Esquema 2). Estas enzimas actúan en un solo paso, mediante el cual uno de los residuos se comporta como ácido y el otro como base, desplazando directamente al grupo saliente ROH, lo cual se asemeja a un mecanismo de tipo S_N2.⁷²

Las glicosidasas han sido muy empleadas en la síntesis de oligosacáridos. Para que estas enzimas lleven a cabo la síntesis requieren de condiciones distintas a las condiciones en sistemas biológicos, donde el agua actúa como nucleófilo (R₁OH) y la enzima realiza exclusivamente hidrólisis. Es el caso de las glicosidasas, es posible reemplazarla por otros nucleófilos, como pueden ser otros glicósidos o alcoholes no naturales (Esquema 2).⁷⁶⁻⁷⁹



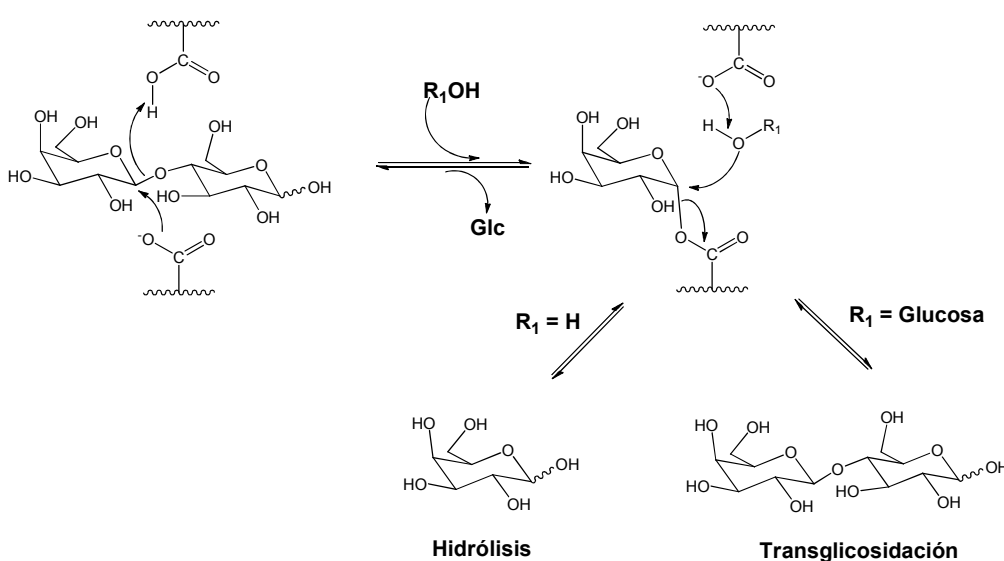
Esquema 1. Mecanismo de reacción en el centro activo de las glicosidasas con retención de la configuración, propuesto por Withers y Aebersold.⁷²



Esquema 2. Mecanismo de reacción en el centro activo de las glicosidasas que invierten la configuración propuesto por Withers y Aebersold.⁷²

En lo referido al mecanismo sintético, se ha propuesto dos aproximaciones:

1. La aproximación termodinámica: se basa en favorecer la reacción inversa mediante el desplazamiento del equilibrio químico, por lo que se le suele conocer como “hidrólisis inversa” o “síntesis por equilibrio controlado”.⁶⁵ Requiere la optimización de las condiciones de temperatura, pH, salinidad y principalmente añadir en exceso productos de hidrólisis (como galactosa, que actuaría después como nucleófilo), y disminuir la presencia de agua, para desfavorecer la hidrólisis.⁸⁰⁻⁸¹ Para llevarlo a cabo se suelen utilizar mezclas de agua-disolvente, evitando que ésta alcance concentraciones importantes y con ello disminuyendo las posibilidades de que pueda entrar al centro activo de la enzima y disminuir la hidrólisis.



Esquema 3: Mecanismo de reacción de las glicosidasas orientado a la hidrólisis o a la transglicosidación dependiendo del grupo nucleófilo que acceda al centro activo.

2. La aproximación cinética o transglicosidación: consiste en usar glicósidos activados que actúan como donadores; éstos se uniran con el residuo de ácido glutámico del centro activo de la enzima formando el complejo glicosil enzima antes descrito (Esquema 1) y al aumentar la concentración del aceptor, este compite con las moléculas de agua para realizar el ataque nucleofílico sobre el complejo. En estos casos, se suelen utilizar donadores que poseen buenos grupos salientes, por ejemplo glicósidos con fluoruros, azida o *p*-nitrofenil (*p*NF), entre otros. Una vez formado el

producto de reacción, este puede ser hidrolizado por la enzima, pero este hecho dependerá de que la transglicosidación sea más rápida que la hidrólisis y que la hidrólisis del producto de reacción sea más lenta que la del donador, aunque por lo general se obtienen bajos rendimientos.⁸²⁻⁸³

La síntesis catalizada por glicosidasas presenta dos importantes ventajas: la primera, es que no necesita pasos de protección y desprotección; la segunda, que la estereoquímica del carbono anomérico formado puede controlarse si se emplea la enzima adecuada, aunque en muchos casos se obtiene un producto mayoritario y mezcla de isómeros.⁸⁴⁻⁸⁷

Las glicosidasas se encuentran ampliamente extendidas en la naturaleza, existiendo gran variedad atendiendo al tipo de sustrato que reconocen y según el tipo de enlace que hidrolizan. Actualmente la oferta comercial de los laboratorios japoneses, europeos y americanos se ha incrementado, fundamentalmente debido al gran número de aplicaciones de estas enzimas. Sin embargo, aún no existe suficiente disponibilidad comercial de muchas de estas glicosidasas.

Dos de los organismos de interés para la búsqueda y caracterización de glicosidasas en el presente trabajo de investigación han sido *Bacillus circulans* ATCC 31382 y el termófilo *Sulfolobus sulfataricus* P2.

I.2.1.1. β -Galactosidasa β -Gal-3 de *Bacillus circulans* ATCC 31382

Bacillus circulans es una bacteria mesófila, Gram positiva, en forma de bastón que habita en el suelo.⁸⁸ La cepa ATCC 31382 se sabe que es capaz de producir tres isoformas de β -galactosidasa, cada una de las cuales hidroliza un tipo determinado de enlace glicosídico: $\beta(1-3)$, $\beta(1-4)$ y $\beta(1-6)$.⁸⁹ En el año 1997 se llevó a cabo la clonación por primera vez del gen de la enzima con actividad $\beta(1-3)$, a la que se denominó β -Gal-3 o β -Gal-C.⁹⁰ Esta enzima, con un tamaño de 67 kD, pertenece a la familia GH35 de las glicosil hidrolasas. Además de hidrolizar enlaces de tipo $\beta(1-3)$,

esta enzima también es capaz de llevar a cabo reacciones de transglicosidación cuando se utiliza como donador *p*NF- β -D-Galactopiranosido (*p*NF- β -Gal) y como aceptores GalNAc y GlcNAc,⁹¹ y en menor medida Manosa (Man),⁹² para la síntesis de Gal- β (1-3)-GalNAc, Gal- β (1-3)-GlcNAc y Gal- β (1-3)-Man respectivamente.

Tal como se describió anteriormente, los disacáridos β (1-3) presentan un papel fundamental en la estructura de un gran número de glicoconjugados.^{9-10,16,93-96} Su síntesis química se ha llevado a cabo y se ha optimizado para hacerla más eficiente, pero aún así se caracteriza por pasos elaborados de protección y desprotección,^{55,97-101} lo que hace más interesante y sostenible la síntesis mediante métodos enzimáticos.

En la actualidad, tan sólo se encuentra comercialmente disponible la β -galactosidasa de testículos bovinos, capaz de llevar a cabo la síntesis del enlace β (1-3). Sin embargo, su extracción de un órgano animal supone un inconveniente a su disponibilidad para su uso a gran escala, y además presenta un bajo rendimiento del 28% en la síntesis de Gal- β (1-3)-GalNAc.¹⁰²⁻¹⁰⁵

En nuestro grupo de investigación se ha llevado a cabo el clonaje y expresión de la proteína β -Gal-3, y se ha empleado para la síntesis de disacáridos Gal- β (1-3)-GalNAc y Gal- β (1-3)-GlcNAc con altos valores de rendimiento tanto en medios tamponados como en presencia de solventes sostenibles. En dichos estudios, se reportó un valor de rendimiento de transglicosilación del 51% y 49% con los aceptores GlucNac y GalNac respectivamente en medios tamponados, y un incremento de la regioselectividad del 99% y 95% con los mismos aceptores respectivamente, pero en presencia de una concentración de 2 M del cosolvente DMA1.¹⁰⁶

Finalmente, estudios posteriores de nuestro grupo de investigación llevados a cabo con la misma enzima, pero en presencia de un 30% v/v del líquido iónico [Bmin] [PF6], han reportado un rendimiento en la transglicosilación del 97% para los aceptores arriba mencionados.¹⁰⁷

I.2.1.2. β -Galactosidasa de *Bacillus circulans*: Biolacta No 5 (Daiwa kasei)

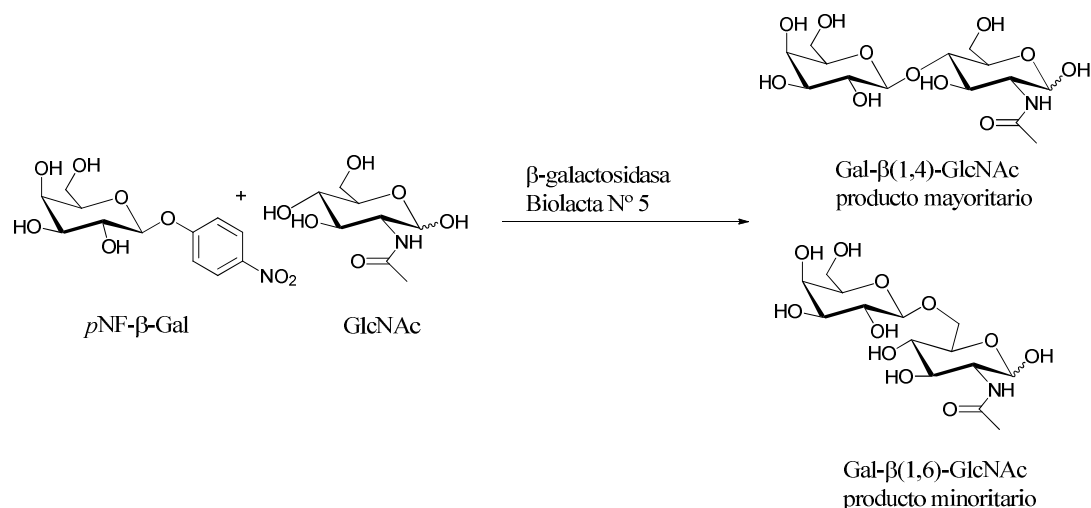
La enzima comercial Biolacta No 5 de la casa Daiwa kasei (Osaka, Japón), es una β -galactosidasa, proveniente del organismo *Bacillus circulans* y según la literatura consultada, éste preparado comercial se elabora con la cepa ATTC 31382 descrita anteriormente.⁹⁰

Múltiples estudios se han llevado a cabo empleando este preparado enzimático, determinando en ellos su capacidad sintética durante la hidrólisis de lactosa, identificando hasta 11 oligosacáridos como subproductos de la reacción.^{106 108109} Por otra parte, se han llevado a cabo ensayos de reacciones de transglicosidación, donde principalmente se emplea el *p*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (*p*NF- β -Gal) como donador y la *N*-Acetil-D-glucosamina (GlcNAc) como aceptor. De estos ensayos se ha concluido que ésta enzima favorece la formación de enlaces de tipo $\beta(1\rightarrow4)$ dando lugar mayoritariamente a la síntesis de *N*-Acetil-D-Lactosamina (Gal- $\beta(1\rightarrow4)$ GlcNAc ó LacNAc) y en menor proporción *N*-Acetil-D-Alolactosamina (Gal- $\beta(1\rightarrow6)$ GlcNAc ó N-Allo, Esquema 4). Tal como se indicó anteriormente, el disacárido $\beta(1\rightarrow4)$ presenta un papel fundamental en la estructura de un gran número de glicoproteínas y glicolípidos.^{110- 113}

Sin embargo, resulta curioso que el preparado comercial de Biolacta N°5 no lleve a cabo la síntesis de oligosacáridos con enlaces $\beta(1\rightarrow3)$, lo cual si ha sido descrito para la cepa ATCC 31382 de éste organismo.¹¹⁴ Hasta la fecha, aún se desconoce con exactitud la razón de esta carencia de actividad, aunque se ha descrito que pudiera estar relacionado con una represión producida por el medio de cultivo utilizado durante la producción o bien, a pérdidas en el proceso de ultrafiltración de Biolacta.⁹⁰

La síntesis de disacáridos Gal $\beta(1\rightarrow4)$ GlcNAc y Gal $\beta(1\rightarrow6)$ GlcNAc ha sido ampliamente estudiada por varios grupos de investigación,^{80,115-117} con la finalidad de

mejorar los rendimientos del isómero $\beta(1\rightarrow4)$ o de cambiar su regioselectividad para favorecer uno de los isómeros formados. Dentro de las estrategias empleadas para mejorar este proceso, se han considerado como opciones disminuir la temperatura, el tiempo de incubación (3h), las unidades enzimáticas (6UI) y el pH (5,0).⁸⁰



Esquema 4. Síntesis de *N*-acetil-D-lactosamina, isómero $\beta(1\rightarrow4)$, catalizada por Biolacta N° 5, utilizando GlcNAc como aceptor y *pNF*- β -Gal como donador. Esta reacción suele generar como producto secundario *N*-acetil-D-alolactosamina (isómero $\beta(1\rightarrow6)$).

β -Galactosidasas aisladas de Biolacta No 5

En el año 1984, Mozaffar y *col*¹¹⁸ llevaron a cabo el aislamiento de dos β -galactosidasas del preparado comercial de Biolacta No 5, utilizando diversas técnicas de cromatografía de permeabilidad en gel y de intercambio iónico. Fruto de este trabajo, se concluyó que las β -galactosidasas aisladas, denominadas como I y II, poseían un peso molecular aparente de 240 kDa y 160 kDa, respectivamente. Este valor se obtuvo por filtración en gel (Sephadex G-200) y se corroboró con electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE). Los parámetros determinados en dicho estudio se muestran en la Tabla 1.

Sin embargo, 14 años después, Vetere y Paoletti ⁸⁰ llevaron a cabo un proceso de purificación con el fin de aumentar la regioselectividad en la síntesis de disacáridos utilizando β -galactosidasas de *B. circulans*. En este proceso de purificación, además de las dos β -galactosidasas (I y II) descritas anteriormente, encontraron una tercera isoenzima de este tipo. Estos autores llevaron a cabo un análisis comparativo de las enzimas aisladas, con respecto a las encontradas inicialmente por Mozaffar y col,¹¹⁸ aunque no se valoró en ningún caso la síntesis de oligosacáridos con éstas enzimas. La diferencia más importante de ambos estudios fue el peso molecular de las enzimas encontradas.¹¹⁹ Algunos de los parámetros medidos en este estudio se encuentran recogidos en la Tabla 1.

Tabla 1. Comparación de las propiedades de las β -galactosidasas purificadas del preparado comercial Biolacta No 5 en los estudios publicados.

Enzima	PM (kDa) ^a	PM (kDa) ^b	AE. UI/mg ^a	AE UI/mg ^b	pH óptimo ^a	pH óptimo ^b	Temp. Óptima ^a	Temp. Óptima ^b
I	240	212	128 (2-16mM)	75,2	6,0	6,0	45 °C	44 °C
II	160	145	56 (2-16mM)	15,3	6,0	4,0	60 °C	74 °C
III	--	86	--	10,2	--	4,0	--	60 °C

PM: peso molecular; AE: actividad específica. ^a Estudio realizado por Mozaffar y col.¹¹⁸ ^b Estudio realizado por Vetere y Paoletti.¹¹⁹

Conviene resaltar que en ninguno de los dos estudios antes mencionados se lleva a cabo electroforesis en condiciones no desnaturizantes ni de las enzimas purificadas ni del preparado comercial, a fin de poder observar la posible presencia de subunidades y/o conglomerados liberados en el SDS-PAGE. Finalmente, todavía hoy en día, no se conoce a fondo cual de las tres enzimas es la responsable de la síntesis de cada uno de los disacáridos (β [1→4] y β [1→6]), pues los autores de los estudios

de tales purificaciones no llevaron a cabo estudios de ello, y hasta la fecha no existen publicaciones sobre éste tema.

Sin embargo, en nuestro grupo de investigación se llevó a cabo la semipurificación de las enzimas contenidas en el preparado comercial Biolacta, y, mediante su empleo, se realizó el estudio de la capacidad sintética diferencial de las fracciones obtenidas.¹²⁰

I.2.1.3. Glicosidasas de *Sulfolobus sulfataricus* P2

Las investigaciones en ambientes extremos llevadas a cabo en las últimas décadas han puesto de manifiesto la existencia de microorganismos capaces de vivir en condiciones que desde una perspectiva humana parecen imposibles, a los cuales se les conoce como extremófilos. Sus condiciones de vida pueden implicar bajas ó altas temperaturas, valores de pH extremos ó altos niveles de sal, siendo el principal requisito para su desarrollo la disponibilidad de agua líquida.¹²¹⁻¹²² Esta resistencia a ambientes extremos hace de estos organismos, y en especial sus enzimas, biocatalizadores de gran interés industrial.¹²³⁻¹²⁷

Los organismos que poseen una temperatura óptima de crecimiento entre 45°C y 80°C se denominan termófilos y los que superan este valor se denominan hipertermófilos.^{128,129,130} Para entender la termoestabilidad de éstos organismos se han llevado a cabo varios estudios, atribuyendo parte de la justificación a la mayor cantidad de interacciones moleculares presentes, como por ejemplo: puentes de hidrógeno, interacciones iónicas, puentes disulfuro e interacciones hidrofóbicas,¹³¹ a la mayor cantidad de cargas eléctricas en la superficie de la proteína, a un aumento en la hidrofobicidad de su núcleo y al reemplazo de aminoácidos considerados como “termolábiles” que están expuestos al disolvente.^{125,132}

Dentro de los organismos hipertermófilos, el género *Sulfolobus*, establecido por Brock en 1972,¹³² está bastante estudiado. Incluye cepas termófilas, con temperaturas óptimas que se encuentran en el rango de 55°C a 80 °C. Suelen ser generalmente células esféricas que frecuentemente producen lóbulos y con una membrana celular

inusualmente falta de peptidoglucanos. De preferencia acidófila, toleran pH hasta 2-3.¹³² La especie *Sulfolobus sulfataricus* es una bacteria aerobia termófila, con temperatura óptima de crecimiento de 80 °C y pH 2.0 a 4.0, que tiene la capacidad de metabolizar azufre. Se ha empleado como modelo para el estudio de los mecanismos de replicación de ADN, transcripción, traducción, integración cromosómica o ciclo celular,¹³⁴⁻¹³⁵ constituyéndose en el organismo de la rama crenarquea más estudiado. Su cepa P2, empleada en el presente trabajo, ha sido secuenciada y anotada en un proyecto conjunto entre la Unión Europea y Canadá.¹³⁶

Con anterioridad, se habían caracterizado enzimas α -fucosidasas de cepas de *Thermus sp.*, capaz de llevar a cabo reacciones hidrolíticas con retención de la configuración anomérica.¹³⁶

Las termozimas (enzimas provenientes de organismos termófilos), presentan una serie de ventajas frente a sus análogas mesófilas: mayor resistencia a disolventes orgánicos, detergentes, cambios de pH,^{123,129,137} o que tienen una mayor estabilidad y una vida media más prolongada, lo que hace que disminuya la necesidad de sustitución en los procesos y facilita su almacenamiento.¹³⁸

En un trabajo realizado por el grupo de Dr Moracci, publicado en el año 2003, se llevó a cabo la clonación del gen codificante de la enzima α -fucosidasa de *Sulfolobus sulfataricus*. En el mismo, se llevó a cabo el estudio de la capacidad de transglicosilación de dicha enzima, empleando como sustrato donador el *p*-nitrofenol- α -L-fucopiranosido y como sustrato aceptor el *p*-nitrofenol- α -D-glucopiranosido. De dicha reacción, realizada en tampón fosfato 20 mM a una temperatura de 75°C, se aislaron como productos los disacáridos α -L-Fuc-(1-3)- α -D-Gluc-O-*p*NF, α -L-Fuc-(1-2)- α -D-Gluc-O-*p*NF y α -L-Fuc-(1-3)- α -D-Fuc-O-*p*NF.¹³⁹

I.2.1.4. Síntesis de glicoconjugados utilizando lipasas

Las lipasas (EC 3.1.1.3, triacilglicerol lipasas) son un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis y síntesis de ésteres carboxílicos. Se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, encontrándose en animales, plantas, hongos y bacterias.¹⁴⁰⁻¹⁴¹ Se caracterizan por su alta regioselectividad y estereoselectividad.¹⁴²⁻¹⁴⁴, y una de las principales características es su alta promiscuidad catalítica, definida como la capacidad que poseen las enzimas de catalizar reacciones que se diferencian de su reacción fisiológica natural.¹⁴⁵⁻¹⁴⁷ Aprovechando esta característica, se han logrado realizar numerosas reacciones catalizadas por distintas lipasas en las que se obtienen productos con enlaces distintos a ésteres,¹⁴⁵ tales como: la síntesis de amidas,¹⁴⁸ reacción de Mannich,¹⁴⁹⁻¹⁵⁰ adiciones aldólicas¹⁵¹ y formación de enlaces carbono-carbono,¹⁵²⁻¹⁵³ entre otras.

I.2.1.4.1. Mecanismo catalítico de las lipasas

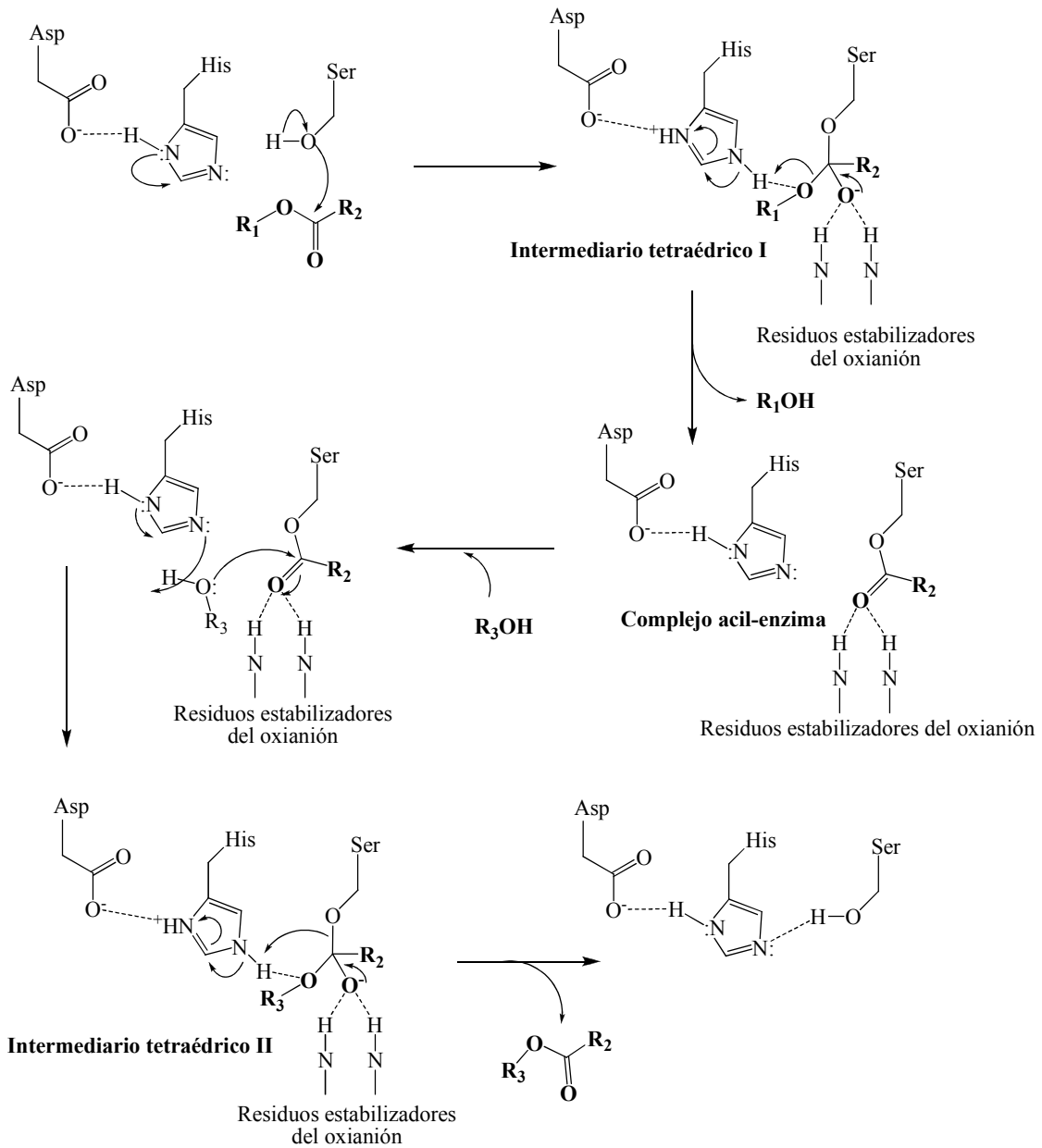
Las lipasas son enzimas que debido a su mecanismo de catálisis resultan muy versátiles y dan lugar a numerosas reacciones. El mecanismo catalítico de las lipasas (Esquema 5) es muy similar al mecanismo que presentan las enzimas de tipo serin-proteasas.^{141,154} En el año de 1990, tras la realización de diversos estudios de difracción por rayos X, se encontraron dos estructuras posibles para las lipasas.¹⁵⁵ En ellas se determinó la presencia de una característica estructura única, que no se ha encontrado en ningún otro tipo de enzima hasta la fecha.¹⁴¹ Así, las lipasas presentan dos posibles formas: “tapadera abierta” y “tapadera cerrada”. La forma de tapa cerrada es una forma inactiva que impide el acceso de los sustratos al centro activo de la enzima y la forma de tapa abierta facilita su acceso.¹⁵⁵

En el primer paso del mecanismo catalítico de las lipasas (Esquema 5), el sustrato que presenta un grupo éster, accede al centro activo de la enzima donde el carbonilo es atacado por el hidroxilo de la serina formando un primer intermediario de estructura tetraédrica. En este proceso, el grupo hidroxilo de la serina cede el protón que es captado por el nitrógeno imidazólico del residuo de una histidina adyacente.

Dicha histidina queda cargada positivamente y esta carga es estabilizada por la carga negativa del aspartato o glutamato vecinal. La carga negativa que se habría originado por la pérdida de un protón en la serina sufre una transposición, y se ubica en el oxígeno del grupo que originalmente formaba el carbonilo. Este oxianión es estabilizado por residuos vecinales en el entorno del centro activo de la enzima.

En el segundo paso, se rompe el intermediario tetraédrico, debido a que el protón presente en el residuo de imidazolio de la histidina se transfiere a la cadena del alcohol que formaba el éster inicial. De esta manera se libera una molécula de alcohol y el resto de la molécula original queda unido al centro activo de la enzima en forma de un complejo acil-enzima. Este complejo de acil-enzima es atacado por una tercera molécula nucleofílica cuya identidad química no está limitada a los grupos alcohol, sino que puede variar y con ello dar lugar a la formación de distintos tipos de síntesis. Cuando, en este paso, el grupo entrante es una molécula de agua, se lleva a cabo la hidrólisis, como suele ocurrir en los sistemas biológicos. Este nucleófilo realiza un ataque sobre el carbonilo del complejo acil-enzima dando lugar a la formación de un nuevo intermediario tetraédrico como el del primer paso.

Finalmente, el sistema tetraédrico colapsa cuando ocurre una segunda protonación sobre el oxígeno de la serina, dando lugar a la liberación de una nueva molécula (por lo general un ácido graso) y la restructuración del centro activo a su forma original. Llevando a cabo una adecuada selección de los nucleófilos, es posible obtener una variedad de productos, provocado por el hecho de que las lipasas no restringen el ataque nucleofílico a un único tipo de sustratos. En su función más natural, las lipasas utilizan agua para generar la hidrólisis de este complejo acil enzima dando lugar a la liberación de ácidos grasos,¹⁵⁶ sin embargo se han descrito numerosas reacciones con otros sustratos, tales como alcoholes para obtener reacciones de transesterificación,¹⁵⁷ aminas para dar lugar a la aminólisis,¹⁴⁸ el uso de amoníaco para realizar reacciones de amonólisis,¹⁵⁸ el uso de peróxido de hidrógeno para realizar perhidrólisis¹⁵⁹ y el uso de hidracina, para la hidrazinólisis.¹⁶⁰



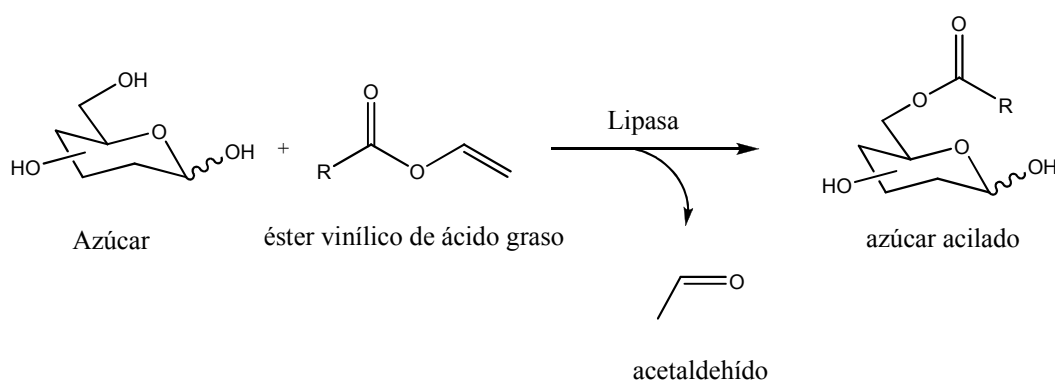
Esquema 5. Mecanismo catalítico de las lipasas (Adaptado de Schmid y Verger).¹⁴¹

I.2.1.4.2. Lipasas en la síntesis de glicoconjugados

Dadas las numerosas ventajas de las lipasas como biocatalizadores, estas enzimas se han utilizado en la síntesis de glicoconjugados. El objetivo fue obtener tensoactivos

biodegradables al sintetizar ésteres de azúcares, mediante la acilación de un grupo hidroxilo del azúcar con ácidos grasos.¹⁶¹⁻¹⁶³ Estos compuestos presentan también actividad antimicrobiana contra organismos como *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearotherophilus* y *Escherichia coli*, lo que convierte a este tipo de compuestos en sustancias con interés terapéutico.¹⁶⁴⁻¹⁶⁶

Para la acilación de azúcares por lo general se utilizan ácidos grasos activados en forma de ésteres vinílicos¹⁶⁷⁻¹⁶⁸ de ésta manera la reacción se vuelve completamente irreversible, pues el grupo vinílico saliente tautomeriza para formar acetaldehído (Esquema 6).



Esquema 6. Representación de la acilación selectiva de un azúcar (en posición 6) a partir de un éster activado, catalizada por una lipasa.

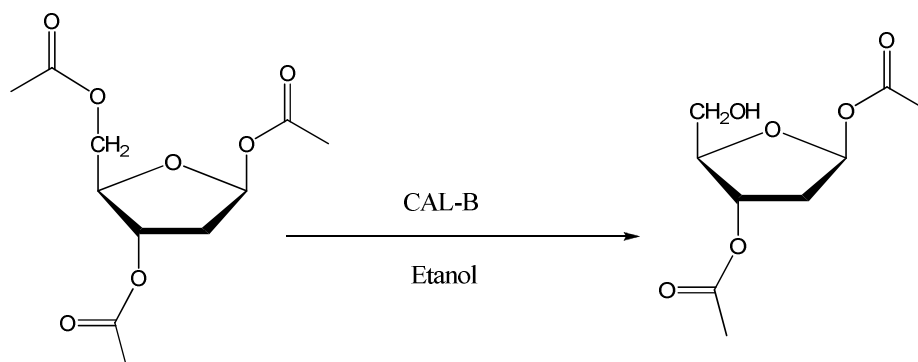
Tal como se muestra en la Tabla 2, la mayoría de las reacciones de acilación descritas empleando lipasas ocurren predominantemente sobre la posición del hidroxilo del carbono 6 del azúcar, y utilizando fundamentalmente la lipasa de *Candida antarctica* (CAL), principalmente su lipasa B (CAL-B), aunque otras enzimas como la de *Candida rugosa* (CRL), *Pseudomonas cepacia* (PCL) y *Thermomyces lanuginosus* (TL) también han sido utilizadas.

Tabla 2. Resultados descritos de algunas lipasas utilizadas en la síntesis de ésteres de azúcares acilados con ácidos grasos.

Enzima	Acilante	Azúcar	Posiciones aciladas	Referencia	
CAL-B	Laurato de vinilo	Sacarosa	6, 6'	[164]	
		Maltosa	6'	[164]	
		Glucosa	6	[168] [164]	
	Palmitato de vinilo	Ácido palmítico	Sacarosa	6, 6' y 1'	[169]
			Ácido láurico	D-fructofuranosa	1
				D-fructofuranosa	1
CAL	Ésteres de oxima de acetona	2-desoxi-D-arabinohexopiranosas	6	[170]	
		2-desoxi-D-lixohexopiranosas			
	Butanoato de etilo	Sacarosa	6 y 6'	[171]	
		Trehalosa	6 y 6'		
		Maltosa	6	[171]	
		Maltulosa	6, 6' y 1'	[171]	
	Dodecanoato de etilo	Sacarosa	6 y 6'		
		Trehalosa	6 y 6'		
		Maltosa	6		
	CRL	Acetato de vinilo	6-metil-O-Tritil-β-D-glucopiranosido	2 y 3	[172]
PCL	Ésteres de la oxima de la acetona	2-desoxi-D-arabinohexopiranosas	6	[170]	
		2-desoxi-D-lixohexopiranosas	6		
TL	Laurato de vinilo	Sacarosa	6, 6' y 1'	[164]	
		Maltosa	6'		
		Glucosa	6		
	Palmitato de vinilo	Sacarosa		6, 6' y 1'	

CAL: *C. antarctica*, CAL-B: lipasa B de *C. antarctica*, CRL: lipasa de *C. rugosa*, PCL: lipasa de *P. cepacia*, TL: lipasa de *T. lanuginosus* (TL).

Otra estrategia utilizada para la obtención de azúcares modificados es la desprotección regioselectiva de azúcares peracetilados mediante la utilización de lipasas. Gudiño y col,¹⁷³ han publicado la desacetilación regioselectiva de pentafuranósidos peracetilados, utilizando CAL-B en presencia de etanol. Los resultados han mostrado que la lipasa muestra una preferencia para la desacetilación de la posición 5 de este azúcar, dando lugar al hidroxilo libre, según se muestra en el Esquema 7. Desacetilación asimétrica de 2-desoxi-1,3,5-tri-O-acetil β -D-ribofuranosa catalizada por CAL-B en etanol (Gudiño y col.).¹⁷³ De la misma forma se han descrito desacetilaciones regioselectivas catalizadas por otras lipasas (*Pseudomonas fluorescens* y *C. rugosa*) en la posición 4 de piranósidos peracetilados,¹⁷⁴ así como en las posiciones 1 y 6.¹⁷⁵ Estos procesos de desacetilación regioselectiva dependen de varios factores como son: la naturaleza de la enzima, la naturaleza del sustrato a hidrolizar y de las condiciones de reacción (entre ellas el pH y la temperatura), por lo que existen numerosas posibilidades para utilizar las lipasas como biocatalizadores en desacetilaciones selectiva de sustratos peracetilados.



Esquema 7. Desacetilación asimétrica de 2-desoxi-1,3,5-tri-O-acetil β -D-ribofuranosa catalizada por CAL-B en etanol (Gudiño y col.).¹⁷³

I.2.2. Procesos de inmovilización y estabilización de enzimas

La inmovilización es una técnica que confina a una enzima catalíticamente activa dentro de un sistema de reacción, dando lugar a un derivado insoluble que posteriormente puede ser reutilizado.¹⁷⁶⁻¹⁷⁸ Dentro de las innumerables ventajas que aporta al proceso este tipo de biocatalizadores, podemos destacar lo siguiente: mejora de la estabilidad de la enzima; permite reutilización del biocatalizador (incluso de

forma continua); el catalizador se puede separar con facilidad de la mezcla; se previene la contaminación por proteínas en el producto final y se evitan fácilmente contaminaciones microbianas en el sistema.¹⁷⁹

En términos de eficiencia, la inmovilización supone ventajas en el aspecto económico para las industrias que utilizan biocatalizadores, ya que la posibilidad de reutilizar una enzima hace que la productividad del catalizador (definida como kg de producto obtenidos por kg de catalizador) sea más alta y con ello reduce los costes de manufactura. Un ejemplo tradicional de esta mejora en la eficiencia lo constituye la producción de ácido 6-aminopenicilánico, cuya productividad es de 600 kg por kg de enzima.¹⁸⁰⁻¹⁸² Por lo anterior, si desde una perspectiva de la química sostenible, el uso de biocatalizadores es considerado como ambientalmente amigable,⁶³⁻⁶⁴ el uso de enzimas inmovilizadas puede resultar aún más sostenible, dada la posibilidad de reutilizar el biocatalizador.

El Prof. Dr. Sheldon¹⁸²⁻¹⁸³ clasifica las metodologías de inmovilización de enzimas en tres grandes grupos: I) inmovilización covalente sobre un soporte previamente funcionalizado, II) captura de la enzima en matrices orgánicas o inorgánicas (encapsulamiento) y III) entrecruzamiento de proteínas. En el presente trabajo se han empleado la primera y la segunda técnica, aplicada esta última a células enteras, que se describen a continuación en mayor detalle.

I.2.2.1. Inmovilización de células enteras por retención física o encapsulamiento

La metodología de inmovilización mediante retención física se puede clasificar en dos tipos, atendiendo al material en el cual se lleve a cabo la inmovilización del biocatalizador. Así, nos encontraremos con:

1) Atrapamiento en matrices (en geles o fibras)

Esta metodología consiste en la retención física del biocatalizador (enzimas o células enteras como se expondrá a continuación en el presente trabajo) en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa constituida generalmente por prepolímeros fotoentrecruzables o polímeros del tipo poliacrilamida, colágeno, alginato o resinas de poliuretano.

2) Inclusión en membranas (microencapsulación y reactores de membrana)

En la técnica de inclusión en membranas, los biocatalizadores están rodeados de membranas semipermeables que permiten el paso de moléculas de sustrato y de producto, pero no del biocatalizador.

A continuación vamos a describir en mayor detalle la técnica empleada en el presente trabajo.

I.2.2.1.1. Atrapamiento en matrices

Existen varias metodologías para llevar a cabo procesos donde el biocatalizador está constituido por la célula entera: a) en condiciones de cultivo en medio sólido o líquido, b) con células inmovilizadas, y c) con las células en condiciones de no crecimiento, siendo este último es el más empleado.

Será en aquellos casos en los cuales las células se encuentran fácilmente disponibles, posean una elevada actividad específica y el proceso posea un menor coste, cuando será elegida la inmovilización de células en lugar de enzimas. Otros supuestos en los que se recomienda la inmovilización de células son en el caso de enzimas que utilizan coenzimas o cofactores a concentración estequiométrica respecto al sustrato, o en el caso de procesos multienzimáticos.

Sin embargo, cuando se lleva a cabo la inmovilización por esta metodología, resulta fundamental optimizar una serie de parámetros tales como la difusión de reactivos, la resistencia de las células a la destrucción, la estabilidad y la productividad del

proceso, para evitar con ello los problemas asociados a la transferencia de masa¹⁸⁴¹⁸⁵.

En la bibliografía encontramos multitud de ejemplos de reacciones biocatalizadas con células inmobilizadas empleando diversas matrices: a) Hidrogeles iónicos: alginato,¹⁸⁶⁻¹⁸⁷ carragenato,^{188,189} pectato,¹⁹⁰⁻¹⁹² y quitosano¹⁹³; b) Termogeles: agar, agarosa, celulosa, gelatina,^{188, 194-196} y gluten,¹⁹⁷⁻¹⁹⁸; c) Polímeros: poliacrilamida, poliuretano, alcohol polivinílico y polialilamina.¹⁹⁹⁻²⁰⁰

1.2.2.1.1.1 Inmovilización por atrapamiento en geles de poliacrilamida

La poliacrilamida es un polímero muy resistente y estable. La polimerización se establece usando como monómeros acrilamida y *N,N*-metilen-bisacrilamida y añadiendo posteriormente persulfato amónico como generador de radicales.²⁰¹

Este procedimiento presenta dos problemas: la toxicidad de la acrilamida y la toxicidad de los radicales hacia el material biológico. Por este motivo, la poliacrilamida, resulta imprescindible que las células no se mantengan en contacto con la acrilamida más de dos horas sin polimerizar.²⁰²

1.2.2.1.1.2 Inmovilización por atrapamiento en agar y agarosa

El agar y la agarosa son hidrocoloides que gelifican al disminuir la temperatura, por lo que se conocen como termogeles. Su estructura está formada por la repetición de unidades de L-galactosa y 3,6-anhidro-L-galactosa con bajo contenido de grupos sulfatos (<1%).¹⁹⁶

Fue en el año 1937 cuando el profesor Araki, de la Universidad Técnica de Kyoto, logró separar dos fracciones en el agar, llamando agarosa a aquella desprovista de grupos sulfatos y que tiene casi la totalidad del poder gelificante del agar, y agarpectina a la fracción que contiene la práctica totalidad de los grupos sulfatos del agar y que apenas tiene poder gelificante. La estructura básica de la agarosa fue dilucidada por el mismo autor en el año 1956, constituyendo la primera información de este compuesto.²⁰³

Sin embargo, estudios más recientes demostraron que esta estructura coexiste con otras.²⁰⁴ En concreto, presenta otras 10 agarobiosas (unidad dimérica cuya polimerización lineal constituye la agarosa) cuyas estructuras aparecen reflejadas en la Figura 4.

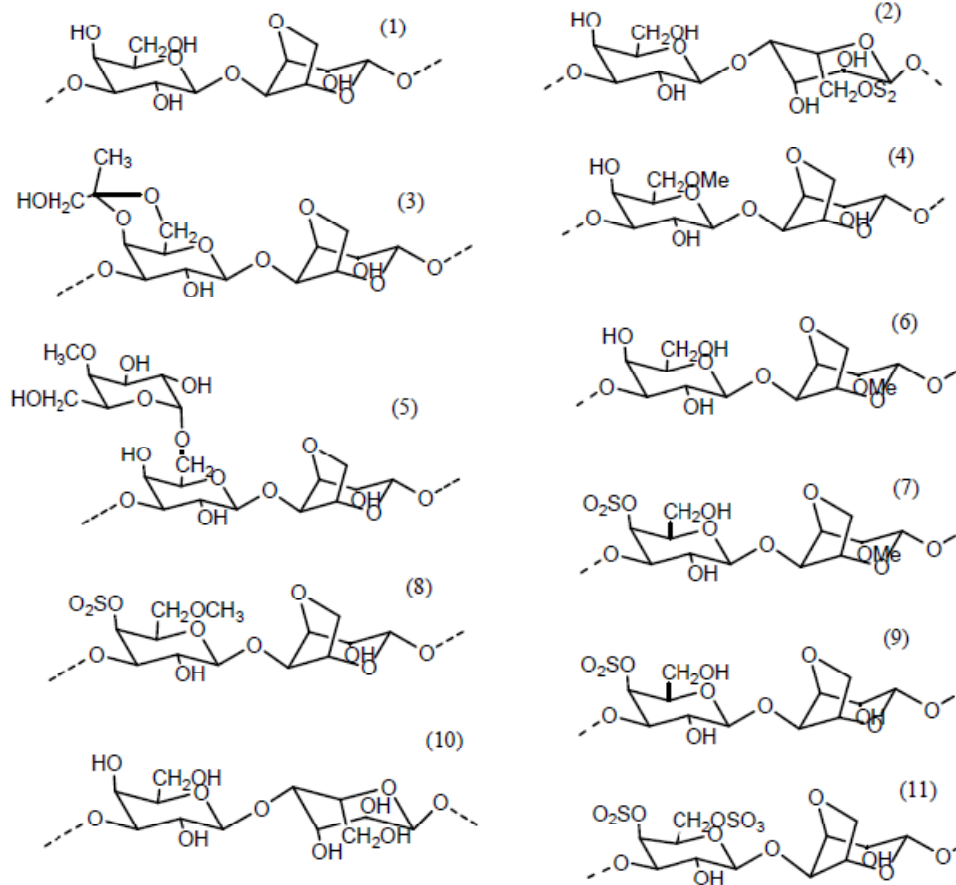


Figura 4. Estructuras de las diversas agarobiosas existentes en las algas agarófitas.

La presencia de una u otra estructura dependerá del alga del cual llevemos a cabo la extracción, de la fecha de recolección, así como de otros parámetros ecológicos.

La gelificación del agar (causada por la agarosa en él contenida), se produce exclusivamente por la formación de enlaces de hidrógeno entre las cadenas de polisacáridos, y al no depender para su gelificación de la presencia obligada de productos o iones, se aplica a distintas áreas de la industria y la investigación.^{205 206}

En el caso de la inmovilización de enzimas en agar hay que tener en cuenta que los agentes captadores de protones, tales como urea, guanidina, yoduro potásico, tiocianato sódico, etc, dificultan, e incluso, cuando se encuentran en concentraciones elevadas, pueden impedir la gelificación, debido a que bloquean la formación de enlaces de hidrógeno.

I.2.2.2. Inmovilización covalente por unión a un soporte

La inmovilización covalente sobre un soporte es un proceso en el que la enzima se une a un material con el que forma un derivado estable. Los soportes pueden provenir de fuentes naturales como el quitosano,²⁰⁷⁻²¹¹ polímeros naturales químicamente modificados como glioxil agarosas,²¹²⁻²¹⁴ soportes orgánicos funcionalizados,²¹⁶⁻²²⁰ o inorgánicos como la sílica mesoporosa.²²¹⁻²²²

La unión covalente es una opción muy utilizada debido a la ventaja de que la unión enzima-soporte es irreversible. Para el presente trabajo se han elegido múltiples soportes: orgánicos funcionalizados con superficies macroporosas, glioxil agarosas, nanofibras de carbono, sílica ó polímeros de naturaleza fenólica. En todos los casos, estos soportes se han empleado para inmovilizar enzimas de interés en la síntesis de oligosacáridos y glicoconjugados.

I.2.2.2.1. Nanofibras de carbono

En la última década se ha producido un gran avance en la síntesis de nuevos nanomateriales, particularmente en el campo de las nanofibras de carbono aplicado a la inmovilización covalente de enzimas.²²³⁻²²⁶ Su empleo ha generado un gran impacto en el desarrollo de sensores,^{223,227-228} dadas sus características propiedades electrónicas, mecánicas, y conductividad, así como su estabilidad química.²²⁹

En la bibliografía podemos encontrar múltiples ejemplos de inmovilización enzimática empleando materiales derivados del carbono: lipasas,²³⁰ peroxidasa de rábano, subtilisina,²³¹ glucosa oxidasa.²²³

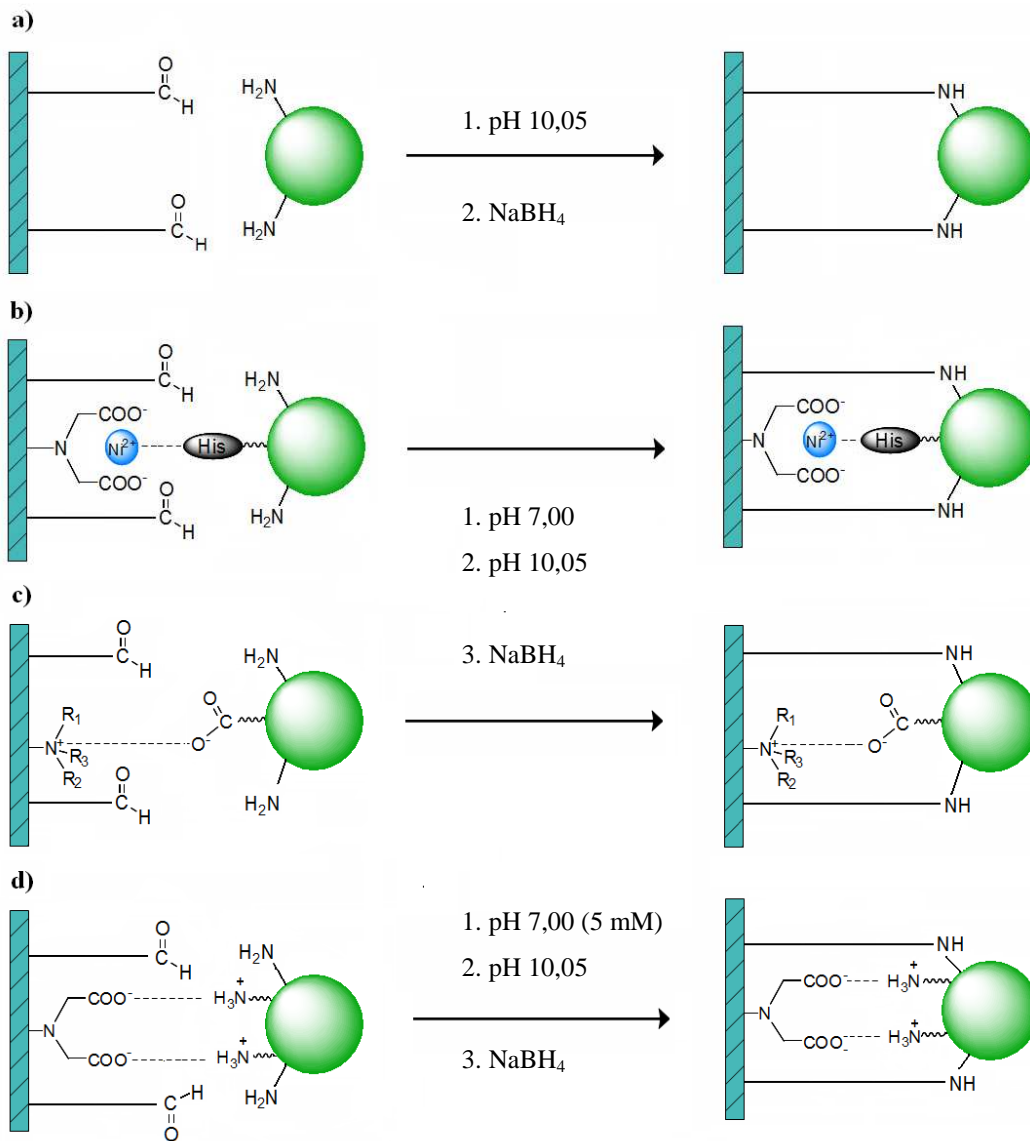
Recientemente, en colaboración con el grupo de investigación del Dr Rubio se han preparado diferentes nanofibras de carbono funcionalizados con grupos amino y carboxilo.

Glioxil agarosas:

Las glioxil agarosas son soportes muy versátiles para inmovilizar enzimas. Se basan en un biopolímero (la agarosa) que han sido modificados para funcionalizar su superficie con grupos aldehído.²¹² Los grupos aldehídos libres tienen la ventaja de que pueden reaccionar de forma específica con los grupos amino primarios libres para formar iminas mediante la formación de Bases de Schiff, que luego son reducidas con borohidruro sódico para formar aminas (Esquema 8).²¹³

Lamentablemente este tipo de inmovilizaciones requieren un pH igual o superior a 10.0, lo que hace esta técnica poco compatible con algunas enzimas sensibles a los cambios de pH. Sin embargo, el grupo de investigación dirigido por el Dr. José Manuel Guisán, ha desarrollado diversas estrategias de inmovilización con glioxil agarosas, que permiten disminuir el tiempo de reacción a pH alcalino para minimizar la desactivación enzimática. El proceso se basa en la atracción soporte-enzima mediante una funcionalización de la glioxil agarosa. De esta forma se han descrito glioxil agarosas funcionalizadas con cationes metálicos como el Ni (II), que interactúan con enzimas recombinantes que poseen extremos polipeptídicos con múltiples histidinas (*Histag*). También se han desarrollado soportes funcionalizados con grupos carboxilo que se cargan de forma negativa a pH 7.0, para atraer enzimas con cargas positivas, por lo que se requiere un punto isoeléctrico de la enzima mayor a 7.0. Finalmente, existen soportes funcionalizados con derivados de tipo catión amonio cuaternario que están cargados positivamente a pH 7.0, los cuales requieren

que la enzima esté cargada negativamente a ese valor de pH, y por lo tanto su punto isoelectrico sea menor a 7.0 (Esquema 8).²¹⁴



Esquema 8. Estrategias de inmovilización sobre glioxil agarosas. a) glioxil agarosa tradicional; b) glioxil agarosa funcionalizada con Ni(II) y ácido iminodiacético (IDA-Ni(II)); c) agarosa funcionalizada con superficie catiónica; d) agarosa funcionalizada con superficie aniónica.

En el caso de la enzima β -Gal3 de *B. circulans*, esta enzima se ha clonado con un extremo de seis histidinas en el extremo amino terminal de la enzima. Por esta razón, es posible considerarla para su inmovilización con las distintas estrategias de inmovilización desarrolladas con las glioxil agarosas.

En nuestro grupo de investigación se ha realizado un trabajo previo de inmovilización de la enzima β -Gal-3 sobre soportes de glioxil agarosa al 10% de entrecruzamiento, posteriormente empleada en la síntesis de disacáridos $\beta(1-3)$, presentado en la Tesis Doctoral del Dr Bayón con un rendimiento de transglicosilación del 34% y 30% empleando como aceptores GlcNac y GalNac respectivamente en medio tamponado.³⁸⁶

I.2.2.3. Síntesis de oligosacáridos y glicoconjugados utilizando enzimas inmovilizadas

En la bibliografía podemos encontrar numerosos ejemplos de glicosidasas y glicosintasas inmovilizadas sobre distintos soportes, y que posteriormente han sido caracterizadas y utilizadas en la síntesis oligosacáridos (Tabla 3). En dicha tabla se pueden señalar algunos datos importantes sobre las ventajas de utilizar este tipo de enzimas inmovilizadas. Por ejemplo, la β -glicosintasa de *Streptomyces* E383A, que se ha inmovilizado sobre un soporte de Ni (II)-sefarosa, conservó 93% de actividad tras nueve ciclos de uso, retiene un 83% de su actividad después de 54 días de almacenamiento a 4 °C en tampón fosfato. La enzima libre se empleó en la síntesis de distintos *p*-nitrofenil disacáridos donde los mayores rendimientos alcanzados (77%) se obtuvieron en la síntesis de *p*NF- β -Glc-(1-3)-Glc, para la misma síntesis, la enzima inmovilizada sobre sefarosa-Ni(II) aumento los rendimientos hasta un 95%.¹²⁰²³⁷

Otro ejemplo de enzima inmovilizada es la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* que ha sido inmovilizada en Duolite A-568.²³⁸ Las reacciones se llevaron a cabo con radiaciones de microondas, en tampón y en presencia de algunos disolventes

orgánicos como hexanol, hexanodiol, glicerol, dietilenglicol dietil éter. Tanto la enzima libre como la inmovilizada, se han comparado en cuanto a su actividad en la síntesis de galactooligosacáridos, dando mejores resultados la enzima inmovilizada, ya que el equilibrio de reacción se desplaza hacia la síntesis cuando se usa la enzima inmovilizada, mientras que en medio acuoso se favorece la hidrólisis del donador. Otra enzima inmovilizada que ha sido utilizada en presencia de disolventes orgánicos es la β -galactosidasa aislada de la almendra,²³⁹ aislada por precipitación de los taninos²⁴⁰ e inmovilizada sobre perlas de alginato de calcio.²⁴¹ Esta enzima ha sido utilizada en presencia de tampón y mezclas de di-isopropil éter, a distintos valores de pH mostrando un comportamiento relativamente predecible en función de las condiciones del medio.²³⁹

Tabla 3. Algunas glicosidasas y glicosintasas inmovilizadas de utilidad en la síntesis de disacáridos y glicoconjugados.

Enzima	Soporte	Productos	Referencias
<i>Streptomyces E383A</i> β -glicosintasa	Sefarosa-Ni ²⁺	Glc- β (1-3)-Glc	[237]
β -galactosidasa <i>Kluyveromyces lactis</i>	Duolita A 568 (resina defenol formaldehído)	Galactooligosacáridos	[238]
β -galactosidasa <i>B. circulans</i> (Biolacta N°5)	Eupergit C	Gal- β (1-4)-GlcNAc	[242]
β -galactosidasa <i>B. circulans</i> (β -gal-3)	CNBr-sefarosa	Gal- β (1-3)-GalNAc Gal- β (1-3)-GalNAc- α -Bn	[243]
β -Galactosidasa de <i>A. oryzae</i> .	Partículas magnéticas F ₃ O ₄ Quitosano	Galactooligosacáridos	[211]

β -glucosidasa de almendra	Perlas de alginato de calcio	2-O-Glc-Tiamina	[239]
----------------------------------	------------------------------	-----------------	-------

Un factor importante en la inmovilización de enzimas es el aumento de la estabilidad y de la termoestabilidad, así por ejemplo, enzimas provenientes de *B. circulans* se han inmovilizado en soportes como el Eupergit C²⁴² y Sefarosa activada con bromuro de cianógeno, en ambos casos con una importante retención de la actividad enzimática y con un aumento de la estabilidad.²⁴³ En el primer caso, la enzima utilizada es regioselectiva hacia la síntesis de enlaces $\beta(1-4)$, y en el segundo caso hacia enlaces de tipo $\beta(1-3)$. Efectos similares de aumento de la estabilidad se han obtenido con la β -galactosidasa de *A. oryzae*, que ha sido inmovilizada sobre partículas magnéticas de Fe₃O₄ sobre quitosano, en este caso la inmovilización favorece la estabilidad térmica y también la estabilidad a diferentes valores de pH.²¹¹

I.3. Glicosidasas en disolventes sostenibles

Al inicio de la década de 1990, apareció un campo de estudio emergente denominado Química Sostenible, el cual pretende implementar en la industria química procesos respetuosos con el medio ambiente.^{183, 244-245} Esta disciplina se conoce también como Química Verde y se inscribe dentro de las “tecnologías sostenibles”.¹⁸³

El nombre “Química Sostenible” fue acuñado inicialmente en la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América por Paul Anastas,²⁴⁴ y para el año 1993 esta entidad crea el Programa de Química Sostenible en dicho país.¹⁸³ Anastas y Warner definen esta nueva disciplina como:

*“La química sostenible es el diseño de productos y procesos químicos que reducen o eliminan la generación de residuos y sustancias tóxicas”.*⁶²

Otra definición sobre este campo la ofrece el Prof. Dr. Sheldon:

“La química sostenible utiliza eficientemente materias primas (preferiblemente de fuentes renovables), elimina residuos, y evita el uso de reactivos y disolventes tóxicos

y/o peligrosos para la salud, en la manufactura y elaboración de productos químicos”.^{183,246}

I.3.1. Los Principios de la Química Sostenible

La química sostenible está basada en doce principios que en general pretenden un diseño ambientalmente benigno de productos y procesos.^{182,244} Estos principios son:⁶²

1. **Prevención:** es mejor prevenir la formación de residuos que dar tratamiento o limpiarlos una vez creados.
2. **Economía atómica:** los métodos de síntesis deberían estar diseñados para maximizar la incorporación de todos los materiales usados en el proceso de producción en el producto final.
3. **Síntesis químicas menos peligrosas (y/o tóxicas):** dentro de lo posible, los métodos de síntesis deberían ser diseñados para usar y generar sustancias que posean poca o ninguna toxicidad para la salud humana o el ambiente.
4. **Diseño de productos químicos seguros:** los productos químicos deberían ser diseñados para obtener la función deseada minimizando su toxicidad.
5. **Disolventes y auxiliares más seguros:** el uso de sustancias auxiliares, como disolventes, reactivos de separación, entre otros, debería ser un hecho innecesario y dentro de lo posible dichas sustancias deben ser inocuas al ser usadas.
6. **Diseño con eficiencia energética:** los requerimientos energéticos de procesos químicos deberían ser reconocidos por su impacto ambiental y económico y deberían ser minimizados. De ser posible los métodos de síntesis deberían ser realizados a temperatura y presión ambiente.
7. **Uso de materias primas renovables:** deberían emplearse éstos materiales siempre que sea técnica y económicamente viable.
8. **Reducción de derivados:** los derivados utilizados (en procesos de bloqueo, protección, desprotección, etc.) deben ser minimizados, e incluso anularse de ser posible, ya que cada paso requiere reactivos adicionales y esto genera residuos.

9. Catálisis: los reactivos catalíticos (tan selectivos como sea posible) se emplearán en lugar de reactivos estequiométricos.
10. Diseño para la degradación: los productos químicos deben ser diseñados para que al final de su función se transformen en productos de degradación inocuos y no persistan en el ambiente.
11. Análisis en tiempo real para prevenir la contaminación: será necesario desarrollar metodologías analíticas para permitir en tiempo real el seguimiento y control durante el proceso antes de que se produzcan sustancias peligrosas.
12. Química inherente a la seguridad para evitar accidentes: deben seleccionar las sustancias y su forma para minimizar el potencial de accidentes, incluidas emanaciones, explosiones e incendios.⁶²

I.3.2. Disolventes Sostenibles

El concepto de disolventes sostenibles ó verdes es bastante restringido, si se consideran los postulados de la química sostenible ya mencionados. Esto implica analizar muchos supuestos y por ello la clasificación de los disolventes considerados sostenibles no estará exenta de tensiones en su totalidad, ya que difícilmente un mismo disolvente cumple todos los requisitos presentados. Desde esta perspectiva se ha llegado a postular que el disolvente más sostenible en sí mismo no es un disolvente,²⁴⁷ sin embargo existen notorias ventajas de utilizar disolventes para el desarrollo de reacciones químicas respecto a los medios sin disolventes, algunas de las ventajas citadas son las siguientes:²⁴⁸⁻²⁴⁹

- Las reacciones ocurren rápidamente y con mayor facilidad cuando los reactivos están disueltos, por que se reducen las restricciones de transferencia de masa.
- Los disolventes pueden afectar a los rendimientos y las regioselectividades de una reacción debido a la distinta solvatación de reactivos, intermediarios y estados de transición.
- Los disolventes actúan como medios para transferir el calor ayudando a minimizar los cambios bruscos de temperatura por gradientes más moderados

- Muchas veces los disolventes facilitan la separación y purificación de los productos.

Desde una perspectiva legal, en la Unión Europea, los disolventes deben reunir una serie de características que hagan su uso menos peligroso y más seguro para el medio ambiente, por este motivo se ha limitado el uso de compuestos orgánicos volátiles (VOC's por sus siglas en inglés), ya que muchos de esos vapores son tóxicos para el ser humano, constituyendo una amenaza a la salud de quienes lo utilizan y a la vez pueden potenciar efectos dañinos en el ambiente, como daños a la capa de ozono y potenciar el efecto de invernadero.²⁴⁸

Tomando en cuenta los aspectos legales sobre la sostenibilidad de los disolventes y los doce principios de la química sostenible, en especial los principios 3, 4 y 5,^{62,250} se han considerado como disolventes sostenibles los siguientes: 1) el agua, 2) disolventes orgánicos obtenidos de fuentes renovables, 3) disolventes orgánicos de bajo impacto ambiental, 4) los disolventes fluorados 5), los líquidos iónicos (LIs), 6) fluidos supercríticos (FSC).^{249,251-253} Para el presente trabajo se han utilizado disolventes descritos en las anteriores categorías con excepción de los fluidos supercríticos.

El agua

Por sus características, el agua se puede considerar el disolvente sostenible por excelencia,²⁵⁴ pues no es tóxico para el ser humano ni para el medio ambiente, no es inflamable, disuelve las enzimas en su forma natural, no requiere procesos de manufactura (aunque sí de purificación), etc. Desde una perspectiva de la química sostenible, el agua es un excelente disolvente. Sin embargo desde la perspectiva de síntesis química, muchas veces el agua no es un buen disolvente para reactivos, o resulta no ser un buen disolvente para los productos, lo que obliga a buscar métodos de separación de mezclas para purificar el producto deseado.²⁴⁸

Disolventes orgánicos obtenidos de fuentes renovables

Los disolventes orgánicos tradicionales son en su mayoría derivados del petróleo (una materia prima no renovable) e incumplen algunos de los postulados de la química sostenible,⁶² entre los que se pueden mencionar los siguientes: aumentan la formación de residuos, los procesos de síntesis química en éstos son relativamente peligrosos (lo que requiere cuidados adicionales en el proceso de síntesis), muchos de ellos son volátiles por lo que se aumentan las emisiones de VOC's, además de que por lo general poseen cierta toxicidad para el ser humano y el medio ambiente.

La obtención de disolventes procedentes de fuentes renovables puede disminuir muchas de las características mencionadas anteriormente. En primer lugar constituyen en sí mismos una forma de evitar residuos, pues convierten lo que sería un potencial residuo en un nuevo disolvente, adicionalmente el diseño de estos disolventes puede ser mejorado para cumplir otras características como mejorar su compatibilidad con la salud o el medio ambiente. Dos de los disolventes de fuentes renovables más conocidos y utilizados son el etanol y metanol,²⁵¹ pues se pueden producir en grandes cantidades por fermentación en procesos relativamente sostenibles y en sí mismos son sustancias que pueden ser biodegradadas con facilidad.

Por otro lado también existen otros disolventes obtenidos de fuentes renovables que también están ya comercializados por Loba Chemie y Sigma-Aldrich, y entre ellos podemos citar el ciclopentenil metil éter (CPME), lactato de etilo y el 2-metiltetrahidrofurano (MeTHF) (Figura 5).²⁴⁸ Otros disolventes derivados de fuentes renovables están en fase de estudio, de los que uno de los ejemplos más claro es el proyecto europeo SolvSafe,²⁴⁸ constituido por una plataforma innovadora de pequeñas y medianas empresas, junto con sectores de investigación, cuya meta ha sido la reducción de disolventes tóxicos/peligrosos actualmente utilizados, reducir los

compuestos orgánicos volátiles enviados a la atmósfera, reducir las emisiones de dióxido de carbono a la atmósfera y aumentar la cantidad de materiales renovables en uso.²⁴⁸

Finalmente, es importante comentar que el actual aumento en la producción de biodiesel (en parte debido al innegable hecho de que los combustibles fósiles son fuentes en proceso de agotamiento) ha conllevado un aumento en su principal subproducto de manufactura: el glicerol, el cual constituye cerca de un 10% de la masa total en el proceso de producción.²⁵⁵ Por lo anterior, es posible prever un aumento masivo en la producción de glicerol como subproducto de la industria del biodiesel, lo cual lo convierte en una posible materia prima a utilizar derivada de la biomasa. Por este motivo se ha explorado la posibilidad de sintetizar y caracterizar disolventes derivados del glicerol, como una alternativa de aprovechamiento de éste subproducto de la industria del biodiesel.²⁵⁶⁻²⁵⁸

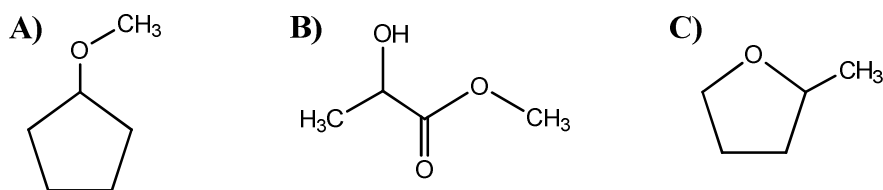


Figura 5. Estructura de algunos disolventes obtenidos de fuentes renovables disponibles comercialmente: **A)** CPME; **B)** lactato de metilo; **C)** MeTHF.

Disolventes orgánicos fluorados

La extracción por disolvente es una técnica muy utilizada en química orgánica, siendo los disolventes más utilizados el éter dietílico, diclorometano, cloroformo y agua. Este proceso se realiza normalmente mediante la explotación de la inmiscibilidad de dos fases líquidas, por lo general una acuosa y otra orgánica.²⁵⁹ En este sentido los compuestos fluorados se conocen como la "tercera fase líquida", ya que los disolventes orgánicos, el agua y los compuestos fluorados son mutuamente inmiscibles.²⁵⁹ Esta propiedad es a menudo una función dependiente de la temperatura

y permite obtener a mayores temperaturas un sistema monofásico que luego desaparece a bajas temperaturas, facilitando obtener el producto deseado en una de las fases.²⁵⁹⁻²⁶⁴

Dada su variable solubilidad, los disolventes fluorados pueden ser empleados en reacciones químicas a temperaturas en las que solo existe una fase y posteriormente, se pueden enfriar hasta separar los reactivos y productos en la fase correspondiente. Esta característica aumenta la eficiencia de los sistemas de reacción y permite además recuperar el disolvente disminuyendo su impacto en el ambiente.

Algunos disolventes fluorados (DF) son derivados perfluorados de alcanos, éter dietílico o trietilaminas. Estos disolventes fluorados se caracterizan por que sus interacciones moleculares son muy débiles, teniendo un menor punto de ebullición y una menor polaridad que los correspondientes alcanos.^{249,265} El disolvente perfluorado más barato disponible comercialmente es el conocido como “FC-72” ó perfluorohexano (C₆F₁₄). Sin embargo se han descrito muchas reacciones en el perfluorometil ciclohexano (PFMC), que es en sí mismo una alternativa más costosa. Sin embargo, el uso a gran escala de DF se encuentra limitado por el alto coste que supone.²⁶⁵⁻²⁶⁶

Líquidos iónicos (LIs)

Los líquidos iónicos (LIs) son una nueva clase de disolventes que han sido recientemente desarrollados y su uso se ha extendido ampliamente a varios campos de estudio, entre ellos, reacciones bajo catálisis enzimática.²⁶⁷⁻²⁶⁸ Los LIs generalmente están formados por cationes orgánicos y aniones que pueden ser, tanto orgánicos como inorgánicos. Actualmente son sustancias que despiertan gran interés en cuanto a su uso, debido a sus muchas propiedades: son líquidos a temperatura ambiente,²⁶⁸⁻²⁶⁹ térmicamente estables,²⁷¹ polares,²⁷² relativamente inertes,²⁷³ tienen una presión de vapor casi nula,²⁷⁴ no son inflamables,²⁷⁵ presentan una buena conductividad iónica,²⁷⁶ bajos puntos de fusión²⁷⁷ y amplias ventanas electroquímicas.²⁷⁸

Los bajos puntos de fusión de los LIs (generalmente inferior a 100°C),²⁷⁹ se han explicado por el gran tamaño que poseen sus iones y la pequeña carga de los mismos, por lo que la energía necesaria para romper los enlaces entre éstos es más baja que la energía requerida para disociar una sal clásica como el cloruro de sodio.²⁸⁰ Respecto a su polaridad, los estudios espectroscópicos sugieren que es similar a la de los alcoholes de bajo peso molecular como el metanol y el etanol.²⁸¹

Muchas de las propiedades de los LIs tales como viscosidad, presión de vapor, polaridad, y solubilidad, entre otras, se pueden modificar con una correcta selección de los aniones y cationes, llegando incluso a diseñar LIs solubles en disolventes como hexano o incluso insolubles en agua.^{277,281-282} Algunos de éstos disolventes pueden disolver cantidades relativamente grandes de hidratos de carbono, hasta 200 g/l de sacarosa, glucosa, lactosa y ciclodextrina,²⁸³ razón por la cual pueden ser una fuente de interés en la síntesis de enzimática de oligosacáridos.

Inicialmente estas sustancias se consideraron como disolventes sostenibles útiles para procesos catalíticos,²⁸⁴ ya que se pueden reciclar,²⁸⁵ aumentan en muchos casos los rendimientos y se pueden utilizar en lugar de disolventes orgánicos volátiles (incluso a temperaturas altas para reacciones enzimáticas y con mejores rendimientos), evitando con esto la emisión de vapores a la atmósfera²⁸⁴ y de riesgos a la salud humana (por inhalación). Por éste motivo, existen varias publicaciones que promocionan los LIs como disolventes sostenibles y de notorios resultados en catálisis enzimática.²⁸⁶⁻²⁸⁸ Algunos autores sostienen que la biodegradabilidad de los LIs puede ser, en algunos casos, difícil de alcanzar y que la ecotoxicidad de los mismos puede superar la de disolventes orgánicos tradicionales,²⁸⁹ sin embargo la estructura de cada LI puede ser utilizada para estimar teóricamente las probabilidades de su ecotoxicidad, lo cual es una herramienta que permite evitar el escalado de reacciones y procesos que luego pueden ser perjudiciales ambientalmente.²⁹⁰

I.3.3. Galactosidasas en disolventes sostenibles

Las galactosidasas son enzimas que tradicionalmente han sido utilizadas en medios acuosos tamponados, tanto para las reacciones de hidrólisis como de síntesis. Sin embargo, el uso de disolventes o co-solventes con este tipo de enzimas es un tema poco explorado. Por ejemplo la β -galactosidasas de *E. coli* y de *Kluyveromyces fragilis* han sido utilizadas caracterizadas en mezclas con hasta un 50% v/v de disolvente orgánico: acetona, acetonitrilo, monoglima, diglima, triglima y tetraglima entre otros. En estas condiciones presentaron menos del 40% de actividad hidrolítica (medida como Velocidad máxima (V_{max}) en cinéticas tipo Michaelis-Menten).²⁹¹ Se conocen también datos de la β -galactosidasa de *A. oryzae* en la síntesis de glicoconjugados con 1-feniletanol como sustrato de partida.²⁹²

Una de las enzimas de interés para este trabajo es la β -galactosidasa de *B. circulans*, que tolera disolventes orgánicos como acetonitrilo, acetona y *tert*-butanol en bajas cantidades debido a que puede ser desnaturalizada, sin embargo en *tert*-butanol al 10% parece mostrar mejores resultados de actividad.²⁹³ Por otra parte, muchos de los datos medidos no corresponden a disolventes que se puedan considerar sostenibles, sino disolventes orgánicos tradicionales.

Los DF se han utilizado en forma de fluidos supercríticos (fluoroformo) con la β -galactosidasa de *B. circulans*, para la síntesis del 1-*O*-(5-fenilpentil)- β -D-galactopiranosido²⁹⁴ y con lipasas para catalizar reacciones de transesterificación (tetrafluoroetano y fluoroformo).²⁹⁵

Recientemente, en nuestro grupo de han desarrollado estudios de síntesis de disacáridos y glicoconjugados en presencia de disolventes derivados del glicerol²⁵⁸ con la β -galactosidasa de *E. coli*,¹²⁰ con la enzima comercial de *B. circulans* (Biolacta)²⁹⁷ y con la enzima β -Gal-3 de *B. circulans*.¹⁰⁶

Los LIs ofrecen una serie de ventajas en la síntesis de carbohidratos debido a que éstos pueden ser solubles o insolubles, permitiendo obtener distintos procesos de

transporte, separación y purificación de los carbohidratos,²⁹⁸⁻³⁰⁰ sin embargo, su utilización en la síntesis de disacáridos catalizada por β -galactosidasas es todavía un campo limitado. Se tiene constancia de que la β -galactosidasa del preparado comercial Biolacta de *B. circulans*,³⁰¹ la β -galactosidasa de *Pyrococcus furiosus*³⁰² y la β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae*,³⁰³ se han empleado en presencia de LIs. En el primer caso, debido a la presencia de estos LIs, se obtuvieron mayores rendimientos en la síntesis del disacárido Gal β (1-4)GlcNAc, así como mayor estabilidad de la enzima,³⁰¹ mientras que con la β -galactosidasa de *P. furiosus*, solo se observó un incremento moderado en la actividad sintética de la enzima (aproximadamente un aumento del 10% respecto a las condiciones en agua), detectándose una inhibición de la enzima a altas concentraciones del LI.³⁰² Respecto a la β -galactosidasa de *A. oryzae*, se ha obtenido mayor actividad en hidrólisis del sustrato donador (*o*NF- β -Gal).³⁰³

Recientemente, en nuestro grupo de investigación se han hecho estudios del efecto de LIs sobre la actividad de la enzima TTP0042 de *Thermus thermophilus* HB27, provocándose un aumento en la actividad y un cambio de regioselectividad hacia el Gal- β (1-4)-GlcNAc,³⁰⁴ así como con el preparado comercial Biolacta, obteniendo en este caso también un incremento en el rendimiento de transglicosilación en presencia de disolventes derivados de glicerol.²⁹⁷ Por último, también se han reportado por nuestro los datos del estudio de la influencia de determinados LIs sobre la actividad de la enzima β -Gal-3 de *B.circulans*.¹⁰⁷

I.3.4. Lipasas en disolventes verdes

Las lipasas utilizadas en reacciones de síntesis por lo general requieren medios anhidros, debido a que en presencia de agua tiende a favorecer las reacciones de hidrólisis.³⁰⁵⁻³⁰⁸ Existen estudios de lipasas con actividad en disolventes verdes (aunque pocos de ellos se refieren a síntesis de carbohidratos), entre ellos: disolventes fluorados,³⁰⁹⁻³¹⁰ metil tetrahidrofurano,³¹¹ y derivados del glicerol.¹⁵⁷ Sin embargo la

síntesis de glicoconjugados tiene como principal dificultad la solubilidad de los sustratos, pues los azúcares no se tienden a disolver en medios poco polares como ocurre con los agentes acilantes.¹⁶⁸ Esto ha llevado a desarrollar este tipo de acilaciones enzimáticas principalmente en presencia de disolventes orgánicos polares (puros o en mezclas) como 2-metil-2-butanol,³¹²⁻³¹³ etil-metil-cetona,¹⁶⁹ piridina,³¹⁴⁻³¹⁵ *tert*-butanol³¹⁴⁻³¹⁶ y dimetilsulfóxido.³¹⁷

Las reacciones de acilación de azúcares llevadas a cabo con lipasas en condiciones sostenibles, se han realizado fundamentalmente en presencia de LIs, ya que muchos de ellos no tienden a desnaturalizar las enzimas como ocurre con disolventes orgánicos de polaridad similar. No existe una regla empírica que permita predecir los posibles comportamientos de las lipasas en LIs, sino que cada enzima se comporta de manera distinta en un determinado LI. Sin embargo para una misma enzima, es posible encontrar tendencias relacionadas con su actividad hidrolítica y sintética en función de las cadenas orgánicas del LI y en general con la estructura de su catión y de su anión.³¹⁸⁻³¹⁹ Las mezclas de disolventes orgánicos con agua o con LIs suelen ser muy utilizadas. En estas mezclas la superficie de contacto es determinante debido a que las lipasas suelen trabajar en la interfase.³²⁰⁻³²¹

En el año 2003 se publicó la síntesis de 1-metil-6-tritil-glucosas y 1-metil-6-tritil-galactosas acetiladas, en presencia de cloroformo, tetrahidrofurano y LIs (hexafluorofosfato de 1-butil-3-metil imidazolio ([Bmim][PF₆])) y hexafluorofosfato de 1-metoxietil-3-metil imidazolio ([Bmoem][PF₆]) utilizando la lipasa CRL. En este caso la acetilación dio como resultado mezcla de productos, observándose mayor selectividad en presencia de Lis que en presencia de disolventes orgánicos clásicos.³²² En el año 2005 Ganske y Bornscheuer,³²³ optimizaron la síntesis de ésteres de glucosa con ácido láurico, mirístico y palmítico, siendo el mejor agente acilante el ácido láurico. La enzima utilizada fue la CAL-B y el medio óptimo fue una mezcla de *tert*-butanol con un 40% de LI, utilizando: [Bmim][PF₆] y [Bmim][BF₄] (tetrafluoroborato de 1-butil-3-metil imidazolio) a 60°C durante 72 h de reacción. Bajo estas condiciones la enzima es mucho más selectiva y realiza la acilación del hidroxilo del carbono 6 de la glucosa.³²⁴⁻³²⁵ En años posteriores se ha continuado el uso de CAL-B como

biocatalizador para este tipo de reacciones utilizando disoluciones de LIs sobresaturados con azúcares,³²⁶ mezclas de LIs³²⁷ y ultrasonidos para mejorar la superficie de contacto de las lipasas.³²⁸

I.3.5. Influencia de los disolventes sostenibles en la estructura terciaria de las enzimas

Los disolventes pueden ejercer numerosos efectos sobre las enzimas, que en muchos casos no son fáciles de dilucidar. El entorno químico de una enzima y en particular su centro activo, durante una reacción química, es muy complejo. Existen iones (en caso de que se use un medio tamponado), sustratos y disolventes, valores de pH y temperaturas, que afectan las interacciones entre las distintas partes de la reacción. Dada la complejidad del sistema, pueden darse interacciones tales como: enzima-disolvente, enzima-sustrato, sustrato-sustrato, sustrato-disolvente. Por ello resulta difícil comprender la globalidad de factores que determinan el resultado final de una reacción enzimática. En la actualidad, existen distintas herramientas tecnológicas que permiten medir en condiciones bastante sensibles y exactas, algunas de las interacciones que pueden darse durante una determinada reacción química.

En el caso de las reacciones enzimáticas, se requiere desarrollar sistemas de alta sensibilidad y bajo consumo de muestra. Dentro de las diferentes técnicas existentes para estudiar la influencia de los disolventes orgánicos (sostenibles o no) en la estructura tridimensional de una enzima, podemos destacar dos de ellas, la espectroscopía de fluorescencia y las técnicas bioinformáticas. La espectroscopía de fluorescencia es una herramienta útil para detectar cambios estructurales de las proteínas debido a la presencia de disolventes orgánicos en el medio de reacción. La bioinformática, a través del modelado molecular y el “*docking*”, permite predecir, interpretar o explicar las posibles interacciones en ambientes microscópicos.³²⁹⁻³³²

En el presente trabajo se utilizarán la espectroscopía de fluorescencia como herramienta para el análisis de los resultados obtenidos.

I.3.5.1. Espectroscopia de Fluorescencia

La fluorescencia es el resultado de la emisión de luz fotoinducida por un grupo fluoróforo. Este fenómeno requiere de una excitación previa, por medio de una radiación incidente a una determinada longitud de onda, que provoca la excitación de los electrones a un nivel energético excitado de la molécula (singlete excitado). La relajación de este estado provoca la emisión de luz con un máximo de emisión en una longitud de onda mayor que la inicial.³³³⁻³³⁴ Este fenómeno está asociado a la presencia de fluoróforos que son estructuras rígidas y conjugadas que estabilizan el estado excitado. En el caso de las proteínas, la emisión de fluorescencia está directamente relacionada con la presencia del triptófano (anillo rígido conjugado) y en menor medida de la tirosina y de la fenilalanina.³³⁵ Una alta presencia de triptófanos en la proteína garantizará un espectro de emisión intenso y fácil de medir, incluso en equipos de baja sensibilidad.

Los cambios en el micro-entorno químico de un triptófano modifican la estructura del complejo excitado y con ello la longitud de onda de emisión y consecuentemente los valores de longitud de onda en los que se obtienen los máximos de fluorescencia. Esta información permite obtener datos sobre la estructura terciaria de una proteína y permite medir el efecto de factores externos como el pH o agentes químicos sobre su estructura terciaria (particularmente el entorno de los triptófanos), ya que la presencia de sustancias que afectan la estructura de la proteína repercutirá directamente en su espectro de fluorescencia.³³⁵⁻³³⁶

I.3.5.2. Herramientas de Bioinformática

Las simulaciones por ordenador han probado ser herramientas eficaces para entender las estructuras de las proteínas y sus dinámicas con el medio.³³⁷⁻³³⁹ Existen varios programas informáticos, bases de datos y servidores que ofrecen numerosas herramientas para analizar y predecir características estructurales de las proteínas como por ejemplo: punto isoeléctrico, puentes disulfuro, plegamientos, etc. Estas

predicciones se realizan en su mayoría basándose en algoritmos creados por homología con información de proteínas previamente caracterizadas.

Bases de datos

En los últimos años las bases de datos reúnen la información de genes y proteínas de numerosos organismos, así también ofrecen importantes herramientas de comparación entre la secuencias de un gen o proteína, lo que ha facilitado el acceso a este tipo de información a nivel mundial. Dentro de las bases de datos de mayor importancia para el análisis de proteínas se pueden citar las siguientes:

NCBI: El NCBI es la base de datos del “*Nacional Center for Biotechnology Information*” de los Estados Unidos de América. Su dirección web es la siguiente: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Esta es una base de datos con múltiples funciones, ofreciendo: base de datos de literatura (PubMed, especializada en biomedicina), nucleótidos, herramientas para análisis de secuencia (GenBank) y herramientas para el diseño de estructuras tridimensionales, entre otras. De ellas, una de las más utilizadas para el análisis comparativo de proteínas es el alineamiento de secuencias proteicas por medio de la herramienta “BLAST” (“*Basic Local Alignment Search Tool*”),³⁴⁰ la que permite obtener valores porcentuales de identidad entre dos ó más proteínas.

Protein Data Bank (PDB): El PDB,³⁴¹ es una base de datos online del “*Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB)*” de los Estados Unidos de América, que acepta el depósito de estructuras tridimensionales de proteínas. Su dirección web es la siguiente: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>

Las macromoléculas disponibles en esta base de datos pueden encontrarse aisladas o bien en forma de complejos: proteína-proteína, proteína-ácido nucléico y macromolécula-ligandos. Los modelos depositados provienen fundamentalmente de

difracción de rayos-X y algunos de espectroscopía de RMN. A cada una de las entradas se les asigna un código de identificación formado por 4 caracteres denominado “PDB ID”.

ExpASy (Expert Protein Analysis System): Esta es una herramienta online del “*Swiss Institute of Bioinformatics*” que permite determinar características de una determinada enzima a partir de su secuencia de aminoácidos en formato “*Fasta(Fast Alignment)*”.³⁴² Su dirección web es la siguiente: <http://web.expasy.org/>

Las herramientas más populares en la predicción de propiedades de proteínas son “*ProtParam*”³⁴³ y “*SWISSPROT*”.³⁴⁴ En la primera de ellas se obtienen varios parámetros estimados a partir de una secuencia escrita en formato *FASTA*,³⁴² tales parámetros son: peso molecular, punto isoelectrico teórico, composición de aminoácidos, composición atómica, coeficiente de extinción molar, vida media estimada, índice de inestabilidad, índice alifático y promedio de hidrofobicidad. En la segunda de ellas se indexan todas las proteínas secuenciadas y contiene múltiples referencias a otras bases de datos.

CAZy: Para el presente trabajo, *CAZy* (“*Carbohydrate Active Enzymes*”) ³⁴⁵ es una base de datos de gran utilidad, ya que ofrece información especializada en visualización y análisis de información genómica, estructural y bioquímica en enzimas activas sobre carbohidratos. La página ha sido desarrollada por el grupo de glicogenómica en arquitectura y función de las macromoléculas Biológicas de la Universidad del Mediterráneo en Provenza, Francia. Su dirección web es la siguiente: <http://www.cazy.org/>

La base de datos *CAZy* inició como página web en 1998 y en ella se describe las familias de los módulos catalíticos estructuralmente relacionados y los hidratos de carbono vinculados (o dominios funcionales) de las enzimas que degradan, modifican o crean enlaces glucosídicos.

I.4. Estudios de interacciones moleculares entre glicoestructuras y ligandos

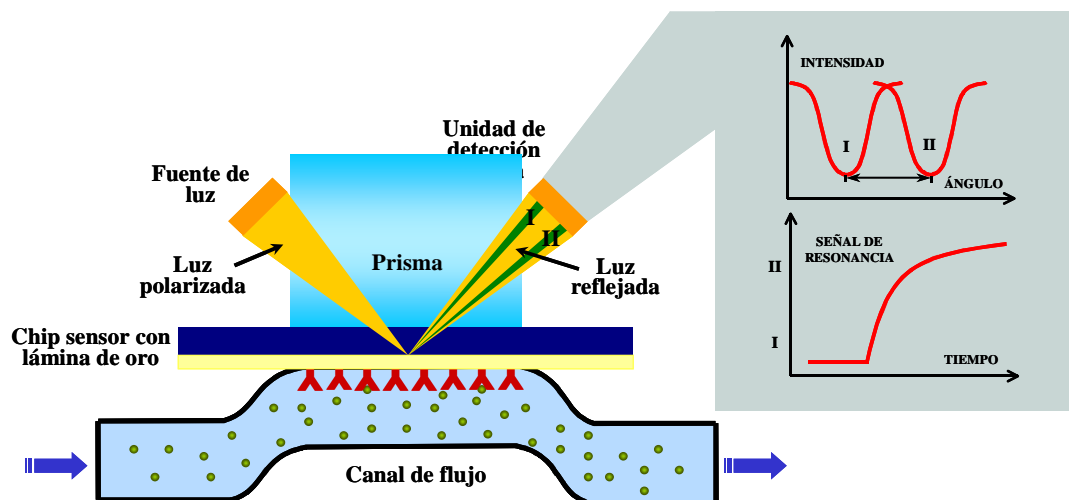
La necesidad de llevar a cabo el estudio de las interacciones moleculares entre glicoestructuras, como pueden ser los glicodendrimeros o los glicopéptidos, con sus respectivos ligandos, ha provocado el desarrollo de sistemas de alta sensibilidad y bajo consumo de muestra. Dentro de las opciones existentes para estudiar las interacciones moleculares se pueden citar; la resonancia magnética nuclear (RMN), por medio de diferencia de la transferencia de saturación (STD, del inglés Saturation Transfer Difference) que permite determinar los sitios de unión entre dos moléculas que interactúan entre sí; ³⁴⁶⁻³⁴⁸ y la resonancia de plasmón de superficie (SPR, del inglés Surface Plasmon Resonance), una herramienta que permite inmovilizar macromoléculas y fluir sobre ellas una solución de analito o ligando, cuantificando la asociación y disociación entre ambas. ³⁴⁹⁻³⁵² En nuestro caso, se empleará la técnica de SPR, aplicada al estudio de la interacción entre glicoconjugados presentes en las membranas y proteínas, como el caso de la heparina y proteínas tales como antitrombina III.

Así mismo, se llevarán a cabo estudios de interacción entre péptidos inmovilizados en las superficies de los chips y diferentes glicopéptidos.

I.4.1. Resonancia de plasmón de superficie (SPR)

La técnica de Resonancia de Plasmón de Superficie (SPR) permite llevar a cabo el análisis cinético de interacciones moleculares de un modo accesible, en tiempo real y sin la necesidad de marcar las moléculas. Como la detección es independiente de la naturaleza química de las muestras analizadas, en principio, todo tipo de moléculas son susceptibles de estudio por esta técnica: proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, fármacos, cofactores o carbohidratos. ³⁵³

La técnica de SPR se basa en la inmovilización de una molécula que actúa como receptora sobre una superficie de oro funcionalizado, con un grosor nanométrico. Esta superficie constituye en sí misma un biosensor. Los biosensores de SPR (Esquema 9) detectan cambios en el índice de refracción en las proximidades de la superficie de oro, utilizando luz polarizada, en la interfaz entre el soporte sólido y el medio líquido. La molécula inmovilizada pasa a formar parte de la superficie que es irradiada con un haz de luz, cuyo índice de refracción se modifica al fluir una disolución de ligando sobre la superficie ya que al fluir la disolución de analito se obtiene una asociación, mientras que al dejar de fluirla y pasar un medio distinto al analito (por ejemplo tampón) se obtiene una disociación, este efecto se mide en unidades de respuesta abreviadas como “RU” por sus siglas en inglés, normalmente se asocia el valor de 1 RU como el equivalente a 1 pg/mm^2 .

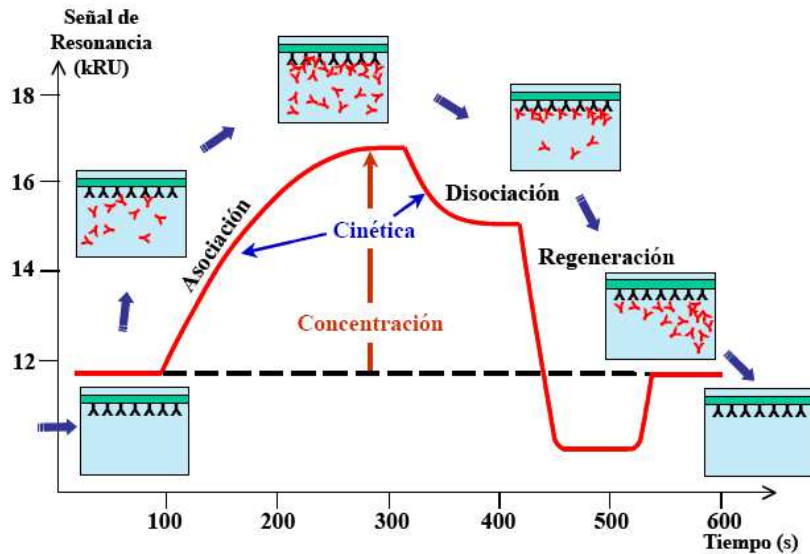


Esquema 9. Esquema del funcionamiento de un SPR. La luz incide sobre la superficie funcionalizada que está en contacto con una disolución de analito que fluye sobre ella. El cambio del índice de refracción es medido y con ello la interacción entre el receptor y el ligando.

Los ensayos se llevan a cabo en presencia de un blanco, que es una superficie con las mismas características que la superficie original antes de inmovilizar al receptor, para obtener un valor que luego es restado a los ensayos de la superficie activada. La información obtenida genera un gráfico denominado sensograma, en el cual se analizan los valores obtenidos entre la celda de interés y la celda control (Esquema 10).³⁴⁹ Con esta técnica se pueden obtener datos de cinéticas dentro de una gran variedad de interacciones macromoleculares, que incluyen sistemas de alta y baja afinidad entre el receptor y el ligando.³⁵⁴⁻³⁵⁵

El análisis cinético de la interacción, requiere eliminar los posibles falsos positivos, mediante la sustracción de la respuesta obtenida con la superficie de control. El modelo más simple es el de la interacción uno-uno (Langmuir), que puede ser aplicado en la mayoría de casos, sin embargo en determinadas situaciones, los procesos de asociación y disociación son tan rápidos que no permiten recoger información, lo que obliga a alcanzar el estado estacionario de la interacción, y con ello determinar la constante de disociación en el equilibrio (K_D) o de asociación (K_A) de la interacción entre analito y ligando.³⁵⁶

Parte de los avances en la técnica de SPR, radican en el diseño de los experimentos, en la actualidad existe gran variedad de chips funcionalizados, que ofrecen diversas alternativas para inmovilizar el receptor pero además existe la posibilidad de preparar chips en el laboratorio que luego son evaluados en el SPR,³⁵⁷⁻³⁶¹ esto permite ampliar y mejorar las opciones de inmovilización y de cuantificación de interacciones moleculares. Gracias a los avances existentes y las numerosas opciones de trabajo en el SPR, muchas interacciones entre glicoestructuras y sus ligandos han llegado a ser cuantificadas.³⁶²⁻³⁶⁸



Esquema 10. Representación de un sensograma. Inicialmente no hay inyección de analito y se observa una línea base. Cuando se inyecta el analito la señal aumenta a medida que se produce la interacción, es la fase de asociación. Cuando se deja de inyectar analito, se libera espontáneamente el que está unido en la fase de disociación. Por último, se inyecta una disolución para recuperar la línea base evitando que quede analito asociado al ligando.

La aplicación más común del SPR en glicobiología es el estudio de reconocimiento molecular carbohidrato-proteína. La mayoría de estos estudios de interacción carbohidrato-lectina se llevan a cabo con el glicoconjugado inmovilizado,³⁶² puesto que de ese modo se intenta mimetizar la presentación de los glicoconjugados en las membranas biológicas. Sin embargo, la otra posibilidad, el inmovilizar la lectina en la superficie, ha sido por lo general menos empleada aunque según Shinohara y col. las constantes cinéticas y de afinidad determinadas son iguales por ambas aproximaciones.³⁶⁹

Análisis de los datos obtenidos por SPR

El análisis de los datos obtenidos mediante SPR se puede llevar a cabo a partir de la determinación de las constantes cinéticas o a partir de la respuesta en el equilibrio.

Determinación de los parámetros cinéticos de la interacción

Para llevar a cabo el análisis cinético de la interacción, lo primero es eliminar los posibles artefactos, mediante la sustracción de la respuesta de fondo que se obtiene al fluir el analito por la superficie control. Posteriormente, se determinan los parámetros cinéticos de la interacción. El modelo más simple es el de la interacción uno-uno (Langmuir) que puede ser aplicado en la mayoría de los casos (ecuación [1]).



La velocidad del proceso de interacción entre el analito y el ligando se define mediante las constantes de asociación (k_{on}) y la de disociación (k_{off}), según se expresa en la ecuación [2]:

$$d[AL]/dt = k_{on} [A][L] - k_{off} [AL] \quad [2]$$

Cuando se alcanza el equilibrio, la velocidad con que se asocian el analito y el ligando es igual a la velocidad con que se disocian, y por tanto el proceso responde a la siguiente ecuación [3]:

$$k_{on} [A][L] = k_{off} [AL] \quad [3]$$

De este modo, se pueden calcular a partir de la velocidad de asociación y disociación las constantes de afinidad en el equilibrio. Se definen como constantes de asociación (K_A) y de disociación (K_D) y se relacionan con k_{on} y k_{off} siguiendo las ecuaciones [4] y [5]:

$$K_A = [AL]/[A][L] = k_{on}/k_{off} \quad [4]$$

$$K_D = [A][L]/[AL] = k_{off}/k_{on} \quad [5]$$

En estos casos se asume que el analito es monovalente y homogéneo, que el ligando es homogéneo y que en la interacción no interviene ningún factor externo. Bajo estas

condiciones, para calcular la afinidad los datos se deben ajustar a una isoterma de Langmuir que responde a la ecuación [6]:

$$R_{\max} = R_0 + (R_{\text{sat}} - R_0) K_A g_0 (1 + K_A g_0)^{-1} \quad [6]$$

Donde R_{\max} es, para una concentración de ligando g_0 , el valor máximo de R a $t = \infty$ que se puede deducir fácilmente de la curva ecuación [7]:

$$dR \cdot dt^{-1} \text{ frente } R \quad [7]$$

R_0 es el valor de R en el punto de partida correspondiente al canal que contiene el tampón sin ligando y R_{sat} es el valor máximo de R cuando todos los sitios de reconocimiento están ocupados. Los parámetros cinéticos se pueden determinar directamente de las curvas experimentales de acuerdo con la ecuación [8]:

$$R = R_{\infty} + (R_{\max} - R_{\infty}) [1 - \exp(k_{\text{off}} t)] \quad [8]$$

Determinación de la constante de asociación en el estado estacionario

En determinadas situaciones, los datos obtenidos de un teórico ajuste cinético serían erróneos, puesto que los procesos de asociación y disociación son tan rápidos que no permiten recoger información. Cuando esto ocurre y en el estudio se alcanza el estado estacionario de la interacción, es posible llevar a cabo el cálculo de la constante de disociación en el equilibrio (K_D) o de asociación (K_A) de la interacción entre analito y ligando, aplicando la ecuación [9]:

$$R_{\text{eq}} = K_A \cdot C \cdot R_{\max} / (K_A \cdot C \cdot n + 1) \quad [9]$$

En la que R_{eq} es la intensidad de la señal (RU) en el equilibrio, K_A es la constante de asociación en el equilibrio, C es la concentración del analito, R_{\max} es la máxima intensidad que podría alcanzar el analito y n es un factor determinado por el impedimento estérico.

Estudio de las interacciones moleculares entre heparinas y proteínas

Tal como ha quedado de manifiesto, la metodología de SPR supone una importante herramienta para el estudio de las interacciones moleculares, simulando en gran medida las condiciones reales de las células.

La heparina y el heparin sulfato (HS) son polisacáridos altamente sulfatados, miembros de una familia que se caracteriza por una estructura de unidades repetidas de ácido glucurónico (GlcUA) o ácido idurónico (IdoUA) y glucosamina (GlcN). (Figura 6)³⁷⁰⁻³⁷¹

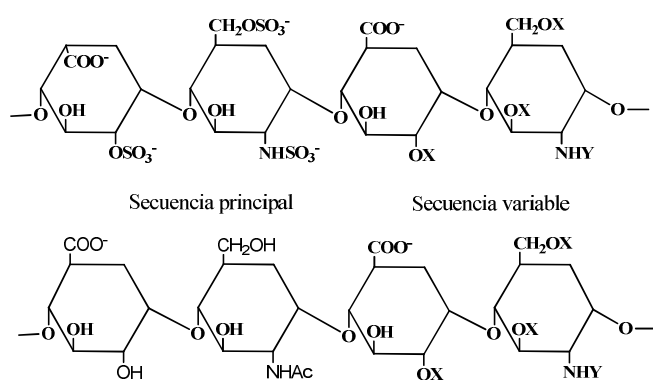


Figura 6. Unidades repetidas de disacáridos de GlcUA o IdoUA y GlcN que conforman la secuencia principal de la HP y HS.

La HS está implicada en multitud de procesos biológicos, tales como el desarrollo embrionario, la cascada de coagulación sanguínea, los procesos inflamatorios, el desarrollo de metástasis o las infecciones víricas y bacterianas. Generalmente, el HS suele estar localizado de modo más ubicuo, fundamentalmente en las superficies celulares y en la matriz extracelular.³⁷²

Existe una gran diversidad estructural en las moléculas de HS, que implicarán múltiples secuencias de reconocimiento molecular, generando la diversidad funcional de la molécula. Así, el patrón de sulfatación y la presencia de residuos de GlcUA, IdoUA y GlcN del HS resultan claves, provocando una variedad en la posición de las

cargas negativas a lo largo de la molécula. Por ejemplo, GlcUA o IdoUA pueden encontrarse sulfatados en el carbon 2, la glucosamina en el carbon 6 o 3, y sus grupos amino acetilados, sulfatados o sin sustitución.³⁷³

Las moléculas de heparina, que se sintetizan en los mastocitos, se caracterizan por poseer una mayor cantidad de residuos de ácido idurónico, unidos mediante enlace 1→4 con glucosamina.³⁷⁴ Se localizan en el intestino, pulmón, hígado y piel de mamíferos, de donde suele ser extraído para su aplicación farmacológica como anticoagulante. Sin embargo, estas heparinas de origen natural están generando problemas de contaminación por las materias primas de origen, lo que está llevando a la industria a la búsqueda de heparinas sintéticas.

Hasta la actualidad se han descrito tres tipos de heparinas: no fraccionada (UF, del inglés unfractionated, de peso molecular medio de 15000 Da); de bajo peso molecular (LMWH, del inglés low molecular weight heparin, con aproximadamente 6000 Da); y ultra bajo peso molecular (ULMWH, del inglés ultra low molecular weight heparin, con un peso inferior a 2000 Da).³⁷⁵ Sin embargo, por ejemplo, tan sólo un tercio de estas moléculas contienen en sus cadenas el pentasácarido que actúa como lugar de reconocimiento para la AT III, responsable de la actividad anticoagulante a través de la interacción con enzimas de la cadena de coagulación, como la trombina o el factor Xa (Figura 7).³⁷⁶

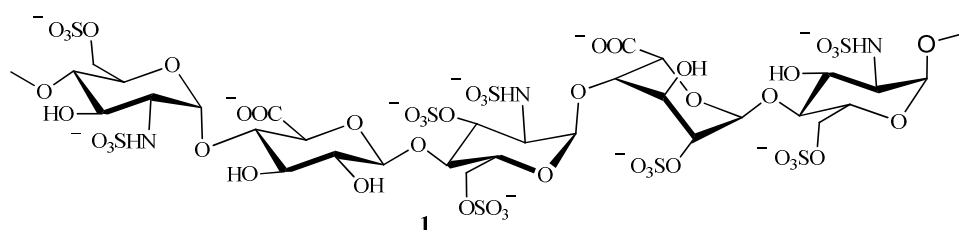


Figura 7. Región de reconocimiento de la AT III, responsable de la actividad de la HP.

Así, el incremento en el número de casos de interacciones HP-proteínas ha llevado a la necesidad de caracterizar estos procesos de reconocimiento. En ese sentido, la

investigación está cada vez más explotando las ventajas que aportan técnicas como el SPR, que permite analizar la necesidad de la presencia determinadas regiones de reconocimiento en las moléculas de HP y HS para una correcta interacción.^{370,377-379.}

Sin embargo, la problemática de aplicar esta técnica surge del hecho de la elección de la correcta metodología de inmovilización.^{351,378,380, 381} Dentro de las múltiples estrategias desarrolladas, la biotilización de los polisacáridos, para su posterior inmovilización mediante su unión a superficies de estreptavidina, se ha convertido en una de las más empleadas.³⁸⁰⁻³⁸¹ En ella, se lleva a cabo la funcionalización de las moléculas mediante la unión a reactivos tales como biotina-LC-hidracida o NHS-LC-biotina. En ambos casos, la funcionalización se produce en el interior de la cadena del glicano. Sin embargo, en el primer caso, la funcionalización se produce uniéndose a residuos de ácidos urónicos; en el segundo, se unen mayoritariamente a glucosaminas, a través de los grupos amino.³⁸¹

En nuestro trabajo, llevaremos a cabo el estudio comparativo de la interacción de diversas moléculas de HP y HS inmovilizadas, aplicando ambas funcionalizaciones antes descritas, y empleando como proteínas modelo para el análisis la ATIII.

II. OBJETIVOS

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral es la obtención de biocatalizadores útiles en la síntesis de glicoestructuras de interés biológico en condiciones sostenibles. Para el desarrollo de este objetivo, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Búsqueda de glicosidasas de organismos mesófilos y termófilos útiles en la síntesis de oligosacáridos de interés biológico.
2. Síntesis enzimática de disacáridos de interés biológico (Gal- β (1-4)-GlcNAc y Gal- β (1-6)-GalNAc) utilizando el cultivo microbiano de *Bacillus circulans* en presencia de disolventes sostenibles.
3. Síntesis enzimática de disacáridos de interés biológico (Gal- β (1-4)-GlcNAc y Gal- β (1-6)-GalNAc) utilizando la fracciones semipurificadas de *Bacillus circulans* proveniente del preparado comercial Biolacta en presencia de disolventes sostenibles.
4. Síntesis enzimática de disacáridos de interés biológico (Gal- β (1-3)-GlcNAc y Gal- β (1-3)-GalNAc) utilizando la enzima β -Gal-3 de *Bacillus circulans* ATCC 31382 inmovilizada mediante diferentes aproximaciones en presencia de disolventes sostenibles.
5. Síntesis enzimática de disacáridos de interés biológico (*p*NF-Gluc-(1-2)-Fuc y *p*NF-Gluc-(1-3)-Fuc) utilizando la enzima α -Fuc de *Sulfolobus sulfataricus* P2 en presencia de disolventes sostenibles.
6. Análisis estructural mediante espectrometría de la influencia de disolventes sostenibles en las reacciones enzimáticas catalizadas por la enzima α -Fuc de *Sulfolobus sulfataricus* P2.

7. Síntesis enzimática de disacáridos de interés biológico utilizando lipasas inmovilizadas en presencia de disolventes sostenibles.

8. Estudio de la interacción de la proteína Antitrombina III con heparinas y heparan sulfato mediante SPR.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. Materiales

III.1.1. Reactivos y disolventes

General

Todos los reactivos se obtuvieron de diferentes casas comerciales y se usaron directamente sin necesidad de purificación previa: Bio-Rad, Fisher, Fluka, Merck, Pierce, Scharlau, SDS, Sigma-Aldrich.

Azúcares

Los estándares de azúcares y otros reactivos utilizados en la presente Tesis Doctoral, fueron, en su mayoría, adquiridos en Sigma-Aldrich: *p*-nitrofenol (*p*NF), *p*-nitrofenil- α -D-fucopiranosido (*p*NF- α -Fuc), *p*-nitrofenil- β -D-fucopiranosido (*p*NF- β -Fuc), *p*-nitrofenil- α -D-galactopiranosido (*p*NF- α -Gal), *p*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (*p*NF- β -Gal), *p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosido (*p*NF- α -Glu), *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (*p*NF- β -Glu), *p*-nitrofenil- α -D-manopiranosido (*p*NF- α -Man), *p*-nitrofenil- β -D-manopiranosido (*p*NF- β -Man), *p*-nitrofenil- β -D-*N*-acetil-galactopiranosido (*p*NF- β -GalNAc), *p*-nitrofenil- β -D-*N*-acetil-glucopiranosido (*p*NF- β -GlcNAc), *N*-acetil-D-lactosamina [Gal- β (1-4)-GlcNAc], D-(+)-galactosa (Gal), D-(+)-manosa (Man), D-(+)-fucosa (Fuc), D-(+)-fructosa (Fru), D-(+)-glucosa (Glu), clorhidrato de D-glucosamina (GluNH₂), clorhidrato de D-galactosamina (GalNH₂), *N*-acetil-D-glucosamina (GlcNAc), *N*-acetil-D-galactosamina (GalNAc), 4-metilumbeliferil- β -D-fucopiranosido, (Fuc- β -MU), 1-desoxi-1-fluoro- α -D-galactopiranosido (Gal- α -F), β -D-galactopiranosil-azida (Gal- β -N₃).

Electroforesis

Los siguientes reactivos para electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) y análisis de proteínas fueron comprados a Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA):

dodecil sulfato de sodio para electroforesis (SDS), *tris*-(hidroximetil)aminometano (Tris), glicina, persulfato de amonio (PSA), page blue 83 (tinción para geles), glicerol para uso en biología molecular y el estándar de albúmina de suero bovina 98%. Mientras que los siguientes reactivos fueron comprados a la casa comercial de BioRad: Dye Reagent (tinción para método Bradford), solución de bis acrilamida 29:1 (40%), tetrametiletilendiamina (Temed) y estándares de diferente peso molecular para electroforesis (Kaleidoscope, dual color y SDS-PAGE standards broad range).

Resonancia de plasmón de superficie

Los estudios de interacción mediante esta técnica se realizaron en un aparato BIAcore-3000 (Biacore). Los datos se analizaron empleando BIAEvaluation software versión 4.1, 2003 (Biacore).

Los Chips para inmovilización de ligandos en SPR, surfactantes y el kit de unión covalente (amino coupling kit) fueron adquiridos de GE Healthcare, Uppsala, Suecia.

Los precursores de peptidoglicano AcLys-D-Ala-D-Ala, AcLys-D-Ala-D-Lactato y AcLys-D-Ala-D-Ser, fueron adquiridos de Bachem (Bubendorf, Suiza).

Los glicopéptidos A40926, vancomicina y teicoplanina fueron adquiridos en Sigma.

Las moléculas de heparina y heparan sulfato fueron obtenidas de Sigma y Celsus.

La proteína antitrombina III empleadas en dichos ensayos fueron adquiridas a Sigma-Aldrich.

Disolventes derivados de biomasa

Los derivados cíclicos de glicerol: 1,3-dioxan-5-ol (**G1**), 5-hidroxi-1,3-dioxan-2-ona, (**G2**) y (2,2-dimetil-1,3-dioxolan-1-il)metanol (**G3**) fueron proporcionados por la empresa COGNIS IP Management GMBH (Alemania).

Los disolventes obtenidos de fuentes renovables derivados de glicerol (García y col. 2010): 1,3-dimetoxipropan-2-ol (**GC4**), 2-butoxi-3-metoxipropan-2-ol (**GC5**), 1-*terc*-butoxi-3-metoxipropan-2-ol (**G6**), 1-isopropoxi-3-(2,2,2-trifluoroetoxi)propan-2-ol (**GC7**), 1,3-bis(2,2,2-trifluoroetoxi)propan-2-ol (**GC8**), 2-metoxi-1,3-bis(2,2,2-trifluoroetoxi)propano (**GC9**), 1-butoxi-3-isobutoxipropan-2-ol (**GC10**), 1,3-dibutoxipropan-2-ol (**GC11**), 1-(3-butoxi-2-metoxipropoxi)butano (**GC12**), fueron proporcionados por el Prof. Dr. José I. García del Instituto de Ciencias Materiales de Aragón perteneciente al CSIC, Zaragoza.

Los derivados de dimetilamida: 2-hidroxi-*N,N*-dimetilpropanamida (**DMA1**), *N,N*-dimetilbenzamida (**DMA2**), *N,N*-dimetilhexanamida (**DMA3**) fueron proporcionados por la empresa COGNIS IP Management GMBH (Alemania)

Líquidos Iónicos (LI)

Los LI: hexafluorofosfato bistriflimida de trioctilmetilamonio [**Troma**][**NTf₂**], metilsulfato de cocosalquil pentaetoxi metil amonio [**CPMA**][**MeSO₄**], hexafluorofosfato de octil metil imidazolio [**Omim**][**PF₆**], hexafluorofosfato de butil metil imidazolio [**Bmim**][**PF₆**], tetrafluoroborato de etil metil imidazolio [**Emim**][**BF₄**], *tris*-(pentafluoroetil)trifluorofosfato de butil metil imidazolio [**Bmim**][**FAP**], tetrafluoroborato de butil metil imidazolio [**Bmim**][**BF₄**], hexafluorofosfato bistriflimida de butil metil imidazolio [**Bmim**][**NTf₂**], metilsulfato de etil metil imidazolio [**Emim**][**MeSO₄**], hexafluorofosfato bistriflimida de 1-hexil-3-metil-imidazolio [**Hmim**][**NTf₂**], fueron adquiridos de Meck-Chemicals (Alemania).

Soportes para inmovilización

Los soportes utilizados para inmovilización fueron: i) Nanofibras de carbono con grupos carboxilo y amino, caracterizados y preparados por el grupo del Dr Rubio del

Instituto de Cerámica y Vidrio (CSIC, Madrid), ii) soportes fenólicos que fueron preparados y caracterizados en nuestro grupo de investigación por el Dr. Gustavo Levin como parte de su estancia posdoctoral . iii) glioxil agarosas, que fueron cedidas por el grupo del Prof. Dr. José Manuel Guisán, del Instituto de Catálisis y Petroleoquímica, CESIC, Madrid. iv) Celite 435® para la inmovilización de PSL.

Glicopéptidos

Los glicopéptidos vancomicina, teicoplanina, mideplanina, dalbavancina, A-40926 y MDL 63,246 fueron suministrados por el grupo del Prof. Dr. Francesco Molinari, Sección de Microbiología Industrial del Departamento de Ciencia y Tecnología Alimentaria y Microbiológica, Universidad de Estudios de Milán (Italia).

III.1.2. Microorganismos

Se llevó a cabo la búsqueda de microorganismos productores de glicosidasas a partir de una colección de 80 levaduras del grupo de Biotransformaciones de la Universidad Complutense de Madrid (Colección BTG). No se poseía información previa de ninguno de estos microorganismos, por lo cual se desconocían las condiciones óptimas de crecimiento de los mismos.

La cepa ATCC 31382 de *Bacillus circulans* fue adquirida de la Colección Americana de Cultivos Tipo.

III.1.3. Enzimas

Las enzimas empleadas en este trabajo fueron:

- Biolacta N°5 con actividad β -galactosidasa (proveniente de *Bacillus circulans* ATCC 31382), de Daiwa Kasei.

- α -fucosidasa de *Sulfolobus sulfataricus*, cedida por el Prof. Dr. Marco Moracci, del Instituto de Bioquímica de Proteínas de Nápoles (Italia) y producida en nuestro laboratorio.
- β -Gal-3 de *Bacillus circulans* ATCC 31382, producida en el laboratorio.
- Lipasas de *Candida rugosa* y *Pseudomonas stutzeri*, Sigma-Aldrich.

III.2. Procedimientos generales

III.2.1. Métodos microbiológicos

III.2.1.1. Medios de cultivo

La composición de los distintos medios de cultivo usados fue la siguiente:

-Caldo Cerebro-corazón enriquecido con glucosa:

Medio rico utilizado para revitalizar cepas microbianas

30 g/l de infusión cerebro-corazón.

Glucosa 2 %

El medio fue esterilizado en autoclave (modelo Presoclave 75 de P Selecta) a 115 °C durante 15 min y conservado a 4 °C.

-Medio YM:

Medio rico utilizado para el crecimiento de levaduras

3 g/l de extracto de levadura.

3 g/l de extracto de malta.

5 g/l de peptona.

10 g/l de dextrosa.

El medio fue esterilizado en autoclave (modelo Presoclave 75 de P Selecta) a 115 °C durante 15 min y conservado a 4 °C.

-Medio LB (Luria-Bertani):³⁸²

Medio rico utilizado para el crecimiento de cepas bacterianas

10 g/l de peptona.

5 g/l de Extracto de Levadura.

5 g/l de Cloruro sódico.

El pH del medio se ajustó a 7, posteriormente fue esterilizado en autoclave a 121 °C durante 20 min y conservado a 4 °C.

-Medio LB enriquecido con glucosa:

Medio rico en el que la glucosa se usa para reprimir catabólicamente la expresión de la RNA polimerasa del fago T7 bajo el control de *Plac*, y así tener el control sobre el momento de la expresión de la proteína y poder evitar, en la medida de lo posible, reacciones de toxicidad durante el crecimiento del cultivo.

10 g/l de Peptona.

5 g/l de Extracto de Levadura.

5 g/l de Cloruro sódico.

5 g/l de Glucosa.

El pH del medio se ajustó a 7, posteriormente fue esterilizado en autoclave a 121 °C durante 20 min y conservado a 4 °C.

-Medio LB-agar:

Medio sólido utilizado para el crecimiento en placa.

30 gr/l de LB-agar

El medio, introducido en una botella de vidrio pyrex, fue esterilizado en autoclave a 121 °C durante 20 min. Una vez esterilizado se dejó enfriar hasta unos 60 °C, fue dispensado en placas petri estériles y conservado a 4 °C.

-Medio YM-agar :

Medio sólido utilizado para el crecimiento en placa.

30 gr/l de YM-agar

El medio, introducido en una botella de vidrio pyrex, fue esterilizado en autoclave a 121 °C durante 20 min. Una vez esterilizado se dejó enfriar hasta unos 60 °C, fue dispensado en placas petri estériles y conservado a 4 °C.

-Medio Super Broth (paper fucosidasa):

Medio rico para el crecimiento de bacteria clonada para la expresión de α -fucosidasa.

32 g/l de Peptona.

20 g/l de Extracto de Levadura.

5 g/l de Cloruro sódico.

El pH del medio se ajustó a 7.4, posteriormente fue esterilizado en autoclave a 121 °C durante 20 min y conservado a 4 °C.

III.2.1.2. Revitalización y mantenimiento de la colección BTG

Revitalización

La colección de microorganismos se encontraba almacenada en forma de criotubos, en una suspensión con glicerol al 20% y congelados a -80 °C. Inicialmente, se llevó a cabo la descongelación de los criotubos y se tomó de los mismos una alícuota de 100 μ l, que fue introducida en un matraz con 15 ml de medio cerebro-corazón enriquecido con glucosa. Los matraces fueron incubados a una temperatura de 30 °C y a una agitación de 180 revoluciones por minuto (r.p.m.), en un incubador Unitron HT Infors con agitación orbital. En períodos de 24 horas se observó su crecimiento, en busca de la aparición de turbidez.

De aquellos matraces en los cuales se detectó crecimiento, se llevó a cabo la incubación en placa para obtener colonias aisladas. Para ello, se tomó una alícuota de 100 μ l, que se traspasó a una placa de medio LB-agar o YM-agar (respectivamente, empleados para bacterias o levaduras) y fue extendida para su crecimiento en césped, para lo que se incubó en estufa a 30 °C. Posteriormente se realizó una inoculación en placa mediante la técnica de agotamiento de asa para comprobar la pureza de los cultivos. Con estos pasos obtuvimos colonias aisladas, que se emplearon para llevar a cabo nuevos cultivos partiendo del aislamiento.

Conservación de la colección BTG

Empleando los cultivos obtenidos de colonias aisladas, se realizó el proceso de conservación de las cepas. Para ello, se empleó el proceso de congelación mediante el cual, en condiciones de esterilidad, se toman 800 μ l del cultivo crecido y se añaden 200 μ l de glicerol estéril, para obtener una concentración del 20% final en el criotubo. Estos se almacenaron a -80°C .

III.2.1.3. Crecimiento de microorganismos

Colección BTG levaduras

En condiciones estériles, en un matraz de 250 ml con 50 ml de medio YM, se inoculó con 100 μ l del contenido de un criotubo guardado a -20°C . Posteriormente, se incubó a 30°C y a 180 r.p.m. durante 16 h.

La caracterización de la cinética de crecimiento se llevó a cabo mediante el estudio de la variación de la densidad óptica (medida como absorbancia a 600 nm) del cultivo. Para ello, se realizó un cultivo en medio líquido, y se fueron tomando muestras en esterilidad a distintos tiempos para poder realizar la representación de la curva de crecimiento.

Así mismo, para poder realizar la correcta correlación entre la densidad óptica y el número de células, se llevó a cabo un plaqueo de diluciones seriadas de un cultivo crecido hasta una absorbancia de 0,6 a 600 nm.

Empleando agua estéril, se realizaron diluciones de la muestra desde el rango de 10^{-1} hasta 10^{-6} , y se plaquearon 50 μ l de las mismas en medio sólido, extendiendo en césped hasta su absorción completa. Estas placas se realizaron por triplicado y se incubaron 24 horas a 30°C . Transcurrido ese tiempo, se llevó a cabo el conteo de las colonias y se seleccionaron las placas que tenían un número de colonias entre 20 y 200. Con ellas, se procedió al cálculo de la relación entre absorbancia y nº de células.

***Bacillus circulans* USA**

En condiciones estériles, en un matraz de 250 ml con 50 ml de medio LB, se inoculó con 100 µl del contenido de un criotubo guardado a -20 °C. Posteriormente, se incubó a 37 °C y a 180 r.p.m. durante el tiempo necesario para alcanzar la fase estacionaria o exponencial, según el caso.

Al igual que en el caso de la colección BTG, se llevó a cabo el procedimiento de determinación de la curva de crecimiento, así como de la correlación entre el nº de células y la absorbancia del cultivo.

***E. coli* recombinante**

En condiciones estériles, en un matraz con medio LB se inoculó con 100 µl del contenido de un criotubo guardado a -80 °C. Posteriormente, se incubó a 37 °C y a 180 r.p.m. durante 16 h. Cada matraz llevaba el antibiótico de selección para el cual la cepa de *E. coli* recombinante presentaba resistencia. En el caso de ampicilina, la concentración empleada fue de 100 mg/ml. Para el caso de kanamicina, se empleó una concentración de 30 mg/ml.

III.2.1.4. Inducción y caracterización de cultivos celulares

III.2.1.4.1. Inducción de cultivos

Se llevó a cabo un estudio en búsqueda de las condiciones óptimas para llevar a cabo las reacciones hidrolíticas con los extractos celulares.

En el caso de la cepa de levadura 443, se analizó la influencia de la presencia de inductores en el medio de cultivo sobre la actividad hidrolítica, así como la búsqueda del pH óptimo de la reacción.

En el caso de la cepa *Bacillus circulans* USA, se procedió a la puesta a punto del pH óptimo, la fuerza iónica del tampón, la estabilidad térmica en la temperatura de reacción y el cálculo de las constantes cinéticas de la enzima implicada en las

reacciones de transglucosilación. Así mismo, se realizó el estudio de la influencia de los inductores del medio sobre la actividad hidrolítica.

Inducción de cultivos

Se llevó a cabo la inducción de la producción de las enzimas implicadas en la hidrólisis mediante la adición de disacáridos al medio de cultivo. Los inductores empleados fueron lactosa, celobiosa, maltosa y sacarosa.

Para ello, por triplicado, se realizaron cultivos en frascos de 250 ml, con 50 ml de medio YM o LB diluido $\frac{1}{2}$ con agua estéril (para levaduras o *B. circulans* USA respectivamente), y con inductor a una concentración de 0,2 g/L. Se inoculó con 100 μ l del contenido de un matraz crecido previamente hasta fase exponencial. Posteriormente, se incubó a 30 °C para las levaduras y 37°C para *B. circulans*, y a 180 r.p.m. durante 16 h o hasta alcanzar la fase exponencial del crecimiento. Como control, se realizaron los cultivos en medio sin diluir y sin inductor añadido.

Llegado a la fase exponencial, se realizó la medida de la densidad óptica del cultivo a 600 nm, y se normalizaron las cantidades de células en cada uno de los ensayos mediante el cálculo empleando la relación entre absorbancia y n° de células.

Las muestras así medidas se dispusieron en Tubos Falcon de 15 ml y se centrifugaron a 10.000 rpm 10 minutos. El pellet se lavó tres veces con tampón fosfato 50 mM pH 6,00 y se conservaron a 4°C para su posterior utilización.

Para evaluar la influencia del inductor sobre la actividad hidrolítica, se llevó a cabo el procedimiento descrito en el apartado III.2.3.1.1. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

pH óptimo

Empleando el método discontinuo descrito en el apartado III.2.3.1, se llevó a cabo la medición de la actividad hidrolítica de los extractos celulares crecidos hasta fase exponencial. Los extractos obtenidos se normalizaron para contener el mismo número de células, y se llevó a cabo la hidrólisis del sustrato activado con *pNF*.

En el ensayo realizado con la cepa 443 la temperatura fue de 30°C, y para la cepa *B. circulans* USA de 37°C. Las mediciones enzimáticas se realizaron en presencia de tampones citrato/fosfato de sodio 30 mM en el rango de pH 6,50 y fosfato de sodio 30 mM desde 6,00 hasta 7,50.

En todos los casos se aseguró que el volumen del tampón fuera al menos 20 veces superior al de muestra y sustrato para asegurar un correcto ajuste del mismo. Posteriormente, se llevó a cabo el cálculo de la actividad enzimática obtenida para cada valor de pH, que se normalizó con el valor máximo hallado en el experimento.

Fuerza iónica

Una vez seleccionado el tampón óptimo para la enzima de *B. circulans* se realizó un estudio de actividad enzimática (medido a 37 °C con *pNF-β-Gal* como sustrato) y se evaluó el efecto de la fuerza iónica a concentraciones de 25, 50, 75 y 100 mM de NaCl.

Estabilidad térmica

Dado que las reacciones de transglicosilación empleando la cepa de *B. circulans* se llevaban a cabo en un tiempo de reacción de 24 horas, se decidió analizar la estabilidad térmica de los extractos celulares a 37 °C por ser la temperatura a la cual se llevan a cabo las reacciones. Para este ensayo se analizó la actividad enzimática de

un extracto celular crecido hasta fase estacionaria sometido a calentamiento durante 26 horas.

Constante de Michaelis-Menten (K_M) y Velocidad Máxima (V_{max})

Finalmente, para caracterizar la enzima β -galactosidasa presente en los cultivos de *B. circulans*, se llevó a cabo la medición de la velocidad de hidrólisis de cultivos normalizados en fase exponencial empleando *pNF- β -Gal* como sustrato. El ensayo se realizó a 37°C durante 90 minutos mediante el método discontinuo (punto III.2.3.1). Las concentraciones de sustrato fueron 0,2, 0,3, 0,8, 1 y 1,5 mM respectivamente. Se representaron las mediciones obtenidas en un gráfico de doble inversa (Lineweaver-Burk) y se determinó por regresión lineal de la recta los valores de V_{max} y K_M para este biocatalizador.

III.2.1.5. Expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*.

Las glicosidasas puras (β -Gal-3 y α -Fuc) se obtuvieron de cultivos de *E. coli BL21* transformados con los plásmidos recombinantes. Para su obtención y purificación, se llevó a cabo el cultivo de *E. coli* en medio LB o Super Broth según el caso, a una temperatura de 37 °C, en presencia del antibiótico frente al que la cepa presentara resistencia. En el caso de β -Gal-3, al medio se añadió un 0,5% de glucosa para reprimir catabólicamente la expresión de la RNA polimerasa del fago T7 bajo el control de *Plac*, y así tener el control sobre el momento de la expresión de la proteína y poder evitar, en la medida de lo posible, reacciones de toxicidad durante el crecimiento del cultivo. Cuando los cultivos alcanzaron una DO_{600} de 0,6-0,9, una vez más, dependiendo de la expresión de la proteína, se indujo la expresión del promotor *Plac* con una concentración de IPTG de 1 mM y se mantuvo en agitación entre 5 y 16 h, a la temperatura correspondiente.

III.2.1.6. Rotura de microorganismos

La rotura de células de los microorganismos utilizados se realizó en un procesador ultrasónico (sonicador) modelo LABSONIC M de la casa Sartorius y en un sonicador Branson Sonifier 450. La ruptura se realizó en 10 ciclos de 25 segundos en tubos de vidrio (Corex) o en su defecto de plástico (Falcon). En todos los casos se realizó sobre un baño de hielo para evitar calentamientos. La intensidad de cada sonicación fue de aproximadamente 12.000 microns (intensidad referida entre pico y pico).

III.2.2. Manipulación de proteínas

III.2.2.1. Cuantificación de Proteínas

Para llevar a cabo la determinación de la cantidad de proteína presente en las disoluciones se empleó el método de Bradford.³⁸³ Este procedimiento se basa en la variación en el espectro de absorción visible del colorante azul brillante de Coomassie G-250 en presencia de una proteína. La adsorción de proteína provoca que el valor del máximo de absorción se desplace de 465 nm a 595 nm. Según las instrucciones del fabricante, el reactivo de Bradford requiere de una dilución 1:5 con agua, partiendo de un concentrado comercial de Bio-Rad (Dye reagent). Como patrón de proteína se utilizó una solución de albúmina de suero bovina (BSA) de concentración 0,75 mg/ml en agua milli-Q o en el tampón de muestra, según fuera el caso. Se realizaron disoluciones sucesivas de la proteína patrón como se muestra en la Tabla 4, completándose con agua milli-Q (o tampón) hasta un volumen total de 0,1 ml. A continuación se añadieron 5 ml de reactivo de Bradford y se homogenizó la mezcla. La adsorción de la proteína al colorante se produce instantáneamente siendo máxima y estable entre los 5 y 20 primeros minutos. Todos los ensayos se realizaron a temperatura ambiente y por triplicado según la tabla de dilución utilizada (Tabla 4).

Los resultados de absorbancia en función de la concentración de proteína, en $\mu\text{g/ml}$ para el volumen final de 5,10 ml, se ajustaron por regresión lineal al modelo de una recta de primer grado, cuya linealidad se valoró según el valor de R^2 .

Tabla 4. Disoluciones sucesivas de proteína patrón para realizar la recta de calibrado en la determinación de proteínas por el método de Bradford.³⁸³

Nº	µl de Proteína (1 mg/ml)	µl de Agua Milli-Q	ml de Bradford	BSA (µg/ml)
0 *	0	100	5,00	0
1	20	80	5,00	2,94
2	30	70	5,00	4,41
3	40	60	5,00	5,88
4	50	50	5,00	7,35
5	60	40	5,00	8,82
6	70	30	5,00	10,29
7	80	20	5,00	11,76
8	90	10	5,00	13,23
9	100	0	5,00	14,71

* El valor de cero se midió para establecer el blanco de trabajo en la recta de calibrado, pero este valor no se representó puesto que no está ubicado en el rango lineal de éste método.

III.2.2.2. Electroforesis de proteínas

III.2.2.2.1. Electroforesis de en geles de poliacrilamida SDS-PAGE

Mediante la técnica de electroforesis en geles de acrilamida, descrita en 1970 por Laemmli, se llevó a cabo el análisis de la pureza de las proteínas empleadas, así como su peso molecular. Se emplearon geles a dos concentraciones de acrilamida. Se usaron geles de separación de 12,5 % de acrilamida preparados con 1,25 de bisacrilamida (29:1 al 40%), 1 ml de tampón Tris-HCl pH 8,80 1,50 M, 1,69 de agua destilada, 40 µl de SDS al 10%, 10 µl de Temed y 30 µl de PSA. Para los geles de

acrilamida de 7,5% se utilizó 0,75 ml de *bis*-acrilamida y 2,19 ml de agua destilada, las demás concentraciones de reactivos fueron iguales a las descritas anteriormente. El gel concentrador utilizado fue al 3% de acrilamida. Se preparó utilizando 150 µl de bisacrilamida (29:1 al 40 %), 1 ml de tampón Tris-HCl pH 6,80 0,50 M, 822 µl de agua destilada 18 µL de SDS al 10 %, 5 µl de Temed y 15 µl de PSA.

Las muestras con proteínas se mezclaron en proporción 1:1 (v:v) con tampón de carga, que se preparó con 773 µl de SDS al 10 %, 613 µl de tampón Tris-HCl 0,50 M pH 6,80, 233 µl de β-mercaptoetanol, 400 µl de glicerol y 0,8 mg de azul de bromofenol. Una vez mezcladas con el tampón de carga, se calentaron a 96 °C durante 10 min y se centrifugaron 3 min. El sobrenadante se cargó en los geles y se corrieron a 175 V en tampón de electroforesis (30,3 g SDS, 144 g tris, 10 g de glicina, 11 de agua destilada). El revelado de los geles se alcanzó con una disolución del tinte comercial Page Blue 83 al 0,1% (metanol: agua: ácido acético, 5:4:1) y se destiñó con la misma mezcla sin Page Blue 83.

III.2.2.2. Electroforesis de proteínas en condiciones nativas

Se llevó a cabo siguiendo el mismo procedimiento que en el apartado III.2.2.2.1 suprimiendo el uso de agentes desnaturizantes (SDS y β-mercaptoetanol) y sin llevar a cabo la desnaturalización a 96 °C de las muestras previa a la carga del gel.

III.2.2.3. Semipurificación de β-galactosida de *B. circulans*

III.2.2.3.1. Precipitación fraccionada con sulfato amónico

Esta técnica se utilizó como primer paso para la purificación de la enzima β-galactosidasa de *Biolacta*. Todo el proceso se llevó a 4°C.

- *Precipitación fraccionada con sulfato amónico*

Para llevar a cabo la semipurificación de las fracciones de Biolacta se disolvieron 5,0 g de la enzima comercial en 100 mL de tampón citrato-fosfato de sodio 50 mM pH 5,00, a lo que se añadieron 17 mL de 2-mercaptoetanol y 17,8 mg EDTA.

A continuación, se adicionó poco a poco sulfato de amonio hasta alcanzar un 75% de saturación final. La cantidad total de sal a adicionar, se calculó empleando la tabla 9. Tras la adición completa de la sal, se mantuvo en agitación suave 30 minutos. Pasado ese tiempo, se centrifugó a 10.000 rpm durante 20 minutos. El precipitado se resuspendió en el menor volumen posible de tampón citratofosfato de sodio 50 mM pH 5,00 y se pasó a su diálisis para eliminar las sales. La membrana de diálisis empleada fue de 8 kDa de tamaño de poro, y el tampón de lavado fue el mismo que el empleado para la disolución. Sobre esta disolución dializada se comprobó la actividad hidrolítica empleando *pNF-β-Gal* como sustrato.

Tabla 5. Cantidad de sulfato amónico que debe ser añadido para alcanzar los distintos porcentajes. Los gramos indicados deben ser añadidos al porcentaje inmediatamente anterior.

	Sulfato de amonio									
Porcentaje de saturación	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%	100%	
Gramos a añadir a 1l de solución	106	55	56	58	60	62	65	67	70	

III.2.2.3.2. Cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-150

Tras llevar a cabo la precipitación con sulfato de amonio, se empleó esta técnica de cromatografía como segundo paso de la purificación de la enzima β -galactosidasa de *B. circulans*. El precipitado obtenido en el punto anterior se cargó en una columna empaquetada empleando Sephadex G-150 superfino como resina. Previa a la carga, se procedió al equilibrado de la columna empleando tampón fosfato 100 mM, pH 6,50, acorde a las instrucciones aportadas por el fabricante. La recogida se fracciones

se llevo a cabo mediante un colector automático de muestras, tomando muestras de 2 ml de volumen aproximado. Todas las muestras fueron analizadas midiendo su absorbancia a 280 nm, y su actividad β - galactosidasa. (Apartado III.2.3.1.2).

Finalmente, se obtuvieron dos series enzimáticas con mayor actividad que se denominaron F_{S1} y F_{S2} , y que se encontraban compuestas por varias fracciones de elución que se agruparon entre sí. Para comprobar el perfil proteico de las mismas, se realizó electroforesis en condiciones nativas y desnaturalizantes.

III.2.2.4. Purificación de proteínas mediante cromatografía de afinidad

III.2.2.4.1. Proteínas con colas de histidina

Las enzimas recombinantes con colas de histidina expresadas en *E. coli* se purificaron por medio de cromatografía de afinidad Ni(II)–agarosa. Este procedimiento se realizó a temperatura ambiente en el dispositivo para purificación de proteínas (Biologic LP, BioRad) utilizando una serie de columnas de afinidad IMAC (del inglés “*immobilized metal affinity chromatography*”), cargadas con iones de Ni(II), utilizándose los siguientes tampones (por orden de elución) como fase móvil:

- Tampón de adhesión: 300 mM de NaCl, pH 8,00 de fosfato de sodio 50 mM y 1 mM de imidazol.
- Tampón de lavado de 300 mM de NaCl, pH 8,00 de fosfato de sodio 50 mM y 10 mM de imidazol.
- Tampón de elución 300 mM de NaCl, pH 8,00 de fosfato de sodio 50 mM y 500 mM de imidazol.

La purificación se llevó a cabo por métodos convencionales detectando la presencia de proteínas con luz UV (280nm)

Se centrifugaron los cultivos de bacterias a 6500 r.p.m. durante 10 min a 4 °C. El pellet obtenido se resuspendió con tampón fosfato de sodio 50 mM, pH 7,00. Las

células fueron resuspendidas y se rompieron por sonicación con las condiciones descritas en el apartado III.2.1.6. Los extractos obtenidos se centrifugaron a 15.000 r.p.m. por 30 min a 4 °C.

Se eliminó el sólido generado y el extracto celular generado, conocido como se hizo pasar por columnas cargadas de Ni(II) en un aparato de purificación de proteínas Biologic LP (BioRad), siguiendo el protocolo dado por el fabricante.

Se cargó en el equipo de purificación el extracto obtenido de un cultivo de 500 ml, diluido en tampón fosfato de sodio 50 mM, 300 mM de NaCl y pH 8,00, a un flujo de 0,5 ml/min. Se utilizaron 3 columnas de Ni(II) de 1 ml conectadas en serie, que fueron equilibradas con tampón de adhesión. Una vez finalizado el proceso de carga de la muestra, se realizó la elución con tampón de lavado, que debido a su concentración de imidazol (10 mM) facilitó la eliminación de otras proteínas que pudieran tener cierta afinidad por el Ni(II). Finalmente se lavó la columna con tampón de elución, obteniéndose una serie de fracciones enriquecidas en proteínas recombinantes con cola de histidinas. Las fracciones con la enzima recombinante (His₆tag), se desalinizaron y se concentraron con un tubo de ultra centrifugación Amicon (Millipore) a 4.000 r.p.m. durante 10 min a 4 °C, repitiendo la desalinización tres veces con tampón fosfato de sodio 50 mM, pH 7,00. Posteriormente, se determinó la actividad relativa de cada proteína purificada y se analizó su pureza por electroforesis SDS-PAGE.

III.2.2.4.2. Proteínas con GST unida (proteínas de fusión)

Las enzimas recombinantes con GST expresadas en *E. coli* se purificaron por medio de cromatografía de afinidad GST–agarosa. Este procedimiento se realizó a temperatura ambiente en el dispositivo para purificación de proteínas (Biologic LP, BioRad) utilizando una serie de columnas de afinidad GST (del inglés “*Glutathione transferase affinity chromatography*”), cargadas con un derivado de glutatión, utilizándose los siguientes tampones (por orden de elución) como fase móvil:

- Tampón de adhesión: 150 mM de NaCl, pH 7,40 de fosfato de sodio 10 mM, y 5mM de EDTA.
- Tampón de lavado: 150 mM de NaCl, pH 7,40 de fosfato de sodio 10 mM, y 5mM de EDTA.
- Tampón de elución: 20 mM de glutatión, pH 8,00 Tris 1000 mM y 5 mM de EDTA

La purificación se llevó a cabo por métodos convencionales detectando la presencia de proteínas con luz UV (280nm)

Se centrifugaron los cultivos de bacterias a 6500 r.p.m. durante 10 min a 4 °C. El pellet obtenido se resuspendió con tampón fosfato de sodio 50 mM, pH 7,00. Las células se rompieron por sonicación con las condiciones descritas en el apartado III.2.1.6. Los extractos obtenidos se centrifugaron a 15.000 r.p.m. por 30 min a 4 °C.

Se recogió el sobrenante, que se diluyó a la mitad con el tampón de adhesión. El procedimiento de carga y elución se llevó a cabo en el aparato de purificación de proteínas Biologic LP (BioRad), siguiendo el protocolo dado por el fabricante.

Se utilizaron 2 columnas de Ni(II) de 1 ml conectadas en serie, que fueron equilibradas con tampón de adhesión. Se cargó la muestra de extracto celular a un flujo de 0,5 ml/min. Una vez finalizado el proceso de carga de la muestra, se realizó la elución con tampón de lavado, que eliminó las proteínas no unidas al cartucho. Finalmente se lavó la columna con tampón de elución, obteniéndose una fracción enriquecida en la proteína de fusión. Las fracciones con la enzima recombinante se desalinizaron y se concentraron con un tubo de ultra centrifugación Amicon (Millipore) a 4.000 r.p.m. durante 10 min a 4 °C, repitiendo la desalinización tres veces con tampón fosfato de sodio 50 mM, pH 7,00. Posteriormente, se llevó a cabo la incubación de la solución resultante con 60 unidades de trombina durante 16

horas, con agitación constante y a 4°C, a fin de romper la unión entre la GST y la α -fucosidasa.

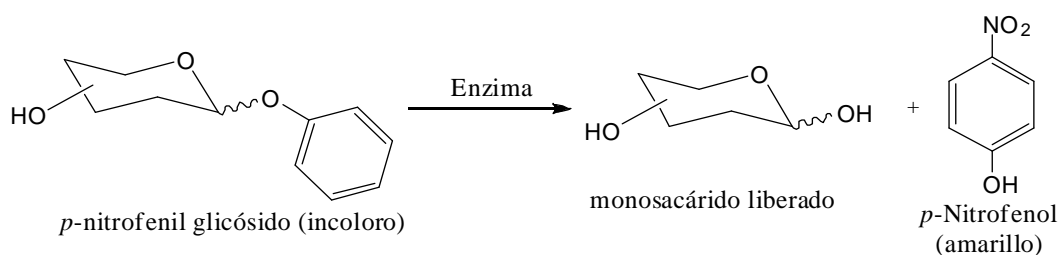
Trascurrida la incubación, se procedió a calentar la muestra a 65°C durante 30 minutos para desnaturalizar tanto la GST como la trombina. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4°C, y se recogió el sobrenadante, eliminando así las proteínas precipitadas por desnaturalización.

Posteriormente, se analizó el tamaño y la pureza mediante SDS-PAGE, así como se determinó la concentración de proteína y su actividad relativa.

III.2.3. Ensayos enzimáticos

III.2.3.1. Determinación de la actividad enzimática de glicosidasas

Para determinar la actividad hidrolítica de las diferentes glicosidasas utilizadas en esta memoria, se usaron azúcares activados en la posición anomérica por una molécula de *p*NF (Esquema 11). Este *p*NF se cuantificó espectrofotométricamente a 405 nm, para determinar la cantidad equivalente de azúcar liberado. Finalmente la actividad enzimática específica se determinó en función de los micromoles de *p*NF liberados por minuto y por un miligramo de proteína.



Esquema 11. Representación de la hidrólisis de *p*-nitrofenil glicósidos para su cuantificación enzimática.

La actividad enzimática se determinó a diferentes valores de pH, según los requerimientos de la enzima, y a un valor de absorbancia de 405 nm (máximo de

absorbancia del *pNF*). Se definió una unidad internacional enzimática (UI), como los micromoles de *pNF* liberados por minuto en las condiciones de un determinado ensayo. Se define la unidad de actividad específica cuando se refiere a la cantidad de enzima en miligramos (UI/mg)

Para la elaboración de la recta de cuantificación del *pNF* liberado se pesaron 25 mg de sólido (*pNF* comercial calidad HPLC. Sigma-Aldrich) y se disolvieron en un matraz aforado de 100 ml con agua destilada. De este primer patrón (1,98 mM) en agua destilada se tomaron 1,6 ml y se le adicionaron 3,48 ml del tampón de interés, para ajustar el pH en las mismas condiciones de la matriz de trabajo.

De éste segundo patrón (566 μ M) se tomaron alícuotas de 20 μ l cada una (Tabla 6) y se añadieron a una cubeta de cuarzo con 2,5 ml de carbonato de sodio 0,20 M (o tampón ajustado al valor de pH deseado en la recta calibrado) y se leyó la absorbancia a 405 nm. Con los datos obtenidos de la Tabla 6 se elaboró un gráfico de absorbancia leída a 405 nm, en función de la concentración milimolar de *pNF*. Cada uno de los puntos se repitió por triplicado.

Tabla 6. Disoluciones sucesivas de un patrón de *pNF* (0,566 mM) para realizar la recta de calibrado a 405 nm.

Nº	Volumen añadido de <i>pNF</i> (0,566 mM)	Concentración en cubeta <i>pNF</i> (mM)
0	0	0,0000
1	20	0,0045
2	40	0,0089
3	60	0,0133
4	80	0,0176
5	100	0,0218
6	120	0,0259
7	140	0,0300
8	160	0,0341
9	180	0,0380

10	200	0,0419
11	220	0,0458
12	240	0,0496
13	260	0,0533
14	280	0,0570
15	300	0,0606

En el caso de las mediciones de actividad hidrolítica de lipasas, el sustrato empleado resultaba altamente insoluble en tampón o agua. Por ello, el proceso de medición y creación de la recta de calibrado se ajustó a las condiciones que favorecían la completa solubilidad.

Las modificaciones incluidas en el proceso fueron dos: i) se empleó acetona como solvente para el sustrato *p*NF-butirato; ii) el tampón empleado fue fosfato de sodio 50 mM pH 6,00 con un 0,8% de Triton.

Por lo demás, el este el proceso fue el mismo que para el resto de glicosidasas, así como la realización de una recta de calibrado acorde a estas condiciones.

III.2.3.1.1. Selección de microorganismos productores de glicosidasas

Se crecieron los microorganismos como se indica en el apartado III.2.1.3, en matraces de 250 ml con 50 ml de medio de cultivo. Los caldos de cultivo, una vez crecidos los microorganismos, fueron traspasados a tubos Falcon y centrifugados a 7000 r.p.m. durante 10 min en una centrífuga RC6 Plus de Sorvall, con rotor F14S-6x250. El volumen trasvasado se normalizó hasta una misma concentración celular mediante el valor de la densidad óptica del cultivo. El sobrenadante se conservó para comprobar la presencia de enzimas extracelulares. Las células precipitadas fueron lavadas con tampón fosfato 30 mM pH 7,00 y de nuevo centrifugadas, para eliminar el medio de cultivo que pudiera quedar. Posteriormente fueron resuspendidas en 5 ml en ese mismo tampón.

Las reacciones de hidrólisis de glicósidos se llevaron a cabo en tubos Eppendorf, en los que se introdujeron 450 µl de cada microorganismo y 50 µl de cada sustrato en una concentración 5 mM, para obtener una concentración final de 0,5 mM. Los sustratos utilizados fueron *pNF-β-Fuc*, *pNF-β-Gal*, *pNF-α-Glu*, *pNF-α-Man* y *pNF-β-D-Man*. Los tubos se mantuvieron en agitación durante 10 min a 30 °C para los microorganismos de la colección BTG y *Bacillus circulans* USA.

Los tubos Eppendorf se centrifugaron a 7000 r.p.m. durante 10 min en una centrífuga de sobremesa (Mikro 120. Hettich). Se tomaron 200 µl del sobrenadante y se introdujeron en un pocillo de una placa multipocillo. Se midió su absorbancia en un lector de microplacas a una longitud de onda de 405 nm, utilizando como blanco tampón fosfato de sodio 30 mM, pH 7,00 con el sustrato correspondiente en una concentración de 0,5 mM.

Para considerar los resultados positivos o negativos se aplicaron los siguientes criterios:

- Absorbancia entre 0 y 0,05 se consideró resultado negativo (-).
- Absorbancia entre 0,05 y 0,5 se consideró resultado positivo (+).
- Absorbancia mayor de 0,5 se consideró resultado doble positivo (++)

Los resultados positivos se repitieron tres veces, para confirmar que se mantuvieran constantes y fueran reproducibles. Cada repetición corresponde a un crecimiento independiente de los microorganismos y su respectiva reacción con los sustratos.

III.2.3.1.2. Cuantificación de la actividad de enzimas de tipo glicosidasa

Fourage y col,³⁸⁴ han explicado dos formas analíticas para cuantificar el *pNF* liberado en reacciones de hidrólisis enzimática, donde se utilizan glicósidos que liberan *pNF*. La primera forma se denomina “método continuo”, y consiste en determinar el aumento de la absorbancia a 405 nm por liberación de *pNF*. En este método, la

temperatura y el pH se deben controlar con precisión, para reproducir con exactitud la recta de calibrado. La segunda forma de determinar la actividad se le conoce como “método discontinuo”, y consiste en detener la reacción en un momento determinado (por lo general añadiendo NaOH ó Na₂CO₃ concentrados), cuantificando el *pNF* liberado en las mismas condiciones de fin de la reacción. El uso de NaOH ó de Na₂CO₃, garantiza alcanzar valores de pH tan altos que el equilibrio de ionización del *pNF* está completamente desplazado hacia la forma disociada ³⁸⁴ Es importante mencionar que ambas metodologías (continua y discontinua) han sido utilizadas en varios estudios, resaltando entre éstos el clonaje y purificación de enzimas termófilas ³⁸⁵ y la purificación de tres enzimas β-galactosidasas de *B. circulans* ATCC 31382, ¹¹⁹ por lo que su validez ha sido comprobada.

- Ensayo de actividad enzimática por liberación de pNF: método continuo

En una cubeta de cuarzo se adicionaron 2 ml de *pNF*-glicopiranosido (5 mM), disuelto en tampón de trabajo a pH 7,00. Los sustratos utilizados fueron *pNF*-β-Fuc, *pNF*-β-Gal, *pNF*-α-Glu, *pNF*-α-Man y *pNF*-β-D-Man. La mezcla se atemperó a la temperatura de la reacción en el espectrofotómetro, mediante un baño de agua circulante conectado al sistema y se agitó con un agitador magnético adaptado al espectrofotómetro. La temperatura de este ensayo fue de 30 °C para las enzimas mesófilas, 37 °C para enzimas de *B. circulans* y 65 °C para enzimas termófilas. Una vez que la cubeta se hubo atemperado por al menos 90 segundos, se añadieron 10 µl de solución enzima (normalmente con una concentración de 1 mg/ml, para que la cantidad total de proteína fuera de 1 µg). Al añadir la enzima se cuantificó el incremento de absorbancia a 405 nm y se midieron los resultados frente a una recta de calibrado de *pNF* realizada en las mismas condiciones experimentales: pH 7,00, tampón fosfato de sodio 50 mM.

- Ensayo de actividad enzimática por liberación de pNF: método discontinuo

En un tubo Eppendorf se añadieron 4 µl de disolución *pNF*-glicopiranosido 50 mM, a este se le añadió el tampón de trabajo en cantidad apropiada para que la suma de

volúmenes incluyendo la enzima (por lo general con un volumen no mayor a 10 μl y de concentración exactamente conocida) fuese de 200 μl . Los sustratos utilizados fueron *pNF- β -Fuc*, *pNF- β -Gal*, *pNF- α -Glu*, *pNF- α -Man* y *pNF- β -D-Man*. Se agitó la mezcla en un vortex y se calentó a la temperatura adecuada del ensayo (30 °C para la colección BTG, 37 °C para *B. circulans* y 65 °C para termófilos). Pasados 10 min, la reacción se detuvo por adición de 800 μl de Na_2CO_3 0,20 M y se enfriaron las muestras hasta su lectura en el espectrofotómetro. Se realizó un blanco de procedimiento, al cual no se le adicionó ninguna cantidad de enzima hasta después de agregar el Na_2CO_3 .

III.2.3.1.3. Determinación de las constantes cinéticas de Michaelis-Menten (KM) y Velocidad Máxima (Vmax)

En el estudio de caracterización de la enzima β -Gal-3, se llevó a cabo la determinación de las constantes de Michaelis-Menten. Para ello, se realizó la determinación de la velocidad de reacción empleando el método continuo (III.2.3.1), empleando como sustrato *pNF-Gal* a las concentraciones de 0,2, 0,3, 0,8, 1 y 1,5 mM. El ensayo se realizó a 37°C, con agitación constante. Finalmente, se representaron las mediciones en el gráfico de dobles inversas o Lineweaver-Burk y se calculó el valor de V_{max} y K_M para este biocatalizador.

III.2.3.2. Reacciones de transglicosidación

III.2.3.2.1. Reacciones de transglicosidación con células enteras

Se crecieron los microorganismos como se indica en el apartado III.2.1.3, en matraces de 250 ml con 50 ml de medio de cultivo. Los caldos de cultivo, una vez crecidos los microorganismos, se midió su absorbancia a 600 nm (densidad óptica del cultivo⁹), y se tomaron volúmenes de los mismos a fin de estandarizar el número de células empleadas para los ensayos. Este volumen fue traspasado a tubos Falcon, y centrifugados a 7000 r.p.m. durante 10 min en una centrífuga RC6 Plus (rotor F14S-6x250. Sorvall). El sobrenadante se conservó para comprobar la presencia de

enzimas extracelulares. Las células precipitadas fueron lavadas con tampón fosfato 30 mM, pH 7,00 y de nuevo centrifugadas para eliminar el medio de cultivo que pudiera quedar. Posteriormente fueron resuspendidas en 5 ml ese mismo tampón.

Las reacciones se efectuaron con una concentración 85 mM de donador y 425 mM de aceptor (relación 1:5), para un volumen de reacción final de 1 ml en tampón fosfato de sodio 50 mM y pH 7,00. Los sustratos utilizados como donadores fueron: *pNF-β-Fuc*, *pNF-β-Gal*, *pNF-α-Glu*, *pNF-α-Man* y *pNF-β-D-Man*, y como aceptores: Fuc, Fru, Gal, Glu, GalNH₂, Man, GalNAc y GlcNAc. Las reacciones se llevaron a cabo a 30 °C en caso de los microorganismos de la colección BTG y a 37°C para *Bacillus circulans* USA y se iniciaron añadiendo 500 µl de células resuspendidas. De cada reacción se tomaron alícuotas de 50 µl cada 1, 3, 8 y 24 h. Cada alícuota se centrifugó a 14.000 r.p.m. durante 5 min, para separar las células y finalizar la reacción. Las reacciones se siguieron por HPLC (apartado III.2.7.1).

III.2.3.2.2. Reacciones de transglucosidación con enzimas glicosidasas libres

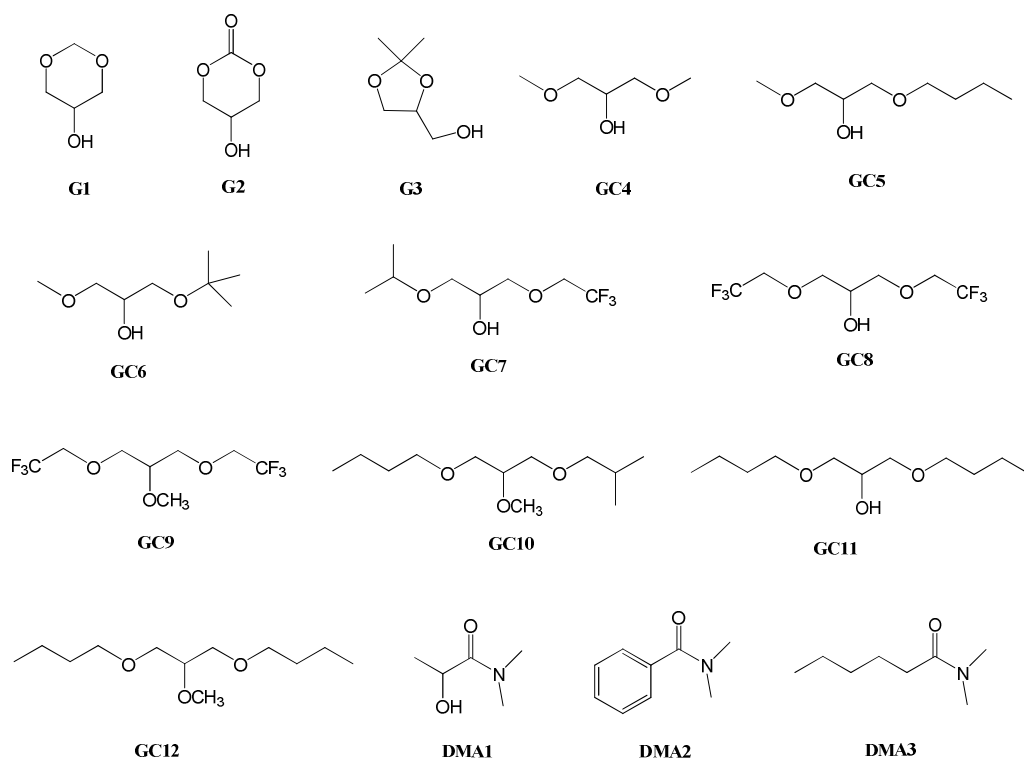
En el caso de las reacciones mediadas por Biolacta, se efectuaron con una concentración 85 mM de *pNF-β-Gal* como donador y 425 mM de aceptor (relación 1:5) para un volumen de reacción final de 1 ml. El sustrato empleado como aceptor fue GlcNAc. Las reacciones se realizaron en citrato-fosfato de sodio 50 mM pH 5,00 con agitación magnética. Cada reacción se inició añadiendo 155 UI de enzima. De cada reacción se tomaron alícuotas de 50 µL cada 30 minutos hasta finalizar la reacción a las 3 horas. Cada alícuota se calentó a 100 °C para finalizar la reacción mediante la desnaturalización de la proteína. Las reacciones se siguieron por HPLC (apartado III.2.7.1).

Las reacciones con α-fucosidasa de *S. sulfotaricus* se llevaron a cabo a 75 °C usando como donador *pNF-α-Fuc*, y aceptor *pNF-α-Gluc*, empleando una relación 1:3 de los mismos. El tamón de trabajo fue 20mM fosfato de sodio, pH 7,00. Se llevaron a cabo

en agitación constante durante 24 horas, tomando alícuotas de 20 μ l a tiempos 0, 3 y 24 horas.

III.2.3.2.3. Reacciones de transglucosidación en presencia de disolventes sostenibles

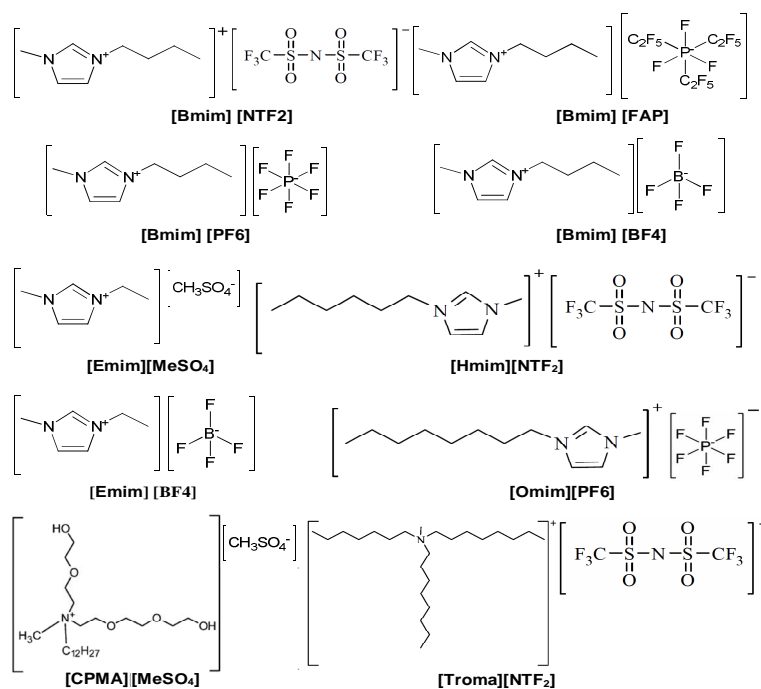
Las reacciones para analizar el efecto de diferentes disolventes sostenibles sobre la actividad enzimática, se realizaron tal y como se describe en el apartado III.2.3.2.2. Para ello, se utilizaron disolventes derivados de biomasa (Esquema 12) en una concentración final de 2M, o LI (Esquema 13) en una concentración final del 30%.



Esquema 12. Disolventes verdes utilizados en este estudio: 1- G1-G3 corresponden a derivados cíclicos del glicerol; GC4-GC12 corresponden a derivados acíclicos del glicerol; DMA1-DMA3 corresponden a derivados de la *N,N*-dimetilamida.

Tabla 7. Características físico-químicas de los diferentes disolventes sostenibles derivados de biomasa.²⁹⁷

Disolvente	Densidad (g/ml)	Log P	Sistema
G1	1.24	-0.057	monofásico
G2	1.41	-0.024	monofásico
G3	1.06	0.030	monofásico
GC4	1.07	-0.60	monofásico
GC5	0.94	0.14	monofásico
GC6	0.91	0.27	monofásico
GC7	1.12	1.14	bifásico
GC8	1.36	1.42	bifásico
GC9	1.27	1.71	bifásico
GC10	0.90	1.93	bifásico
GC11	0.89	2.07	bifásico
GC12	0.89	2.48	bifásico
DMA1	1.06	-0.69	monofásico
DMA2	1.15	1.41	monofásico
DMA3	0.91	1.42	bifásico



Esquema 13. LIs utilizados como co-solventes en reacciones de transglucosidación.

Tabla 8. Características físico-químicas de los diferentes líquidos iónicos.³⁰⁴

Compuesto	Masa molar (g.mol ⁻¹)	Densidad (g.ml ⁻¹)	Conductividad (mS ⁻¹)	Log P	Solubilidad en agua (30% m/v)
[Bmim][BF ₄]	226,03	1,12	2,3	N/D	insoluble
[Bmim][FAP]	584,2	1,63	2,3	N/D	insoluble
[Bmim][NTf ₂]	419,36	1,44	N/D	N/D	insoluble
[Bmim][PF ₆]	284,2	1,24	0,146	-2,39	insoluble
[Emim][MeSO ₄]	174	1,34	N/D	N/D	insoluble
[Emim][BF ₄]	198,0	1,24	1,4	-2,66	soluble
[Hmim][NTf ₂]	475,5	1,25	N/D	0,79	insoluble
[Omim][PF ₆]	340,3	1,37	N/D	-0,35	insoluble
[Troma][NTf ₂]	648,9	1,08	0,04	N/D	insoluble
[CPMA][MeSO ₄]	517,7	1,21	N/D	N/D	soluble

III.2.4. Purificación de compuestos

III.2.4.1. Cromatografía en columna de carbono-celite

La purificación de disacáridos obtenidos en reacciones enzimáticas de transglicosidación se realizó por medio de columnas de 2 x 50 cm, con una altura de columna de aproximadamente 20 cm de fase estacionaria compuesta por un 50 % m/m de carbón activado y 50 % m/m de celite. Las columnas se lavaron como mínimo con 3 volúmenes de cada una de las fases móviles respecto al volumen de soporte. Las fases móviles usadas (por orden de elución) fueron:

- 100 % agua milli-Q,
- 5 % de etanol absoluto en agua milli-Q
- 10% de etanol absoluto en agua milli-Q.
- 15 % de etanol absoluto en agua milli-Q.

Los disacáridos se recogieron en las fracciones de la última elución, correspondiente al 15% de etanol (analizadas inicialmente por CCF). Posteriormente se analizó la

pureza por HPLC (apartado III.2.7.1.1) y se determinó su estructura por RMN (apartado III.2.7.2).

III.2.4.2. Cromatografía en capa fina (TLC)

Fase estacionaria: cromatoplasmas de sílice 60 F₂₅₄.

Las fases móviles se describen en cada caso.

Reveladores:

- Lámpara de ultravioleta/visible (UV/vis) de $\lambda = 254\text{nm}$.
- Revelador de azúcares: 10% de ácido sulfúrico en metanol.

III.2.4.3. Cromatografía en columna de sílica gel

La cromatografía en columna se llevó a cabo en columnas de vidrio de diferentes diámetros. Como fase estacionaria se empleó sílica gel 60, AC, C 40-63 μm . Se localizaron por CCF las fracciones que contenían la muestra, las cuales fueron concentradas a vacío.

III.2.4.4. Liofilización

Los procesos de liofilización se efectuaron en un liofilizador Labconco, Lyph-Lock 12, (Hucha-Erlóss). Las muestras se congelaron introduciendo los viales en acetona con nieve carbónica de modo que tuvieran la mayor superficie posible. A continuación se conectaron al liofilizador hasta que se convirtieron en un polvo seco.

III.2.5. Inmovilización de células enteras

III.2.5.1. Inmovilización en agar y agarosa

Para llevar a cabo el proceso de atrapamiento de células enteras, se seleccionaron el agar y la agarosa como matrices, dada su facilidad de manejo y sus condiciones de gelificación (a temperatura ambiente).

Para ello, se realizó un cultivo de *B. circulans* USA hasta estado estacionario. Transcurrido ese tiempo, se midió la densidad óptica del mismo y se normalizó la cantidad de células e emplear. El extracto se centrifugó para eliminar el medio de cultivo, y se lavaron las células tres veces con tampón fosfato de sodio 30 mM pH 7,00.

Por otro lado, se preparó una solución de agarosa al 3,5% y de agar al 2%, que se esterilizó y se dejó enfriar. Una vez atemperado y aún líquido, se mezcló con las células resuspendidas en 1 ml de tampón de lavado. La mezcla se dispensó en placa Petri para dejar solidificar.

Transcurrido el tiempo necesario para la solidificación, se cortó en cuadrados y se trasvasó a un matraz para llevar a cabo la medida de la actividad enzimática. Para ello, según el método continuo, se pusieron en un matraz el contenido de la placa con el inmovilizado, 45 ml de tampón fosfato de sodio 30 mM pH 7,00 y 5 ml del sustrato *pNF-Gal* a una concentración de 5 mM. La reacción se dejó 90 minutos en agitación a 37°C. Transcurrido ese tiempo, se filtró, y se midió la absorbancia a 405 nm del sobrenante recogido.

Como control, se empleó un matraz con la misma cantidad de células que las empleadas para la inmovilización. El procedimiento para la cuantificación de la actividad enzimática fue el mismo que para el inmovilizado.

III.2.5.2. Inmovilización en acrilamida

En el proceso de inmovilización en poliacrilamida, la polimerización se produce por la adicción de un agente iniciador.

El procedimiento de inmovilización se llevó a cabo empleando un cultivo B. circulans USA hasta estado estacionario. Transcurrido ese tiempo, se midió la densidad óptica del mismo y se normalizó la cantidad de células e emplear. El extracto se centrifugó para eliminar el medio de cultivo, y se lavaron las células tres veces con tampón fosfato de sodio 30 mM pH 7,00.

Para la elaboración del gel se empleó poliacrilamida constituido por un 19% p/v de acrilamida y un 1% p/v de bis-acrilamida. A esta disolución se adicionó 500 µl de persulfato de amonio y 50 µl de TEMED como agentes iniciadores. Seguidamente, y antes del comienzo de la polimerización, se añadió a la mezcla una suspensión de las células lavadas resuspendidas en agua.

La mezcla se dispuso en una placa hasta su completa gelificación.

Transcurrido ese tiempo, se comprobó el grado de gelificación y se llevó a cabo la hidrólisis de *pNF-β-Gal* con el biocatalizador inmovilizado. Para ello, según el método continuo, se pusieron en un matraz el contenido de la placa con el inmovilizado, 45 ml de tampón fosfato de sodio 30 mM pH 7,00 y 5 ml del sustrato *pNF-Gal* a una concentración de 5 mM. La reacción se dejó 90 minutos en agitación a 37°C. Transcurrido ese tiempo, se filtró, y se midió la absorbancia a 405 nm del sobrenante recogido.

III.2.6. Inmovilización de la enzimas

III.2.6.1. Proceso de funcionalización e inmovilización en nanofibras

Para la inmovilización en nanofibras de carbono, se disponía de dos tipos de funcionalizaciones posibles: con grupos carboxilo y con grupos amino. Ambos soportes habían sido sintetizados y oxidados por el grupo de investigación del Dr Rubio. Por tanto, se debió realizar la funcionalización de las mismas en cada caso, siguiendo los protocolos propuestos en la bibliografía para la inmovilización en nanotubos de carbono.²³⁰

Las nanofibras oxidadas se trataron del siguiente modo según la funcionalización deseada:

Nanofibras funcionalizadas con grupos amino: se llevó a cabo la funcionalización mediante carbodiimida. En este caso, no se precisó un tratamiento previo a la inmovilización.

Nanofibras funcionalizadas con grupos carboxilo: se llevó a cabo la funcionalización mediante el sistema de acoplamiento por NHS. El procedimiento se llevó a cabo según lo descrito a continuación:

- a) **Pretratadas con isopropanol:** aproximadamente 10 mg del soporte se dispersaron en 20 ml de isopropanol mediante 40 minutos de sonicación. A continuación, se centrifugó y se eliminó el isopropanol. Seguidamente, se llevan a cabo 3 lavados de las nanofibras con tampón MES 50 mM pH 6,2.

Posteriormente, se realiza la activación mediante la incubación con 10 ml de NHS 400 mM en tampón MES 50 mM pH 6,2. La preparación se sónica durante 60 minutos. A continuación, se adicionan 10 ml de EDC 20 mM y se vuelve a sonicar durante 40 minutos.

Pasado ese tiempo, la solución se centrifuga a 10000 rpm y se elimina el sobrenadante. Las nanofibras se lavaron 3 veces con tampón MES 50 mM pH 6,2 para eliminar los restos de reactivos. El sólido resultante se deja secar en estufa a 37°C durante una noche.

- b) **Sin pretratamiento con isopropanol:** aproximadamente 10 mg del soporte se dispersaron en 20 ml de tampón MES 50 mM pH 6,2 mediante 40 minutos de sonicación. A continuación, se centrifugó y se eliminó el isopropanol. Seguidamente, se llevan a cabo 3 lavados de las nanofibras con tampón MES 50 mM pH 6,2.

Posteriormente, se realiza la activación mediante la incubación con 10 ml de NHS 400 mM en tampón MES 50 mM pH 6,2. La preparación se sónica durante 60 minutos. A continuación, se adicionan 10 ml de EDC 20 mM y se vuelve a sonicar durante 40 minutos.

Pasado ese tiempo, la solución se centrifugó a 10.000 rpm y se eliminó el sobrenadante. Las nanofibras se lavaron 3 veces con tampón MES 50 mM pH 6,2 para eliminar los restos de reactivos. El sólido resultante se deja secar en estufa a 37°C durante una noche.

Para la inmovilización de la enzima β -Gal-3 y de las lipasas de *C. antártica* y *P. stutzeri* en nanofibras carboxilo, se utilizó 0,1 mg de proteína en un tubo Eppendorf de 2 ml junto con 10 mg de soporte y 1,5 ml de tampón MES 50 mM pH 6,20 o 7,50. La mezcla se dejó en contacto a temperatura ambiente durante 5, 17 o 24 h en agitador vertical a 25 r.p.m. Pasado este tiempo, se cuantificó la cantidad de proteína en el líquido sobrenadante, y se determinó la cantidad de enzima unida covalentemente al soporte. Así mismo, se midió la actividad hidrolítica de los inmovilizados. La mezcla final se centrifugó y lavó con el tampón de inmovilización, y se conservó a 4°C para su empleo.

Para la inmovilización de la enzima β -Gal-3 y de las lipasas de *C. antarctica* y *P. stutzeri* en nanofibras amino, se pesaron 100 mg del soporte y se adicionaron 10 mg de enzima (disolución para β -Gal-3 y CAL-B; y polvo seco para CAL y PSL). Se adicionaron agua hasta un volumen final de 10 ml, y se ajustó el pH a 5,00. Se mantuvo en agitación constante para favorecer la unión iónica al soporte. Posteriormente, se añadió carbodiimida hasta alcanzar una concentración final de 1 mM, y que se llevara a cabo la unión covalente. La mezcla se mantuvo en agitación durante 90 minutos. Transcurrido ese tiempo, se centrifugó durante 10 minutos a 10.000 rpm, se tomó el sobrenadante de la misma, y se lavó tres veces con tampón fosfato 50 mM pH 6,0. Se llevó a cabo cuantificación de la proteína residual en el

sobrenadante, y se evaluó la actividad hidrolítica del inmovilizado. El soporte inmovilizado se almacenó a 4° C hasta su utilización.

III.2.6.2. Proceso de inmovilización en polímeros fenólicos

Para llevar a cabo la síntesis del polímero mediada por la peroxidasa de soja (SBP), se empleó como sintón de la reacción de polimerización el compuesto 3-(4-Hidroxifenil)ácido propionico éster *N*-hidroxisuccinimida. Este trabajo de polimerización fue realizado por el Dr Gustavo Levin durante su estancia Postdoctoral en nuestro grupo de investigación.

De manera general, el proceso de síntesis del polímero se realizó conforme al siguiente procedimiento:

Se disolvieron 100 mg del sintón de polimerización 3-(4- Hidroxifenil)ácido propionico éster *N*-hidroxisuccinimida en 25 ml de tetrahidrofurano y 60 ml de tampón fórmico/formiato de sodio 30 mM de pH 3.5.

A esta disolución se añadieron 0,22 mg de la enzima SBP, así como 500 µl totales de H₂O₂ 5%, dosificados a razón de 50 µl cada 2,5 minutos durante 25 minutos.

La reacción se mantuvo en constante agitación orbital y una temperatura de 25°C.

El seguimiento de la reacción se realizó mediante la toma de muestras de la misma a diferentes tiempos de reacción, y su posterior análisis por HPLC para evaluar el sustrato de partida no consumido.

Transcurridos 60 minutos, la reacción se detuvo mediante centrifugación del volumen total de la reacción.

El polímero precipitado de la reacción se lavó 3 veces con el tampón fórmico/formiato antes descrito y finalmente con agua milliQ.

Finalmente, el polímero obtenido se secó en estufa a 40°C para su posterior empleo como soporte de inmovilización.

La inmovilización se realizó con 0,1 mg de enzima β -Gal-3, la cual se diluyó con tampón MES 50 mM pH 6,20 hasta un volumen final de 1,5 ml. Luego se añadió 10 mg de soporte. La mezcla se sometió a agitación orbital a 25 °C durante 12 horas. Transcurrido ese tiempo, se sometió a centrifugación a 15.000 rpm durante 10 minutos y se recogió el sobrenadante. Con el sobrenadante recogido se procedió a medir la cantidad de enzima no unida. El soporte inmovilizado se lavó con el tampón de la inmovilización tres veces y se llevó a cabo la medición de la actividad enzimática del inmovilizado por el método discontinuo. El derivado inmovilizado se conservó a 4 °C.

III.2.6.3. Proceso de inmovilización en soporte de glioxil agarosa

La inmovilización se realizó con 0,5 mg de enzima β -Gal-3, la cual se diluyó con tampón bicarbonato de sodio 100 mM pH 10,50 con un 50% de PEG-600 hasta un volumen final de 5 ml y el pH final de la disolución se ajustó hasta 10. Luego se añadió 1 g de soporte (agarosa entrecruzada al 10%, TEA, IDA o Ni en cada caso). La mezcla se sometió a agitación orbital a 25 °C durante 30 min. De la mezcla se tomaron 10 μ l de muestra, que se filtraron para medir la actividad de la enzima en el líquido sobrenadante. Cuando se completó el proceso de inmovilización, se añadieron 5 mg de NaBH₄. La mezcla se sometió a agitación orbital sin tapar durante 30 minutos. La mezcla final se filtró sobre un plato poroso y se lavó con tampón fosfato de sodio 50 mM pH 6,00. El derivado inmovilizado se conservó a 4 °C.

III.2.6.4. Proceso de inmovilización en celite

La inmovilización por adsorción de la lipasa de PSL sobre celite se realizó con 100 mg de enzima PSL, la cual se diluyó con tampón fosfato de sodio 50 mM pH 6,00 hasta un volumen final de 600 μ l. Luego se añadió 200 g de soporte y 3 ml de

acetona fría. La mezcla se sometió a agitación orbital a 4 °C durante 100 min. Transcurrido ese tiempo, se filtró la suspensión y se lavó tres veces con tampón de inmovilización. La cuantificación de la enzima inmovilizada se llevó a cabo con una muestra tomada del solvente de inmovilización extraído en la filtración. Así mismo, se llevó a cabo la cuantificación de la actividad enzimática del inmovilizado. El derivado inmovilizado se conservó a 4 °C.

III.2.6.5. Estabilización frente a pH de la enzima β -Gal-3 inmovilizada

Este ensayo se realizó para los complejos inmovilizados con nanofibras de carbono, polímero fenólico y glioxil agarosas. En todos los casos el procedimiento general fue el mismo, variando tan sólo los tiempos de toma de muestra entre ellos.

Se añadieron 10 mg de soporte seleccionado con enzima inmovilizada para medir la actividad hidrolítica utilizando el método discontinuo descrito en el apartado III.2.3.1.2. La hidrólisis se realizó a 37 °C utilizando *p*NF- β -Gal 5 mM como sustrato. Las mediciones enzimáticas se realizaron en presencia de tampón citrato/fosfato de sodio 50 mM en el rango de pH 4,00 y fosfato de sodio 50 mM en el rango de pH 5,50 – 8,00, y tampón Tris-HCl 50 mM en el rango de pH 9,00. La actividad enzimática obtenida para cada valor de pH se expresó como actividad relativa respecto al valor máximo hallado y el error promedio del experimento (expresado como desviación estándar) no superó el 5%.

III.2.6.6. Reacciones de desacetilación con lipasas inmovilizadas en nanofibra

Este procedimiento se llevó a cabo con las lipasas inmovilizadas en nanofibras de carbono y en Celite ®.

En el caso de las nanofibras, el volumen de trabajo fue menor debido a la menor disponibilidad del soporte. En ese caso, se disolvieron 10 mg de las lipasas

inmovilizadas en un volumen de 450 μ l de los disolventes etanol, MeTHF, THF y DMA3. A ello se adicionaron 50 μ l de agua, que supuso un 10% del volumen final. Como sustrato se emplearon 15 mg de β -D-galactosa peracetilada.

En el caso del empleo de celite como soporte, se disolvieron 100 mg de las lipasas inmovilizadas en un volumen de 4,5 ml de los disolventes etanol, MeTHF, THF y DMA3. A ello se adicionaron 500 μ l de agua. Como sustrato se emplearon 150 mg de β -D-galactosa peracetilada.

En todos los casos, la reacción se realizó en agitación constante a 30°C. Se tomaron alícuotas de 20 μ l a distintos tiempos, que se diluyeron con 180 μ l de butanol para su posterior análisis por HPLC y CCF (III.2.7.1.1).

III.2.6.7. Reacción de transglucosidación con β -gal-3 inmovilizada

Mediante el empleo de todos los complejos inmovilizados, se llevó a cabo la reacción de transglucosilación, a fin de conocer el rendimiento sintético del inmovilizado.

En todos los casos, la reacción se llevó a cabo siguiendo el siguiente procedimiento.

Las reacción se llevó a cabo tal y como se describe en el apartado III.2.3.2.2, añadiendo 10 mg de soporte inmovilizado con la enzima. Pasado el tiempo de reacción, las muestras se centrifugaron a 14.000 r.p.m. durante 5 minutos para separar el biocatalizador y finalizar la reacción. El sobrenadante se conservó para medir la actividad enzimática por HPLC (apartado III.2.7.1).

III.2.6.8. Termoestabilidad de la enzima β -Gal-3 inmovilizada

Para estudiar la termoestabilidad de la enzima β -Gal-3 de *B. circulans* inmovilizada, se añadieron 100 mg de los soportes (nanofibra, TEA agarosa y soporte fenólico) en 100 μ l de tampón fosfato 50 mM pH 6,00 y se incubaron a 37°C y 50 °C. A 1, 3 y 24 h, se tomaron 10 μ l de la suspensión y se midió su actividad hidrolítica, según el método continuo descrito en el apartado III.2.3.1.2.

III.2.6.9. Termoestabilidad de la enzima PSL inmovilizada en celite

Para estudiar la termoestabilidad de la enzima PSL inmovilizada en celite, se añadieron 50 mg de soporte en 1,5 ml de tampón fosfato 50 mM pH 6,00 y se incubaron a 37 °C y 50 °C. A 10, 1,5, 24, 48, 85 y 120 h, se tomaron 10 μ l de la suspensión y se midió su actividad hidrolítica, según el método discontinuo descrito en el apartado III.2.3.1.2.

III.2.6.10. Reutilización de la enzima β -Gal-3 inmovilizada en nanofibras y agarosas-TEA

Se disolvieron 10 mg de β -Gal-3 inmovilizada en nanofibra o 10 UI del inmovilizado en TEA en tampón fosfato de sodio 50 mM pH 6 con el objetivo de llevar a cabo la reacción en tres medios de reacción diferentes: i) tampón, ii) tampón y 2M del derivado de biomasa DMA1, y iii) tampón y 30% del LI [Bmim][PF₆], para un volumen final de 0.5 ml. La reacción se llevó a cabo utilizando concentración final de 85 mM de *p*NF- β -Gal como donador, y 425 mM de GlcNAc como aceptor, a 37 °C, durante 1,5 h en agitación orbital. Pasado el tiempo de reacción, las muestras se centrifugaron a 14.000 r.p.m. durante 5 minutos. El sobrenadante se conservó para medir la actividad enzimática por HPLC (apartado III.2.7.1). El soporte con la enzima inmovilizada fue lavado dos veces con tampón fosfato de sodio 50 mM pH 6.

Para los sucesivos ciclos, se añadió de nuevo medio de reacción. Puesto que el [Bmim][PF₆] se podía reutilizar porque precipitaba al centrifugar, no fue necesario volver a añadir este co-solvente en los distintos ciclos de reutilización.

III.2.7. Técnicas Analíticas

III.2.7.1. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

III.2.7.1.1. HPLC para el análisis de oligosacáridos

El seguimiento de las reacciones enzimáticas de transglicosidación empleando β -Gal-3, *B. circulans* USA y Biolacta, se realizó mediante un cromatógrafo Jasco 2000, equipado con una columna NH₂P50-4E de grupos amino (Asahipak, Japón): diámetro interno: 4,6 mm, longitud 250 mm, tamaño de partícula: 5 μ m. Las condiciones de trabajo fueron: flujo 0,8 ml/min, fase móvil de 80 % acetonitrilo y 20 % de agua (v/v). El sistema tiene tres detectores: uno luz ultravioleta (UV) y otro de difracción circular (DC) fijados a 317 nm (máximo de absorción de los derivados de *p*NF y un detector de dispersión de la luz por evaporación (“*evaporative light scattering detector*”, ELSD). Las condiciones de trabajo con este último detector fueron: temperatura del tubo de deriva [DT]: 60 °C y de la cámara de spray [SC]: 54 °C

Las alícuotas obtenidas de las distintas reacciones de este trabajo, se diluyeron 10 veces y se filtraron para ser analizadas por HPLC-ELSD. De los datos obtenidos en el cromatograma, se estimaron las proporciones de disacáridos mediante la metodología de calibración absoluta (o del estándar externo). Para ello se utilizó un estándar externo de disacáridos puros (Gal- β (1-3)-GlcNAc, Gal- β (1-3)-GalNAc, Gal- β (1-6)-GlcNAc Gal- α (1-6)-Glu-*p*NF y Gal- α (1-6)-Man-*p*NF) de concentración conocida. Se realizó una recta de calibrado del área del compuesto en función de las concentraciones (1,25, 2,5, 3,75, 5, 6,25 y 7,5 mg/ml). Los datos se ajustaron a un modelo polinómico de primer grado y se evaluaron por su valor de R².

El detector UV se utilizó para estimar en el cromatograma la distribución de los grupos *p*-nitrofenol liberados y/o condensados durante la reacción, ya que éstos (sin ionizar) absorben normalmente a 317 nm. Los glicoconjugados con estos anillos aromáticos se detectaron también por DC (317 nm), ya que la presencia de dobles enlaces del sistema aromático cerca de un centro quiral como es el carbono anomérico permiten ser detectados con ésta técnica.

Las mismas condiciones de análisis se emplearon en el caso de las reacciones de desacetilación llevadas a cabo con lipasas. En este caso, el patrón empleado fue una muestra pura de β -D-Galactosa tetraacetilada, que ha sido regioselectivamente atacada en la posición anomérica.

Para el análisis de las muestra de transglicosilación llevadas a cabo por la enzima α -fucosidasa se emplearon las mismas condiciones de detección, a excepción de la mezcla de solventes de cromatografía, que fue de un 83% de acetonitrilo y un 17% de agua, a fin de favorecer la correcta separación de los compuestos presentes en la reacción.

III.2.7.2. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)

Los espectros de ^1H -RMN de los disacáridos purificados se realizaron con presaturación de agua deuterada (D_2O) o CHCl_3 según el caso, en un espectrómetro Bruker AC-250 de 250 MHz. En el caso de muestras muy diluidas o para espectros de ^{13}C -RMN se utilizó el espectrómetro Bruker Av de 500 MHz ó de 700 MHz.

III.2.7.3. Espectroscopía de Fluorescencia

Se analizó el espectro de emisión de fluorescencia de la enzima α -fuc utilizando un espectrómetro Perkin Elmer LS50B. Se excitó la proteína a una longitud de onda (λ) de 295 nm, la emisión fue adquirida de 310 nm a 400 nm. La excitación y emisión de ancho de banda se ajustó a 3 nm, las mediciones se hicieron en celdas de 1 cm de

paso de luz con un termorregulador CCF ajustado a 25°C. El análisis se realizó utilizando el software Spectra Félix 32. Primero se analizó el espectro de los solventes **G2, G3, GC4, GC8, DMA1, [Bmin][Ntf₂]** y **[Emin][MeSO₄]** para conocer cuáles de ellos daban señal de manera intrínseca. A continuación, el de la enzima α -fuc en tampón fosfato de sodio 30 mM pH 7,00 para poder compararlos y confirmar que la emisión de los solventes era inapreciable comparada con la de la enzima y que no interferiría en las mediciones. Después se realizaron varias adiciones de **G3, GC4, GC8, DMA1, [Bmin][Ntf₂]** y **[Emin][MeSO₄]** en la cubeta con la enzima, logrando las siguientes concentraciones finales: 0, 0,09, 0,2, 0,9 y 2. Se registraron los espectros de emisión para dichas mezclas y se representó la fluorescencia normalizada en función de la λ .

III.2.7.4. Resonancia de Plasmón de superficie (SPR)

Los análisis se realizaron en un equipo Biacore 3000 (GE Healthcare). Se utilizaron dos tipos de chip:

- SA: contiene una superficie funcionalizada con estreptavidina, que permite la unión de moléculas biotiniladas. La unión estreptavidina-biotina es tan fuerte, que se puede asemejar a una unión covalente.
- CM4: contiene una superficie de oro funcionalizado con 30% de dextrano, lo que reduce la señal y evita uniones inespecíficas. Esta matriz permite la unión a los grupos carboxilo a través de enlaces covalentes mediante distintos métodos químicos.

III.2.7.4.1. Estudios de interacción de moléculas de heparina y heparan sulfato

Para los chips CM4, los experimentos se llevaron a cabo en presencia de tampón fosfato de sodio 10 mM pH 7,40 con cloruro de sodio 150 mM y 0,005% de P20. Cada chip tiene cuatro celdas FC (Flow Cell), que pueden actuar independientemente, permitiendo la inmovilización diferenciada en cada una de ellas.

III.2.7.4.1.1 Funcionalización con biotina de las moléculas de heparina y heparan sulfato

Las moléculas de heparina y HS se prepararon para su inmovilización mediante la unión covalente al sustrato biotina-LC-hidracida y sulfo-NHS-biotina. Se emplearon dos condiciones diferentes a fin de conseguir la inmovilización por dos zonas diferentes de la estructura: acoplamiento de la biotina a través de los grupos urónicos con el primer sustrato y con los residuos amino no substituidos de las glucosaminas mediante el segundo sustrato.

Para la unión al primer sustrato, se llevó a cabo el siguiente protocolo: 50 mg de las heparinas y HS disponibles (HP LMW, HS de Celsus, HP Celsus) se disolvieron en 5 ml de tampón MES 0,1 M pH 4,50, y se incubaron con 62,5 μ l de EDAC (100 mg/ml en tampón MES 0,1 M pH 4,50) durante 5 minutos con agitación constante. Transcurrido ese tiempo, se adicionó 125 μ l de biotin-LC-hidracida (50 mM en DMSO) y se incubó durante toda la noche a 28 °C con agitación constante.

Pasado ese tiempo, se centrifugó la muestra a 13.000 rpm durante 5 minutos y se dializó empleando una membrana Spectra/Por® de tamaño de poro 6-8, empleando tampón HEPES 10 mM pH 7,40 como tampón de lavado.

Para el caso de la heparina LMW se procedió a la eliminación de la biotina no unida mediante el empleo de una tubo de centrifuga Amicon ® ultra-15, de tamaño de poro 3, centrifugando la muestra durante 20 minutos a 9.000 rpm, y empleando tampón HEPES 10 mM pH 7,40 como tampón de lavado.

En el caso del empleo del otro sustrato, el procedimiento fue el siguiente: se pesaron 50 mg de las diferentes HP y HS disponibles, que se disolvieron en 5 ml de tampón bicarbonato de sodio 50 mM pH 8,30. A ello se adicionó 50 μ l de NHS-LC-biotina (20,5 μ mol en DMF). La mezcla resultante se incubó durante dos horas a 4 °C con agitación continua. Transcurrido ese tiempo, se procedió a eliminar la biotina no unida del mismo modo que en el caso anterior.

Las muestras obtenidas fueron liofilizadas para obtener un polvo seco, y almacenadas a 4 °C hasta su empleo.

III.2.7.4.1.2 Preparación del chip SA

Todos los experimentos en el aparato de BIAcore se realizaron a una temperatura controlada de 25 °C.

III.2.7.4.1.2.1 Normalización de la superficie de SA

El chip fue normalizado conforme a lo descrito en el manual de BIAcore. Para ello, se realizaron tres inyecciones de NaCl 1M y de NaOH 50 mM alternativamente, a un flujo de 20 µl/min, con un tiempo de contacto de 1 minutos para cada una de ellas. A continuación, se lavó la superficie con tres inyecciones de tampón HBS-P.

III.2.7.4.1.2.2 Inmovilización de ligandos en la superficie del chip

El proceso de inmovilización se hizo conforme al siguiente esquema: la celda Fc1 se bloqueo para su empleo como control; en la celda Fc2 se inmovilizó la HP LMW; Fc3 con HS de Celsus; Fc4 con HP de Celsus.

Para llevarlo a cabo, se realizaron tres inyecciones de 5 µl de cada una de las moléculas a una concentración de 30 µg/ml en HBS-P, con un flujo de trabajo de 5 µl/min. A continuación, se realizaron tres inyecciones de lavado con el tampón HBS-P, para eliminar de la superficie las moléculas que no se habían unido correctamente.

Finalmente, se cuantificaron las unidades de resonancia obtenidas (RU), que reflejan la respuesta de inmovilización.

III.2.7.4.1.2.3 Estudio de interacciones moleculares entre HP/HS y proteínas

Para llevar a cabo el estudio de la interacción entre la HP y la HS con proteínas, se seleccionaron una proteína implicada en importantes funciones biológicas: antitrombina III (AT III).

Para el estudio de la ATIII, las muestras fueron inyectadas (15 µl) a un flujo de 5 µl/min en tampón fosfato de sodio 10 mM pH 7,40 con cloruro de sodio 150 mM y 0,005% de P20 (HBS-P), midiendo después la disociación durante 180 s. Las concentraciones utilizadas para fluir los la ATIII fueron: 0,01, 0,025, 0,05, 0,1, 0,25, 0,5 y 1 µM. después de cada inyección fue necesario inyectar 5 µl de NaCl 1 M para llevar a cabo la disociación completa.

El procesamiento de datos y los análisis de resultados se llevaron a cabo mediante el programa BiaEvaluation v.4.1.1 (GE Healthcare). A todas las señales se les restó el blanco y fueron ajustadas a un modelo matemático para obtener los parámetros cinéticos de la interacción.

III.2.8. Herramientas informáticas

III.2.8.1. Programas bioinformáticos

III.2.8.1.1. Análisis de secuencias proteicas

La comparación de secuencias peptídicas, búsqueda de proteínas homólogas o análisis de proteínas, como cálculo de su punto isoeléctrico, su masa molecular o la predicción de posibles fragmentos transmembrana de proteínas, se realizó con los paquetes de programas del servidor ExPASy: BLAST,³⁴⁰ pI/MW, ProtParam.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1. Capítulo 1. Búsqueda de glicosidasas aplicadas a la síntesis de oligosacáridos

Actualmente, para poder profundizar en el conocimiento del papel desempeñado por los glicoconjugados, resulta de gran necesidad disponer de herramientas que nos permitan obtener dichos compuestos a gran escala, así como con un elevado grado de pureza. Por ello, en la primera parte de esta Tesis Doctoral, nos planteamos como objetivo trabajar en la búsqueda de nuevas enzimas glicosidasas aplicables al campo de la síntesis de glicoconjugados. Este capítulo parte del empleo de técnicas de microbiología y enzimología para poder abordar el trabajo de búsqueda de enzimas en microorganismo mesófilos y termófilos disponibles en nuestro grupo de investigación.

IV.1.1. Selección de organismos mesófilos productores de glicosidasas

Nuestro grupo de investigación poseía una colección de microorganismos, que sirvió de punto de partida de nuestro trabajo. En este caso, todos ellos estaban catalogados bajo el nivel 1 de bioseguridad, lo cual permitió el trabajo sin la necesidad de tomar medidas especiales de seguridad para su manejo, crecimiento y conservación. Esta colección estaba denominada como colección BTG, y se constituía de bacterias, hongos y levaduras. Estas últimas fueron el objeto de nuestra búsqueda.

Unida a esta colección, se llevó a cabo el mismo trabajo de búsqueda y optimización con la cepa bacteriana de *Bacillus circulans* de la colección americana (Código ATCC 31382), a fin de completar el amplio trabajo desarrollado en nuestro grupo con glicosidasas recombinantes provenientes de esta bacteria.³⁸⁶

Dado que las levaduras de la colección no se encontraban identificadas en ningún caso, a excepción de un código alfanumérico que emplearemos a título identificativo,

el primer paso del trabajo fue la revitalización de las cepas. Las levaduras se encontraban designadas con las siglas TCL y sumaban en total 80 ejemplares. La mayoría de ellas llevaban mucho tiempo congelados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en glicerol al 20%, lo cual suponía la premisa de un posible problema de viabilidad en muchas de ellas. Dado este posible impedimento, optamos por emplear como primer medio de cultivo el conocido como caldo cerebro-corazón enriquecido con glucosa al 20 %. Se trata de un medio enriquecido, empleado en los casos de microorganismos con complicaciones para el crecimiento, o bien que han estado sometidos a largos períodos de almacenamiento o condiciones inadecuadas. Para estos casos, se suele optar por estos medios enriquecidos en lugar de otros generales como puede ser el medio YM o LB en bacterias.

De aquellos microorganismos que consiguieron ser revitalizados, se llevó a cabo una siembra en placa con YM agar para su crecimiento en césped, una inoculación en medio líquido YM, y un agotamiento de asa en placas de YM agar.

En este caso, un gran número de microorganismos lograron crecerse en medio líquido. Sin embargo, decidimos llevar a cabo una selección de los mismos de cara a su posterior trabajo de optimización. En este caso, los criterios establecidos fueron:

1-Crecimiento en medio YM tanto sólido como líquido en 24 h a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2-Pureza de los cultivos, determinada a partir del agotamiento de asa en placas de YM agar y a través de observación en el microscopio de los crecimientos en YM líquido.

Así, finalmente pudimos seleccionar 7 microorganismos que se adaptaron a los requisitos establecidos. De ellos, se crearon copias en criotubos para su conservación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y liofilizados, tal y como se describe en el apartado III.2.1.2.

El procedimiento anteriormente descrito fue asimismo realizado con la cepa *Bacillus circulans* USA, pero sustituyendo el medio YM por LB. En este caso, la cepa creció sin ningún problema y se pudo emplear para su posterior trabajo.

IV.1.1.1. Selección de microorganismos mesófilos productores de glicosidasas de la colección BTG

Empleando el protocolo descrito en el apartado III.2.3.1.1 de Materiales y Métodos se llevó a cabo un estudio de las actividades hidrolíticas presentes en los microorganismos seleccionados anteriormente. En este caso, se emplearon cultivos celulares en medio líquido hasta alcanzar la fase estacionaria. Dado que nuestro trabajo se orientó hacia la búsqueda de glicosidasas, decidimos emplear como sustratos una serie de monosacáridos activados con *pNF*, que, al hidrolizarse en la presencia de determinadas glicosidasas, liberan al medio una molécula de *pNF* que puede ser detectada por métodos colorimétricos. Los sustratos utilizados fueron *pNF-β-Fuc*, *pNF-β-Gal*, *pNF-α-Glu*, *pNF-α-Man* y *pNF-β-D-Man*. En nuestro caso, para facilitar el trabajo, se empleó un lector de microplacas multipocillo, permitiendo reducir el tiempo de trabajo y aumentar el número de repeticiones de las medidas. Así mismo, decidimos tomar unos valores de absorbancia para establecer los resultados considerados positivos y negativos:

- Absorbancia entre 0 y 0,05 se consideró resultado negativo (-).
- Absorbancia entre 0,05 y 0,5 se consideró resultado positivo (+).
- Absorbancia mayor de 0,5 se consideró resultado doble positivo (++)

Los resultados encontrados se muestran en la Tabla 9. Tal como se puede observar en la tabla, el ensayo resultó positivo o doble positivo para todas las actividades a excepción de β -fuc, que no se encontró en ningún microorganismo. Hay que tener en cuenta que en ninguno de los casos se llevó a cabo la inducción de la expresión de glicosidasas, y estamos analizando únicamente la expresión basal mostrada por el microorganismo.³⁸⁷

Tabla 9. Resultados del cribado de actividades de microorganismos productores de glicosidasas.

<i>p</i> NF-	β -Fuc	α -Glu	β -Gal	β -Man	α -Man
TCL 442	-	++	-	-	-
TCL 435	-	++	-	-	-
TCL 439	-	+	+	-	+
TCL 443	-	++	-	-	-
TCL 427	-	-	-	+	+
TCL 436	-	+	-	-	-
TCL 441	-	+	-	-	-

Dado que muchas de las levaduras no presentaron una buena actividad hidrolítica frente a estos sustratos, y unido al hecho de que al tratarse de una colección sin identificar corríamos el riesgo de riesgo de seleccionar microorganismos productores de enzimas ya caracterizadas, poco novedosas o de poco interés, optamos por seleccionar la cepa que mejor resultados nos había dado en este ensayo, y tratar de trabajar con ella en una segunda fase de cultivos inducidos. Por ello, se decidió comenzar la búsqueda de microorganismos capaces de sintetizar oligosacáridos por aquellos candidatos que presentaron actividad α -glucosidasa, los cuales aparecen en la Tabla 9.

IV.1.1.2. Reacciones de transglicosidación con células de organismos mesófilos

Tal como se explicó en la Introducción de esta memoria (apartado I.2.1), las glicosidasas tienen la capacidad de, en determinadas circunstancias, utilizar el sustrato como donador para realizar reacciones de transglicosidación. Así, para averiguar si nuestros microorganismos tenían esta capacidad, decidimos emplear los seleccionados con actividad α -glucosidasa como biocatalizadores en reacciones de transglicosidación, tal y como se explica en el apartado III.2.3.2. Para ello, se utilizó como donador el *p*NF- α -gluc, y se seleccionó un sustrato como aceptor, GlcNAc.

En ninguna de las reacciones se obtuvo ningún resultado positivo para la síntesis de disacáridos (resultados no mostrados). Esto pone de manifiesto como, a pesar de reconocer el sustrato donador y ser capaces de hidrolizarlo, no son capaces de llevar a cabo reacciones de transglucosilación. Además, debemos tener en cuenta que el hecho de trabajar con células enteras dificulta en gran medida el control estricto sobre las condiciones de reacción, puesto que pueden darse reacciones secundarias no controladas que provoquen la degradación de los productos o bien inhiban la actividad sintética de la. Además, al no estar identificada la colección BTG, y no conocer la especie de los microorganismos con los que se han realizado las reacciones impide conocer las condiciones óptimas de crecimiento, recursos genéticos o caracterizaciones enzimáticas previas.

Por todo ello, decidimos seleccionar un único microorganismo para tratar de trabajar en las condiciones de optimización de la reacción. En este caso, se seleccionó el más activo para la hidrólisis de *p*NF- α -Glc, el TCL 443. Nuestro trabajo posterior consistió, centrándonos en esta cepa, en tratar de llevar a cabo un trabajo de optimización de las condiciones de cultivo, búsqueda de pH óptimo, etc. (III.2.1.4).

IV.1.1.2.1. Inducción de la producción de α -glucosidasa de 443

Tras los ensayos de screening realizados, se decidió seleccionar la cepa TLC 443 puesta que era la que mayor actividad presentaba. (Tabla 9)

La enzima α -glucosidasa produce la hidrólisis de residuos de glucosa. Es frecuente que las glicosidasas presenten también actividades para otros sustratos debido a fenómenos de promiscuidad de sustrato.³⁸⁸⁻³⁹⁴

Es bien sabido que la presencia de determinados disacáridos en el medio de cultivo puede llevar a la activación de la expresión de los genes de las glicosidasas de modo similar al provocado en el operón *lac*, que, en presencia de lactosa, activa la expresión de β -galactosidasa, entre otras enzimas y transportadores.³⁹⁵

Para llevar a cabo los ensayos de inducción de la expresión de las glicosidasas se utilizó medio YM diluido a la mitad, añadiendo un 1% de un solo disacárido en cada

caso, tratando de favorecer el empleo del mismo como fuente de carbono y provocar un aumento en la expresión de las enzimas implicadas en el metabolismo de de estas moléculas. En nuestro caso, los disacáridos utilizados fueron celobiosa, lactosa, maltosa, melibiosa y sacarosa, tal y como se muestra en el apartado III.2.1.4.

Inicialmente, y para poder llevar a cabo la correcta estandarización del cultivo, se realizaron dos ensayos:

- Elaboración de la curva de crecimiento del microorganismo en medio YM control.
- Plaqueo en dilución seriada para poder llevar a cabo proceso de conteo celular y establecer así la proporción correcta entre la absorbancia a 600 nm y el número de unidades formadoras de colonias presentes (ufc/ml).

En primer lugar se llevó a cabo el procedimiento descrito en el apartado III.2.1.3 de Materiales y Métodos para establecer la relación entre la absorbancia a 600 nm (densidad óptica) y la concentración celular del cultivo en ufc/ml. A partir del dato obtenido, se procedió posteriormente al cálculo de la concentración celular en cada fase de la curva de crecimiento.

Posteriormente, para llevar a cabo la curva de crecimiento, se siguió el procedimiento descrito en el apartado III.2.1.3 de Materiales y métodos. El resultado obtenido se representa en la Figura 8. Tal como se observa, la estandarización de los cultivos empleados a un crecimiento de 16 horas asegura que se encuentren en la fase estacionaria del mismo.

Resulta importante destacar cómo es crítico el conocimiento de la masa celular de trabajo de cara a estandarizar las medidas obtenidas, llevando a cabo los estudios de hidrólisis siempre con la misma cantidad de células para cada caso. Este aspecto resulta fundamental para poder llevar a cabo la correcta comparación de datos,

sobretudo en aquellos casos en los cuales la velocidad de crecimiento no sea la misma entre las diferentes cepas o cultivos

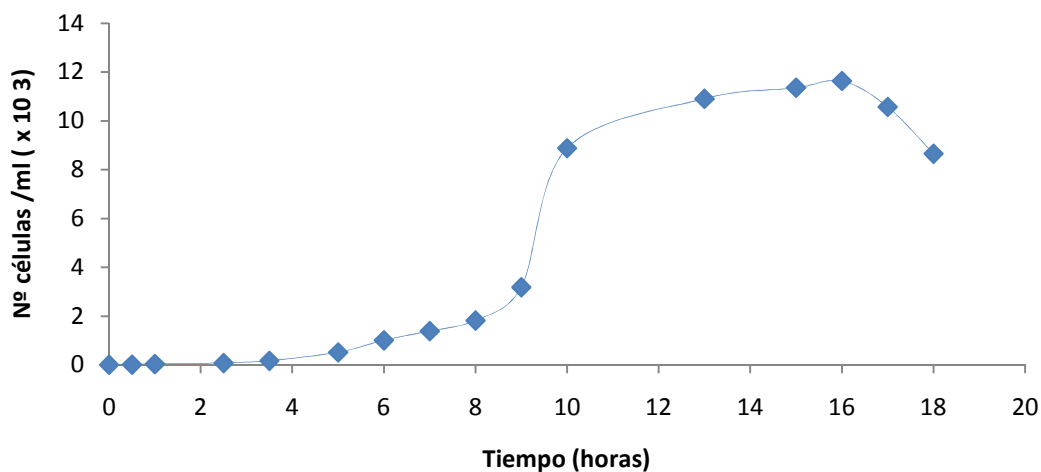


Figura 8. Curva de crecimiento de la levadura 443, donde se representa la densidad óptica del cultivo, medida como absorbancia del mismo a 600 nm.

.A continuación, y teniendo en cuenta lo anterior, realizamos el estudio de la inducción del cultivo y su posterior efecto sobre la hidrólisis de nuestros sustratos modelo.

Tras llevar a cabo el cultivo durante 16 horas, se realizó la medida de la densidad óptica del mismo, a fin de conocer la implicación del disacárido adicionado sobre la inducción del crecimiento. La medida se realizó por triplicado, y en la Figura 9 se representan los resultados.

Tal como se puede ver, tan sólo la adicción de celobiosa produce un incremento en el crecimiento celular, cercano en este caso al 20% más con respecto al control. En el resto de los casos, se produce un descenso al 80% con el medio YM diluido, al 90% con la adicción de maltosa, al 85% con sacarosa, y un descenso al 78% en la adicción de lactosa.

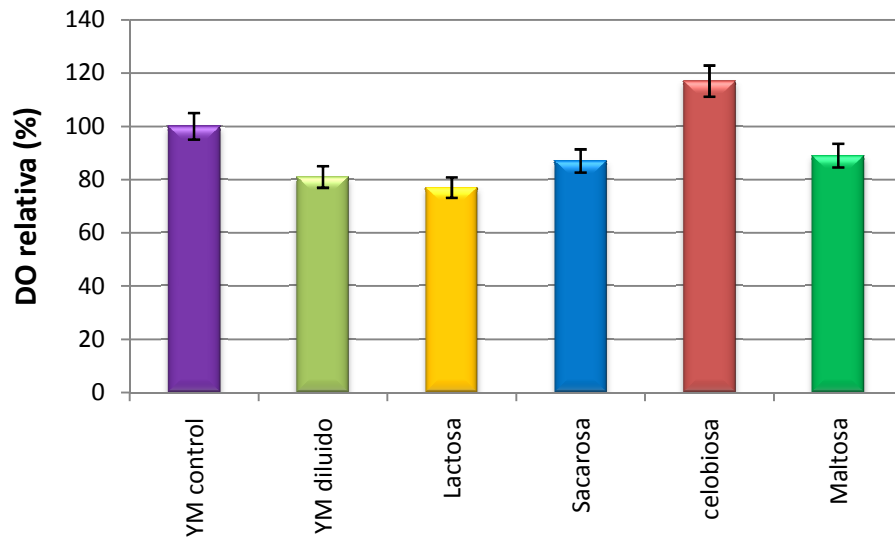


Figura 9. Densidad óptica relativa de los cultivos de 443 tras 16 horas de cultivo.

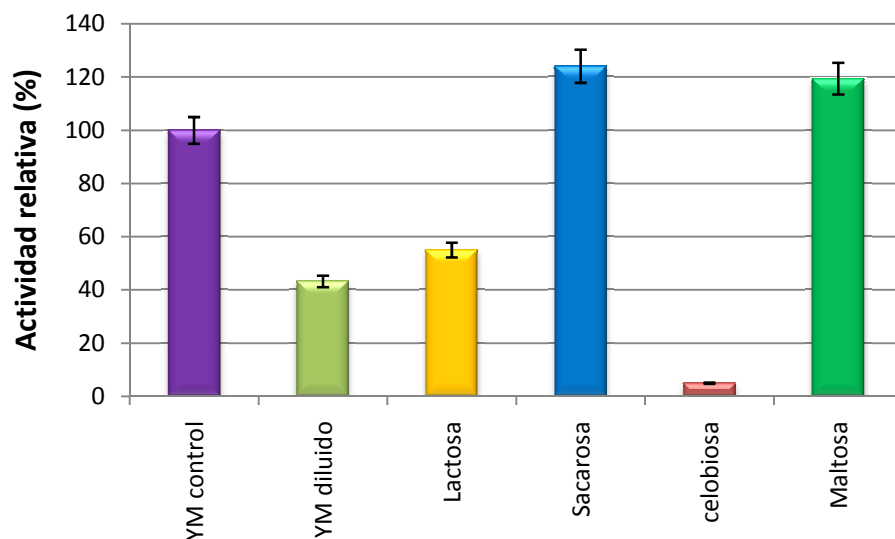


Figura 10. Actividad relativa de los cultivos de 443 tras 16 horas de cultivo.

Por otro lado, se realizó el análisis de la actividad hidrolítica de los cultivos inducidos. Para ello, llevada a cabo la producción por triplicado en presencia de los distintos disacáridos, y lavados los extractos (apartado III.2.4.4), se midió su actividad hidrolítica tal y como se describe en el apartado III.2.3.1.2, cuyos resultados se muestran en la Figura 10. La maltosa y la sacarosa muestran una

actividad ligeramente superior a la del control no inducido, llegando a un incremento del 20% y 25% respectivamente. Sin embargo, lo más significativo es el efecto producido por la presencia de celibiosa, que provoca un descenso muy pronunciado en la expresión de la enzima α -glucosidasa analizada, llevando a un valor de actividad inferior al 10% con respecto al control.

IV.1.1.2.1.1 Reacciones de transglicosidación con células de 443

En la búsqueda de las condiciones óptimas de transglicosilación, lo primero que se llevó a cabo fue la búsqueda del pH óptimo de la hidrólisis.

Para ello, tal como se describe en el apartado III.2.1.4 de Materiales y métodos, se empleó la misma cantidad de células de un cultivo en fase estacionaria crecido en YM, y se llevó a cabo la prueba de actividad hidrolítica (apartado III.2.3.1.1 Materiales y métodos) empleando tampones dentro del siguiente rango de pH 6- 7.5. Los datos obtenidos se muestran en la Figura 11. Tal como se puede observar, el pH óptimo es 7.0, con lo cual, los siguientes ensayos de transglicosilación se realizan a ese pH.

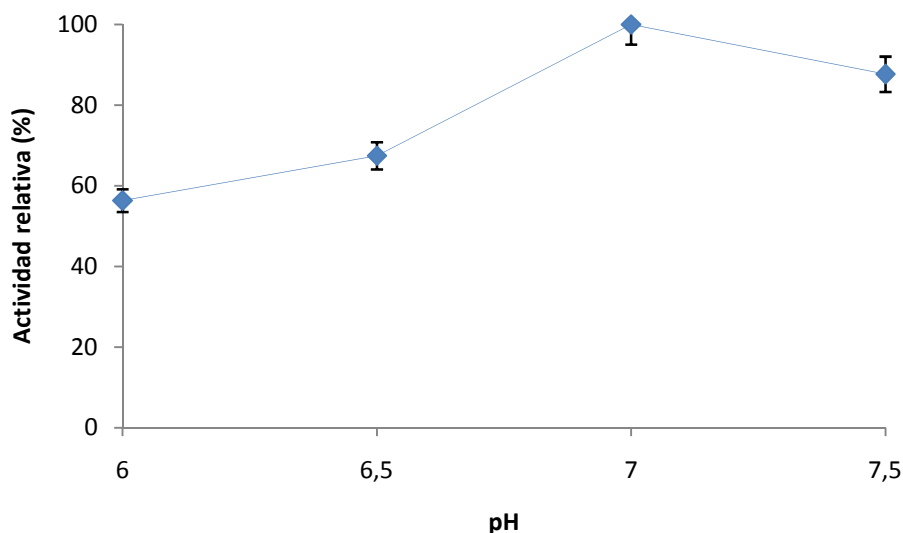


Figura 11. Estudio de pH óptimo para la hidrólisis de α -gluc por la levadura 443.

Empleando cultivos inducidos con sacarosa y maltosa, así como el control YM, que tal como se ha mostrado en la Figura 10 resultarn ser los mejores inductores de la producción de la enzima hidrolítica, se llevan a cabo diversas pruebas en la búsqueda de un aceptor reconocido por la enzima.

Para ello, y tal y como se explica en el apartado III.2.3.2, se procedió a probar distintos aceptores. En todos los casos se utilizó como donador el pNF- α -gluc, y se seleccionaron como posibles sustratos aceptores, Glc, Fruc, Gal, Fuc, Man, GalNac y GlcNac.

En ninguno de los casos se encontró actividad de transglicosilación (resultados no mostrados).

IV.1.1.3. Estudio de la actividad glicosidasa de la cepa *Bacillus circulans USA*

Para poder llevar a cabo un conocimiento profundo de la actividad glicosidasa del mesófilo *Bacillus circulans USA*, nos propusimos llevar a cabo los siguientes estudios:

- Estudio de la cinética de crecimiento microbiano, así como establecer la relación entre ufc/ml y absorbancia para la estandarización de los ensayos posteriores.
- Screening de actividades hidrolíticas, empleando diversos sustratos con pNF como marcador colorimétrico.
- Realizar ensayos de transglicosilación empleando la célula entera, así como calcular el rendimiento de las mismas.
- Inmovilización mediante metodologías de atrapamiento con la célula entera, y comprobar posteriormente su capacidad hidrolítica.

Este abordaje se realiza con el objetivo de poder comparar la actividad de la enzima β -galactosidasa presente en este microorganismo, y que ha sido ampliamente estudiado en nuestro grupo a través de la expresión de la misma mediante un vector

de clonaje y expresión. Así mismo, parte del trabajo descrito en esta tesis se refiere al uso de esa misma enzima purificada mediante el empleo de diversas metodologías de inmovilización.

IV.1.1.3.1. Caracterización del microorganismo: curva de crecimiento, actividad hidrolítica y constantes catalíticas

Para poder llevar a cabo el esquema propuesto anteriormente, lo primero que nos propusimos hacer era conocer la cinética de crecimiento del microorganismo, a fin de poder caracterizar el tiempo necesario de cultivo para alcanzar la fase estacionaria, condición necesaria para los posteriores ensayos de hidrólisis.

Tras la realización del conteo de células por el procedimiento descrito en el apartado III.2.1.3 de materiales y métodos, se estableció la relación entre la absorbancia y la concentración celular. Este dato se empleó para los cálculos necesarios en la elaboración de la posterior curva de crecimiento.

Tal como se describe en el apartado de materiales y métodos III.2.1.3, se llevó a cabo el seguimiento del cultivo durante 50 horas, y se fueron tomando muestras para medir la densidad óptica del mismo, analizada como absorbancia a 600 nm. El resultado se muestra en la Figura 12.

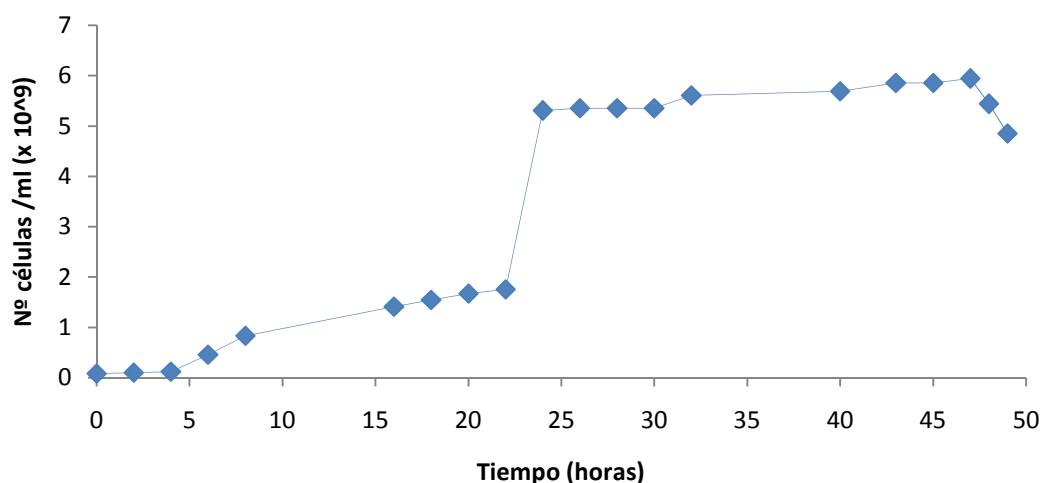


Figura 12. Curva de crecimiento de *Bacillus circulans*. Tal como se puede observar, a las 24 horas de crecimiento el cultivo se encuentra dentro de la fase estacionaria.

A continuación, empleando cultivos en fase estacionaria, y estandarizando en todos los casos con el empleo del mismo número de células, llevamos a cabo el procedimiento descrito en materiales y métodos III.2.3.1.1. Los resultados se muestran en la Tabla 10. Tal como se observa, la actividad hidrolítica predominante en dicho microorganismo es la correspondiente a la β -galactosidasa, objeto de nuestro estudio posterior.

Tabla 10. Resultados del screening de actividades hidrolíticas de *Bacillus circulans USA*.

<i>pNF-</i>	β -Fuc	α -Glu	β -Gal	β -Man	α -Man
BC USA	+	+	++	-	+

Para poder obtener los datos de las constantes catalíticas de la enzima β -galactosidasa objeto de estudio, llevamos a cabo la reacción de hidrólisis descrita en el apartado III.2.1.4 de Materiales y métodos, a diferentes concentraciones de sustrato *pNF*-Gal. Tras medir la absorbancia a 410 nm de la misma, y realizar el cálculo del *pNF* liberado por unidad de tiempo, elaboramos la representación de las dobles inversas o Lineaweaver-Burk para realizar el cálculo de dichas constantes. Los valores obtenidos fueron de un valor de K_m de 1,43 mM y V_{max} 0,012 mM s⁻¹, medidos a 37°C.

IV.1.1.3.2. Estudios de transglicosilación con la célula entera de *Bacillus circulans USA*

De cara a optimizar el posterior proceso de transglicosilación, realizamos una serie de ensayos para encontrar las mejores condiciones de trabajo:

- pH
- Fuerza iónica
- Inducción de la producción enzimática mediante la adicción de disacáridos en el medio de cultivo.

En todos los casos, se llevaron a cabo los ensayos de optimización empleando cultivos en fase estacionaria.

Para comenzar, llevamos a cabo el análisis del pH óptimo, tal como se describe en el III.2.1.4 de Materiales y métodos. Tras la realización de dicho ensayo, encontramos que la mayor actividad se observaba a pH 6.0, por lo cual se tomó ese como el adecuado para las posteriores reacciones de transglicosilación. No obstante, no se encontraron grandes diferencias entre los resultados para los diferentes pH (datos no mostrados).

En la consiguiente búsqueda de la fuerza iónica óptima para el tampón de trabajo en los ensayos de transglicosilación, se realizó el ensayo descrito en el apartado III.2.1.4 de Materiales y métodos, consistente en la realización del ensayo de actividad hidrolítica del cultivo celular (en fase estacionaria, y en todos los casos mediante la estandarización del contenido celular a emplear) en tampónes preparados a diferente concentración de cloruro de sodio, obteniendo un rango de ensayo de entre 0 a 100 mM. En la Figura 13 podemos comprobar como la célula es capaz de trabajar a altas concentraciones salinas, obteniéndose para todos los casos un valor de % actividad relativa superior al control. No obstante, nosotros trabajamos a una concentración de 30 mM para poder extrapolar los datos a los obtenidos con las enzimas puras.

Tal como se aprecia en la figura, el empleo de soluciones tamponadas con una concentración salina de 100 mM nos reportó una actividad relativa superior al 200% comparada con el control de concentración 0 mM. Para el caso de la concentración de 25 mM, encontramos un incremento de la actividad relativa cercano al 160% respecto al control.

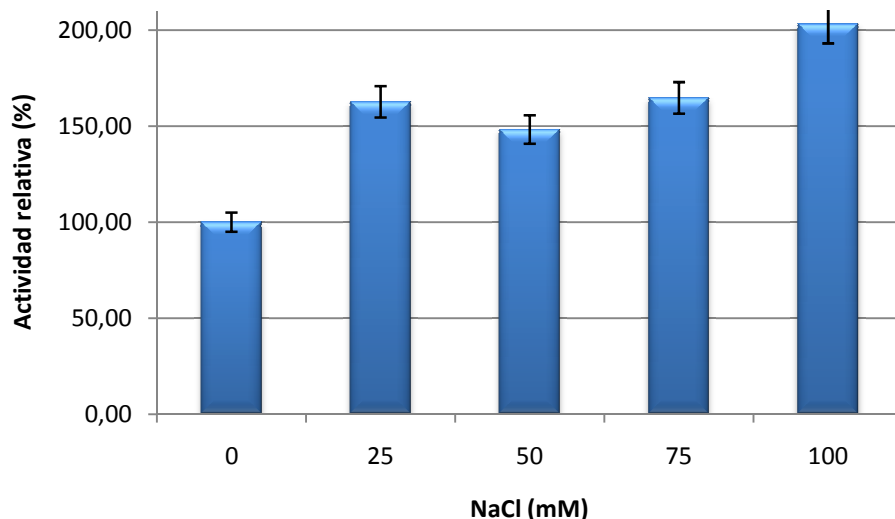


Figura 13. Efecto de la concentración salina sobre la actividad hidrolítica de *Bacillus circulans USA*.

Con la intención de mejorar la producción enzimática, llevamos a cabo la inducción de la expresión e incremento del crecimiento de nuestra bacteria. Para ello, tal como se describe en el apartado III.2.1.4 de Materiales y métodos, y del mismo modo que fue realizado para la levadura 443 anteriormente descrita, llevamos a cabo el cultivo en medios inducidos con celobiosa, maltosa, sacarosa y lactosa.

Por un lado, analizamos la influencia de estos disacáridos sobre la velocidad de crecimiento. Los datos obtenidos se encuentran en la Figura 14. Tal como vemos en la imagen, ninguno de los inductores mejoró la producción celular, si no todo lo contrario. Así mismo, mediante la adición de sacarosa y maltosa se observó la formación de agregados floculares en el cultivo, lo cual impedía la correcta medición, y nos generó unos valores de DO relativa del 25% y 30 % respectivamente. El mejor valor se obtuvo con la adición de celobiosa, con un 63% de DO relativa, aunque en este caso también fue inferior al control.

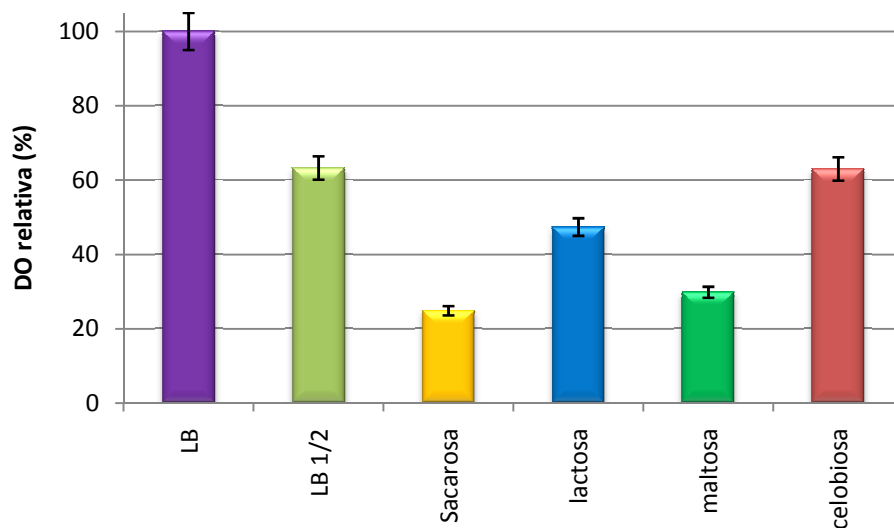


Figura 14. Efecto de la adición de inductores al medio de cultivo sobre la velocidad de crecimiento.

A continuación, valoramos la acción del inductor sobre la expresión y posterior actividad de la enzima β -galactosidasa presente en nuestro cultivo, y objeto de nuestro estudio.

Tal como se describe en el apartado III.2.1.4 de Materiales y métodos, se realizó la medida de la actividad hidrolítica del cultivo, estandarizando en todos los casos mediante el empleo de la misma concentración celular en todos los casos. El resultado se refleja en la Figura 15.

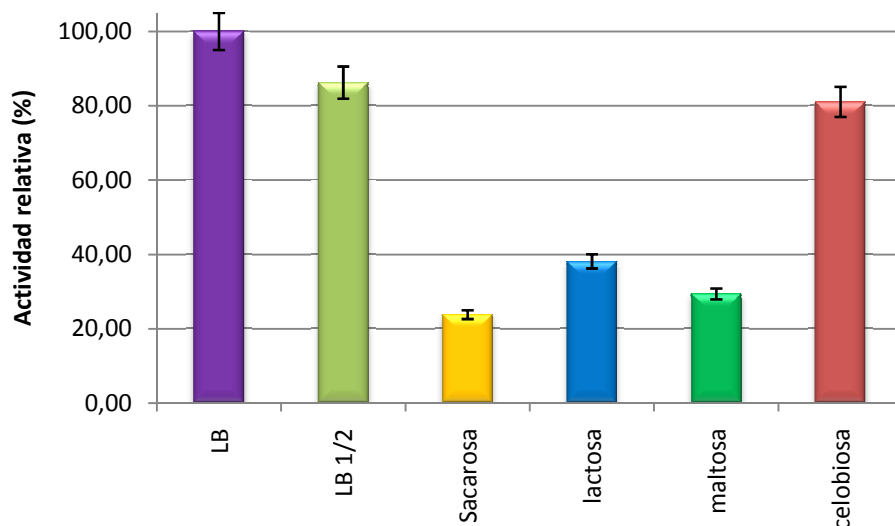


Figura 15. Efecto de la adición de inductores sobre la actividad hidrolítica del cultivo, empleando pNF-Gal como sustrato.

Al observar la Figura 15, referida a la influencia del inductor sobre la actividad hidrolítica del cultivo, vemos un resultado muy similar al anterior. De nuevo, los peores valores son referidos a la maltosa y sacarosa con un 30% y 22% respectivamente, que podría justificarse debido a un problema de difusión del sustrato en el interior de los agregados floculares. En este caso, sin contar el medio de LB diluido que presentó un valor del 85% de actividad relativa, el mejor resultado se obtuvo con la adición de celobiosa, con un valor cercano al 80% de actividad relativa.

Concluimos que ninguno de los disacáridos actuó adecuadamente como inductor, y que resulta más adecuado realizar el cultivo en condiciones estándar de LB.

Por tanto, una vez finalizado este estudio de las condiciones óptimas de producción de microorganismo, así como de las condiciones más adecuadas para la realización de las reacciones de transglicosilación, llevamos a cabo, siguiendo el procedimiento

descrito en el apartado III.2.3.2.1 de Materiales y métodos, las reacciones de transglicosilación.

Para ello, se emplearon los siguientes aceptores: glucosa, manosa, fructosa, galactosa, fucosa, GlucNac y GalNac.

La enzima tan sólo resultó activa en transglicosilación en presencia de GlucNac como aceptor. Esto contrasta claramente con la actividad encontrada por la enzima pura obtenida mediante clonaje, donde reconoce como aceptores tan GlucNac como GalNac.¹⁰⁶⁻¹⁰⁷

El rendimiento de la reacción de transglicosilación, obtenido tras 24 horas de reacción de 37°C fue de un 52%.

En nuestro grupo de investigación ya hemos trabajado con anterioridad con la enzima β - galactosidasa proveniente de *Bacillus circulans*, y conocemos que el producto mayoritario de dicha reacción de transglicosilación se trata del disacárido Gal- β .(1,3)-GlucNac. Para confirmar la posición del enlace de nuestro producto, se realizaron inyecciones en el HPLC de un patrón del mismo, cuya identidad se había previamente confirmado mediante RMN. Estas, confirmaron que se trataba de dicho producto.

Durante la reacción, se tomaron alícuotas de la misma a diferentes tiempos. Tras la inyección de las mismas en el equipo de HPLC, elaboramos una recta de aparición de disacárido, que se muestra en la Figura 16. En ella podemos ver como la aparición del disacárido sigue una tendencia lineal, donde a las 24 horas desconocemos si se ha alcanzado el máximo de producción. Sin embargo, tras llevar a cabo un ensayo de estabilidad del cultivo en el tiempo, pudimos comprobar como a ese tiempo se comienza a producir un descenso significativo de la actividad hidrolítica, lo que conlleva a su vez asociado un descenso en la capacidad de transglicosilación. Por esa

razón, establecimos 24 horas como el tiempo máximo de reacción. Los datos referidos al estudio de estabilidad se muestran en la Figura 17.

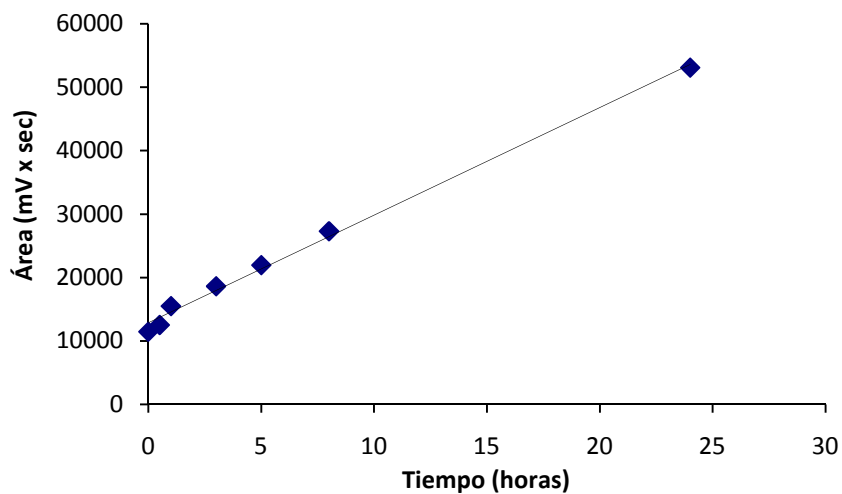


Figura 16. Cinética de aparición del disacárido B-Gal-1,3-GlucNac empleando células de *Bacillus circulans* en fase estacionaria.

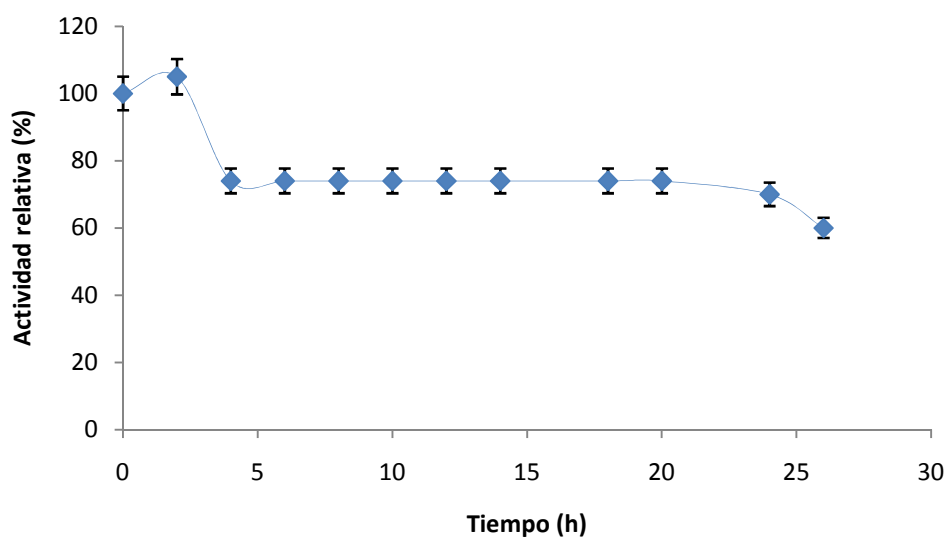


Figura 17. Estabilidad térmica del cultivo de *Bacillus circulans* a 37°C. Los datos se refieren a la actividad hidrolítica retenida en el tiempo.

IV.1.1.3.3. Inmovilización por atrapamiento de la célula entera de *Bacillus circulans* USA

Una vez obtenido el biocatalizador activo en la síntesis de disacáridos, se llevó a cabo la inmovilización del microorganismo completo mediante la técnica de atrapamiento en agar, agarosa y poliacrilamida.

Para ello, y siguiendo el procedimiento descrito en el apartado III.2.5 de materiales y métodos, se realizó la inmovilización en agarosa al 3,5%, agar al 2% y poliacrilamida.

En todos los casos, se empleó la misma cantidad de células a inmovilizar para poder llevar a cabo la correcta estandarización.

En el caso de la agarosa y el agar, se observó hidrólisis de *pNF*-Gal con el inmovilizado. Las placas de agar y agarosa presentaban una consistencia elevada, debido a su entramado, siendo estas últimas más duras que las primeras, debido a que el entramado de la agarosa es mayor y sobre todo más homogéneo.²²⁹

Sin embargo, los bajos datos de hidrólisis obtenidos pueden deberse a un problema de difusión del sustrato al interior de las perlas formadas, así como de la liberación del *pNF* al correspondiente tampón de reacción, hecho que experimentalmente se comprueba por la coloración típica amarilla de *pNF* que adquieren las perlas. Esto a su vez dificulta el proceso de limpieza de las mismas, para su posterior reutilización.

En el caso de la inmovilización en agar, se obtuvo un valor de actividad del 24,9%, y para la inmovilización en agarosa del 25,4%. En ambos casos, el control empleado fueron células libres.

En el caso de la inmovilización empleando poliacrilamida no se pudo llevar a cabo la hidrólisis de *pNF*-Gal dado que el inmovilizado que obteníamos no poseía la consistencia adecuada, y, al intentar llevar a cabo las medidas de actividad, se disolvía el soporte inmovilizado por efecto de la agitación del medio.

IV.2. Capítulo 2: Síntesis de glicoconjugados de interés biológico mediante el empleo de glicosidasas

Tal como se puso de manifiesto en la Introducción de esta Memoria, una de las estrategias enzimáticas empleadas en la síntesis de oligosacáridos de interés biológico consiste en la utilización de glicosidasas.

Para abordar esta tarea, nos propusimos trabajar fundamentalmente con tres fuentes de enzimas glicosidasas: preparado comercial de Biolacta, con actividad β -Galactosidasa, empleado previamente en nuestro grupo de investigación en las tesis doctorales de los Dr Sandoval y Dra Pérez;³⁹⁷⁻³⁹⁸ β -galactosidasa *Bacillus circulans*, de producción propia a partir de la clonación y expresión de la misma en nuestro grupo de investigación, empleada previamente en la tesis doctoral del Dr Bayón;³⁸⁶ α -fucosidasas donadas por el grupo del Prof. Dr. Moracci.

La clonación de la enzima β -Gal-3 de la cepa *Bacillus circulans* ATCC 31382, fue llevada a cabo como parte del trabajo desarrollado por el Dr. Carlos Bayón para el trabajo presentado en su Tesis Doctoral.³⁸⁶

Concretamente, en esta tesis se ha presentado en apartados anteriores (IV.1.1.3) el trabajo desarrollado con esta bacteria, mediante el empleo de la célula entera como biocatalizador.

Esta enzima, de amplio interés, se encuentra implicada en la síntesis de los disacáridos Gal- β (1-3)-GlcNAc y Gal- β (1-3)-GalNAc. Inicialmente descrita por Ito y *col.*,⁹⁰ presenta un gran potencial, tal como ha sido demostrado en estudios anteriores de nuestro grupo, y por ello, nosotros nos propusimos llevar a cabo el desarrollo de procesos de inmovilización en diversos soportes, destacando derivados de glioxil

agarosas, nanofibras de carbono, y, por último, mediante un proceso de multistep enzimático acoplado, inmovilizando sobre soportes fenólicos sintetizados por la peroxidasa extraída de la cascara de soja.

IV.2.1. Síntesis de glicoconjugados catalizada por la β -Galactosidasa comercial de Biolacta

El preparado comercial de la casa Biolacta ha sido empleado con anterioridad por varios investigadores, incluido nuestro propio grupo, para llevar a cabo la síntesis de disacáridos de interés biológico.^{212,297,399-401} Se sabe que esta enzima reconoce al GlcNAc como aceptor¹⁰⁹ y en la mayor parte de estos trabajos se utiliza el preparado comercial de esta enzima.

Para nuestro trabajo, nos propusimos llevar a cabo un proceso de semipurificación del extracto, tratando con ello de separar las diversas fracciones enzimáticas que habían sido analizadas en otros trabajos. Así, se pueden encontrar en la bibliografía la publicación de dos procesos de purificación. En uno de ellos, el proceso se aborda desde sucesivos procesos de cromatografía de exclusión molecular empleando la matriz Sephadex 150 e intercambio iónico.^{91,118} Finalmente, obtienen dos β -galactosidasas a partir del crudo comercial.¹¹⁸ En un trabajo posterior, los autores Vetere y Paoletti¹¹⁹ repitieron la purificación de este preparado dando como resultado el aislamiento de una tercera β -galactosidasa.

En ambos estudios se presentan los resultados del estudio de la actividad hidrolítica de las enzimas purificadas, pero en ninguno de ellos se abordan estudios de transglicosilación. Por ello, nosotros nos propusimos ahondar en este aspecto.

IV.2.1.1. Caracterización y purificaciones de la enzima comercial

Teniendo en cuenta lo indicado en el punto anterior, nos propusimos llevar a cabo en primer lugar la semipurificación de diferentes preparados enzimáticos a partir de la β -galactosidasa Biolacta N° 5 comercial (F_0). El proceso de purificación parcial se hizo siguiendo lo descrito en la bibliografía,¹¹⁸¹¹⁹⁹¹ (III.2.2.3), obteniéndose los siguientes preparados enzimáticos: F_{S1} y F_{S2} , mediante procesos de cromatografía de exclusión molecular y precipitación con sulfato de amonio al 75%.

IV.2.1.1.1. Precipitación fraccionada con sulfato amónico

La precipitación mediante la adición de sulfato amónico es una técnica ampliamente descrita en la bibliografía.⁸¹⁸² Su acción se debe a que el sulfato amónico provoca un aumento de la fuerza iónica del medio, forzando a las proteínas a unirse por sus regiones menos hidrofílicas, formando agregados y precipitando.

Dependiendo de la estructura de las diferentes proteínas presentes en el medio, el aumento gradual de concentración de la sal provoca su precipitación escalonada.

Sin embargo, por estudios previos desarrollados en la tesis del Dr Bayón, conocemos que la presencia de esta sal en el tampón de purificación provoca una inactivación de la actividad hidrolítica de las glicosidasas, impidiendo su detección en el medio de reacción. Por tanto, resulta necesario eliminar el sulfato amónico, bien mediante el empleo de membranas de diálisis o bien mediante tubos de Vivaspin de bajo peso molecular.³⁸⁶

La precipitación de la enzima se hizo conforme a lo descrito en el apartado III.2.2.3.1, empleando un 75% de saturación de sal. Las muestras obtenidas se concentraron y desalinizaron mediante Vivaspin (Sartorius) para su posterior carga en la columna de exclusión molecular. Previamente a ello, se comprobó su actividad hidrolítica (III.2.3.1.2)

IV.2.1.1.2. Aislamiento por cromatografía de exclusión molecular

Tras la precipitación fraccionada con sulfato amónico se llevó a cabo una cromatografía de exclusión por peso molecular, que se basa en la separación de las proteínas a partir de diferencias en su tamaño y volumen en solución. Como fase estacionaria se utilizó Sephadex G-150 superfino, que separa moléculas de una masa comprendida entre 5 y 150 kDa. La muestra obtenida tras la precipitación se aplicó en una columna de Sephadex G-150 superfino equilibrado en tampón fosfato 100 mM, pH 6,00. A continuación, el mismo tampón fue utilizado como fase móvil. Las fracciones eluidas se recogieron y se determinó su absorbancia a 280 nm, así como su actividad frente a *pNF-β-gal* (III.2.2.3.2). El perfil de elución obtenido se representa en la Figura 18.

Las fracciones con actividad β-galactosidasa se reunieron en dos muestras, que comprendían las fracciones 20-23 y 25-28 (**F_{S1}** y **F_{S2}** respectivamente). Las muestras se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y nativas para observar el grado de pureza (apartado III.2.2.2.1). El rendimiento de los distintos pasos de purificación y la electroforesis se muestran agrupados en el apartado en la Tabla 11.

Tabla 11. Rendimientos del proceso de semipurificación de las β-galactosidasas presentes en Biolacta N° 5

Fracción	Proteínas (mg)	Rendimiento (% prot.)	AE (UI/mg)
F ₀	830	100	27,0
F _{S1}	44,9	5,4	32,0
F _{S2}	68,4	8,2	13,5

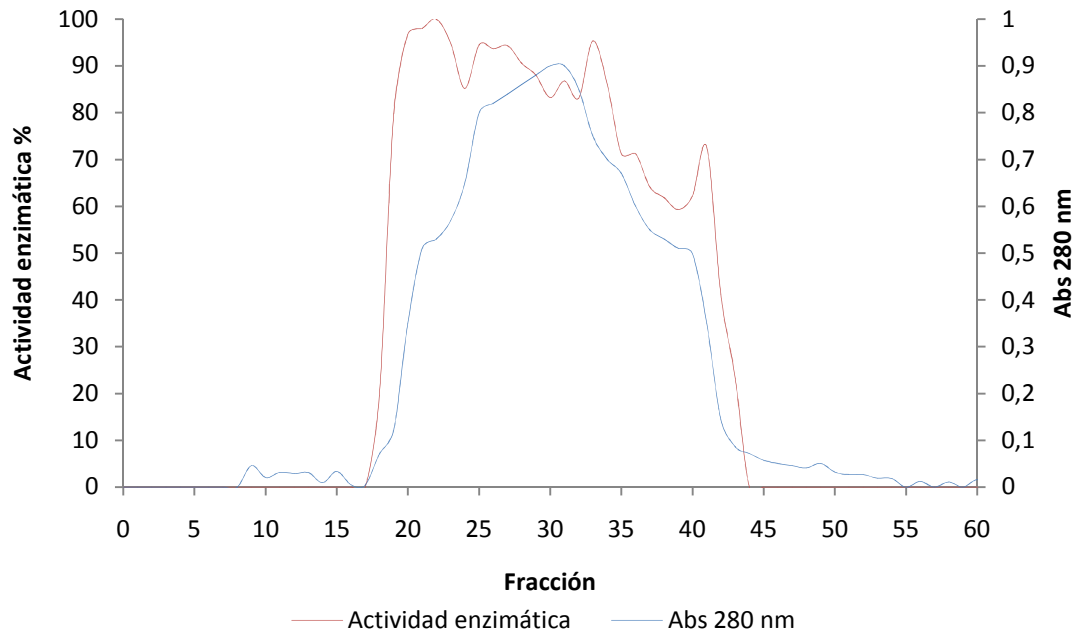


Figura 18. Perfil de elución de la β -galactosidasa de Biolacta en cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-150.

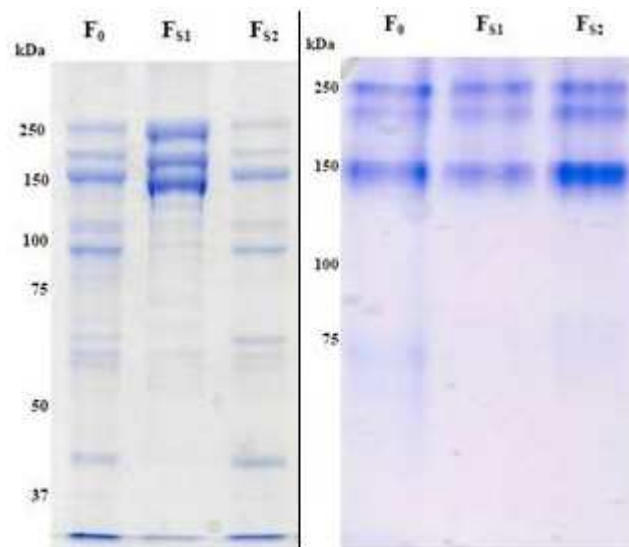


Figura 19. Perfiles de elución en gel de electroforesis (7,5% acrilamida) para proteínas semipurificadas obtenidas de Biolacta en condiciones a) desnaturalizantes; b) no desnaturalizantes. En todos los casos, se emplearon 5 μ g de carga en el pocillo.

Al analizar la Figura 19, correspondiente a la electroforesis en condiciones desnaturalizantes, se observan 3 bandas principales para la fracción F_{S1} . A través de su peso molecular estimado, podemos pensar que, al menos dos de ellas, se encuentran dentro del peso molecular que correspondería con las β -galactosidasas I y II mencionadas en la literatura,^{81,115} cuyos pesos moleculares oscilan entre 240-212 kDa para la primera enzima y 160-145 kDa para la segunda. Este dato puede justificar la mayor actividad hidrolítica encontrada para esta fracción (32,0 UI/mg). Por otra parte, la tercera enzima del preparado comercial con un peso aproximado de 86 kDa desaparece de dicha fracción.

Sin embargo, en los resultados mostrados por la electroforesis en condiciones no desnaturalizantes (Figura 19), observamos como se repite la misma tendencia de conglomerados de proteínas agrupados en tres bandas de alto peso molecular (aproximadamente superior a los 140 kDa) para todas las fracciones. Este hecho podría llevar a pensar que en la preparación comercial utilizada en nuestros ensayos pudiera no estar presente la tercera β -galactosidasa con un peso de 86 kDa descrita inicialmente por Vetere y Paoletti.¹¹⁹ Estos resultados nos inclinan a pensar que quizás esta enzima es en realidad una subunidad de una proteína más grande o bien podría darse la situación de que sea un monómero de un conglomerado de proteínas (por ejemplo un trímero).

IV.2.1.1.3. Síntesis de disacáridos con la β -galactosidasa de Biolacta en medios acuosos tamponados

Como parte del trabajo experimental de la tesis de la Dra Pérez en nuestro grupo de investigación,³⁹⁸ se determinaron las condiciones óptimas para llevar a cabo la síntesis enzimática de disacáridos utilizando la β -galactosidasa de Biolacta. En estos estudios se determinó que el sustrato reconocido por esta enzima como aceptor era el GlcNAc, y en estas condiciones la enzima era capaz de sintetizar mayoritariamente

el isómero β -(1 \rightarrow 4) y en menor proporción el isómero β -(1 \rightarrow 6) (Esquema 4).^{120,297} Para llevar a cabo la reacción se empleó *p*NF- β -Gal como donador (0,17M) y GlcNAc como aceptor (0,85M) según se describe en el punto III.2.3.2.2 y como biocatalizador se emplearon las diferentes fracciones obtenidas de Biolacta. En todos los casos se emplearon 155 unidades enzimáticas, a excepción de la fracción F_{S2}, donde se emplearon 7,2 unidades debido a su baja actividad hidrolítica.

Tabla 12. Resultados obtenidos en reacciones de transglucosidación realizadas con las fracciones derivadas β -galactosidasa comercial de Biolacta en medios acuosos tamponados con fosfato/ citrato de sodio pH 5,00 50 mM.

Fracción	Hidrólisis Gal	Gal β (1 \rightarrow 4)GlcNAc	Gal β (1 \rightarrow 6)GlcNAc	Tiempo de reacción (h)
F ₀	6	93	1	3
F _{S1}	71	--	29	3
F _{S2}	--	99	1	3

Tal como se puede extraer de los datos de la Tabla 12, la fracción F_{S1} mostró una preferencia hacia la hidrólisis. Esta fracción contenía una mayor presencia de proteínas de alto peso molecular en el geles de electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE, Figura 19), pero apenas proteínas menores de 100 kDa, como la III isoenzima mencionada por Vetere y Paoletti¹¹⁹ la cual posee un peso de aproximadamente 86 kDa, por lo que podríamos pensar que las dos primeras isoenzimas corresponderían a proteínas específicamente hidrolíticas.

Los resultados con la fracción semipurificada F_{S2} mostraron una alta regioselectividad, con una clara tendencia a la síntesis del isómero Gal- β (1 \rightarrow 4)-GlcNAc y baja hidrólisis.

En un trabajo desarrollado con la piruvato oxidasa de *Lactobacillus plantarum*⁴⁰² se vinculaba la capacidad sintética a las posibles uniones entre proteínas o subunidades, que mejoraban la actividad de la misma. Pudiera ser que esta tendencia sintética mostrada por la fracción F_{S2}, estuviera relacionada con la presencia de subunidades o

proteínas pequeñas que resultan visibles en el SDS-PAGE (Figura 19) y que están ausentes en la fracción F_{S1}. En ese caso, estas subunidades o enzimas de bajo peso molecular estarían asociadas a un incremento en la actividad catalítica de la enzima hacia la síntesis de disacáridos, pero no así en la hidrólisis.

IV.2.1.1.4. Síntesis de disacáridos con la fracciones semipurificadas de Biolacta en presencia de disolventes verdes

Estudios previos desarrollados por nuestro Grupo de investigación han analizado el papel desarrollado por la presencia de determinados disolventes verdes como co-solventes en las reacciones enzimáticas con Biolacta,^{120,297} demostrando que su adicción genera un cambio en la regioselectividad de la reacción de transglicosilación, favoreciendo el isómero $\beta(1\rightarrow6)$. Estos disolventes verdes, en su mayoría obtenidos a partir de subproductos de la industria (como el glicerol) y de biomasa (como los derivados de la *N,N*-dimetilamida) han sido valorados para establecer la concentración óptima, obteniendo un valor de 2 M.^{120,297} Las estructuras de los disolventes empleados en estos estudios, así como un resumen de los resultados obtenidos se muestran a continuación en el Esquema 12 y Tabla 7, que se encuentran en el apartado III.2.3.2.3 de Materiales y métodos.

Tabla 13. Rendimientos de transglicosidación obtenidos con los distintos disolventes derivados del glicerol de cadena abierta con las β -galactosidasa de Biolacta.

Medio	Gal (%)	Gal- $\beta(1\rightarrow4)$ GlcNAc (%)	Gal β -(1 \rightarrow 6)GlcNAc (%)
Tampón	-	84	17
Glicerol	35	14	9
GC4	-	15	85
GC5	-	23	77
GC6	-	13	87
GC7	-	-	93
GC8	-	-	100

GC9	79	-	21
GC10	-	17	83
GC11	-	-	92
GC12	-	21	71

Valores tomados de García y *col.*³¹⁵

Asímismo, los disolventes de derivados cíclicos del glicerol y derivados de la *N,N*-dimetilamida (Esquema 12) se han probado en la síntesis de disacáridos con las β -galactosidasas de Biolacta. Los efectos de éstos disolventes sobre la regioselectividad de la enzima han seguido una tendencia similar, favoreciendo la formación del disacárido con enlaces $\beta(1\rightarrow6)$ y disminuyendo los porcentajes de disacárido con enlaces $\beta(1\rightarrow4)$. Estos resultados de estudios se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. Porcentajes de los rendimientos en las reacciones de transglucosidación obtenidos con la β -galactosidasa de Biolacta en tampón citrato/fosfato 50 mM a pH 5.0 y 2 M de disolvente verde en dicho tampón.

Disolvente	Gal (%)	Gal β -(1 \rightarrow 4)GlcNAc (%)	Gal β -(1 \rightarrow 6)GlcNAc (%)
Tampón	-	83	17
G1	-	9	91
G2	81	13	7
G3	-	29	71
DMA1	-	9	91
DMA2	-	83	12
DMA3	-	24	75

Así, siguiendo la metodología descrita en el punto III.2.3.2.2, se llevó a cabo la síntesis de disacáridos utilizando como catalizadores las fracciones semipurificadas de Biolacta: F_{S1} y F_{S2} en presencia de disolventes verdes a una concentración 2M de cada uno de éstos. Los disolventes seleccionados fueron: **G1**, **GC7**, **GC8** y **GC11**,

así como tampón a modo de control. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 15.

Tabla 15. Resultados obtenidos en reacciones de transglicosidación (%) empleando las fracciones semipurificadas (F_{S1} y F_{S2}), obtenidas de Biolacta N° 5 en medios 2M en disolventes verdes y tamponados con fosfato/ citrato de sodio pH 5,0, 50 mM. Todas las reacciones se realizaron a un tiempo final de 3 horas.

Fracción	Medio	Hidrólisis	Gal β (1→4)GlcNAc	Gal β (1→6)GlcNAc %
		Gal	%	
F_{S1}	Tampón	100	0	0
F_{S1}	G1	100	0	0
F_{S1}	GC7	100	0	0
F_{S1}	GC8	100	0	0
F_{S1}	GC11	100	0	0
F_{S2}	Tampón	0	100	0
F_{S2}	G1	3	80	17
F_{S2}	GC7	1	89	10
F_{S2}	GC8	3	69	28
F_{S2}	GC11	3	69	28

Analizando en profundidad la Tabla 15, encontramos como la fracción F_{S1} muestra una clara tendencia a la realización de la hidrólisis en exclusiva, la cual no se modifica con la presencia de disolventes verdes. Por otra parte, la fracción F_{S2} mostró una baja tendencia a hidrolizar, hecho confirmado en la reacción efectuada en tampón, donde se obtiene un 100% de área para el isómero β (1→4). Estos resultados pueden sugerir que podrían ser las proteínas de bajo peso molecular (o subunidades proteicas de otras) las implicadas en la actividad sintética.

La presencia de co-solventes modificó parcialmente los rendimientos de transglicosilación con un incremento cercano al 20% del isómero β (1→6). Esto podría llevarnos a pensar que serían algunas de las proteínas presentes en esta fracción y no en la otra las implicadas en el cambio de regioselectividad.

A continuación, nos propusimos analizar la influencia de los disolventes derivados de los disolventes del grupo de las *N,N*-dimetilamidas. En el estudio previo resumido en la Tabla 15, se puede observar como los mejores resultados se obtuvieron con DMA1 como co-solvente. Las reacciones se realizaron a 3 horas.

Por tanto, siguiendo el protocolo descrito en el apartado III.2.3.2.3 se llevaron a cabo las reacciones con los derivados de *N,N*-dimetilamidas como co-solventes, a una concentración de 2 M, empleando las dos fracciones semipurificadas de Biolacta. En la tabla se presentan los resultados al tiempo final.

Tal como podemos observar en la Tabla 16, la presencia de DMA1 como co-solvente derivados de glicerol, donde la fracción F_{S1} mantiene su actividad altamente hidrolítica, mientras que la fracción F_{S2} muestra una tendencia hacia la síntesis del isómero $\beta(1\rightarrow4)$ sin ser afectada por los disolventes verdes. Este fenómeno podría corroborar lo indicado anteriormente, donde el cambio de regioselectividad podría ser específico para una determinada fracción de enzimas (probablemente una enzima en específico), y que debido al proceso de purificación hubiera sido eliminada del preparado crudo original.

Tabla 16. Resultados obtenidos en reacciones de transglucosidación (%) realizadas con 9 unidades enzimáticas de las fracciones semipurificadas (F_{S1} y F_{S2}) obtenidas de Biolacta N° 5 en medios 2M en DMA1 tamponado con fosfato/ citrato de sodio pH 5,0, 50 mM.

Fracción	Medio	Hidrólisis Gal	Gal $\beta(1\rightarrow4)$ GlcNAc	Gal $\beta(1\rightarrow6)$ GlcNAc
F_{S1}	Tampón	100	0	0
F_{S1}	DMA1	100	0	0
F_{S2}	Tampón	0	100	0
F_{S2}	DMA1	1	81	18

IV.2.2. Producción y purificación de la β -Gal-3 de *B. circulans* ATCC 31382

La enzima β -Gal-3 fue clonada por el Dr Bayón como parte de su trabajo de tesis doctoral. Durante dicho trabajo, se llevó a cabo la clonación del gen en el plásmido pET28b (+). Este plásmido fue posteriormente introducido en bacterias de *E. coli* BL21, cepa especializada en la producción de proteínas recombinantes. La proteína expresada fue denominada β -Gal-3-NTag, al poseer anclado en el extremo N-terminal una cola de histidinas para facilitar el posterior proceso de purificación. No obstante, en este trabajo se denominará de modo abreviado como β -Gal-3.

Así, durante el trabajo de la presente tesis, se llevó a cabo el proceso de producción descrito en el apartado (apartado III.2.1.5), rotura de células (apartado III.2.1.6) y purificación por colas de histidina en columna de níquel (II) (apartado III.2.2.4). En la Figura 20 se muestra un perfil típico de purificación de la enzima β -Gal-3.

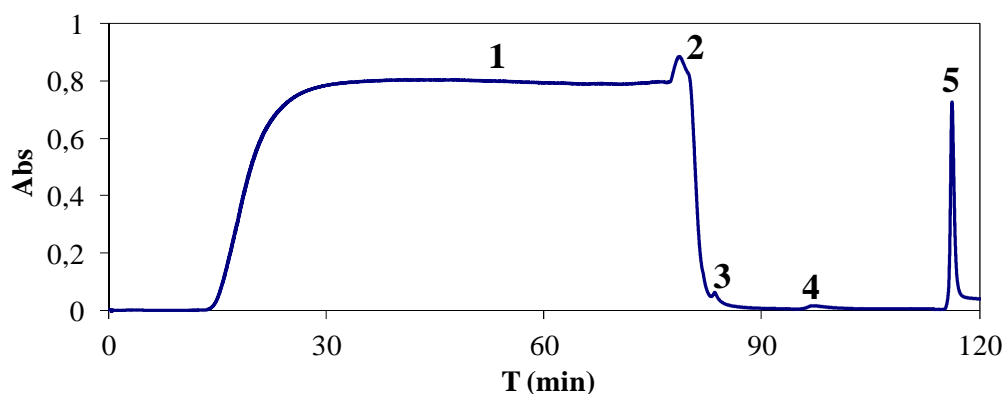


Figura 20. Perfil de purificación de la enzima β -Gal-3-NTag. **1)** Proteínas no unidas a la columna. **2)** Proteínas no unidas debido a la saturación de la columna. **3)** Proteínas unidas por unión inespecífica eluidas con el tampón de adhesión. **4)** Proteínas unidas por unión inespecífica eluidas con el tampón de lavado. **5)** Enzima β -Gal-3-Ntag eluida con el tampón de elución.

Una vez purificada la enzima se midió su concentración por el método de Bradford (apartado III.2.2.1) y se realizó un gel SDS-PAGE para comprobar su pureza (apartado III.2.2.2.1). Como se puede observar en la Figura 21, la banda del carril 3, correspondiente a la enzima β -Gal-3 purificada, presenta un alto grado de pureza.

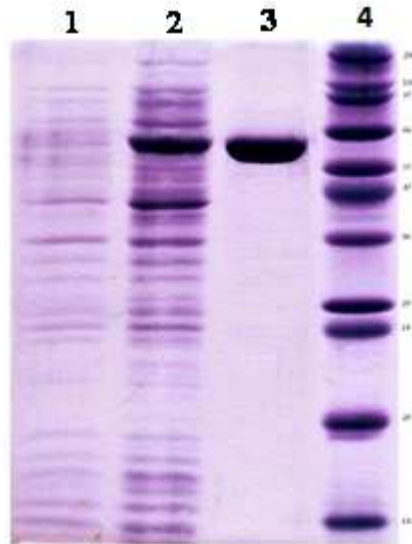


Figura 21. Gel SDS-PAGE de la purificación de β -Gal-3-NTag y β -Gal-3-CTag. **1)** Extracto celular sin inducir con IPTG. **2)** Extracto celular inducido con IPTG. **3)** β -Gal-3 purificada. **4)** Patrones de peso molecular.

IV.2.3. Inmovilización de la enzima β -Gal-3 de *B. circulans* ATCC 31382

Como se explicó en el apartado I.2.2 de la Introducción de esta Memoria, la inmovilización de enzimas supone importantes ventajas como la mejora de la estabilidad o la posibilidad de reutilizar el biocatalizador, ya que se puede separar fácilmente de la mezcla de reacción, lo que además previene la contaminación por proteínas en el producto final.¹⁷⁹

Por ello se desarrolló un proceso de inmovilización para la enzima β -Gal-3 de *B. circulans* ATCC 31382 utilizando tres estrategias:

1. Inmovilización sobre polímeros de glioxil agarosas facilitados por el grupo del Prof. Dr. Guisán, perteneciente al Instituto de Catálisis y Petroleoquímica del CSIC.
2. Inmovilización sobre nanofibras de carbono, facilitadas por el grupo del Prof. Dr. Rubio, del Instituto de Cerámica y Vidrio, CSIC.
3. Inmovilización sobre polímeros fenólicos, sintetizados enzimáticamente por el Prof. Dr. Levin, del Centro de Investigación y Transferencia de Entre Ríos (CITER) CONICET- UNER., Argentina, como parte de su estancia Postdoctoral en nuestro grupo de Investigación.

Los resultados obtenidos en cada uno de estos experimentos se detallan a continuación.

IV.2.3.1. Inmovilización de β -Gal-3 de *B. circulans* ATCC 31382 en glioxil agarosas

En trabajos anteriores desarrollados por nuestro grupo, ya se habían llevado a cabo procesos de inmovilización sobre soportes glioxil agarosa. Concretamente, la enzima β -Gal-3 había sido inmovilizada sobre uno de los tipos disponibles de este soporte, con grandes resultados. El soporte glioxil agarosa²¹² se trata de un polímero funcionalizado con grupos aldehído, el cual puede ser así mismo modificado posteriormente, dando lugar a un abanico de posibles funcionalizaciones, tal como se ha descrito en la introducción de este trabajo. Para este trabajo, se emplearon las siguientes agarosas: en forma de glioxil agarosa; funcionalizada con cationes metálicos y níquel, que denominaremos IDA-Ni²⁺; en forma aniónica a través del empleo de ácido iminodiacético, que llamaremos IDA; y, finalmente, en forma catiónica a través del empleo de trietilamina, que denominaremos TEA.

IV.2.3.1.1. Estabilización de la enzima en medios alcalinos (pH 10)

Como parte del trabajo Fin de Máster de Sergio Navarrete, y en colaboración con el trabajo desarrollado por el Dr Bayón para su Tesis Doctoral, se llevó a cabo un estudio para la optimización de la estabilización de la enzima mediante la adición de un 50% de polietilenglicol-600 (PEG-600) en el tampón de inmovilización al trabajar con el polímero de glioxil agarosa. Este compuesto se caracteriza por crear múltiples puentes de hidrógeno con las proteínas, lo que evita posibles cambios conformacionales.^{404 405 406 407} Partiendo de las condiciones óptimas descritas en dichos trabajos (pH, concentración del agente estabilizante, carga enzimática y tiempo de contacto), se llevó a cabo el proceso de inmovilización en el resto de soportes, empleando la glioxil agarosa tradicional como control del proceso.

El proceso de inmovilización y cálculo del rendimiento de la misma (% de enzima inmovilizada y % de actividad retenida por el complejo inmovilizado) se llevó a cabo conforme a lo descrito en el apartado III.2.6.3 de materiales y métodos. El resumen de resultados de los 4 soportes derivados de agarosas se presenta en la Tabla 17.

Tabla 17. Resultados obtenidos para la inmovilización de β -Gal-3 en diferentes soportes de agarosas modificadas.

Soporte	Enzima inmovilizada (%)	Carga enzimática (mg soporte)	Actividad enzimática	
			UI/mg	(%)
Enzima libre	-	-	6,2	100
Agarosa glioxil	100	0,5	5,27	85
TEA	100	0,5	3,3	53
IDA	60	0,5	0,17	2,7
IDA- Ni²⁺	100	0,5	0,06	0,96

Tal como se puede observar en la Tabla 17, tan sólo se obtuvieron resultados positivos de retención de actividad en el caso del empleo de glioxil agarosa sin modificar y de TEA, destacando el primero.

Sin embargo, dado que el trabajo con el soporte de glioxil agarosa tradicional ya había sido previamente desarrollado por nuestro grupo, decidimos continuar explorando la actividad y características del complejo obtenido mediante el empleo de TEA como soporte de inmovilización.

IV.2.3.1.2. Influencia del pH en la actividad de la enzima β -Gal-3 inmovilizada

En la bibliografía encontramos ejemplos de cómo un gran número de las enzimas modifican su intervalo de pH de trabajo cuando se inmovilizan al variar el microentorno de la proteína.⁴⁰⁸⁻⁴⁰⁹ En la búsqueda de las condiciones óptimas para llevar a cabo reacciones con la enzima β -Gal-3 inmovilizada en soportes de glioxil agarosa-TEA, se procedió al cálculo de su pH óptimo, siguiendo el protocolo descrito en el apartado III.2.6.5. Para ello se realizó la reacción de hidrólisis utilizando *p*NF- β -Gal en distintas condiciones de pH por el método discontinuo. En la Figura 22 se muestran los resultados junto con los obtenidos previamente para la enzima libre y con la inmovilización en glioxil agarosa tradicional. La diferencia fundamental que se puede encontrar es que en el caso de emplear TEA como soporte, el máximo de actividad se desplaza a pH 7, al contrario que ocurre con el otro soporte y con la enzima libre, donde en ambos casos se mantiene en un valor de pH 6. Así mismo, se ve una tendencia de mejora en la actividad a pH básicos con los complejos inmovilizados. Estos valores indican un aumento en la estabilidad de la enzima inmovilizada a pHs básicos.

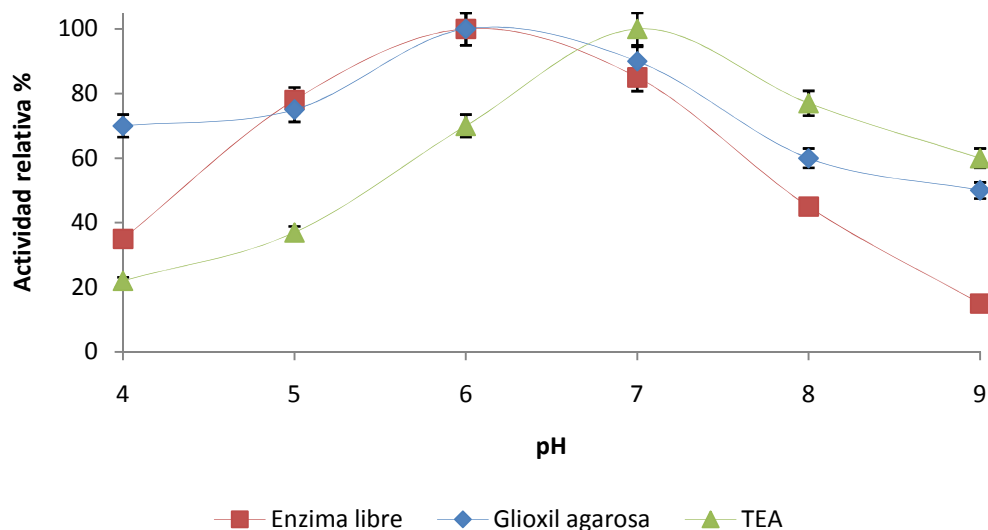


Figura 22. Efecto del pH en la actividad de la enzima β -Gal-3 libre e inmovilizada sobre glioxil agarosa sobre el sustrato p NF- β -Gal e 5 mM a 37 °C. El pH se ajustó con tampones citrato/fosfato de sodio, Tris-HCl y fosfato de sodio 50 mM. Las actividades están referidas en términos relativos al valor máximo determinado en cada caso, normalizando para cada tipo de inmovilización.

IV.2.3.1.3. Estabilidad térmica de la enzima β -Gal-3 inmovilizada

Para estudiar el efecto de la temperatura sobre la β -Gal-3 inmovilizada sobre glioxil agarosa, se incubó la enzima inmovilizada en los dos soportes, así como la enzima libre a 37°C y a 50 °C, siguiendo el protocolo del apartado III.2.6.8. Se midió su actividad a 1, 3, 12 y 24 h, obteniéndose los resultados de la Figura 23 y Figura 24. Como se puede observar, a 37 °C, tanto la enzima inmovilizada como la libre conservan una actividad próxima al 85% en glioxil agarosa, y al 70% en TEA una vez transcurridas 24 h. Las diferencias son más representativas a 50 °C, temperatura a la cual la enzima libre pierde rápidamente su actividad, quedando por debajo del 50 % a las 3 h. Sin embargo, la enzima inmovilizada mantiene su actividad durante más tiempo, conservando el 46% a las 24 h en glioxil agarosa y un 64% en TEA, tiempo en el que la enzima libre estaba completamente inactivada. Estos resultados ponen de manifiesto como el proceso de inmovilización en soportes derivados de glioxil

agarosa mejora notablemente la termoestabilidad de la enzima β -Gal-3. Si a esto unimos el hecho de que se produce una apertura hacia condiciones de trabajo de pH más extremos, nos lleva a proponer este biocatalizador como un modelo muy versátil de trabajo.

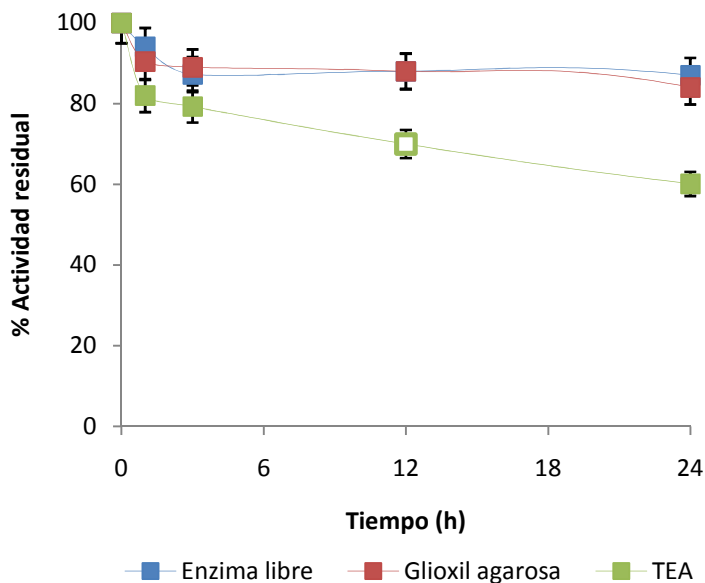


Figura 23. Estabilidad térmica de la enzima β -Gal-3 libre e inmovilizada incubada en tampón fosfato de sodio 50 mM pH 6,00 a 37° durante 24 h.

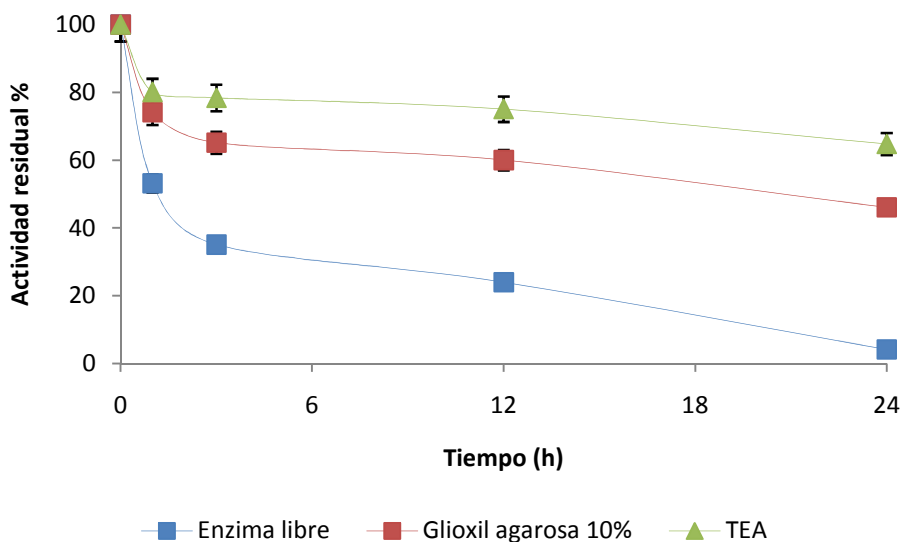


Figura 24. Estabilidad térmica de la enzima β -Gal-3 libre e inmovilizada incubada en tampón fosfato de sodio 50 mM pH 6,00 a 50° durante 24 h.

IV.2.3.1.4. Síntesis de disacáridos catalizada por β -Gal-3 inmovilizada en glioxil agarosa

Una vez conocidas las condiciones óptimas para llevar a cabo las reacciones de transglucosilación empleando los derivados inmovilizados, se llevó a cabo el estudio siguiendo el protocolo del apartado correspondiente de materiales y métodos, III. 2.6.3. Se realizaron las reacciones utilizando como aceptores GlcNAc y GalNac, en presencia de sólo tampón fosfato de sodio, 50 mM, pH 7 (que había mostrado mayor actividad en nuestros estudios), y con disolventes sostenibles como co-solventes. La elección de los co-solventes se basó en los estudios previos realizados en el grupo con la enzima libre. En ellos, encontramos que el derivado de biomasa **DMA1** y el líquido iónico **[Bmim][PF₆]**, generaron los mejores resultados.³⁸⁶ Los resultados obtenidos en nuestro estudio, empleando los inmovilizados de β -Gal-3 en TEA se muestran en la Figura 25.

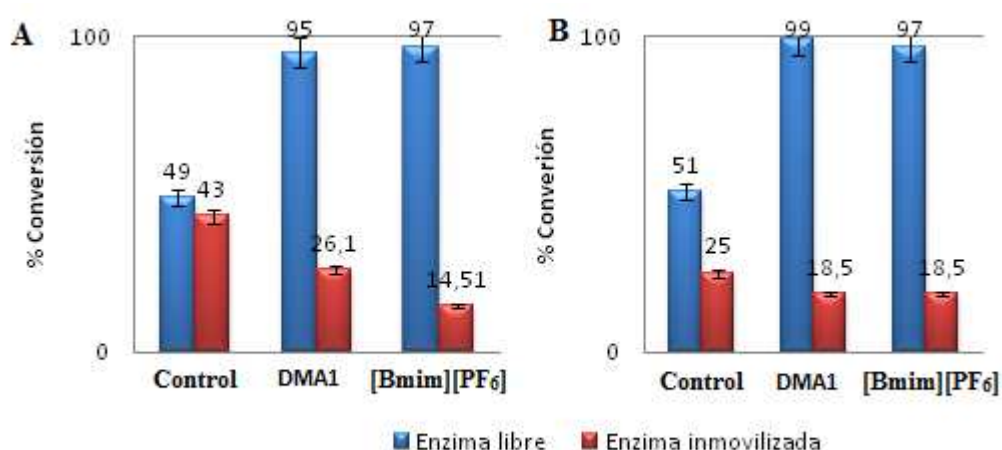


Figura 25. Rendimientos de la reacción de transglucosidación con la enzima β -Gal-3 libre e inmovilizada utilizando *p*NF-gal como donador y como aceptor, en **A)** GalNac y en **B)** GlcNAc.

Como se puede observar, en la reacción control con tampón, se obtuvo un resultado del 25% de Gal- β (1-3)-GlcNAc con el inmovilizado, frente al 51% de la enzima

libre. En la síntesis de Gal- β (1-3)-GalNAc se obtuvo un 43% de rendimiento con la enzima inmovilizada, frente al 49% de la enzima libre. La disminución de rendimiento es mayor en el caso de las reacciones con **DMA1**, puesto que se pasó de un rendimiento del 99% con la enzima libre a un 18,5% con la enzima inmovilizada en la síntesis de Gal- β (1-3)-GlcNAc, y de un 95% en la síntesis de Gal- β (1-3)-GalNAc con la enzima libre a un 26,1% con la enzima inmovilizada. Los peores resultados se produjeron con el LI **[Bmim][PF₆]**, con el que la síntesis de Gal- β (1-3)-GlcNAc con la enzima libre y con la enzima inmovilizada pasó de un 97 a un 18,5% respectivamente, y la síntesis de Gal- β (1-3)-GalNAc disminuyó de un 97 a un 14,51%.

En la bibliografía existen ejemplos de inmovilización de la enzima β -Gal-3 de *B. circulans* ATCC 31382 en CNBr-sefarosa, donde se había llevado a cabo un estudio de la capacidad sintética del complejo inmovilizado, empleando en ese casos *p*NF-gal como donador y benzil- α -D-GalNAc y metil- α -D-GalNAc como aceptores en presencia de DMF, con los que obtuvieron un rendimiento del 62 y del 53% respectivamente.²⁴³ Este rendimiento fue mayor que el que se obtuvo en nuestros estudios en la reacción con solo tampón o con **DMA1** o **[Bmim][PF₆]** como co-solvente, en la reacción con la enzima inmovilizada en glioxil agarosa. Guisan y *col.* compararon la inmovilización de la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* en CNBr-sefarosa y en glioxil agarosa.⁴¹⁰ Estos autores, al igual que en nuestro caso, obtienen menor actividad con el soporte de glioxil agarosa, pero sin embargo, al igual que en nuestros estudios, observan un incremento en la estabilización de la enzima. Para justificar este resultado, los autores exponen que en el sistema de inmovilización en glioxil agarosa se trata de un sistema covalente multipuntual, frente al soporte CNBr-sefarosa, que inmoviliza a la enzima por un solo punto de unión, lo que permite que la enzima se comporte de una manera similar a la enzima libre. Así, aunque la inmovilización multipuntual aumentará la rigidez de la enzima, esto conllevará a su vez un incremento en la estabilidad, aunque a su vez suele implicar un descenso de actividad.⁴¹¹

Así, lo descrito por estos autores se corresponde con lo encontrado en nuestros resultados, ya que al inmovilizar la β -gal-3 se perdió parte de la actividad comparada con la enzima libre, pero se aumentó la estabilidad frente al pH y la temperatura (apartados IV.2.3.1.2 y IV.2.3.1.3).

Así, a pesar de haber encontrado rendimientos menores con la enzima inmovilizada comparada con la enzima libre, debemos poner de manifiesto que el principal beneficio que confiere el hecho de inmovilizar un biocatalizador es su posibilidad de ser reutilizado repetidas veces dado su incremento en la estabilidad enzimática. Así, al poder ser reutilizado, se podría considerar compensado el hecho de la pérdida de rendimiento.

IV.2.3.1.5. Reutilización de la β -Gal-3 de *B. circulans* ATCC 31382 en glioxil agarosa

Así, siguiendo lo comentado en el punto anterior, nos propusimos estudiar la posibilidad de reutilizar el inmovilizado enzimático en glioxil agarosa.

Para ello, se llevaron a cabo las reacciones de transglicosilación descritas en el apartado III.2.3.2.2. Para ello, empleamos GlcNac como aceptor modelo, fundamentalmente debido a su menor coste. La evaluación de la reutilización se llevó a cabo conforme lo descrito en el III.2.6.10, mediante el empleo de los siguientes medios de reacción: de sólo tampón fosfato de sodio 50 mM pH 7.0; con **DMA1** como co-solvente; y con el LI **[Bmim][PF₆]**.

Como se puede ver en los resultados (mostrados en la Figura 26), las enzimas fueron sufriendo una desactivación brusca en todos los casos con el primer reuso, que termina por estabilizarse en el siguiente reuso. En ninguno de los casos la enzima mantuvo buenos resultados de actividad sintética, lo cual podría ser atribuido a un problema por la metodología empleada, puesto que al realizarse reacciones de 3 horas, el inmovilizado permanece mucho tiempo en uso, con cambios de

temperatura, pasando de 37°C de reacción, a 4°C en el almacenaje entre los reusos. Esto podría perjudicar a la estabilidad de la enzima, justificando parcialmente el resultado.

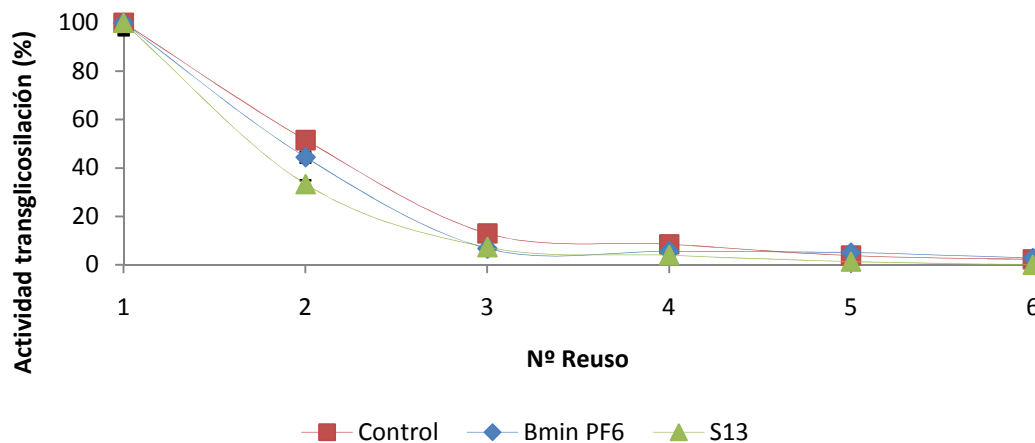


Figura 26. Reutilización de la enzima β -Gal-3 de *B. circulans* ATCC 31382 en reacciones de transglucosilación utilizando como aceptor GlcNAc en sólo tampón o en presencia de DMA1 o [Bmim][PF₆] como co-solventes.

Por último, decir que, debido a que el [Bmim][PF₆] se puede separar de la mezcla de reacción, así como del soporte, este co-solvente puede ser reutilizado en todas las reacciones que se lleven a cabo con la enzima inmovilizada, aumentando la sostenibilidad del proceso.

IV.2.3.2. Inmovilización de β -Gal-3 de *B. circulans* ATCC 31382 en nanofibras de carbono

Continuando con el estudio de inmovilización enzimática, se llevó a cabo la inmovilización de la enzima β -Gal-3 de *B. circulans* ATCC 31382 sobre diferentes nanofibras de carbono funcionalizados con grupos amino o carboxilo.

El proceso se puso a punto previamente mediante la modificación de diferentes parámetros tales como: tiempo de contacto, pH de inmovilización, pre-tratamiento de las nanofibras con isopropanol, etc. El desarrollo del proceso de inmovilización se monitorizó midiendo la cantidad de proteína inmovilizada a diferentes tiempos. Para ello se utilizó la metodología del procedimiento experimental descrito en el apartado III.2.6.1.

En el presente trabajo se realizaron ensayos empleando dos tipos de nanofibras: i) funcionalizadas con grupos carboxilo; ii) funcionalizadas con grupos amino. Sin embargo, en el caso del empleo de las nanofibras funcionalizadas con grupos amino no se obtuvo actividad (datos no mostrados). Por tanto, a continuación, siempre que indiquemos nanofibras nos estaremos refiriendo en exclusiva a los soportes funcionalizados con grupos carboxilos.

Los resultados de los ensayos de puesta a punto se describen en la Tabla 18.

Tabla 18. Resultados de la inmovilización de β -Gal-3 y actividad enzimática sobre soportes nanofibras de carbono. (Pretratamiento con isopropanol).

Condiciones de inmovilización	Enzima inmovilizada (%)	Carga ^a	Actividad enzimática	
			UI/mg	(%)
Enzima libre	-	-	27,94	100
pH 6,2 5 horas contacto, pretratamiento	74,9	10	6,69	24
pH 6,2 5 horas contacto, no pretratamiento	67,9	10	15,46	55,3
pH 6,2 17 horas contacto, pretratamiento	100	10	1,05	3,8
pH 6,2 17 horas contacto, no pretratamiento	100	10	5,40	19,3
pH 6,2 24 horas contacto, pretratamiento	100	10	1,48	5,3
pH 6,2 24 horas contacto, no pretratamiento	100	10	0,03	0,1
pH 7,5 17 horas contacto, pretratamiento	100	10	2,6	9,3
pH 7,5 17 horas contacto, no pretratamiento	100	10	2,9	10,4

^a: mg enzima/g soporte

Al analizar la Tabla 18 encontramos un resumen de los resultados obtenidos empleando la nanofibra funcionalizada con grupos carboxilo. Como puede

observarse en dicha tabla, los resultados obtenidos con las distintas condiciones han sido muy diversos, obteniéndose los mejores porcentajes de inmovilización con el pH 6,2, a menor tiempo de contacto (5 horas), y con las nanofibras sin pretratar con isopropanol, obteniéndose un valor de actividad enzimática retenida del 55,3%. A pesar de obtener en este caso el menor grado de enzima inmovilizada con un 15,5%, esto se ve claramente compensado por una mejor actividad del complejo formado por la nanofibra y la enzima. Sin embargo, en todos los casos encontramos una disminución de la actividad con respecto a la enzima libre.

Esta inactivación, originada por el proceso de inmovilización, puede ser debida a la modificación de la estructura terciaria activa de la enzima, causada por la inmovilización de la enzima por diversos residuos (lisina, cisteína ó histidina) del centro activo de la enzima ó próximos a él. También puede ser debido a la naturaleza de los soportes.

Así mismo, debemos considerar cómo las nanofibras de carbono presentan una alta hidrofobicidad, resultando en un entorno poco favorable para la actividad de las glicosidasas, de naturaleza hidrofílica.

IV.2.3.2.1. Influencia del pH en la actividad de la enzima β -Gal-3 inmovilizada

Tal como se describía en el caso de la inmovilización en agarosas (apartado IV.2.3.1), llevamos a cabo el estudio del pH óptimo de trabajo del complejo inmovilizado enzima-nanofibra, siguiendo el protocolo descrito en el apartado III 2.6.5. Para ello se realizó la reacción de hidrólisis utilizando *p*NF- β -Gal en distintas condiciones de pH por el método discontinuo. En la Figura 27 se muestran los resultados junto con los obtenidos previamente para la enzima libre y con la inmovilización en nanofibra. Tal como se puede observar, el máximo de actividad con el complejo inmovilizado se desplaza a pH 8, al contrario que ocurre con la enzima libre, donde se mantiene en un valor de pH 6. Al igual que en el caso descrito para las inmovilizaciones en glioxil agarosa, vemos como se produce una tendencia hacía la mejora en la actividad a pH básicos con los complejos inmovilizados. Estos

valores indican un aumento en la estabilidad de la enzima inmovilizada en ese rango de pH.

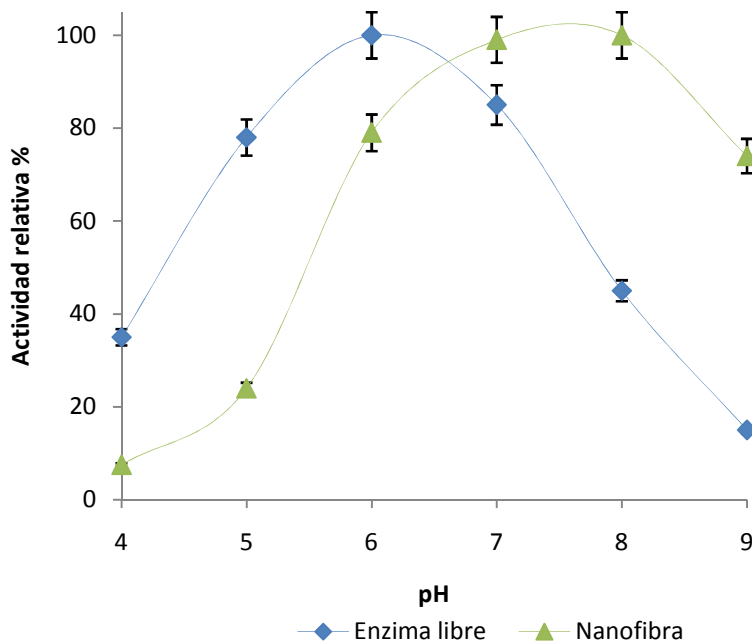


Figura 27. Efecto del pH en la actividad de la enzima β -Gal-3 libre e inmovilizada sobre nanofibras de carbono-carboxil sobre el sustrato *p*NF- β -Gal e 5 mM a 37 °C. El pH se ajustó con tampones citrato/fosfato de sodio, Tris-HCl y fosfato de sodio 50 mM. Las actividades están referidas en términos relativos al valor máximo determinado en cada caso, normalizando para cada tipo de inmovilización.

IV.2.3.2.2. Estabilidad térmica de la enzima β -Gal-3 inmovilizada

Para estudiar el efecto de la temperatura sobre la β -Gal-3 inmovilizada sobre nanofibras de carbono, se incubó la enzima inmovilizada en los dos soportes, así como la enzima libre a 37 y a 50 °C, siguiendo el protocolo del apartado III.2.6.8. Se midió su actividad a 1, 2, 3, 12 y 24 h, obteniéndose los resultados de la Figura 28 y Figura 29. Como se puede observar, a 37 °C, la enzima libre conserva una actividad próxima al 88%, y un 60% en nanofibra, una vez transcurridas 24 h. Las diferencias son de nuevo más representativas a 50 °C, temperatura a la cual la enzima libre pierde rápidamente su actividad, quedando por debajo del 50 % a las 3 h. Sin

embargo, la enzima inmovilizada pierde la actividad aún más rápido (5% a las 3 horas). Este hecho puede deberse a que, tal como ha sido manifestado por varios autores, las nanofibras de carbono poseen la capacidad de ser buenos transmisores del calor.²²⁹ Estos resultados ponen de manifiesto como estos soportes no son adecuados para la inmovilización de enzimas termófilas que operen a altas temperaturas.

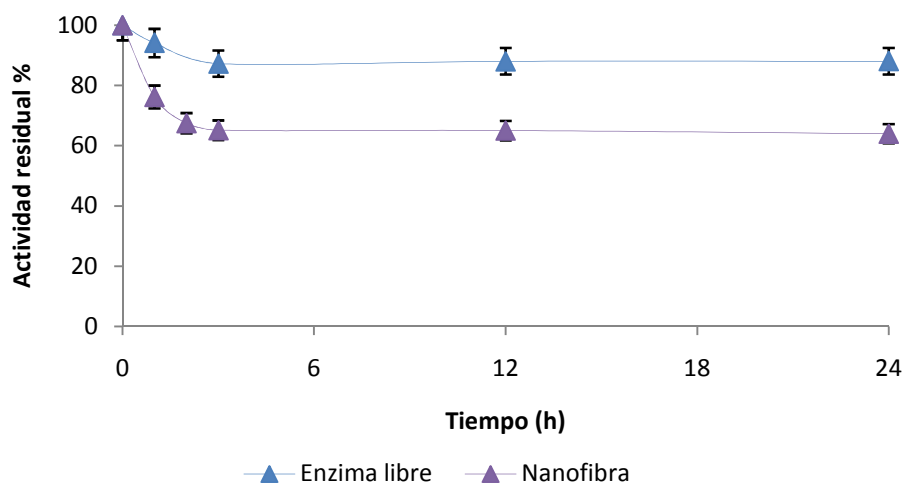


Figura 28. Estabilidad térmica de la enzima β -Gal-3 libre e inmovilizada incubada en tampón fosfato de sodio 50 mM pH 6,00 a 37° durante 24 h.

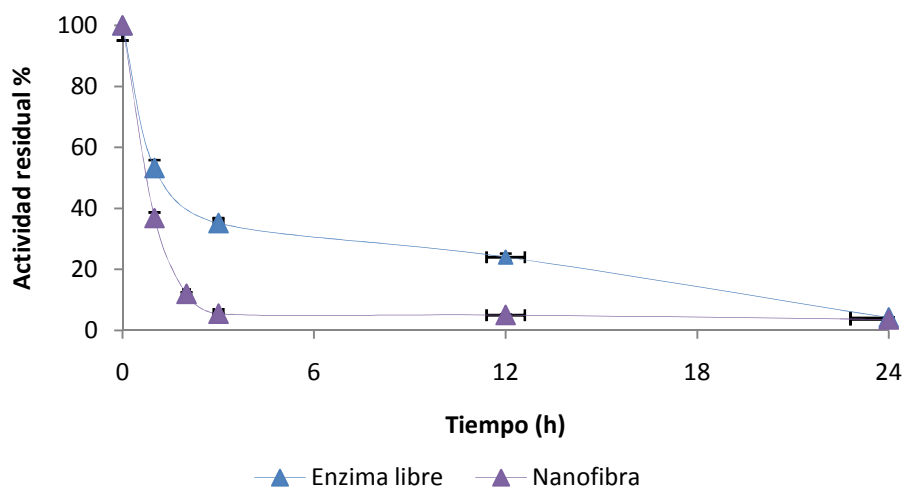


Figura 29. Estabilidad térmica de la enzima β -Gal-3 libre e inmovilizada incubada en tampón fosfato de sodio 50 mM pH 6,00 a 50° durante 24 h.

IV.2.3.2.3. Síntesis de disacáridos catalizada por β -Gal-3 inmovilizada en nanofibra de carbono

A pesar de no tratarse del mejor soporte de los testados en la presente investigación, decidió llevarse a cabo el estudio de capacidad sintética siguiendo el protocolo del apartado III.2.6.7 Debido a a las propiedades tan versátiles de este soporte para posibles funcionalizaciones posteriores. Se realizaron las reacciones utilizando como aceptores GlcNAc y GalNAc, en presencia de solo tampón fosfato de sodio, 50 mM, pH 7, y con disolventes sostenibles como co-solventes. Al igual que en el caso anterior (IV.2.3.1.4), se seleccionaron **DMA1** y el líquido iónico **[Bmim][PF₆]**. Los resultados obtenidos en nuestro estudio, empleando los inmovilizados de β -Gal-3 en nanofibra se muestran en la Figura 30.

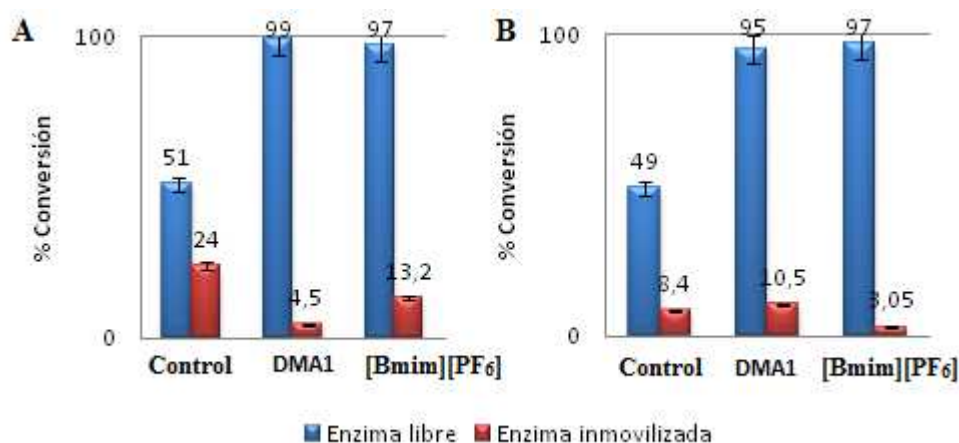


Figura 30. Rendimientos de la reacción de transglucosidación con la enzima β -Gal-3 libre e inmovilizada utilizando *pNF*-gal como donador y como aceptor, en **A)** GlcNAc y en **B)** GalNAc.

Como se puede observar, en la reacción control, con tampón, se obtuvo un resultado del 24% de Gal- β (1-3)-GlcNAc, frente al 51% de la enzima libre. En la síntesis de Gal- β (1-3)-GalNAc se obtuvo un 8,4% de rendimiento con la enzima inmovilizada, frente al 49% de la enzima libre. La disminución de rendimiento es mayor en el caso de las reacciones con **DMA1**, puesto que se pasó de un rendimiento del 99% con la

enzima libre a un 18,5% con la enzima inmovilizada en la síntesis de Gal- β (1-3)-GlcNAc. Los peores resultados se produjeron con el LI [Bmim][PF₆], con el que la síntesis de Gal- β (1-3)-GlcNAc con la enzima libre y con la enzima inmovilizada pasó de un 97 a un 13,2% respectivamente, y la síntesis de Gal- β (1-3)-GalNAc disminuyó solo de un 97 a un 3,05%.

A la vista de estos resultados, podemos concluir que, a pesar de obtener peores resultados en el caso de la enzima inmovilizada por el posible efecto en la estructura terciaria de la proteína, así como por el entorno hidrofóbico aportado por la nanofibra, esto puede verse de nuevo compensado por la posibilidad de reutilizar el biocatalizador.

IV.2.3.2.4. Reutilización de la β -Gal-3 de *B. circulans* ATCC 31382 en nanofibras de carbono

Así, nos propusimos estudiar la posibilidad de reutilizar el inmovilizado enzimático.

Para ello, se llevaron a cabo las reacciones de transglicosilación descritas en el apartado III.2.3.2.3, donde empleamos GlcNAc como aceptor modelo. La evaluación de la reutilización se llevó a cabo conforme lo descrito en el apartado III.2.6.10, mediante el empleo de los siguientes medios de reacción: de sólo tampón fosfato de sodio 50 mM pH 7.0; con DMA1 como co-solvente; y con el LI [Bmim][PF₆].

Como se puede ver en los resultados (mostrados en la Figura 31), las enzimas fueron sufriendo una desactivación gradual en todos los casos, que termina por estabilizarse en el reuso sexto. En todos los casos la enzima mantuvo cerca del 50 % de actividad de transglicosilación hasta el 4º reuso. Sin embargo, al igual que lo mencionado en el caso de las glioxil agarasosas, la metodología empleada para llevar a cabo el ensayo de reuso pudo influir en el resultado, donde al realizarse reacciones de 3 horas, el inmovilizado permanece mucho tiempo en uso, con cambios de temperatura, pasando

de 37°C de reacción, a 4°C en el almacenaje entre los reusos. Esto podría llevar a una justificación, al menos parcial, del resultado encontrado.

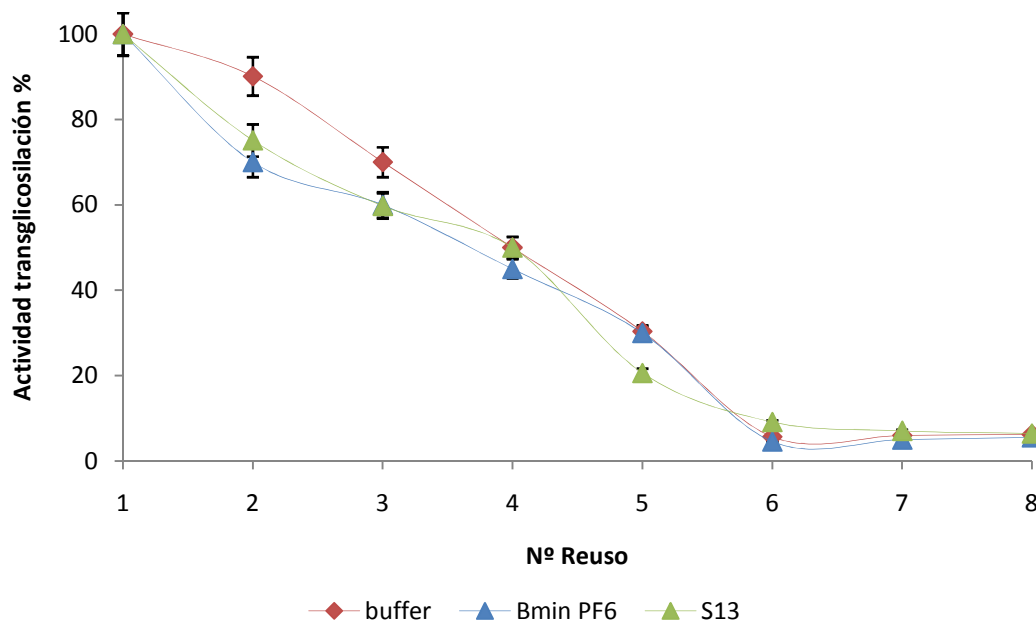


Figura 31. Reutilización de la enzima β -Gal-3 de *B. circulans* ATCC 31382 en reacciones de transglucosidación utilizando como aceptor GlcNAc en solo tampón o en presencia de DMA1 o [Bmim][PF₆] como co-solventes.

Por último, decir que, al igual que en las inmobilizaciones anteriores, el [Bmim][PF₆] se puede separar de la mezcla de reacción, permitiendo su reutilización.

IV.2.3.3. Inmovilización de β -Gal-3 de *B. circulans* ATCC 31382 en polímeros fenólicos

Como parte del trabajo desarrollado durante la estancia Postdoctoral del Dr Levin en nuestro grupo de investigación, se llevó a cabo la inmovilización de β -Gal-3 en polímeros fenólicos sintetizados mediante la polimerización mediada por la

peroxidasa de cáscara de soja, propiedad del grupo de investigación de procedencia del Dr Levin.

El proceso de síntesis del polímero, así como el proceso de inmovilización enzimática se llevó a cabo conforme lo descrito en el apartado III.2.6.2. En la Tabla 19 encontramos los resultados de la inmovilización.

Tabla 19. Resultados obtenidos para la inmovilización de β -Gal-3 en el polímero fenólico

Soporte	Enzima inmovilizada (%)	Carga enzimática (mg enzima/g soporte)	Actividad enzimática	
			UI/mg	(%)
Enzima libre	-	-	7,3	100
Polímero fenólico	64	10	1,79	24,5

El proceso de inmovilización se siguió midiendo la cantidad de proteína inmovilizada a tiempo final. Para ello se utilizó la metodología del procedimiento experimental descrito en el apartado III. 2.6.2.

Como se puede observar, a pesar de no inmovilizarse la totalidad de la enzima disponible, el proceso de inmovilización mantiene cerca de un 25% de la actividad hidrolítica de la enzima β -Gal-3. Este proceso concuerda con lo encontrado anteriormente, donde se observa una inactivación de la enzima por el proceso de inmovilización.

IV.2.3.3.1. Influencia del pH en la actividad de la enzima β -Gal-3 inmovilizada

Al igual que en los casos anteriores, se lleva a cabo el estudio de la influencia del pH en la actividad del inmovilizado, siguiendo el protocolo descrito en el apartado III.2.6. Para ello se realizó la reacción de hidrólisis utilizando *p*NF- β -Gal en distintas condiciones de pH por el método discontinuo. En la Figura 32 se muestran los resultados junto con los obtenidos previamente para la enzima libre y con la inmovilización en el polímero fenólico. Tal como se puede observar, el máximo de

actividad con el complejo inmovilizado se desplaza a pH 7, al contrario que ocurre con la enzima libre, donde se mantiene en un valor de pH 6.

Al igual que hemos observado en el resto de las inmovilizaciones sobre los diferentes soportes, vemos que se produce una tendencia al incremento en la actividad a pH básicos con los complejos inmovilizados, con el consiguiente incremento en la estabilidad del complejo.

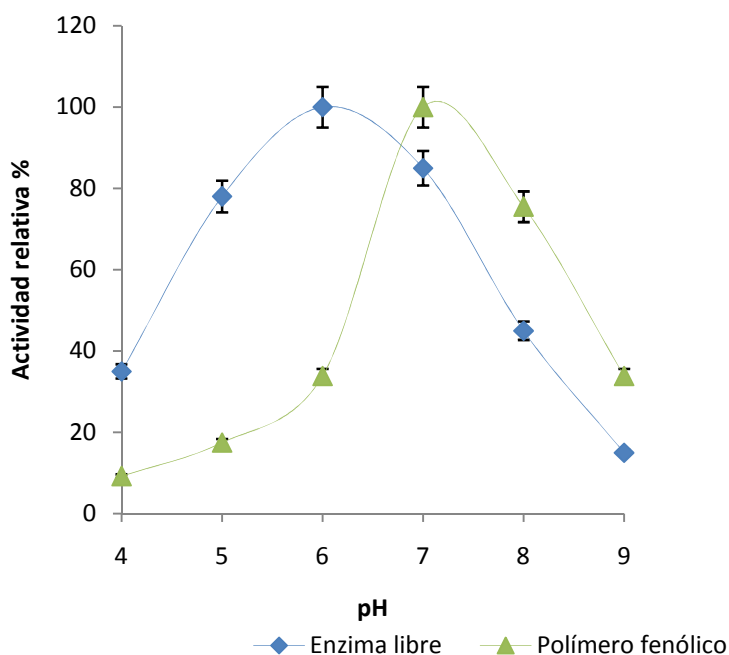


Figura 32. Efecto del pH en la actividad de la enzima β -Gal-3 libre e inmovilizada sobre el polímero fenólico sobre el sustrato p NF- β -Gal e 5 mM a 37 °C. El pH se ajustó con tampones citrato/fosfato de sodio, Tris-HCl y fosfato de sodio 50 mM. Las actividades están referidas en términos relativos al valor máximo determinado en cada caso, normalizando para cada tipo de inmovilización.

IV.2.3.3.2. Estabilidad térmica de la enzima β -Gal-3 inmovilizada

Para estudiar el efecto de la temperatura sobre la β -Gal-3 inmovilizada sobre el polímero fenólico, se incubó la enzima inmovilizada, así como la enzima libre a 37 y a 50 °C, siguiendo el protocolo del III.2.6.8. Se midió su actividad a 0,5, 1, 2, 4, 10, 12, 24, 36 y 48 h, obteniéndose los resultados de la Figura 33 y Figura 34. Como se

puede observar, a 37 °C, la enzima libre y el inmovilizado conservan una actividad próxima al 88%. Las diferencias más notables se encuentran en los ensayos realizados a 50 °C, temperatura a la cual la enzima libre pierde rápidamente su actividad, quedando totalmente inactivada a las 24 horas. Sin embargo, la enzima inmovilizada mantiene una actividad cercana al 37% a las 48 horas. Este fenómeno de incremento de la estabilidad de los complejos inmovilizados ya se había puesto de manifiesto en el caso de las glioxil agarosas y de las nanofibras.

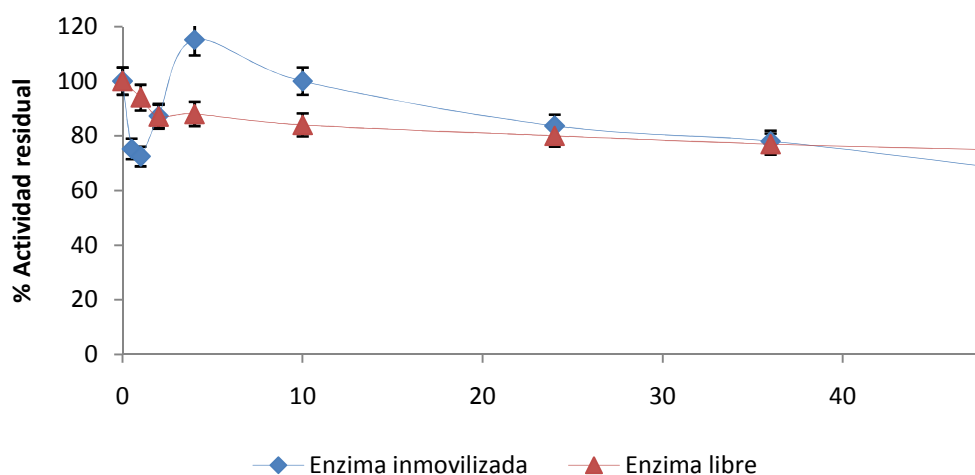


Figura 33. Estabilidad térmica de la enzima β -Gal-3 libre e inmovilizada incubada en tampón fosfato de sodio 50 mM pH 6,00 a 37° durante 24 h.

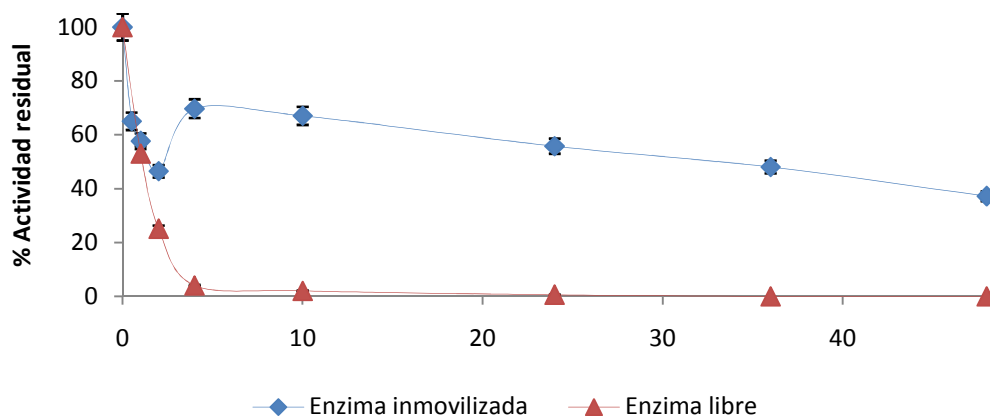


Figura 34. Estabilidad térmica de la enzima β -Gal-3 libre e inmovilizada incubada en tampón fosfato de sodio 50 mM pH 6,00 a 50° durante 24 h.

IV.2.3.3.3. Síntesis de disacáridos catalizada por β -Gal-3 inmovilizada en polímeros de naturaleza fenólica

En el estudio de la transglicosilación empleando el complejo inmovilizado de β -Gal-3 sobre los soportes poliméricos, se emplearon las condiciones descritas en el apartado III. 2..6.7. Se realizaron las reacciones utilizando como aceptor GlcNAc, en presencia de solo tampón fosfato de sodio, 50 mM, pH 6. Para poder conocer la cinética de dicha reacción, se tomaron muestras a diferentes tiempos, que se analizaron por HPLC. El resultado se refleja en la Figura 35 .

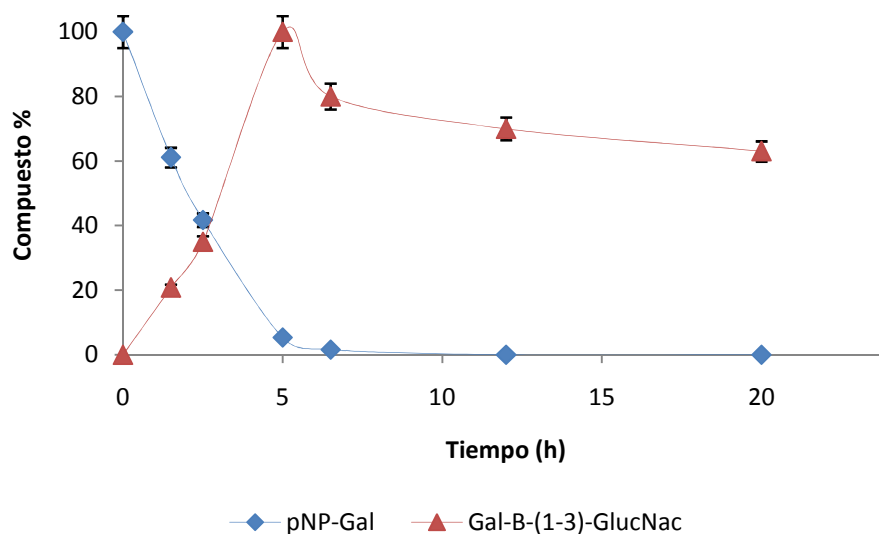


Figura 35. Cinética de la reacción de transglicosilación con la enzima β -Gal-3 libre e inmovilizada utilizando *pNF-gal* como donador y como aceptor GlcNAc.

Como se puede observar, a las 5 horas de reacción se ha consumido la mayoría del sustrato donador *pNF-Gal*, que coincide con el máximo de síntesis. En el siguiente tiempo, 6,5 horas, ya ha comenzado a ser hidrolizado el producto. Por tanto, a través de este experimento, podemos concluir como para poder llegar a obtener el máximo rendimiento en la reacción resulta de suma importancia no dejar transcurrir la reacción más allá de 5 horas.

En este caso, comparado con lo expuesto en el resto de inmovilizados, nos encontramos con un rendimiento del 100% en la reacción. Este hecho, unido al

incremento en la estabilidad y la mejora en la estabilidad a pH básicos, nos hace pensar en el polímero fenólico como un estupendo candidato a la inmovilización enzimática.

Estudios posteriores con el empleo de co-solventes, así como las posibilidades de reutilización del soporte serán desarrollados para explorar al máximo la versatilidad del complejo inmovilizado.

IV.2.4. Producción y purificación de la α -fucosidasa de *S. sulfataricus*

La enzima α -fucosida fue clonada por el Grupo de Investigación del Dr Moracci, y cedida gentilmente para la realización de los ensayos de esta Tesis. El proceso de clonación y expresión está descrito en una publicación del mismo grupo.¹³⁹ Durante dicho trabajo, se llevó a cabo la clonación del gen en el plásmido pGEX. Este plásmido fue posteriormente introducido en bacterias de *E. coli* BL21, cepa especializada en la producción de proteínas recombinantes. La proteína expresada fue denominada α -Fuc-NTag, al poseer anclado en el extremo N-terminal una proteína de fusión GST para facilitar el posterior proceso de purificación. Sin embargo, en el presente trabajo se abreviará como α -Fuc.

Así, durante el trabajo de la presente tesis, se llevó a cabo el proceso de producción descrito en el apartado (apartado III.2.1.5), rotura de células (apartado III.2.1.6) y purificación por proteína de fusión GST en columna de GST (apartado III.2.2.4). Posteriormente, la proteína obtenida fue incubada con trombina para romper el enlace a la proteína GST y obtener la α -Fuc aislada. El perfil de elución obtenido del proceso de purificación es similar al mostrado en la figura Figura 20 para la β -Gal-3.

Una vez purificadas las enzimas se midió su concentración por el método de Bradford (apartado III.2.2.1) y se corrió un gel SDS-PAGE para comprobar su

pureza (apartado III.2.2.2.1). Como se puede observar en la Figura 36, el carril 1 y 2 pertenecen a la proteína antes y después de ser incubada con trombina respectivamente, donde se aprecia la diferencia de tamaño entre la proteína resultante de la unión de GST y α -Fuc (aproximadamente 85 KDa), y la proteína α -fuc aislada (aproximadamente 57 KDa).

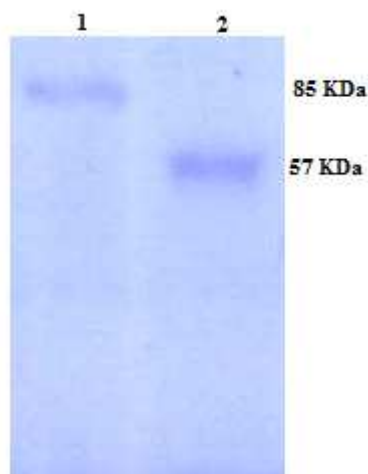
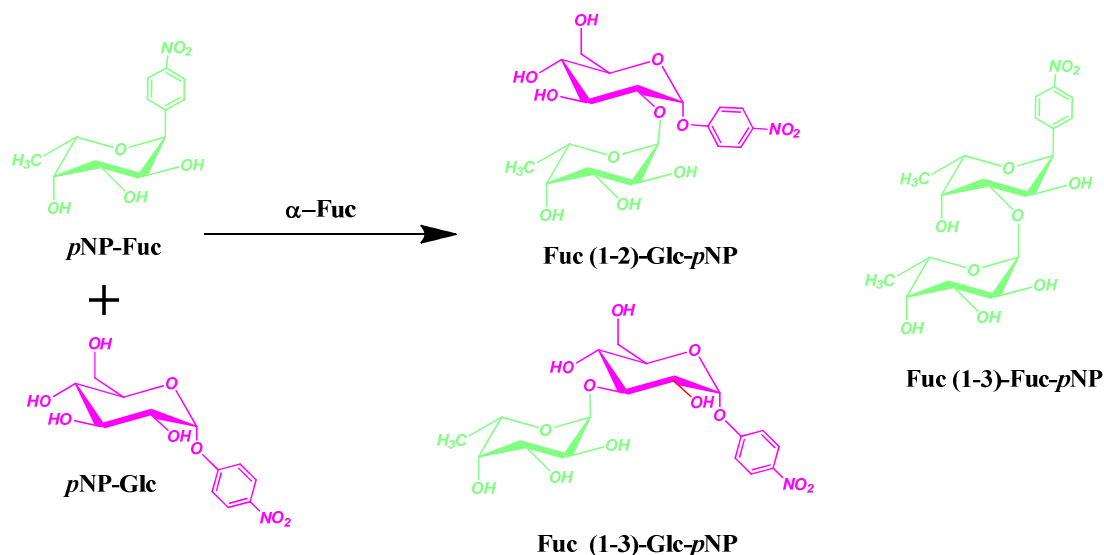


Figura 36. Gel SDS-PAGE de la purificación de α -Fuc **1)** Proteína eluída sin incubar con trombina. **2)** Proteína después de la incubación con trombina.

IV.2.4.1.1. Reacciones de transglicosilación con la α -fucosidasa de *S. sulfotaricus* en presencia de disolventes verdes

Por los ensayos descritos por Moracci y col,¹³⁹ sabemos que la enzima α -fuc es capaz de llevar a cabo la reacción de transglicosilación entre el donador *p*NF-Fuc y el aceptor *p*NF-Glc, dando lugar a tres productos: α -L-Fuc-(1-3)- α -D-Glc-O-*p*NF, α -L-Fuc-(1-2)- α -D-Glc-O-*p*NF, α -L-Fuc-(1-3)- α -D-Fuc-O-*p*NF.¹³⁹ En su caso, esta reacción fue llevada a cabo empleando como medio de reacción tampón fosfato 20 mM, pH 7.0.



Esquema 14. Reacción de transglucosidación catalizada por la enzima α -fucosidasa utilizando como donador p NF- α -Fuc y como aceptor p NF- α -Glc para la síntesis de Fuc- α (1-2)-Glc- p NF, Fuc- α (1-3)-Glc- p NF y Fuc- α (1-3)-Fuc- p NF

Por ello, y dados los precedentes descubiertos en nuestro grupo de investigación,²⁹⁷ donde se había demostrado como la presencia de disolventes verdes podía afectar en la regioselectividad de las enzimas, nos propusimos descubrir si en el caso de la α -Fuc también se podía ver afectada la regioselectividad.

Por ello, siguiendo los protocolos descritos en los apartados III.2.3.2.2y III.2.3.2.3, se llevaron a cabo las reacciones de transglucosilación con 0.17 mmol de p NF-Fuc y 0.51 mmol de p NF-Gluc, empleando los disolventes verdes **GC2**, **GC3**, **GC4**, **GC8**, **DMA1**, **DMA2**, **DMA3** a una concentración final de 2M. Esta concentración fue obtenida como óptima en estudios previos de nuestro grupo de investigación para otras glicosidasas.^{120,296-297}

El proceso de expresión de la proteína mediante el sistema de proteína de fusión GST es una metodología muy útil para el caso de enzimas poco solubles. Sin embargo, presenta la principal desventaja de la necesidad de romper la unión GST- α -Fuc mediante la incubación con trombina. Este paso no suele tener un alto rendimiento,

y, además, conlleva la optimización empírica del mismo, lo cual disminuye su reproducibilidad.⁴¹²⁻⁴¹⁴ En nuestro caso, a pesar de realizar el proceso de producción y purificación conforme a lo descrito por los autores, obtuvimos en todos los lotes un bajo porcentaje de proteína final, lo cual resultó limitante a la hora de llevar a cabo las reacciones por la baja disponibilidad de la proteína, lo cual justifica la decisión de mantener la reacción durante más horas.

El seguimiento de las reacciones de transglicosilación se llevó a cabo mediante cromatografía de HPLC acoplada a los detectores de ultravioleta (UV) y light scattering (ELSD), tal como se describe en el apartado III.2.7.1.1.

En la Figura 37 se muestra un cromatograma de la reacción de transglicosilación. En la Figura 37-A se muestra el tiempo 0 h, en el que aparecen los sustratos de partida *pNF- α -Fuc* y *pNF- α -Glc*. En la Figura 37-B se muestra el tiempo 24 h, ya se observa la aparición de los dos productos de transglicosilación. El pico del aceptor se mantiene, debido a que se encontraba 3 veces más concentrado que el donador. Es importante destacar que a tiempo 0, la solubilidad de los sustratos era muy pequeña, lo cual dificultaba en muchos casos la correcta toma de muestra. Esto se resolvía durante el transcurso de la reacción, así como con la adición de determinados solventes, que favorecerían la solubilidad de los sustratos.

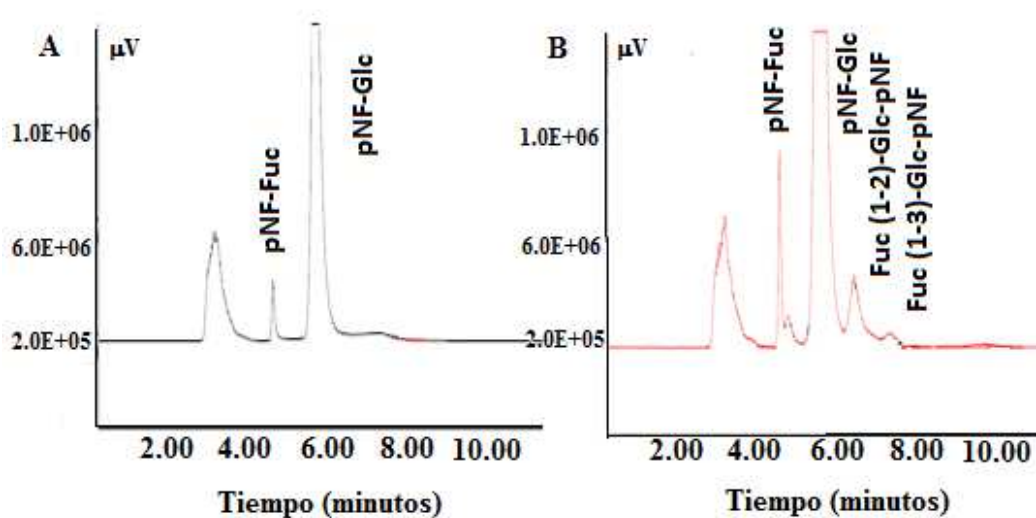


Figura 37. Cromatogramas de HPLC-ELSD de la reacción de transglucosidación con la enzima α -Fuc en tampón fosfato de sodio 30 mM pH 7,00 utilizando *p*NF-fuc como donador y *p*NF-Glc como aceptor. **A)** Tiempo 0 h. **B)** Tiempo 24 h.

Los resultados obtenidos con los diferentes co-solventes se muestran en la Figura 38. Como control, se empleó tampón fosfato 30 mM pH 7,00. Todas las reacciones se realizaron a 75° C durante 24 horas.

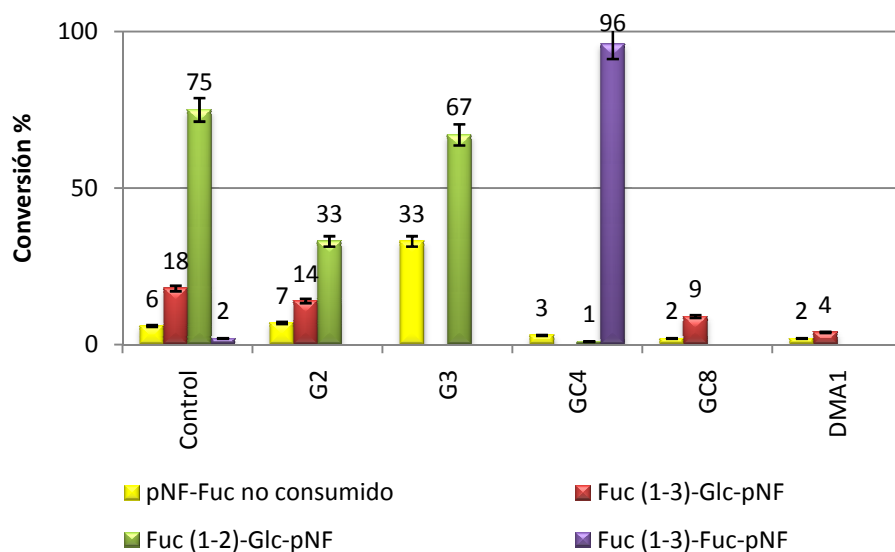


Figura 38. Reacciones de transglucosidación con la enzima α -Fuc utilizando como donador *p*NF-Fuc, como aceptor *p*NF-Glc y como co-solventes una batería de disolventes sostenibles derivados de biomasa.

Los rendimientos obtenidos con el control son mayores que los descritos por Moracci et col, del 14%. Sin embargo, hay que comentar que en dicha publicación los autores llevan a cabo la reacción durante 5 horas para obtener un consumo total del donador. En nuestro caso, la velocidad de la reacción fue menor y, transcurridas 24 horas, aún permanecía un residual del 6%.

En la Figura 38 se pueden observar los resultados obtenidos en presencia de disolventes sostenibles derivados de biomasa. En presencia de los diferentes

disolventes sostenibles se observaron varios comportamientos diferentes; i- Aquellos en los que la reacción transcurrió de forma muy similar a la reacción control en solo en tampón: **G2** (con aparición de los tres productos, presentando un rendimiento del 33% para el producto mayoritario, menor que en el caso del tampón). ii-Aquellos en los que la reacción se desplazó hacia síntesis mayoritaria del autocondensado: **GC4**, con un rendimiento para este producto del 96%. iii-Aquellos en los cuales se dio mayoritariamente hidrólisis del donador, con alta presencia de fucosa como producto de la misma: **GC8 y DMA1** (con un consumo del donador del 98% en ambos casos). iv-Aquellos en los que se modificó la regioselectividad de la enzima α -Fuc hacía la síntesis de un único producto: **G3**, con un rendimiento del 67% para el producto Fuc (1-2)-Glc-*p*NF.

Los productos se purificaron mediante una columna de sílica, según el protocolo descrito en el apartado III.2.4.3.

La caracterización de los productos obtenidos se llevó a cabo mediante RMN (500 MHz, CHCl₃ en todos los casos) (apartado III.2.7.2), confirmando la estructura de los mismos:

α -Fuc-(1-3)- α -D-Glc-O-*p*NF: ¹³⁹ 1H-NMR(¹³C-NMR): Glc: 5.74(94.2) H1, 5.09(72.2) H2, 4.37(74.1) H3, 5.19(69.1) H4, 3.89(69.16) H5, 4.13-4.03(61.6)H6a,H6b; α -L-Fuc: 5.46(96.5)H1, 5.06(68.6) H2, 5.24(67.2) H3, 5.27(70.8) H4, 4.12(65.3) H5, 1.13(15.6) H6.

α -Fuc-(1-2)- α -D-Glc-O-*p*NF: ¹³⁹ 1H-NMR (¹³C-NMR): Glc: 5.77(95.6) H1, 3.95(76.7) H2, 5.67(70.9) H3, 5.11(70.6) H4, 3.99(68.5) H5, 4.03-4.24(61.3)H6a,H6b; α -L-Fuc: 5.24(98.3)H1, 5.08(67.9) H2, 5.17(67.4) H3, 5.19(70.4) H4, 4.05(65.5) H5, 0.71(15.6) H6.

α -Fuc-(1-3)- α -L-Fuc-O-*p*NF: ¹³⁹ 1H-NMR: 5.90 (H1 fucosa unida mediante enlace aril), 5.32 (H2 fucosa unida mediante enlace aril), 5.30 (H4 fucosa unida mediante enlace aril), 5.27 (2H, H3-H4 unida fucosa externa), 5.22 (H2 fucosa externa), 5.20

(H1 fucosa externa), 4.45 (H3 fucosa unida mediante enlace aril), 4.41 (H5 fucosa unida mediante enlace aril), 4.06 (H5 fucosa externa), 1.21 (H6 fucosa unida mediante enlace aril), 1.11 (H6 fucosa externa). ¹³C-RMN: 94.8, 93.8, 71.0, 69.5, 69.1, 69.0, 67.7, 67.0, 66.4, 64.8, 15.9, 16.0.

Al tratar de establecer algún tipo de relación entre los efectos observados en la actividad sintética de la enzima y las propiedades físico-químicas de los disolventes, resulta muy complicado establecer una correlación. Con anterioridad estos disolventes han sido empleados en nuestro grupo de investigación con la β -galactosidasa comercial de *B. circulans* (Biolacta)²⁹⁷ y de *E. coli*,²⁹⁶ obteniéndose con ellas variaciones en la regioselectividad de las enzimas y mejoras en la síntesis de disacáridos, que han sido explicadas en términos de polaridad, hidrofobicidad e interacciones moleculares con los disolventes.

IV.2.4.2. Reacciones de transglucosidación con la α - Fuc en presencia de LIs

Finalmente, nos planteamos evaluar diferentes tipos de LIs como co-solventes de las reacciones de transglucosidación. Los LIs utilizados en este estudio aparecen representados en el Esquema 13. LIs utilizados como co-solventes en reacciones de transglucosidación., donde el [Bmim][PF₆] ya ha sido empleado con anterioridad en los ensayos de β -Gal-3 (IV.2.3). La cantidad de LI utilizada para cada reacción fue de un 30%, ya que los datos bibliográficos previos demuestran que algunas glicosidasas presentaron mejores rendimientos y una mayor estabilidad a esta concentración.¹⁰⁷ Esto también había sido confirmado por nuestro grupo de investigación con la enzima TTP0042 de *T. thermophilus* HB27.³⁰⁴

Se evaluaron un total de 10 Lis, en su mayoría inmiscibles con el tampón a la temperatura de trabajo (75°C). Esta característica resulta de gran utilidad en los procesos de recuperación de los LIs post-reacción, mediante un sencillo proceso de centrifugación o decantación.

Las reacciones con la enzima α -Fuc se llevaron a cabo tal y como se describe en el apartado III.2.3.2.2 utilizando *p*NF-Fuc como donador, y como aceptor *p*NF-Glc, añadiendo una concentración del 30% de cada uno de los LIs. Los resultados se muestran en la Figura 39.

Cabe destacar que para la mayoría de los disolventes fue imposible su análisis mediante HPLC debido a que coelúan con los compuestos de interés. Se hicieron múltiples intentos para ajustar las condiciones de cromatografía a fin de solventar este problema, pero tan sólo se pudo conseguir para dos de ellos. Los datos referidos a los LIs que no pudieron ser analizados no se muestran.

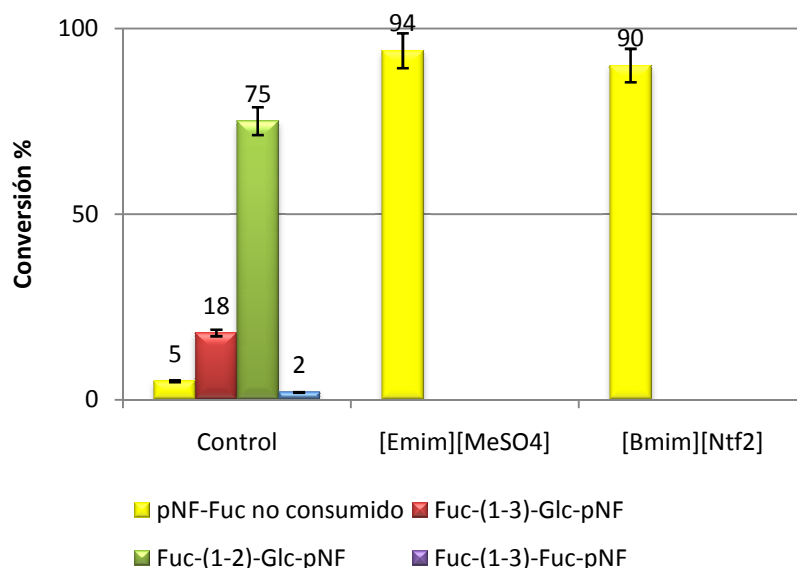


Figura 39. Reacciones de transglicosidación con la enzima α -Fuc utilizando como donador *p*NF-Fuc, como aceptor *p*NF-Glc y como co-solventes una batería de líquidos iónicos al 30%.

En la Figura 39 se pueden observar los resultados obtenidos cuando la reacción de transglicosidación se realizó en presencia Lis. Como se ha comentado anteriormente, el rendimiento obtenido en la síntesis del disacárido Gal- β (1-3)-GlcNAc en tampón fosfato de sodio 30 mM pH 7,00 y transcurridas 24 h, fue del 75% para el disacárido

Fuc-(1-2)-Glc-*p*NF, 18% para el disacárido Fuc-(1-3)-Glc-*p*NF, un 2% para el autocondensado Fuc(1-4)-Fuc-*p*NF, y un residual del 5% del donador *p*NF-Fuc no consumido. Las reacciones llevadas a cabo con los LIs [Bmim][Ntf₂] y [Emim][MeSO₄], mostraron un comportamiento muy marcado hacia una nula actividad sintética y escasa actividad hidrolítica, quedando en ambos casos un residual del donador sin consumir del 90% o superior.

En la bibliografía existen pocas referencias del efecto generado por los LIs en las reacciones mediadas por glicosidasas, pero ninguna relacionada con las α -fucosidasas hasta la fecha.

Hay que mencionar que, la mayor parte de los LIs son inmiscibles con la fase acuosa del medio de reacción, por lo cual el fenómeno de interacción ocurrirá mayoritariamente en la interfase entre la parte acuosa y el LI. Por este hecho, resulta determinante que se lleve a cabo una correcta agitación del medio de reacción, suficientemente elevada para generar la fragmentación del LI en pequeñas partículas que favorezcan el contacto con la enzima.

Debemos tener en cuenta que para cada LI se generará un entorno químico distinto, con unas interacciones características con el biocatalizador y que, seguramente sea el responsable de las modificaciones en la actividad enzimática. Por este motivo, nos propusimos analizar mediante técnicas espectroscópicas como la espectroscopia de fluorescencia, el papel desempeñado por los LI en el medio de reacción, tratando de encontrar justificación a los resultados encontrados experimentalmente en nuestros ensayos.

IV.2.5. Estudio del efecto del disolvente en la estructura terciaria de la enzima α -Fuc de *S. sulfotaricus* por espectroscopía de fluorescencia

La técnica de espectroscopia de fluorescencia supone una herramienta muy útil para analizar los posibles cambios conformacionales ocurridos en las enzimas por la presencia en el medio de reacción de terminandos compuestos, como son los co-solventes.

Lo primero que nos propusimos fue llevar a cabo un screening previo para determinar qué co-solventes de todos los empleados en las reacciones de transglicosilación eran adecuados para su empleo en estos estudios de fluorescencia. El factor excluyente era su capacidad de emisión en el entorno seleccionado. Esto es así puesto que, si el co-solvente generaba una señal de fluorescencia *per se*, esto imposibilitaría distinguirla adecuadamente de la señal debida a la proteína.

Por tanto, tras llevar a cabo el ensayo con los co-solventes puros, con una λ de excitación de 295 nm, y un rango de emisión de 310 a 400 nm, observamos que, de los 5 disolventes verdes analizados (**G2**, **G3**, **GC4**, **GC8** y **DMA1**), todos, a excepción de **G2** eran válidos. Por otro lado, con las mismas condiciones experimentales se llevó a cabo el ensayo para los LIs **[Bmim][Ntf₂]** y **[Emim][MeSO₄]**, obteniendo que tan sólo el segundo era adecuado para el ensayo.

Así, conocido lo anterior, procedimos a medir las posibles variaciones de fluorescencia de la proteína disuelta con diferentes concentraciones de los solventes **G3**, **GC4**, **GC8**, **DMA1** y **[Emim][MeSO₄]**.

La enzima se disolvió en tampón fosfato de sodio 30 mM pH 7,00 para medir su emisión en forma nativa, obteniéndose un máximo a 329-330 nm en función del co-solvente. Después, se fueron añadiendo sucesivamente alícuotas de los co-solventes individualmente, tal y como se explica en el protocolo del apartado III.2.7.3. Como resultado, se fueron obteniendo los espectros para cada concentración. Una vez llevado a cabo para todos los solventes, se observó que tan sólo se generaban cambios conformacionales con los solventes **GC4** y **DMA1**. Por ello, tan sólo se muestran los datos referidos a estos dos co-solventes En las Figura 40 y Figura 41

se muestran los máximos de emisión para las concentraciones de **GC4** y **DMA1** utilizadas en las reacciones de transglicosidación del apartado IV.2.4.1.1. En el caso de **GC4**, con una concentración 2 M el máximo de emisión se desplazó hasta 327 nm. En el caso de **DMA1** encontramos una variación a la concentración e 1 M hasta 327 nm igualmente, pero partiendo en este caso de 330 nm para la conformación nativa. Estas variaciones, aunque leves, podrían sugerir algún tipo de modificación en el entorno químico de los triptófanos de la enzima, lo que se asocia con una modificación conformacional en la estructura de la proteína.³³⁵

El aminoácido triptófano es residuo altamente hidrofóbico, que suele estar localizado en regiones internas y poco expuestas de la enzima. Los resultados obtenidos con estos co-solventes indicarían variaciones en la estructura de los triptófanos, dependiente de la concentración del co-solvente.

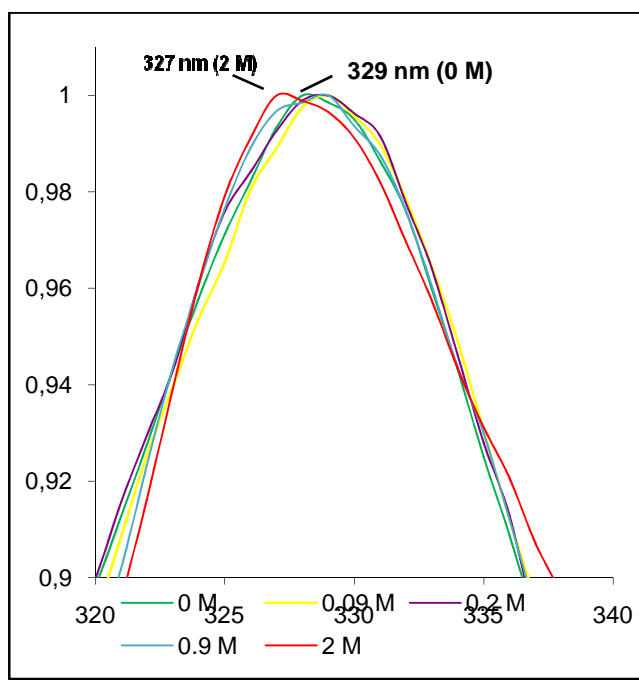


Figura 40. Espectro de emisión de fluorescencia de α -Fuc en tampón fosfato de sodio 30 mM pH 7,00 y a diferentes concentraciones de **GC4**.

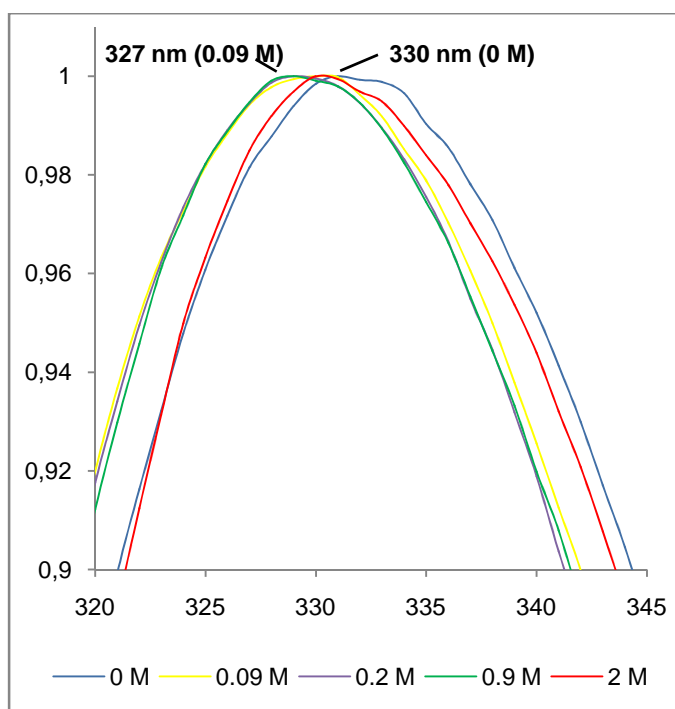


Figura 41. Espectro de emisión de fluorescencia de α -Fuc en tampón fosfato de sodio 30 mM pH 7,00 y a diferentes concentraciones de **DMA1**.

IV.2.6. Síntesis de glicoconjugados con lipasas

Para finalizar este capítulo dedicado a la síntesis de glicoconjugados mediante biocatálisis, se abordó el empleo de lipasas como biocatalizadores.

Las lipasas son unas enzimas que se caracterizan por su elevada promiscuidad catalítica, convirtiéndolas en potenciales en multitud de reacciones. Dentro de la química de los carbohidratos, las lipasas catalizan dos reacciones fundamentalmente:

- Procesos de acilación de grupos hidroxilos de los azúcares, utilizando como agentes acilantes ácidos carboxílicos o ésteres. Por ejemplo, podemos encontrar multitud de ejemplos del empleo de ésteres de vinilo como agentes acilantes.^{168,215,415}
- Deacetilación de azúcares, fundamentalmente en reacciones de deacetilación regioselectiva en azúcares peracetilados, llevando a cabo la desprotección regioselectiva de determinadas posiciones de una molécula. Esta reacción ha

sido llevada a cabo tanto en entornos acuosos (hidrólisis) como en alcohólicos (alcoholisis) ^{173,416-417}

En nuestro trabajo, nos propusimos llevar a cabo reacciones de desprotección regioselectiva de azúcares peracetilados empleando las lipasas de *C. antarctica* (CAL), lipasa B de *C. antarctica* (CAL-B) y *P. stutzeri* (PSL).

Primeramente se caracterizaron las lipasas por su pureza y actividad hidrolítica del butirato de *p*-nitrofenilo (*p*NF-butirato); posteriormente se llevó a cabo su inmovilización sobre diferentes soportes; y, finalmente, se evaluaron como catalizadores inmovilizados en reacciones de desacetilación regioselectiva de azúcares peracetilados.

IV.2.6.1. Caracterización de las lipasas utilizadas

Las lipasas empleadas se encontraban todas ellas a disposición comercial. Por ello, inicialmente llevamos a cabo estudios para determinar su contenido proteico, así como su actividad hidrolítica frente a sustratos marcados con *p*NF.

IV.2.6.1.1. Lipasas de *C. antarctica*

En nuestro laboratorio disponíamos de dos lipasas pertenecientes al microorganismo *C. antártica*. Por un lado, un preparado comercial donde se contienen todas las fracciones protéicas del microorganismo con actividad lipasa; por otro, empleamos un preparado comercial líquido enriquecido en CAL-B.

La primera determinación fue medir la cantidad de proteína contenida en cada uno de ellos mediante el procedimiento descrito en el apartado III.2.2.1. Posteriormente, para el preparado comercial sólido, establecimos el porcentaje real proteico

contenido en peso, encontrando que poseía un 11,1% en CAL. Para el preparado líquido, se llevo a cabo la determinación del valor proteico, pero no así su porcentaje.

Como parte del trabajo experimental llevado a cabo durante la tesis del Dr Manuel Sandoval, se realizaron análisis por SDS-PAGE de estas lipasas, y se conocía que la muestra de CAL presentaba un perfil más impuro que la muestra de CAL-B. Esto es de esperar, puesto que la segunda se trata de un extracto más enriquecido en la fracción de lipasa-B.

A continuación, llevamos a cabo las medidas de actividad hidrolítica de las lipasas. Para ello, y fruto del trabajo realizado por el Dr Celiz de la Universidad de Salta (Argentina) durante su estancia postdoctoral en nuestro Grupo de investigación, se puso a punto la metodología analítica. Se realizó la medida empleando como sustrato el éster de *p*-nitrofenol de butirato (*p*NF-butirato), disuelto en acetona dada su insolubilidad en agua, y empleando tampón fosfato de sodio 50 mM pH 6,0, con un 0,8% de Triton, que resultó el valor óptimo para mejorar la solubilidad del sustrato. Todas las actividades fueron medidas a 37°C. El protocolo completo empleado está descrito en el apartado III.2.3.1.2. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 20.

Tabla 20. Actividad hidrolítica de las lipasas de *C. antarctica* utilizadas en este estudio.

Enzima	Sustrato	Actividad (UI/mg enzima)
CAL	<i>p</i> NF-Butirato	7,14
CAL-B	<i>p</i> NF-Butirato	12,6

IV.2.6.1.2. Lipasas de *Pseudomonas stutzeri*

La tercera lipasa que empleamos fue la procedente del microorganismo *Pseudomonas stutzeri* (PSL). A través del cálculo del contenido proteico, obtuvimos

un resultado del 9,6%. Según los datos de SDS-PAGE aportados en la Tesis del Dr Manuel Sandoval, este preparado comercial tan sólo contiene una banda, de peso molecular entre 36 y 29 kDa.

Respecto a su actividad hidrolítica, se empleó la misma metodología que la descrita para el resto de las lipasas, y que se puede encontrar con detalle en el apartado III.2.3.1.2. El dato de actividad hidrolítica obtenido con la enzima PSL fue de 93,43 UI/mg enzima, empleando como sustrato el *p*NF-butirato.

IV.2.6.2. Inmovilización de lipasas en nanofibras de carbono

Empleando las nanofibras de carbono descritas en el apartado correspondiente a la inmovilización de la enzima β -Gal-3 (IV.2.3.2), se realizó el mismo procedimiento con las lipasas antes descritas.

Igualmente, el proceso se puso a punto mediante la modificación del tiempo de contacto, pH de inmovilización, pre-tratamiento de las nanofibras con isopropanol, etc. El proceso de inmovilización se siguió midiendo la cantidad de proteína inmovilizada a diferentes tiempos. Para ello se utilizó la metodología del procedimiento experimental descrito en el apartado III.2.6.1.

En este caso, también se ensayaron tanto las nanofibras de carbono funcionalizadas con grupos carboxilo como amino. De nuevo, en el caso de las segundas, no se obtuvo actividad en ninguno de los casos (datos no mostrados).

Por tanto, siempre que indiquemos nanofibras nos estaremos refiriendo exclusivamente a las funcionalizadas con grupos carboxilos.

Tabla 21. Resultados de la inmovilización de lipasa CAL y actividad enzimática sobre nanofibras de carbono. (Pretratamiento con/sin isopropanol).

Condiciones de inmovilización	Enzima inmovilizada (%)	Carga ^a	Actividad enzimática	
			UI/mg	(%)
Enzima libre	-	-	7,14	100
pH 6,2, 5 horas contacto, pretratamiento	100	10	0,19	2,7
pH 6,2 5 horas contacto, no pretratamiento	100	10	0,11	1,5
pH 6,2 17 horas contacto, pretratamiento	100	10	0	0
pH 6,2 17 horas contacto, no pretratamiento	100	10	1,67	23,4
pH 6,2 24 horas contacto, pretratamiento	100	10	16,28	228
pH 6,2 24 horas contacto, no pretratamiento	100	10	0	0
pH 7,5 17 horas contacto, pretratamiento	100	10	4,00	56,1
pH 7,5 17 horas contacto, no pretratamiento	100	10	1,24	17,3

a: mg enzima/g soporte

En la Tabla 21 encontramos un resumen de los resultados obtenidos para la enzima CAL empleando la nanofibra funcionalizada con grupos carboxilo. Como puede observarse en dicha tabla, los resultados obtenidos con las distintas condiciones han sido muy diversos, obteniéndose los mejores porcentajes de inmovilización con el pH 6,2, a mayor tiempo de contacto (24 horas), y con las nanofibras con pretratamiento. En este caso, se produce un incremento significativo de la actividad hidrolítica con respecto a la obtenida para la enzima libre (aproximadamente 2,5 veces superior).

Para el caso de la enzima CAL-B, vemos en la Tabla 22 como, en el caso del empleo del tampón de pH 6,2, resulta fundamental que las nanofibras hayan sido pre-tratadas con isopropanol. Sin embargo, para el pH de 7,5 no es tan crítico, aunque es cierto que el mejor resultado se encuentra en las pre-tratadas (92 U/mg). Por otro lado, observando la tabla, vemos como el tiempo de contacto es crítico. Al aumentar el tiempo de contacto, se produce una inmovilización excesiva de la enzima, que puede afectar a la rigidez de la misma, disminuyendo su actividad catalítica. Por el contrario, a tiempos cortos, la enzima se inmoviliza completamente, pero no presenta valores de actividad altos. En este caso, resulta fundamental controlar adecuadamente el tiempo y pH de la inmovilización.

Tabla 22. Resultados de la inmovilización de lipasa CAL-B y actividad enzimática sobre nanofibras de carbono. (Pretratamiento con/sin isopropanol).

Condiciones de inmovilización	Enzima inmovilizada (%)	Carga ^a	Actividad enzimática	
			UI/mg	(%)
Enzima libre	-	-	12,6	100
pH 6,2, 5 horas contacto, pretratamiento	100	10	1,46	11,6
pH 6,2 5 horas contacto, no pretratamiento	100	10	0	0
pH 6,2 17 horas contacto, pretratamiento	100	10	4,90	38,9
pH 6,2 17 horas contacto, no pretratamiento	100	10	0	0
pH 6,2 24 horas contacto, pretratamiento	100	10	0	0
pH 6,2 24 horas contacto, no pretratamiento	100	10	0	0
pH 7,5 17 horas contacto, pretratamiento	100	10	11,59	92,0
pH 7,5 17 horas contacto, no pretratamiento	100	10	2,90	23,0

a: mg enzima/g soporte

Tabla 23. Resultados de la inmovilización de lipasa PSL y actividad enzimática sobre nanofibras de carbono. (Pretratamiento con/sin isopropanol).

Condiciones de inmovilización	Enzima inmovilizada (%)	Carga ^a	Actividad enzimática	
			UI/mg	(%)
Enzima libre	-	-	93,43	100
pH 6,2, 5 horas contacto, pretratamiento	100	10	0	0
pH 6,2 5 horas contacto, no pretratamiento	100	10	113	121
pH 6,2 17 horas contacto, pretratamiento	100	10	9,81	10,5
pH 6,2 17 horas contacto, no pretratamiento	100	10	0	0
pH 6,2 24 horas contacto, pretratamiento	100	10	0	0
pH 6,2 24 horas contacto, no pretratamiento	100	10	0	0
pH 7,5 17 horas contacto, pretratamiento	100	10	7,57	8,1
pH 7,5 17 horas contacto, no pretratamiento	100	10	3,74	4,0

a: mg enzima/g soporte

Finalmente, para el caso de PSL (Tabla 23) encontramos que el factor determinante es el tiempo de contacto. Al emplear nanofibras pretratadas, con un tampón de pH 6,2 y el tiempo de contacto más corto (5 horas), el complejo inmovilizado muestra el mejor valor de actividad (113 U/mg).

IV.2.6.2.1. Reacciones de desacetilación regioselectiva de azúcares peracetilados utilizando lipasas inmovilizadas

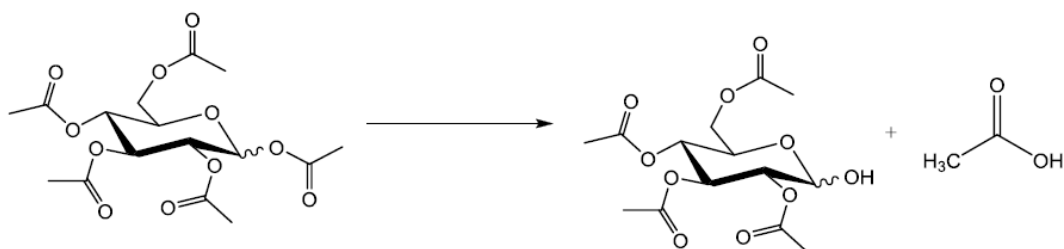
Aprovechando la capacidad de las lipasas para actuar sobre los enlaces tipo éster de compuestos hidrófobos, se llevaron a cabo reacciones de desacetilación regioselectiva de azúcares peracetilados. Las condiciones de reacción se describen en el apartado III.2.6.4.

Como sustrato se empleó β -D-Galactosa peracetilada, empleando como disolventes etanol, tetrahidrofurano, metiltetrahidrofurano y el solvente derivado de biomasa **DMA3**. Así mismo, se adicionó un 10% del volumen de H_2O para que se llevara a cabo la hidrólisis.

En todos los casos, la reacción se siguió por HPLC y CCF para monitorizar el consumo del sustrato. Las reacciones se dejaron hasta un tiempo final de 144 horas (6 días).

Los resultados se muestran en la

Tabla **24**.



Esquema 15. Reacción desacetilación de β -D-galactosa peracetilada catalizada por lipasas.

Tabla 24. Desacetilación de β -D-galactosa peracetilada catalizada por lipasas inmovilizadas en nanofibras de carbono en disolventes verdes. Los rendimientos están referidos a 6 días de reacción.

Enzima	Disolvente	Rendimiento (%)
CAL-B	Etanol	4
CAL-B	DMA3	0
CAL-B	THF	3
CAL-B	MeTHF	0
PSL	Etanol	51
PSL	DMA3	32
PSL	THF	0
PSL	MeTHF	0
CAL	Etanol	0
CAL	DMA3	0
CAL	THF	0
CAL	MeTHF	0

Tabla 25. Desacetilación de β -D-galactosa peracetilada catalizada por lipasas libres en en disolventes verdes. Los rendimientos están referidos a 48 horas de reacción.³⁹⁷

Enzima	Disolvente	Rendimiento (%)
CAL-B	Etanol	8
CAL-B	DMA3	3
CAL-B	THF	3
CAL-B	MeTHF	7
PSL	Etanol	58
PSL	DMA3	96
PSL	THF	15
PSL	MeTHF	25

Los rendimientos de esta reacción aparecen mostrados en la

Tabla 24. En ellos se puede observar como la única enzima que presenta unos resultados significativos es la PSL, únicamente con los solventes DMA3 y etanol, obteniendo un 32 y 51 % respectivamente de consumo del sustrato de partida.

Las otras lipasas CAL-B y CAL no presentaron buenos resultados. El problema fundamental puede derivar de un escaso reconocimiento del sustrato. Además, debemos tener en cuenta que, al emplear solventes como el MeTHF o el THF, se formaban dos fases, donde la nanofibra se quedaba embebida dentro de la fase acuosa. A pesar de que la reacción se llevaba a cabo bajo una enérgica agitación, en algunos casos puede darse la situación en la cual no se favorezca una correcta difusión del sustrato (muy hidrófobo, y que quedaba mayoritariamente disuelto en la fase orgánica) hacía las nanofibras con las lipasas inmovilizadas (mayoritariamente en la fase acuosa). Esto podría explicar porque los mejores resultados se han obtenido en el caso de etanol y **DMA3**, miscible completamente con agua el primero y parcialmente miscible el segundo.

Para confirmar la estructura del compuesto mayoritario de cada reacción, se llevó a cabo una purificación mediante columna de sílice tal como se describe en el apartado III.2.4.3 de materiales y métodos. Los compuestos extraídos se analizaron por RMN. En todos los casos, el compuesto mayoritario extraído demostró la capacidad de la enzima hacía la hidrólisis regioselectiva de la posición anomérica del azúcar. Estos compuestos resultan de gran interés puesto que presentan un importante papel como intermediarios en la síntesis de oligosacáridos y glicoconjugados.¹⁷⁴

IV.2.6.3. Inmovilización de lipasas en celite

En vista de que la lipasa PSL fue la única enzima que aportó algún resultado interesante en las reacciones de desacetilación utilizando el biocatalizador inmovilizado en nanofibras, decidimos probar un soporte más hidrofóbico como la

celite. La enzima se inmovilizó siguiendo las condiciones descritas en el apartado 3.5.5.1 Los resultados de la misma se presentan en la Tabla 26.

Tabla 26. Resultados de la inmovilización de PSL en celite.

Condiciones de inmovilización	Enzima inmovilizada (%)	Carga enzimática (mg enzima/g soporte)	Actividad enzimática	
			UI/mg	(%)
Enzima libre	-	-	93,43	100
100 minutos, pH 6.0	98	500	27,09	29

Tal como se observa en la Tabla 26, el rendimiento de la inmovilización respecto a la cantidad de enzima inmovilizada fue muy alto, obteniendo un valor del 98% tras 100 minutos de contacto. Así mismo, retiene un 29% de actividad comparado con la enzima libre.

Por ello, decidimos llevar a cabo las mismas reacciones de deacetilación que las reflejadas en el apartado anterior.

IV.2.6.3.1. Reacciones de desacetilación regioselectiva de azúcares peracetilados utilizando PSL inmovilizada en celite

Las condiciones de reacción se describen en el apartado III.2.6.6.

Como sustrato se empleó de nuevo β -D-Galactosa peracetilada, empleando como disolventes etanol, tetrahidrofurano, metiltetrahidrofurano y el solvente derivado de biomasa DMA3. Así mismo, se adicionó un 10% del volumen de H₂O para que se llevara a cabo la hidrólisis.

En todos los casos, la reacción se siguió por HPLC y CCF para monitorizar el consumo del sustrato. Las reacciones se dejaron hasta un tiempo final de 96 horas.

Los resultados se muestran en la Tabla 27.

Tabla 27. Desacetilación de β -D-galactosa peracetilada catalizada por PSL inmovilizada en celite en disolventes verdes. Los rendimientos están referidos a 96 horas de reacción.

Enzima	Disolvente (500 μ L)	Rendimiento (%)
PSL	Etanol	43
PSL	DMA3	51
PSL	THF	0
PSL	MeTHF	44

En este caso, los rendimientos fueron superiores a los encontrados con la enzima inmovilizada en nanofibras. Este hecho puede deberse al carácter hidrofóbico de este soporte, favoreciendo el contacto entre la enzima y el sustrato.

Sin embargo, a partir de las 48 horas de reacción, la regioselectividad de la enzima se vió variada con respecto a la enzima libre, encontrando la aparición de múltiples compuestos de deacetilación.

Se llevó a cabo la purificación y posterior caracterización del mayoritario, que resultó ser de nuevo el producto con la desacetilación en el carbono anomérico. Este hecho puede quizás deberse al propio proceso de inmovilización. En la bibliografía se encuentran trabajos donde se describe un fenómeno similar mediante el empleo de CAL-B inmovilizada en el soporte acrílico comercializado bajo la denominación Novozyme 435, donde el biocatalizador presentó regioselectividad en la hidrólisis del isómero *S* del éster (*R,S*) 2-*O*-butiril-*O*-fenilacético, mientras que la misma enzima inmovilizada sobre octil agarosa fue estereoselectiva hacia el isómero *R*.⁴¹⁸

En este caso, la enzima libre de PSL ha mostrado ser regioselectiva hacia la posición 1 de azúcares peracetilados mientras que la misma enzima inmovilizada (en celite) ha mostrado una preferencia a más de una posición de los azúcares, aunque el mayoritario fue de igual modo la posición 1.

IV.2.6.3.2. Estabilidad térmica de la enzima PSL inmovilizada en celite

Finalmente, dado que las reacciones implicaban tiempos de reacción largos, nos propusimos estudiar el efecto de la temperatura sobre la enzima PSL inmovilizada en celite. Para ello, se llevó a cabo la incubación tanto de la enzima inmovilizada como de la enzima libre a 37° y 50° C, siguiendo el protocolo descrito en el apartado III.2.6.9. Se midió su actividad a 0, 1,5, 24, 48, 85 y 120 horas, obteniéndose los resultados de la Figura 42 y Figura 43.

Como se puede observar, a 30 °C la enzima libre presenta una actividad retenida cercana al 56% frente al 25% de la enzima inmovilizada. No obstante, para el ensayo realizado a 50°C si apreciamos claramente como la enzima inmovilizada aporta un valor superior, mostrando una actividad retenida del 77% frente a la enzima libre (52%). Este fenómeno de incremento de la estabilidad en los biocatalizadores inmovilizados es un hecho común, que ya habíamos observado para el caso de otras enzimas inmovilizadas.

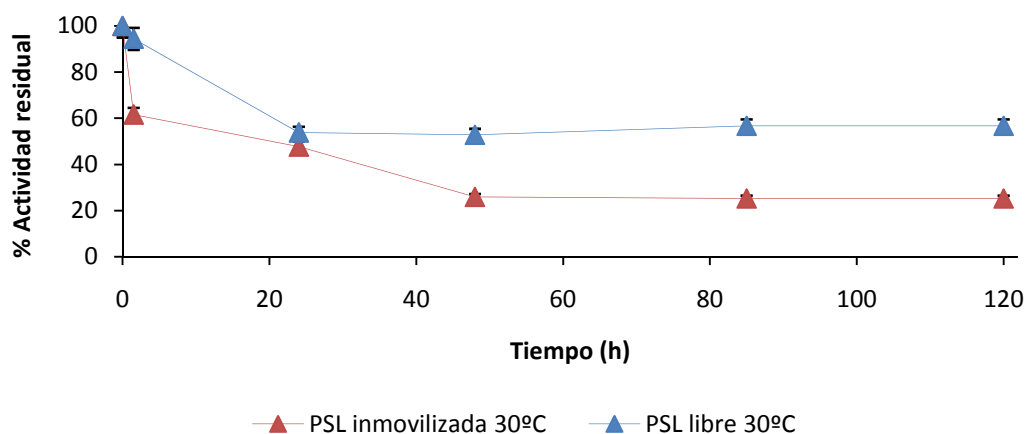


Figura 42. Estabilidad térmica de la enzima PSL libre e inmovilizada incubada en tampón fosfato de sodio 50 mM pH 6,00 a 37° durante 120 h.

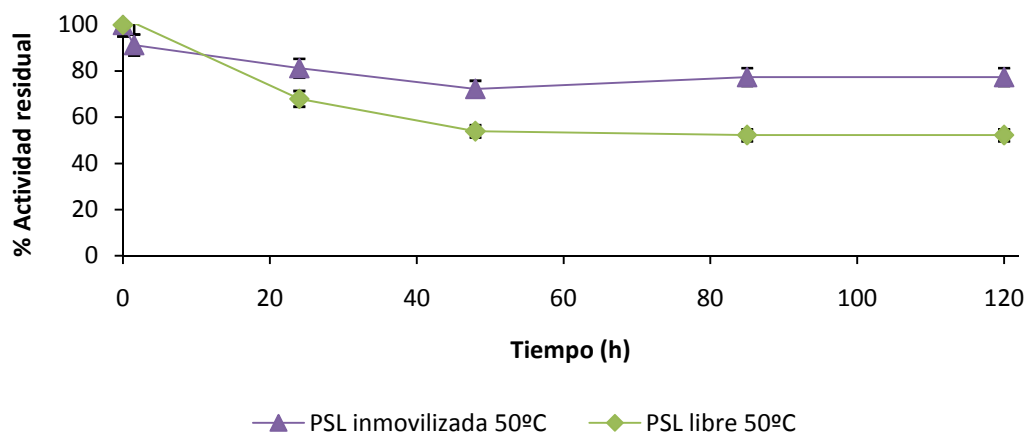


Figura 43. Estabilidad térmica de la enzima PSL libre e inmovilizada incubada en tampón fosfato de sodio 50 mM pH 6,00 a 50° durante 120 h.

IV.3. Capítulo 3. Estudio de las interacciones proteína-heparina y proteína-heparan sulfato

El estudio de las interacciones entre diversas proteínas, tales como la ATIII, y glicoconjugados de membrana como la heparina y el heparan sulfato ha sido ampliamente descrito en la bibliografía. Concretamente, la herramienta de SPR supone un importante modelo para el desarrollo de los mismos al mimetizar las condiciones celulares.

Sin embargo, resulta clave para este mimetismo la elección de la correcta metodología de inmovilización de las moléculas sobre la superficie del chip. Con este propósito, nos propusimos abordar el trabajo de inmovilización de heparina y heparan sulfato en un chip mediante dos metodologías diferentes. A continuación, y para poder valorar la influencia que pudiera tener esta diferencia, llevamos a cabo el estudio de la interacción entre el inmovilizado y dos proteínas.

IV.3.1.1. Análisis de interacción mediante SPR

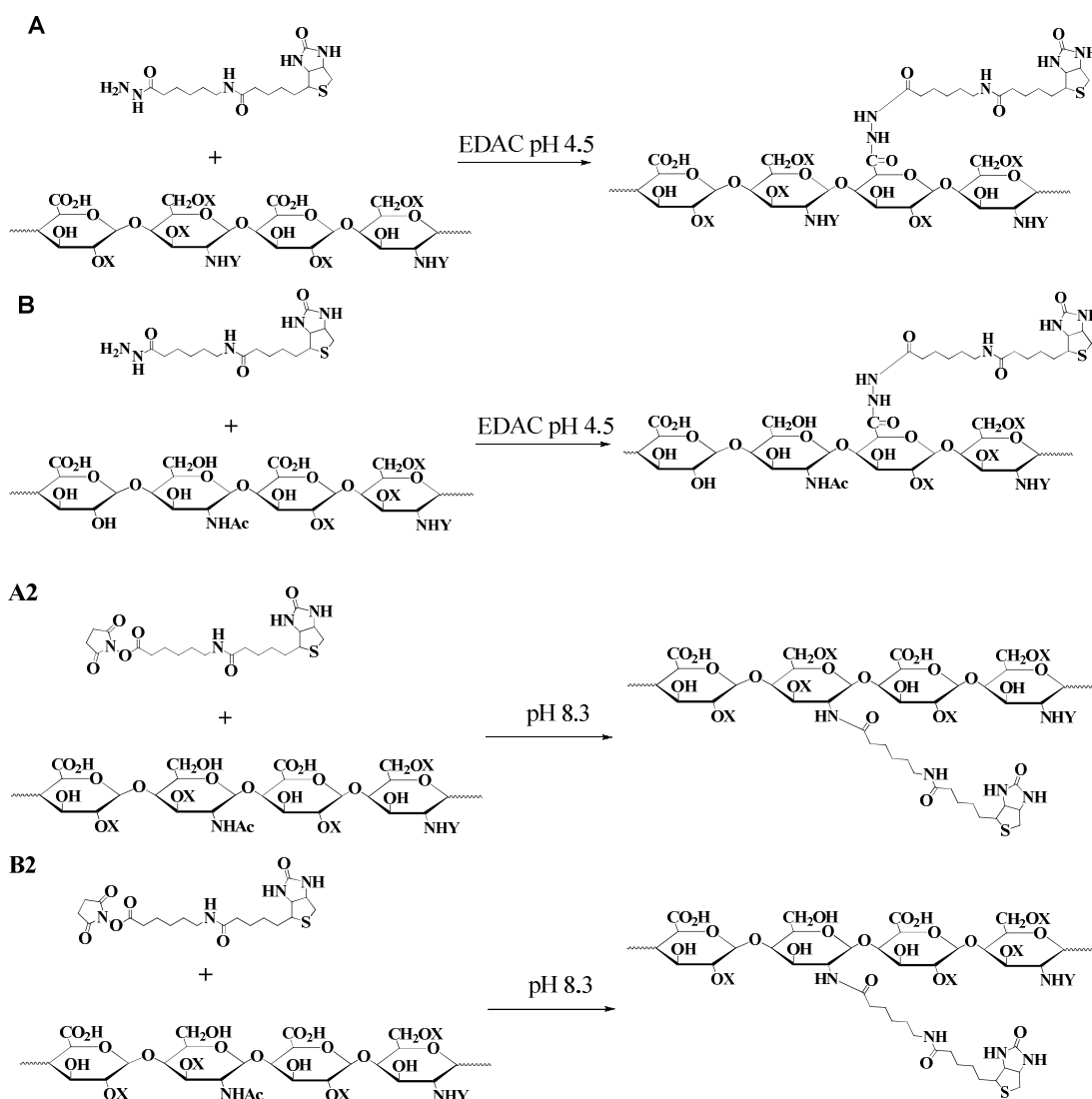
Empleando la técnica de SPR se llevó a cabo el análisis de la interacción de ATII con los glicoconjugados heparina y heparan sulfato. Para ello, lo primero que se realizó fue la funcionalización de HP y HS mediante dos técnicas de unión a biotina. El procedimiento se encuentra descrito en el apartado III.2.7.4.1.1. Partiendo de 4 tipos de moléculas (HP LMW, HP Celsus, HP Sigma y HS Celsus), se realizó la funcionalización a través de los grupos urónicos de la molécula o a través de la glucosamina. Creamos con ello dos conjuntos de moléculas, cuya inmovilización se realizó a través de dos zonas diferentes de la estructura molecular (Esquema 16).

A continuación, se llevó a cabo el proceso de inmovilización sobre la superficie de un chip SA, según la metodología del apartado III.2.7.4.1.2.2. La celda 1 fue empleada como referencia en todos los casos. Los resultados de este proceso se muestran en la Tabla 28.

Tabla 28. Resultados de la respuesta de inmovilización en unidades de resonancia (RU) para las diferentes moléculas.

	Biotina-LC-Hidrácida	NHS-LC-biotina
HP LMW	333	47
HP Celsus	686	360
HP Sigma	715	418
HS Celsus	842	172

Seguidamente, se llevaron a cabo los estudios de interacción por SPR, fluyendo las diferentes concentraciones de proteínas sobre el chip, tal y como se describe en el apartado III.2.7.4.1.2.3.



Esquema 16. Esquema de las moléculas de HS y HP funcionalizadas con biotina. A) Conjugación de heparina con biotina-LC-hidracida B) Conjugación de heparan sulfato con biotina-LC-hidracida; A2) Conjugación de heparina con NHS-LC-biotina. B2) Conjugación de heparan sulfato con NHS-LC-biotina. X=H o SO₃H; Y=CH₃CO o SO₃H

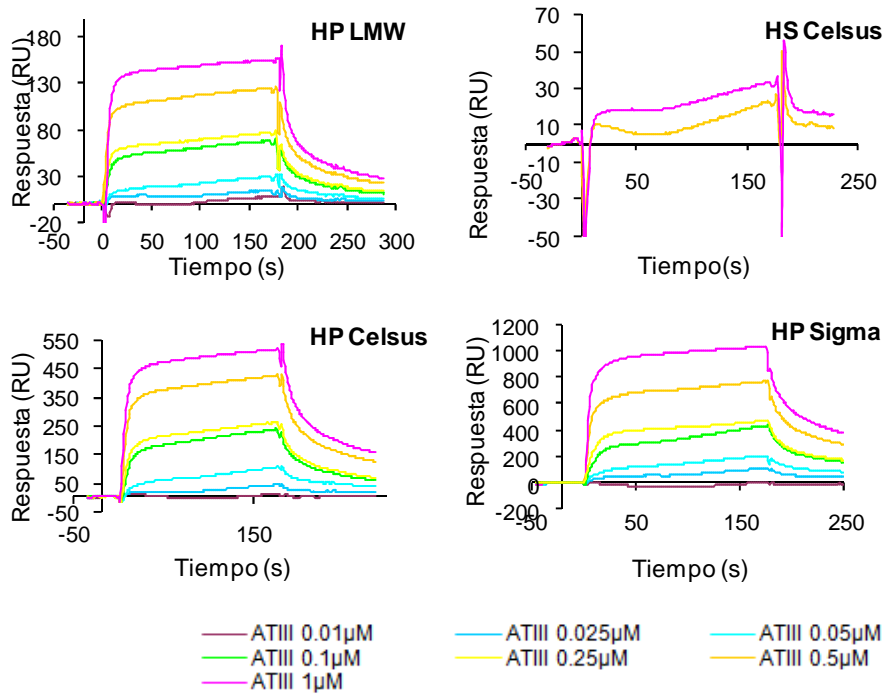


Figura 44. Sensogramas de SPR de la unión ATIII con HP/ HS inmovilizado mediante biotina-LC-hidracida, mostrando las fases de asociación y disociación.

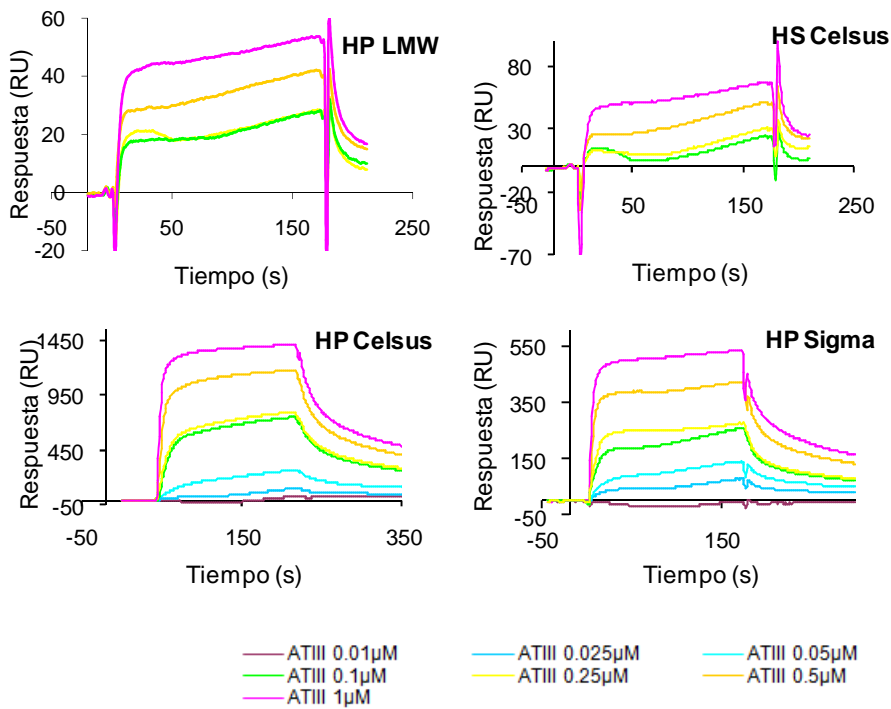


Figura 45. Sensogramas de SPR de la unión de ATIII con HP y HS inmovilizado mediante NHS-LC-biotina sobre un chip SA, mostrando las fases de asociación y disociación.

Los datos obtenidos en los sensogramas (Figura 44 y Figura 45) se ajustaron a un modelo de interacción uno-uno de Langmuir.⁴¹⁹

En la Tabla 29 se muestran los parámetros cinéticos obtenidos para estas interacciones. Las K_{DI} obtenidas, que se calcularon como k_{d1}/k_{a1} , estaban en el rango micromolar para todos los casos de las moléculas HP Celsus, HP LMW y HP Sigma, lo que denota una interacción muy parecida en ambos métodos de funcionalización. Por el contrario, la molécula HS Celsus muestra unas K_{DI} más elevadas en el caso de la inmovilización mediante biotina-LC-hidrazida comparada con la inmovilización mediante NHS-LC-biotina ($1,29 \times 10^{-5}$ y $1,48 \times 10^{-8}$ respectivamente), lo que implica que la unión es más débil en el primer caso.

Tabla 29. Determinación de los parámetros cinéticos de la interacción entre HP y HS inmovilizados y la proteína ATIII.

Molécula inmovilizada	Funcionalización	$k_{a1} (M^{-1}s^{-1})$	$k_{d1} (s^{-1})$	$K_A (M^{-1})$	$K_{DI} (M)$
HP LMW	Biotina-LC-hidracida	$6,53 \times 10^4$	$9,28 \times 10^{-3}$	$7,04 \times 10^6$	$1,42 \times 10^{-7}$
HP Celsus		$1,15 \times 10^5$	$1,70 \times 10^{-2}$	$6,75 \times 10^6$	$1,48 \times 10^{-7}$
HP Sigma		$8,99 \times 10^4$	$1,34 \times 10^{-2}$	$6,74 \times 10^6$	$1,48 \times 10^{-7}$
HS Celsus		$1,55 \times 10^2$	$2,00 \times 10^{-3}$	$7,75 \times 10^4$	$1,29 \times 10^{-5}$
HP LMW	NHS-LC-biotina	$7,07 \times 10^2$	$9,44 \times 10^{-6}$	$7,49 \times 10^7$	$1,33 \times 10^{-8}$
HP Celsus		$1,19 \times 10^5$	$1,77 \times 10^{-2}$	$6,72 \times 10^6$	$1,49 \times 10^{-7}$
HP Sigma		$1,44 \times 10^5$	$1,50 \times 10^{-2}$	$9,61 \times 10^6$	$1,04 \times 10^{-7}$
HS Celsus		$2,68 \times 10^2$	$3,95 \times 10^{-6}$	$6,78 \times 10^7$	$1,48 \times 10^{-8}$

Es conocido que la inmovilización a través de biotina suele llevar asociado un proceso de pérdida de la capacidad de reconocimiento de las moléculas de HP y HS debido, entre otras razones a la modificación del patrón de sulfatación, a una pérdida de flexibilidad de la molécula o bien a una restricción de la accesibilidad a los sitios de unión.³⁸¹

En nuestro caso, los niveles de inmovilización obtenidos fueron superiores a los encontrados en la bibliografía para estudios similares,³⁸¹ donde los autores reportan

un valor de 66 RU para la HP de Celsus, frente a nuestro valor de 686 RU con la misma metodología de inmovilización. Para la otra metodología, basada en grupos aminos, los mismos autores obtienen un valor de 52 RU frente a nuestro valor de 418 RU con la misma molécula.

Mediante las metodologías de inmovilización planteadas en nuestro trabajo, la biotilización se produce en el interior de la cadena del glicoconjugado. En el caso del empleo de biotina-LC-hidracida, la unión de la biotina puede darse de modo aleatorio a lo largo de toda la molécula en cualquier grupo de ácido urónico presente. En el caso del empleo de NHS-LC-hidracida, la unión con la biotina se restringe a posiciones con aminos libres. Esto puede llevar a que, en el caso del empleo del primer reactivo de funcionalización, la molécula quede unida de manera multipuntual, generando una superficie inmovilizada superior, lo cual concuerda con los valores superiores de RU de la inmovilización encontrados para este caso.

Referido al análisis de la interacción con proteínas, es bien sabido que el reconocimiento HP/HS-ATIII requiere de la presencia de un patrón de sulfatación definido en el glicoconjugado.^{370,378-379}

Cuando se lleva a cabo el análisis de la interacción de ATIII con HS, encontramos que la interacción es bastante débil. Esto podría encontrarse justificado por una posible modificación de la región de reconocimiento específico provocada por la inmovilización.³⁷⁸

Por contra, los resultados mostrados para la molécula de HP Celsus son muy superiores al resto. Es importante considerar que la molécula de HP Celsus se comercializa unida a un peptidoglicano. La presencia de este brazo podría generar un incremento de la flexibilidad de la molécula, mejorando con ello la capacidad de reconocimiento a la ATIII. Sin embargo, no se observan grandes diferencias en lo referido al cálculo de las constantes de interacción tal como se observa en la Tabla 29.

V. CONCLUSIONES

Una vez presentados los resultados obtenidos y considerando los objetivos propuestos en la realización de éste trabajo, se plantean las siguientes conclusiones:

1. Se ha llevado a cabo una búsqueda de microorganismos productores glicosidasas en una colección de 80 ejemplares. De las actividades obtenidas, se seleccionó una cepa con actividad α -glucosidasa, cuya producción es inducible por sacarosa y maltosa y presenta una elevada actividad en la hidrólisis de residuos de α -glucosa en condiciones mesófilas.
2. Se ha realizado un estudio de la cepa *Bacillus circulans* USA ATCC 31382, realizando la caracterización de su curva de crecimiento. Así mismo, se ha analizado la actividad actividad β -galactosidasa de dicha bacteria, obteniendo una actividad hidrolítica cuyas constantes catalíticas determinadas fueron de K_m 1,43 mM y V_{max} 0,012 mM s⁻¹. Así mismo, se llevó a cabo un estudio de optimización de los parámetros de reacción de pH, fuerza iónica y estudios de inducción de la expresión de la enzima, obteniéndose un pH óptimo de 6, una fuerza salina de hasta 200 mM y una ausencia de la inducción por la presencia de disacáridos.
3. Se ha estudiado la actividad de transglicosilación de la cepa americana de *Bacillus circulans* ATCC 31382, presentando un rendimiento máximo del 52 % en la síntesis del disacárido Gal- β (1-3)-GlcNAc a las 24h.
4. La cepa de *Bacillus circulans* ATCC 31382 se inmovilizó en matrices de agar y agarosa obteniéndose valores del 24,9 y 25,4 % de rendimiento hidrolítico respectivamente.
5. Se ha empleado el preparado comercial de β -galactosidasa de Biolacta N° 5 para llevar a cabo una semipurificación de la misma. Se obtuvieron dos fracciones enzimáticas mediante aislamiento por precipitación fraccionada con sulfato

-
- amónico y aislamiento por cromatografía de exclusión molecular. Ambas fracciones presentaban un contenido proteico diferente, así como distinta actividad hidrolítica. La fracción F_{s1} presentaba un contenido del 44,9% en proteínas, con una actividad de 32 UI/mg; la fracción F_{s2} presentó un contenido proteico del 68,4%, y una actividad hidrolítica de 13,5 UI/mg.
6. Se emplearon las fracciones F_{s1} y F_{s2} para llevar a cabo reacciones de transglucosilación en presencia de disolventes sostenibles como co-solventes de la reacción, como los derivados de biomasa. La fracción F_{s1} presentó una clara tendencia a la hidrólisis, mientras que la fracción F_{s2} se vio influenciada por la presencia en el medio de reacción de los co-solventes, favoreciendo la síntesis de Gal- β (1 \rightarrow 4)-GlcNAc, mientras que al utilizar disolventes sostenibles (DMA1, G1, GC7, GC8 y GC 11) se obtiene un cambio en la regioselectividad, favoreciendo el disacárido Gal- β (1 \rightarrow 6)-GlcNAc.
 7. Se llevó a cabo el estudio de inmovilización de la enzima β -Gal-3, clonada a partir de la cepa *Bacillus circulans* ATCC 31382 mediante tres estrategias diferentes: inmovilización en polímeros de glioxil agarosas; inmovilización en nanofibras de carbono; e inmovilización sobre polímeros fenólicos.
 8. La inmovilización sobre glioxil agarosas presentó excelentes resultados al emplear el soporte de agarosa al 10% de entrecruzamiento, con una actividad enzimática retenida del 85%. Al emplear agarosas funcionalizadas con grupos TEA, se obtuvieron interesantes resultados, con una actividad enzimática retenida del 53%.
 9. La enzima inmovilizada en el soporte agarosa-TEA se empleó para el estudio de la influencia del pH en la actividad hidrolítica, presentando una tendencia a estabilizar la enzima en pH básicos. Así mismo, se llevó a cabo la estabilidad térmica del complejo inmovilizado a 37°C y 50°C, obteniéndose una mejora de

la termostabilidad como resultado de la inmovilización. Así mismo, se valoró la actividad de transglicosilación del inmovilizado en un medio acuoso, y en presencia de **DMA1** y **[Bmin][PF₆]** como co-solventes del medio de reacción. Se obtuvo un rendimiento del 25%, 18,5% y 18,5% respectivamente para el disacárido Gal- β (1-3)-GlcNAc; y unos rendimientos de 43%, 26,1% y 14,51% respectivamente para el disacárido Gal- β (1-3)-GalNAc.

10. La inmovilización sobre nanofibras de carbono funcionalizadas con grupos carboxílo reportó los mejores resultados al realizarse la inmovilización a temperatura ambiente, pH 6,2, 5 horas de contacto y sin pretratamiento con isopropanol del soporte, aportando un resultado del 55,3% de actividad enzimática retenida.
11. La enzima inmovilizada en la nanofibra de carbono presentó de nuevo una tendencia a la estabilidad de la enzima en pH básicos. Así mismo, se llevó a cabo la estabilidad térmica del complejo inmovilizado a 37°C y 50°C, obteniéndose una mejora de la termostabilidad como resultado de la inmovilización. Finalmente, se valoró la actividad de transglicosilación del inmovilizado en un medio acuoso, y en presencia de **DMA1** y **[Bmin][PF₆]** como co-solventes del medio de reacción. Se obtuvo un rendimiento del 24%, 4,5% y 13,2% respectivamente para el disacárido Gal- β (1-3)-GlcNAc; y unos rendimientos de 8,4%, 10,5% y 3,05% respectivamente para el disacárido Gal- β (1-3)-GalNAc.
12. Finalmente, la enzima β -Gal-3 se inmovilizó en el soporte de polímero fenólico sintetizado. Este inmovilizado presentó una actividad retenida del 24,5% y un pH óptimo de 7.0. El estudio de su estabilidad térmica aportó una notable estabilización del complejo por la acción de la inmovilización.

-
13. Se empleó el complejo inmovilizado con el polímero fenólico para analizar la capacidad de transglicosilación de la enzima, obteniendo un 100% de rendimiento en la síntesis de Gal- β (1-3)-GlcNAc transcurridas 5 horas de reacción.
 14. Se llevó a cabo la expresión del enzima α -Fuc para su empleo como biocatalizador en la producción de los disacáridos α -L-Fuc-(1-3)- α -D-Glc-O-*p*NF, α -L-Fuc-(1-2)- α -D-Glc-O-*p*NF y α -L-Fuc-(1-3)- α -D-Fuc-O-*p*NF.
 15. El empleo de disolventes sostenibles como co-solventes de la reacción de transglicosilación generó una modificación en el rendimiento de la reacción, mediante una modificación en la regioselectividad de la enzima. La presencia de **G2** provocó una disminución del rendimiento de la reacción con un consumo total del donador del 54%; la presencia de **G3** provocó el desplazamiento a la síntesis exclusiva del producto α -L-Fuc-(1-2)- α -D-Glc-O-*p*NF, con un rendimiento en la síntesis del mismo del 67% ; la presencia de **GC4** generó la formación exclusiva del producto autocondensado α -L-Fuc-(1-3)- α -D-Fuc-O-*p*NF, con un rendimiento del mismo del 96%; finalmente, la presencia de **DMA1** anuló prácticamente la reacción de transglicosilación, con un consumo total del donador del 6 %.
 16. La presencia de LIs en el medio de reacción se analizó mediante el empleo de los mismos como co-solventes a una concentración final del 30%. En todos los casos se obtuvo una escasa actividad sintética, con un 90% de donador no consumido al tiempo final de reacción.
 17. Se ha estudiado el efecto de la presencia de co-solventes (derivado de biomasa **DMA1** y **GC4** sobre la estructura de la enzima α -Fuc, mediante técnicas de espectroscopía de fluorescencia. Se ha concluido que en concentración 2 M,

estos co-solventes causan modificaciones estructurales que podrían justificar los efectos observados en la reacción de transglicosilación.

18. Se valoró la actividad de las lipasas CALB, CAL y PSL en la capacidad de desacetilación regioselectiva de β -D-Galactosa peracetilada. Para ello, dichas enzimas fueron inmovilizadas en nanofibras de carbono con grupos carboxilo.
19. En el estudio realizado para la enzima CAL, se obtuvieron las mejores condiciones de inmovilización empleando un pH de 6,2, 24 horas de contacto y las nanofibras con pretratamiento con isopropanol. Este soporte inmovilizado se empleó en la reacción de desacetilación, pero no se obtuvo ningún resultado positivo.
20. Se realizó el estudio de la inmovilización de la enzima CALB en nanofibras de carbono, obteniéndose las mejores condiciones con un pH de 7,5, 17 horas de contacto y las nanofibras sometidas a pretratamiento con isopropanol. Se empleó el biocatalizador inmovilizado en las reacciones de desacetilación, obteniéndose un rendimiento del 4% y 3% mediante el empleo de etanol y THF como solventes de la reacción.
21. Finalmente, la enzima PSL se inmovilizó en las nanofibras de carbono, siendo sus mejores condiciones un pH de 6,2, 5 horas de contacto y no pretratamiento realizado. Dicho soporte se empleó en las reacciones de desacetilación, con unos rendimientos del 51% y 32% mediante el empleo de etanol y **DMA3** como solventes de la misma.
22. Se llevó a cabo la caracterización del producto de la reacción de deacetilación. En ambos casos, se determinó que ambas enzimas eran capaces de llevar a cabo la hidrólisis regioselectiva sobre la posición anomérica del azúcar peracetilado.

23. La enzima PSL se inmovilizó en el soporte Celite 435®, reportando una actividad hidrolítica retenida del 29%. Este complejo inmovilizado se empleó para la desacetilación de la β -D-Galactosa peracetilada. Los resultados obtenidos demostraron la capacidad del complejo de hidrolizar regioselectivamente la posición anomérica del azúcar, con importantes rendimientos al emplear **DMA3** como solvente de la reacción. El complejo inmovilizado presentó una alta estabilización térmica.
24. Se ha llevado a cabo un estudio de interacción entre HP y HS, inmovilizados mediante diferentes metodologías de funcionalización con biotina, y las proteínas ATIII mediante la técnica de SPR. Los resultados demuestran que la influencia para la interacción de la presencia de la secuencia de reconocimiento, así como la mejora en la afinidad al emplear la HP de Celsus debido a su brazo espaciador.

VI. BIBLIOGRAFÍA

VI. Bibliografía

1. Lingwood, C. A. (1998). "Oligosaccharide receptors for bacteria: a view to a kill." *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2(6): 695-700.
2. Schmidt, M. A., Riley, L. W. and Benz, I. (2003). "Sweet new world: glycoproteins in bacterial pathogens." *Trends Microbiol.* 11: 554-561.
3. Rudd, P. M., Wormald, M. R. and Dwek, R. A. (2004). "Sugar-mediated ligand-receptor interactions in the immune system." *Trends Biotechnol.* 22(10): 524-530.
4. Varki, A. (1993). "Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct." *Glycobiology* 3(2): 97-130.
5. Dwek, R. A. (1996). "Glycobiology: toward understanding the function of sugars." *Chem. Rev.* 96(2): 683-720.
6. Imberty, A. and Varrot, A. (2008). "Microbial recognition of human cell surface glycoconjugates." *Curr. Opin. Struct. Biol.* 18: 567-576.
7. Heimbürg-Molinari, J., Lum, M., Vijay, G., Jain, M., Almogren, A. and Rittenhouse-Olson, K. (2011). "Cancer vaccines and carbohydrate epitopes." *Vaccine* 29(48): 8802-8826.
8. Van den Akker, F., Steensma, E. and Hol, W. (1996). "Tumor marker disaccharide D-Gal- β (1-3)-GalNAc complexed to heat-labile enterotoxin from *Escherichia coli*." *Prot. Sci.* 5: 1184-1188.
9. Springer, G. F. (1984). "T and Tn, general carcinoma autoantigens." *Science* 224: 1198-1206
10. Hölemann, A., Seeberger, P.H. (2004). "Carbohydrate diversity: synthesis of glycoconjugates and complex carbohydrates." *Curr. Opin. Biotechnol.* 15: 615-622.
11. Springer, G. F., Desai, P. R., Wise, W., Carlstedt, S. C., Tegtmeyer, H., Stein, R. and Scanlon, E. F. (1990). "Pancarcinoma T and Tn epitopes: autoimmunogens and diagnostic markers that reveal incipient carcinomas and help establish prognosis." *Immunol. Ser.* 53: 587-612.
12. Hakomori, S. (2001). "Tumor-associated carbohydrate antigens defining tumor malignancy: basis for development of anti-cancer vaccines." *Adv. Exp. Med. Biol.* 491: 369-402.
13. Ragupathi, G., Damani, P., Srivastava, G., Srivastava, O., Sucheck, S., Ichikawa, Y. and Livingston, P. (2009). "Synthesis of sialyl Lewis A (sLea, CA19-9) and construction of an immunogenic sLeA vaccine." *Cancer Immunol. Immunother.* 58(9): 1397-1405.
14. Ravindranath, M. H., Amiri, A. A., Bauer, P. M., Kelley, M. C., Essner, R. and Morton, D. L. (1997). "Endothelial-selectin ligands sialyl Lewis(x) and sialyl Lewis(a) are differentiation antigens immunogenic in human melanoma." *Cancer* 79(9): 1686-1697.

15. Ugorski, M. and Laskowska, A. (2002). "Sialyl Lewis(a): a tumor-associated carbohydrate antigen involved in adhesion and metastatic potential of cancer cells." *Acta Biochim. Pol.* 49(2): 303-311.
16. Takada, A., Ohmori, K., Yoneda, T., Tsuyuoka, K., Hasegawa, A., Kiso, M. and Kannagi, R. (1993). "Contribution of carbohydrate antigens sialyl Lewis A and sialyl Lewis X to adhesion of human cancer cells to vascular endothelium." *Cancer Res.* 53(2): 354-361.
17. Monzavi-Karbassi, B., Cunto-Amesty, G., Luo, P., Shamloo, S., Blaszyk-Thurin, M. and Kieber-Emmons, T. (2001). "Immunization with a carbohydrate mimicking peptide augments tumor-specific cellular responses." *Int. Immunol.* 13(11): 1361-1371.
18. Murata, T. and Usui, T. (2006). "Enzymatic synthesis of oligosaccharides and neoglycoconjugates." *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70(5): 1049-1059.
19. Li, Z., Willke, R. J., Pinto, L. A., Rittenhouse, B. E., Rybak, M. J., Pleil, A. M., Crouch, C. W., Hafkin, B. and Glick, H. A. (2001). "Comparison of length of hospital stay for patients with known or suspected methicillin-resistant *Staphylococcus* species infections treated with linezolid or vancomycin: a randomized, multicenter trial." *Pharmacotherapy* 21(3): 263-274
20. Rubinstein, E., Cammarata, S. K., Oliphant, T. H. and Wunderink, R. G. (2001). "Linezolid (PNU-100766) versus vancomycin in the treatment of hospitalized patients with nosocomial pneumonia: a randomized, double-blind, multicenter study." *Clin. Infect. Dis.* 32(3): 402-412.
21. Sears, P. and Wong, C.-H. (1998). "Mechanism-based inhibition of carbohydrate-mediated biological recognitions." *Chem. Commun.*(11): 1161-1170.
22. Yarema, K. J. and Bertozzi, C. R. (1998). "Chemical approaches to glycobiology and emerging carbohydrate-based therapeutic agents." *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2(1): 49-61
23. Bertozzi, C. R. and Kiessling, L. L. (2001). "Chemical Glycobiology." *Science* 291(5512): 2357-2364.
24. Rudd, P. M., Elliott, T., Cresswell, P., Wilson, I. A. and Dwek, R. A. (2001). "Roles for glycosylation in the immune system." *Science* 291: 2370-2376.
25. Dube, D. H. and Bertozzi, C. R. (2005). "Glycans in cancer and inflammation - potential for therapeutics and diagnostics." *Nat. Rev. Drug. Discov.* 4(6): 477-488.
26. Bernardi, A. and Cheshev, P. (2008). "Interfering with the sugar code: design and synthesis of oligosaccharide mimics." *Chem. Eur. J.* 14(25): 7434-7441.
27. Schimdt, R. and Michel, R. (1986). "Divinylglycole zur synthese von desoxyhexosen- synthese der D-bzw. L-Chalcose." *Angew. Chem. Int. Ed.* 98: 213-236.
28. Mammen, M., Choi, S.-K., Whitesides, G. M. (1998). "Polyvalent interactions in biological systems: implications for design and use of multivalent ligands and inhibitors." *Angew. Chem. Int. Ed.* 37: 2754-2794
29. Kiessling, L. L., Gestwicki, J. E., Strong, L. E. (2000). "Synthetic multivalent ligands in the exploration of cell-surface interactions." *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4: 696-703.

30. Nicolaou, K. C., Mitchell, H. J. (2001). "Adventures in carbohydrate chemistry: new synthetic technologies, chemical synthesis, molecular design, and chemical biology" *Angew. Chem. Int. Ed.* 40: 1576-1624.
31. Houseman, B. and Mrksich, M. (2002). "Model systems for studying polyvalent carbohydrate binding interactions." *Host-Guest Chemistry*. S. Penadés, Springer Berlin Heidelberg. 218: 1-44.
32. Weijers, C. A. G., Franssen, M. C. R. and Visser, G. M. (2008). "Glycosyltransferase-catalyzed synthesis of bioactive oligosaccharides." *Biotechnol. Adv.* 26(5): 436-456.
33. Plante, O., Palmacci, E. and Seeberger, P. (2001). "Automated solid-phase synthesis of oligosaccharides." *Science* 291: 1523-1527.
34. Palmacci, E., Plante, O., Hewitt, M. and Seeberger, P. (2003). "Automated synthesis of oligosaccharides." *Helv. Chim. Acta* 86: 3975-3990.
35. Seeberger, P. (2003). "Automated carbohydrate synthesis to drive chemical glycomics." *Chem. Commun.*: 1115-1121.
36. Unverzagt, C. (2003). "Synthesis of a core trisaccharide as a versatile building block for *N*-glycans and glycoconjugates." *Chem. Eur. J.* 9: 1369-1376.
37. Weiss, H. and Unverzagt, C. (2003). "Highly branched oligosaccharides: a general strategy for the synthesis of multiantennary *N*-glycans with a bisected motif." *Angew. Chem. Int. Edit.* 42: 4261-4263.
38. Seeberger, P. H. (2008). "Automated carbohydrate synthesis as platform to address fundamental aspects of glycobiology - current status and future challenges." *Carbohydr. Res.* 343: 1889-1896.
39. Crout, D. H. G. and Vic, G. (1998). "Glycosidases and glycosyl transferases in glycoside and oligosaccharide synthesis." *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2(1): 98-111.
40. Sasaki, A., Ishimizu, T., Geyer, R. and Hase, S. (2005). "Synthesis of β -mannosides using the transglycosylation activity of endo- β -mannosidase from *Lilium longiflorum*." *FEBS J.* 272(7): 1660-1668.
41. Zeng, Y., Wang, J., Li, B., Hauser, S., Li, H. and Wang, L.-X. (2006). "Glycopeptide synthesis through endo-glycosidase catalyzed oligosaccharide transfer of sugar oxazolines: probing substrate structural requirement." *Chem. Eur. J.* 12(12): 3355-3364.
42. Faijes, M. and Planas, A. (2007). "In vitro synthesis of artificial polysaccharides by glycosidases and glycosynthases." *Carbohydr. Res.* 342(12-13): 1581-1594.
43. Hommalai, G., Withers, S. G., Chuenchor, W., Cairns, J. R. K. and Svasti, J. (2007). "Enzymatic synthesis of cello-oligosaccharides by rice β -glucosidase glycosynthase mutants." *Glycobiology* 17(7): 744-753.
44. Vocadlo, D. J. and Davies, G. J. (2008). "Mechanistic insights into glycosidase chemistry." *Curr. Opin. Chem. Biol.* 12(5): 539-555.
45. Bojarova, P. and Kren, V. (2009). "Glycosidases: a key to tailored carbohydrates." *Trends Biotechnol.* 27(4): 199-209.
46. Gambert, U. and Thiem, J. (1997). "Chemoenzymatic synthesis of the Thomsen-Friedenreich antigen determinant." *Carbohydr. Res.* 299(1-2): 85-89.
47. Gonzalez Lio, R. and Thiem, J. (1999). "Chemoenzymatic synthesis of spacer-linked oligosaccharides for the preparation of neoglycoproteins." *Carbohydr. Res.* 317(1-4): 180-190.

48. Koeller, K. M., Smith, M. E. B., Wong, C-H. (2000). "Chemoenzymatic synthesis of PSGL-1 glycopeptides: Sulfation on tyrosine affects glycosyltransferase-catalyzed synthesis of the *O*-glycan." *Bioorg. Med. Chem.* 8: 1017-1025.
49. Yan, F., Mehta, S., Eichler, E., Wakarchuk, W. and Whitfield Dennis, M. (2004). "Chemoenzymatic synthesis of lactosamine and $\alpha(2-3)$ sialylated lactosamine building blocks. Synthesis of carbohydrates through biotechnology" *J. Amer. Chem. Soc.* 873: 53-72.
50. Ueki, A., Takano, Y., Kobayashi, A., Nakahara, Y. and Hojo, H. (2010). "Solid-phase synthesis of glycopeptide carrying a tetra-*N*-acetyllactosamine-containing core 2 deca-saccharide." *Tetrahedron* 66(9): 1742-1759.
51. Yu, H., Thon, V., Lau, K., Cai, L., Chen, Y., Mu, S., Li, Y., Wang, P. G. and Chen, X. (2010). "Highly efficient chemoenzymatic synthesis of β 1-3-linked galactosides." *Chem. Commun.* 46(40): 7507-7509.
52. Bröder, W. and Kunz, H. (1993). "A new method of anomeric protection and activation based on the conversion of glycosyl azides into glycosyl fluorides." *Carbohydr. Res.* 249(1): 221-241.
53. Fukase, K., Yasukochi, T., Nakai, Y. and Kusumoto, S. (1996). "*p*-Nitrophenyl group for anomeric protection of oligosaccharides, selective oxidative cleavage via *p*-acetamidophenyl glycosides." *Tetrahedron Lett.* 37(19): 3343-3344.
54. Dasgupta, S. and Nitz, M. (2011). "Use of *N,O*-dimethylhydroxylamine as an anomeric protecting group in carbohydrate synthesis." *J. Org. Chem.* 76(6): 1918-1921.
55. Paulsen, H. (1982). "Advances in selective chemical syntheses of complex oligosaccharides." *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 21(3): 155-173.
56. Schimdt, R. and Michel, R. (1980). "Einfache synthese von α - und β -*O*-glycosylimidaten. Herstellung von glycosiden und disacchariden." *Angew. Chem. Int. Ed* 92: 763-765
57. Tietze, L., Fischer, F. and Guder, R. (1982). "Stereoselective synthesis of protected 1-*O*-trimethylsilyl- α -D-glucopyranoside." *Synthesis*: 946.
58. Wang, C. C., Lee, J. C., Luo, S. Y., Kulkarni, S. S., Huang, Y. W., Lee, C. C., Chang, K. L. and Hung, S. C. (2007). "Regioselective one-pot protection of carbohydrates." *Nature* 446(7138): 896-899.
59. Wang, P. G. (2007). "Sugars synthesized in a snap." *Nat. Chem. Biol.* 3(6): 309-310.
60. Boltje, T. J., Buskas, T. and Boons, G.-J. (2009). "Opportunities and challenges in synthetic oligosaccharide and glycoconjugate research." *Nat. Chem.* 1(8): 611-622.
61. Böhm, G. and Waldmann, H. (1995). "Synthesis of glycosides of fucose under neutral conditions in solutions of LiClO₄ in organic solvents." *Tetrahedron Lett.* 36(22): 3843-3846.
62. Anastas, P. T. and Warner, J. C. (1998). *Green chemistry: theory and practice*. Oxford University Press. New York.
63. Sheldon, R. A. and van Rantwijk, F. (2004). "Biocatalysis for sustainable organic synthesis." *Aust. J. Chem.* 57(4): 281-289.

64. Alcalde, M., Ferrer, M., Plou, F. J. and Ballesteros, A. (2006). "Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes." *Trends Biotechnol.* 24: 281-287.
65. Perugini, G., Trincone, A., Rossi, M. and Moracci, M. (2004). "Oligosaccharide synthesis by glycosynthases." *Trends Biotechnol.* 22(1): 31-37.
66. Blanchard, J. E. and Withers, S. G. (2001). "Rapid screening of the aglycone specificity of glycosidases: applications to enzymatic synthesis of oligosaccharides." *Chem. Biol.* 8(627-633).
67. Vasella, A., Davies, G. J. and Bohm, M. (2002). "Glycosidase mechanisms." *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6(5): 619-629.
68. Hinou, H. and Nishimura, S. I. (2009). "Mechanism-based probing, characterization, and inhibitor design of glycosidases and glycosyltransferases." *Curr. Top. Med. Chem.* 9(1): 106-116.
69. Henrissat, B., Davies, G. (1997). "Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases." *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7: 637-644.
70. Giordano, A., Andreotti, G., Tramice, A. and Trincone, A. (2006). "Marine glycosyl hydrolases in the hydrolysis and synthesis of oligosaccharides." *Biotechnol. J.* 1(5): 511-530.
71. Trincone, A. and Giordano, A. (2006). "Glycosyl hydrolases and glycosyltransferases in the synthesis of oligosaccharides." *Curr. Org. Chem.* 10(10): 1163-1193.
72. Withers, S. G. and Aebersold, R. (1995). "Approaches to labeling and identification of active site residues in glycosidases." *Protein Sci.* 4(3): 361-372.
73. Gijzen, H. J. M., Qiao, L., Fitz, W. and Wong, C. H. (1996). "Recent advances in the chemoenzymatic synthesis of carbohydrates and carbohydrate mimetics." *Chem. Rev.* 96(1): 443-473.
74. Daines, A. M., Maltman, B. A. and Flitsch, S. L. (2004). "Synthesis and modifications of carbohydrates, using biotransformations." *Curr. Opin. Chem. Biol.* 8(2): 106-113.
75. Moracci, M., Trincone, A. and Rossi, M. (2001). "Glycosynthases: new enzymes for oligosaccharide synthesis." *J. Mol. Catal. B. Enzym.* 11(4-6): 155-163.
76. Zeng, X. and Uzawa, H. (2005). "Convenient enzymatic synthesis of a *p*-nitrophenyl oligosaccharide series of sialyl *N*-acetylglucosamine, sialyl Le^x and relevant compounds." *Carbohydr. Res.* 340(16): 2469-2475.
77. Turner, P., Svensson, D., Adlercreutz, P. and Karlsson, E. N. (2007). "A novel variant of *Thermotoga neapolitana* β-glucosidase B is an efficient catalyst for the synthesis of alkyl glucosides by transglycosylation." *J. Biotechnol.* 130(1): 67-74.
78. Li, W., Xiang, X., Tang, S., Hu, B., Tian, L., Sun, Y., Ye, H. and Zeng, X. (2009). "Effective enzymatic synthesis of lactosucrose and its analogues by β-D-galactosidase from *Bacillus circulans*." *J. Agric. Food Chem.* 57(9): 3927-3933.
79. Ashida, H., Ozawa, H., Fujita, K., Suzuki, S. and Yamamoto, K. (2010). "Synthesis of mucin-type *O*-glycopeptides and oligosaccharides using transglycosylation and reverse-hydrolysis activities of *Bifidobacterium* endo-α-*N*-acetylgalactosaminidase." *Glycoconjugate. J.* 27(1): 125-132.

80. Vetere, A. and Paoletti, S. (1996). "High-yield synthesis of *N*-acetylglucosamine by regioselective transglycosylation." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 219(1): 6-13.
81. Nieder, V., Marx, S. P., Gallego, R. G., Kamerling, J. P., Vliegthart, J. F. G. and Elling, L. (2003). "Synthesis of nucleotide-activated disaccharides with β -galactosidase from *Bacillus circulans* and α -galactosidase from *Bifidobacterium adolescentis*." *J. Mol. Catal. B. Enzym.* 21(4-6): 157-166.
82. Murata, T., Hattori, T., Amarume, S., Koichi, A. and Usui, T. (2003). "Kinetic studies on endo- β -galactosidase by a novel colorimetric assay and synthesis of *N*-acetylglucosamine-repeating oligosaccharide β -glycosides using its transglycosylation activity." *Eur. J. Biochem.* 270(18): 3709-3719
83. Sandoval, M., Ferreras, E., Pérez-Sánchez, M., Berenguer, J., Sinisterra, J. V. and Hernaiz, M. J. (2012). "Screening of strains and recombinant enzymes from *Thermus thermophilus* for their use in disaccharide synthesis." *J. Mol. Cat. B: Enz.* 74: 162-169.
84. Crout, D. H. G. and Vic, G. (1998). "Glycosidases and glycosyl transferases in glycoside and oligosaccharide synthesis." *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2(1): 98-111.
85. Palcic, M. M. (1999). "Biocatalytic synthesis of oligosaccharides." *Curr. Opin. Biotechnol.* 10: 616-624.
86. Scigelova, M., Singh, S., Crout, D.H.G. (1999). "Glycosidases - a great synthetic tool." *J. Mol. Cat. B: Enzymatic.* 6: 483-494.
87. Harrison, J. A., Kartha, K. P. R., Turnbull, W. B., Scheuerl, S. L., Naismith, J. H., Schenkman, S., Field, R. A. (2001). "Hydrolase and sialyltransferase activities of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase towards NeuAc- α -2,3-Gal- β -O-PNP." *Bioorg. Med. Chem. Lett* 11: 141-144.
88. Bergey, D. H., Boone, D. R., Garrity, G. M., Castenholz, R. W., Brenner, D. J., Krieg, N. R. and Staley, J. T. (2001). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Firmicutes*. Springer-Verlag New York.
89. Song, J., Abe, K., Imanaka, H., Imamura, K., Minoda, M., Yamaguchi, S. and Nakanishi, K. "Causes of the production of multiple forms of β -galactosidase by *Bacillus circulans*." *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75(2): 268-278.
90. Ito, Y. and Sasaki, T. (1997). "Cloning and characterization of the gene encoding a novel β -Galactosidase from *Bacillus circulans*." *Bios. Biotech. Biochem.* 61(8): 1270-1276
91. Fujimoto, H., Miyasato, M., Ito, Y., Sasaki, T. and Ajisaka, K. (1998). "Purification and properties of recombinant β -galactosidase from *Bacillus circulans*." *Glycoconjugate. J.* 15(2): 155-160.
92. Miyasato, M. and Ajisaka, K. (2004). "Regioselectivity in β -galactosidase-catalyzed transglycosylation for the enzymatic assembly of D-galctosyl-D-mannose." *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68(10): 2086-2090.
93. Rapoport, E., Khaidukov, S., Baidina, O., Bojenko, V., Moiseeva, E., Pasyrina, G., Karsten, U., Nifant'ev, N., LePendou, J. and Bovin, N. (2003). "Involvement of the Gal- β (1-3)-GalNac β structure in the recognition of apoptotic bodies by THP-1 cells." *Eur. J. Cell. Biol.* 82(6): 295-302.

94. Caines, M. E. C., Zhu, H., Vuckovic, M., Willis, L. M., Withers, S. G., Wakarchuk, W. W. and Strynadka, N. C. J. (2008). "The structural basis for T-antigen hydrolysis by *Streptococcus pneumoniae*." *J. Biol. Chem.* 283(46): 31279-31283.
95. Shirato, H., Ogawa, S., Ito, H., Sato, T., Kameyama, A., Narimatsu, H., Xiaofan, Z., Miyamura, T., Wakita, T., Ishii, K. and Takeda, N. (2008). "Noroviruses distinguish between type 1 and type 2 histo-blood group antigens for binding." *J. Virol.* 82(21): 10756-10767.
96. Mandal, P. K. and Turnbull, W. B. (2010). "Studies on the synthesis of Lewis-y oligosaccharides." *Carbohydr. Res.* 346(14): 2113-2120.
97. Lemieux, R. U. and Driguez, H. (1975). "Chemical synthesis of 2-acetamido-2-deoxy-4-O-(α -L-fucopyranosyl)-3-O-(β -D-galactopyranosyl)-D-glucose. Lewis a blood-group antigenic determinant." *J. Am. Chem. Soc.* 97(14): 4063-4069.
98. Schmidt, R. R. and Rücker, E. (1980). "Stereoselective glycosidations of uronic acids." *Tetrahedron Lett.* 21(15): 1421-1424.
99. Khare, D. P., Hindsgaul, O. and Lemieux, R. U. (1985). "The synthesis of monodeoxy derivatives of lacto-N-biose I and N-acetyl-lactosamine to serve as substrates for the differentiation of α -L-fucosyltransferases." *Carbohydr. Res.* 136(0): 285-308.
100. Schmidt, R. R. (1986). "New methods for the synthesis of glycosides and oligosaccharides- are there alternatives to de Koenigs-Knorr method?" *Angew. Chem. Int. Ed.* 25: 212-235.
101. Wilstermann, M. and Magnusson, G. (1995). "Synthesis of disaccharide glycosyl donors suitable for introduction of the β -D-Gal p-(1-3)- α -and- β -d-Gal pNAC groups." *Carbohydr. Res.* 272(1): 1-7.
102. Hedbys, L., Johansson, E., Mosbach, K., Larsson, P. O., Gunnarsson, A., Svensson, S. and Lonn, H. (1989). "Synthesis of Gal- β -1-3-GlcNac and gal- β -1-3-GlcNac-set by an enzymatic method comprising the sequential use of beta-galactosidases from bovine testes and *Escherichia coli* " *Glycoconjugate. J.* 6(2): 161-168.
103. Gambert, U., Lio, R. G., Farkas, E., Thiem, J., Bencomo, V. V. and Liptak, A. (1997). "Galactosylation with β -galactosidase from bovine testes employing modified acceptor substrates." *Bioorg. Med. Chem.* 5(7): 1285-1291.
104. Schroder, S., Schmidt, U., Thiem, J., Kowalczyk, J., Kunz, M. and Vogel, M. (2004). "Synthesis of oligosaccharides as potential novel food components and upscaled enzymatic reaction employing the β -galactosidase from bovine testes." *Tetrahedron* 60(11): 2601-2608.
105. Gambert, U. and Thiem, J. (1997). "Chemoenzymatic synthesis of the Thomsen-Friedenreich antigen determinant." *Carbohydr. Res.* 299(1-2): 85-89.
106. Bayón, C., Cortés-Cabrera, A., Aires-Trapote, A., Civera, C., Hernáiz, M.J. (2013) "Highly efficient and regioselective enzymatic synthesis of β -1-3 galactosides in biosolvents." *RSC Adv.* 3: 12155-12163
107. Bayón C., Cortés A., Berenguer J. and Hernáiz M.J. (2013) "Highly efficient synthesis of Gal β (1-3)-GalNac and Gal β -(1-3)-GlucNac in ionic liquids. *Tetrahedron.* 69:4973-4978.

108. Yanahira, S. Kobayashi, T. Suguri, T. Nakakoshi, M. Miura, S. Ishikawa, H. Nakajima, I. (1995) "Formation of oligosaccharides from lactose by *Bacillus circulans* β -Galactosidase". *Bios. Biotech. Biochem.* 59, (6), 1021-1026.
109. Usui, T. Morimoto, S. Hayakawa, Y. Kawaguchi, M. Murata, T. Matahira, Y. Nishida, Y. (1996) "Regioselectivity of β -D-galactosyl-disaccharide formation using the β -D-galactosidase from *Bacillus circulans*". *Carbohydr. Res.* 285, 29-39.
110. Klisch, K. Jeanrond, E. Pang, P. C. Pich, A. Schuler, G. Dantzer, V. Kowalewski, M. P. Dell, A. (2008) "A tetraantennary glycan with bisecting *N*-acetylglucosamine and the Sd(a) antigen is the predominant *N*-glycan on bovine pregnancy-associated glycoproteins". *Glycobiology* 18, (1), 42-52.
111. Sangeetha, S. R. Appukuttan, P. S. (2005) "IgA1 is the premier serum glycoprotein recognized by human galectin-1 since T antigen Gal β (1 \rightarrow 3)GalNAc is far superior to non-repeating *N*-acetyl lactosamine as ligand". *Int. J. Biol. Macromol.* 35, (5), 269-276.
112. Sajdel-Sulkowska, E. M. Koibuchi, N. (2000) "Altered CD15 glycolipid expression in the developing rat cerebellum following treatment with antithyroid drug, propylthiouracil". *Endocr. J.* 47, (3), 353-358.
113. Malagolini, N. Chiricolo, M. Marini, M. Dall'Olio, F. (2009) "Exposure of α (2 \rightarrow 6) sialylated lactosaminic chains marks apoptotic and necrotic death in different cell types". *Glycobiology* 19, (2), 172-181.
114. Zeng, X. X. Yoshino, R. Murata, T. Ajisaka, K. Usui, T. (2000) "Regioselective synthesis of *p*-nitrophenyl glycosides of β -D-galactopyranosyl-disaccharides by transglycosylation with β -D-galactosidases". *Carbohydr. Res.* 325, (2), 120-131.
115. Vetere, A. Paoletti, S. (1996) "High-yield synthesis of *N*-acetyllactosamine by regioselective transglycosylation". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 219, (1), 6-13.
116. Li, J. Wang, P. G. (1997) "Chemical and enzymatic synthesis of glycoconjugates 2. High yielding regioselective synthesis of *N*-Acetyllactosamine by use of recombinant thermophilic glycosidases library". *Tetrahedron Lett.* 38, (46), 7967-7970.
117. Takayama, S. Shimazaki, M. Qiao, L. Wong, C.-H. (1996) "Synthesis of lactosamine derivatives using β -galactosidase from *Bacillus circulans*". *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 6, (10), 1123-1126.134
118. Mozaffar, Z. Nakanishi, K. Matsuno, R. Kamikubo, T. (1984) "Purification and properties of β -galactosidases from *Bacillus circulans*". *Agric. Biol. Chem.* 48, (12), 3053-3061.
119. Vetere, A. Paoletti, S. (1998) "Separation and characterization of three β -galactosidases from *Bacillus circulan*"s. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* 1380, (2), 223-231.

120. Pérez-Sánchez, M., Sandoval, M., Cortés-Cabrera, A., García-Marín, H., Sinisterra, J. V., García, J. I. and Hernaiz, M. J. (2011). "Solvents derived from glycerol modify classical regioselectivity in the enzymatic synthesis of disaccharides with Biolacta β -galactosidase." *Green Chem.* 13: 2810-2817.
121. Rothschild, L. J. and Mancinelli, R. L. (2001). "Life in extreme environments." *Nature* 409(6823): 1092-1101.
122. Niehaus, F., Bertoldo, C., Kähler, M. and Antranikian, G. (1999). "Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application." *Appl. Microbiol. Biotech.* 51(6): 711-729.
123. Sellek, G. A. and Chaudhuri, J. B. (1999). "Biocatalysis in organic media using enzymes from extremophiles." *Enzym. Microbiol. Tech.* 25(6): 471-482.
124. Demirjian, D. C., Moris-Varas, F. and Cassidy, C. S. (2001). "Enzymes from extremophiles." *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5(2): 144-151.
125. van den Burg, B. (2003). "Extremophiles as a source for novel enzymes." *Curr. Opin. Microbiol.* 6(3): 213-218.
126. Egorova, K. and Antranikian, G. (2005). "Industrial relevance of thermophilic archaea." *Curr. Opin. Microbiol.* 8(6): 649-655.
127. Salameh, M. d., Wiegel, J., Allen I. Laskin, S. S. and Geoffrey, M. G. (2007). "Lipases from extremophiles and potential for industrial applications." *Adv. Appl. Microbiol.* 61: 253-283.
128. Panasik, N., Brenchley, J. E. and Farber, G. K. (2000). "Distributions of structural features contributing to thermostability in mesophilic and thermophilic α/β barrel glycosyl hydrolases." *Biochim. Biophys. Acta* 1543(1): 189-201.
129. Vieille, C. and Zeikus, G. J. (2001). "Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability." *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65(1): 1-43.
130. Zhou, X. X., Wang, Y. B., Pan, Y. J. and Li, W. F. (2008). "Differences in amino acids composition and coupling patterns between mesophilic and thermophilic proteins." *Amino Acids* 34(1): 25-33.
131. Li, W. F., Zhou, X. X. and Lu, P. (2005). "Structural features of thermozyms." *Biotechnol. Adv.* 23(4): 271-281.
132. Paiardini, A., Gianese, G., Bossa, F. and Pascarella, S. (2002). "Structural plasticity of thermophilic serine hydroxymethyltransferases. Extensive comparative study of an enzyme family with a focus on the structural features involved in thermostabilization." *Proteins* 50: 122-134.
133. Brock TD, Brock KM, Belly RT, Weiss RL. (1972) "Sulfolobus: a new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature". *Arch Mikrobiol.* 84(1):54-68.
134. She Q1, Singh RK, Confalonieri F, Zivanovic Y, Allard G, Awayez MJ, et al. (2001). "The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2". *Proc Natl Acad Sci* ;98(14):7835-40
135. Pfeifer F, Palm P, Schleifer K-H, editors. (1994). "Molecular Biology of Archaea" *Stuttgart: Gustav Fischer*; pp. 1–267.
136. Eneyskaya E.V., kulminskaya –a.-a., Kalkkinen N., Nifantiev N.E., Arbatskii N.P. Saenko A.I., Chepurnaya O.V. and Arutyunyan A.V. (2001) "An alpha-L-

- fucosidase from *Thermus* sp. with unusually broad specificity". *Glycoconj.* 10, 827-834
137. Leuschner, C. and Antranikian, G. (1995). "Heat-stable enzymes from extremely thermophilic and hyperthermophilic microorganisms." *World J. Microbiol. Biotechnol.* 11(1): 95-114.
138. Coolbear, T., Daniel, R. M. and Morgan, H. W. (1992). "The enzymes from extreme thermophiles: bacterial sources, thermostabilities and industrial relevance." *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 45: 57-98.
139. Cobucci-Ponzano B., Trincone A., Giordano A., Rossi M. and Moracci M. (2003). "Identification of an archaeal α -L-fucosidase encoded by an interrupted gene". *J. Biological Chemistry.* 278: 14622-14631.
140. Fojan, P. Jonson, P. H. Petersen, M. T. N. Petersen, S. B. (2000) "What distinguishes an esterase from a lipase: A novel structural approach". *Biochimie* 82, (11), 1033-1041.
141. Schmidt, R. D. Verger, R. (1998) "Lipases: interfacial enzymes with attractive applications". *Angew. Chem. Int. Ed.* 37, (12), 1608-1633.
142. Bornscheuer, U. Kazlauskas, R. (1999) "Hydrolases in organic synthesis regio- and stereoselective biotransformations". *Weinheim:Wiley/VCH*
143. Liese, A. Seelbach, K. Wandrey, C. (2000) "Industrial biotransformations". *Weinheim: Wiley/VCH*
144. Schmidt, M. Bornscheuer, U. T. . (2005) "High-throughput assays for lipases and esterases". *Biomol. Eng*22, (1-3), 51-56.
145. Kapoor, M. Gupta, M. N. (2012) "Lipase Promiscuity and its biochemical applications". *Process Biochem.*
146. Hult, K. Berglund, P. (2007) "Enzyme promiscuity: mechanism and applications". *Trends Biotechnol.* 25, (5), 231-238.
147. Gupta, M. Kapoor, M. Majumder, A. B. Singh, V. (2011) "Isozymes, moonlighting proteins and promiscuous enzymes". *Curr. Sci.* 100, 1152-1162.
148. Gotor-Fernández, V. Busto, E. Gotor, V. (2006) "*Candida antarctica* Lipase B: An ideal biocatalyst for the preparation of nitrogenated organic compounds". *Adv. Synth. Catal.* 348, (7-8), 797-812.
149. Li, K. He, T. Li, C. Feng, X. W. Wang, N. Yu, X. Q. (2009) "Lipase-catalysed direct Mannich reaction in water: utilization of biocatalytic promiscuity for C-C bond formation in a "one pot" synthesis". *Green Chem.* 11, 777-779.
150. He, T. Li, K. Wu, M. Y. Feng, X. W. Wang, N. Wang, H. Y. Li, C. Yu, X. Q. (2010) "Utilization of biocatalytic promiscuity for direct Mannich reaction". *J. Mol. Catal. B: Enz.* 67, 189-194.
151. Li, C. Feng, X. W. Wang, N. Zhou, Y. J. Yu, X. Q. (2008) "Biocatalytic promiscuity: the first lipase-catalysed asymmetric aldol reaction". *Green Chem.* 10, 616-618.
152. Branneby, C. Carlqvist, P. Magnusson, A. Hult, K. Brinck, T. Berglund, P. (2003) "Carbon-carbon bonds by hydrolytic enzymes". *J. Am. Chem. Soc.* 125, 874-875.

153. Svedendahl, M. Hult, K. Berglund, P. (2005) "Fast carbon-carbon bond formation by a promiscuous lipase". *J. Am. Chem. Soc.* 127, 17988-17989.
154. Cygler, M. Grochulski, P. Kazlauskas, R. J. Schrag, J. D. Bouthillier, F. Rubin, B. Serreqi, A. N. Gupta, A. K. (1994) "A structural basis for the chiral preferences of lipases". *J. Am. Chem. Soc.* 116, (8), 3180-3186.
155. Brady, L. Brzozowski, A. M. Derewenda, Z. S. Dodson, E. Dodson, G. Tolley, S. Turkenburg, J. P. Christiansen, L. Høge-Jensen, B. Norskov, L. Thim, L. Menge, U. (1990) "A serine protease triad forms the catalytic center of a triacylglycerol lipase". *Nature* 343, 767-770.
156. Murthy, M. S. R. C. Swaminathan, T. Rakshit, S. K. Kosugi, Y. (2000) "Statistical optimization of lipase catalyzed hydrolysis of methyl oleate by response surface methodology". *Bioprocess Biosyst. Eng.* 22, (1), 35-39.
157. Wolfson, A. Atyya, A. Dlugy, C. Tavor, D. (2010) "Glycerol triacetate as solvent and acyl donor in the production of isoamyl acetate with *Candida antarctica* lipase B". *Bioprocess Biosyst. Eng.* 33, (3), 363-366.
158. Li, X.-G. Lähitie, M. Kanerva, L. T. (2008) "*Burkholderia cepacia* lipase and activated β -lactams in β -dipeptide and β -amino amide synthesis". *Tetrahedron: Asymmetry* 19, (15), 1857-1861.
159. Kirk, O. Christensen, M. W. r. Damhus, T. Godtfredsen, S. E. (1994) "Enzyme catalyzed degradation and formation of peroxy-carboxylic acids". *Biocatal. Biotransform.* 11, (1), 65-77.
160. Yadav, G. D. Borkar, I. V. (2010) "Lipase-catalyzed hydrazinolysis of phenyl benzoate: Kinetic modeling approach". *Process Biochem.* 45, (4), 586-592.
161. Zhang, X. Hayes, D. (1999) "Increased rate of lipase-catalyzed saccharide-fatty acid esterification by control of reaction medium". *J. Am. Oil Chem. Soc.* 76, (12), 1495-1500.
162. Ducret, A. Giroux, A. Trani, M. Lortie, R. (1996) "Characterization of enzymatically prepared biosurfactants". *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73, 109-113.
163. Oguntimein, G. B. Erdmann, H. Schmid, R. D. (1993) "Lipase catalysed synthesis of sugar ester in organic solvents". *Biotech. Lett.* 15, (2), 175-180.
164. Ferrer, M. Soliveri, J. Plou, F. J. López-Cortés, N. Reyes-Duarte, D. Christensen, M. Copa-Patiño, J. L. Ballesteros, A. (2005) "Synthesis of sugar esters in solvent mixtures by lipases from *Thermomyces lanuginosus* and *Candida antarctica* B, and their antimicrobial properties". *Enzym. Microb. Tech.* 36, (4), 391-398.
165. Habulin, M. Sabeder, S. Knez, Z. (2008) "Enzymatic synthesis of sugar fatty acid esters in organic solvent and in supercritical carbon dioxide and their antimicrobial activity". *J. Supercrit. Fluids* 45, (3), 338-345.
166. Malaisse, W. (2002) "Monosaccharide esters: new tools in biomedicine". *Acta Clin. Belg.* 57, (2), 49-52.

167. Degueil-Castaing, M. De Jeso, B. Drouillard, S. Maillard, B. (1987) "Enzymatic reactions in organic synthesis: 2- ester interchange of vinyl esters". *Tetrahedron Lett.* 28, (9), 953-954.
168. Ganske, F. Bornscheuer, U. T. (2005) "Lipase-catalyzed glucose fatty acid ester synthesis in ionic liquids". *Org. Lett.* 7, (14), 3097-3098.
169. Sabeder, S. Habulin, M. Knez, Z. (2006) "Lipase-catalyzed synthesis of fatty acid fructose esters". *J. Food. Eng.* 77, (4), 880-886.
170. Pulido, R. Gotor, V. (1994) "Towards the selective acylation of secondary hydroxyl groups of carbohydrates using oxime esters in an enzyme-catalyzed process". *Carb. Res.* 252, (0), 55-68.
171. Woudenberg van Oosterom, M. van Rantwijk, F. Sheldon, R. A. (1996) "Regioselective acylation of disaccharides in *tert*-butyl alcohol catalyzed by *Candida antarctica* lipase". *Biotech. Bioeng.* 49, 328-333.
172. Palocci, C. Falconi, M. Chronopoulou, L. Cernia, E. (2008) "Lipase-catalyzed regioselective acylation of tritylglycosides in supercritical carbon dioxide". *J. Supercrit. Fluids* 45, (1), 88-93.
173. Gudiño, E. D. Iribarren, A. M. Iglesias, L. E. (2009) "Diastereoselective enzymatic preparation of acetylated pentofuranosides carrying free 5-hydroxyl groups". *Tetrahedron: Asymmetry* 20, (15), 1813-1816.
174. Terreni, M. Salvetti, R. Linati, L. Fernandez-Lafuente, R. Fernández-Lorente, G. Bastida, A. Guisan, J. M. (2002) "Regioselective enzymatic hydrolysis of acetylated pyranoses and pyranosides using immobilised lipases. An easy chemoenzymatic synthesis of α and β -D-glucopyranose acetates bearing a free secondary C-4 hydroxyl group". *Carb. Res.* 337, (18), 1615-1621.
175. Fernandez-Lorente, G. Palomo, J. M. Cocca, J. Mateo, C. Moro, P. Terreni, M. Fernandez-Lafuente, R. Guisán, J. M. (2003) "Regio-selective deprotection of peracetylated sugars via lipase hydrolysis". *Tetrahedron* 59, 5705-5711.
176. Klibanov, A. M. (1983). "Immobilized enzymes and cells as practical catalysts." *Science* 219(4585): 722-727.
177. Norde, W., MacRitchie, F., Nowicka, G. and Lykelma, J. (1986). "Protein adsorption at solid-liquid interfaces: reversibility and conformation aspects." *J. Colloid Interface Sci.* 112: 447-456.
178. Lamb, S. B. and Stuckey, D. C. (2000). "Enzyme immobilization on colloidal liquid aphrons (CLAs): the influence of system parameters on activity." *Enzym. Microb. Tech.* 26(8): 574-581.
179. Bornscheuer, U. T. (2003). "Immobilizing enzymes: How to create more suitable biocatalysts." *Angew. Chem. Int. Ed.* 42(29): 3336-3337.
180. Spieß, A., Schlothauer, R. C., Hinrichs, J., Scheidat, B. and Kasche, V. (1999). "pH gradients in immobilized amidases and their influence on rates and yields of β -lactam hydrolysis." *Biotech. Bioeng.* 62(3): 267-277.
181. Tischer, W. and Kascher, V. (1999). "Immobilized enzymes: crystals or carriers?" *Trends Biotechnol.* 17: 326-335.

182. Sheldon, R. A. (2007). "Enzyme immobilization: the quest for optimum performance." *Adv. Synth. Catal.* 349(8-9): 1289-1307.
183. Sheldon, R. A., Arends, I. and Hanefeld, U. (2007). *Green Chemistry and Catalysis*. Weinheim, Wiley-VCH.
184. Shreve y Vogel, (1992) Comparison of substrate utilization and growth kinetics between immobilized and suspended *Pseudomonas* cells. *Biotech Bioeng* 41 (3): 370-9
185. Huang J., Hoojimans C.M, Briasco C.A., Geraats S.G.M., Luyben K.,Ch. A: M., Thomas D. y Barbotin.N (1990). "Effect of free-cell growth parameters on oxygen concentration in gel-immobilised recombinant *Escherichia coli*" *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 33: 619-623.
186. Mofidi N., Agyhai-Moghadam M. y Sarboluuki M.N. (2000). "Mass preparation and characterization of alginate microspheres". *Process. Biochem.*, 35: 885-888.;
187. Pátková J., Smugrovicová D., Omény Z. y Bafrancova P. (2000). "Very high gravity worth fermentation by immobilised yeast". *Biotechnol. Lett.*, 22, 1173-1177.
188. Nakajima H., Sonomoto K., Usui N., Sato F., Yamada Y., Tanaka A, Fukui S.(1985). "Entrapment of *Lavandula vera* cells and production of pigments by entrapped cells". *J. Biotechnol.* , 2, 101-117.
189. Vassileva M., Azcon R., Barea J.M. y Vassilev N. (2000). "Rock phosphate solubilization by free and encapsulated cells of *Yarrowia lipolytica*". *Process Biochem.*, 35, 693-697.
190. Branccini I. y Pérez S. (2001). "Molecular basis of Ca²⁺ - induced gelation in alginates and pectins: The egg-box model revisited". *Biomacromolecules*, 2, 1089- 1096.
191. Germeiner P., Kurillova L., Malovikova A., Toth D. y Tomasovicova D. (1989). "Properties of spherical calcium pectate and alginate gels and their use in diffusion chromatography, solids separations ad immobilization of enzyme and cells". *Folia Microbiol.*, 34, 3, 214-227.
192. Kurillová L., Germeiner P., Vikartovská A., Miková H., Rosenberg M. y Ilavský M. (2000). "Calcium pectate gel beads for cell entrapment. 6. Morphology of stabilized and hardened calcium pectate gel beads with cells for immobilized biotechnology". *J. Microencapsulation*, 17(3), 279-296.
193. Krajewska B. (2004). "Application of chitin and chitosan –based materials for enzyme immobilization: a review". *Enzyme Microb. Technol.*, 35, 126-129.
194. Kattar J.I.S. (1999). "Removal of chromium ions by agar immobilized cells of the cyanobacterium *Anacystis nidulans* in acontinuous flow bioreactor". *Enzyme Microb. Technol.*, 25, 564-568.
195. Christov P., Spassov G. y Pramatorova V. (1999). "Effect of matrix on (S) – pchlorodiphenyl methanol production by immobilized *Debaryomyces marana*".*Process. Biochem.*, 34, 231-237.
196. Armisén R. (1991). "Agar and agarose biotechnological applications". *Hydrobiology.*, 221, 159-166.
197. Long J-Ch, Lee W-Ch, Guo S-H (2000). "Inmobilization of cell-associated enzyme by entrapping in gluten matrix". *Biocatal. Biotrans.* 17, 431-443.

198. Umemura I., Takamatsu S., Sato T., Tosa T. y Chibata I. (1984). "Improvement of production of L-aspartic acid using immobilized microbial cells". *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 20, 291-295.
199. Pattanapitpaisal P., Brown N.L. Macaskie L.E. (2001). "Chromate reduction by *Microbacterium liquefaciens* immobilised in PVA". *Biotechnol. Lett.*, 23, 61-65.
200. Trelles J., Fernández M., Lewkowicz E., Iribarren A.M., J.V. Sinisterra. (2004). "Free and immobilised *Citrobacter amalonaticus* CECT 863 as a biocatalyst for nucleoside synthesis". *Int. J. Biotechnol.*, 6, 376-384.
201. Nilsson K., Birnbaum S., Flygare S., Linse L., Schrödel U., Jeppson U., Larsson P.O., Mosbach K. y Brodelius P. (1983). "A general method for the immobilization of cells with preserved viability". *Eur. J. Appl. Microb. Technol.*, 7, 319-326.
202. Carballeira D. (2003). "Nuevos microorganismos biocatalizadores para la reducción estereoselectiva de compuestos carbonílicos: Oxidación de alcoholes y monoxigenación de cetonas, valoración cruzada HTS/QSAR-3D CoMFA" Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid.
203. Araki C. (1944). "Chemical studies on agar-agar. Separation of agarobiose from the agar-agar like substances of *Gelidium amansii* by partial hydrolysis". *J. chem. Soc. Japan*, 65; 544-8; 627-32.
204. Lahaye M. y Rochas C. (1991). "Chemical structure and physico-chemical properties of agar". *Hydrobiology*, 221, 137-148.
205. Rees D. A. y Welsh E.J. (1977). "Secondary and tertiary Structure of polysaccharides in solution and gels". *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* 16, 214-224.
206. Foord, S. A., Atkins E.D.T. (1989). "New X-Ray diffraction results from agarose: Extended single helix structures and implications for gelation mechanism". *Biopolymers*, 28, 1345-1365.
207. Barbara, K. (2004). "Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review." *Enzym. Microb. Tech.* 35(2-3): 126-139.
208. Chiou, S. H. and Wu, W. T. (2004). "Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups." *Biomaterials* 25(2): 197-204.
209. Taqieddin, E. and Amiji, M. (2004). "Enzyme immobilization in novel alginate: chitosan core-shell microcapsules." *Biomaterials* 25(10): 1937-1945.
210. Cetinus, S. A., Öztop, H. N. and Saraydin, D. (2007). "Immobilization of catalase onto chitosan and cibacron blue F3GA attached chitosan beads." *Enzym. Microb. Tech.* 41(4): 447-454.
211. Pan, C., Hu, B., Li, W., Sun, Y., Ye, H. and Zeng, X. (2009). "Novel and efficient method for immobilization and stabilization of β -D-galactosidase by covalent attachment onto magnetic Fe₃O₄-chitosan nanoparticles." *J. Mol. Cat. B: Enz.* 61(3-4): 208-215.
212. Guisán, J. M. (1988). "Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes." *Enzym. Microb. Tech.* 10: 375-382.
213. Mateo, C., Palomo, J. M., Fuentes, M., Betancor, L., Grazu, V., López-Gallego, F., Pessela, B. C. C., Hidalgo, A., Fernández-Lorente, G., Fernández-Lafuente, R. and Guisán, J. M. (2006). "Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins." *Enzym. Microb. Tech.* 39(2): 274-280.

214. Mateo, C., Bolivar, J. M., Godoy, C. A., Rocha-Martin, J., Pessela, B. C., Curiel, J. A., Muñoz, R., Guisan, J. M. and Fernández-Lorente, G. **(2010)**. "Improvement of enzyme properties with a two-step immobilization process on novel heterofunctional supports." *Biomacromolecules* 11(11): 3112-3117.
215. Mateo, C., Fernández-Lorente, G., Abian, O., Fernández-Lafuente, R. and Guisán, J. M. **(2000)**. "Multifunctional epoxy supports: A new tool to improve the covalent immobilization of proteins. The promotion of physical adsorptions of proteins on the supports before their covalent linkage." *Biomacromolecules* 1(4): 739-745.
216. Boller, T., Meier, C. and Menzler, S. **(2002)**. "Eupergit oxirane acrylic beads: how to make enzymes fit for biocatalysis." *Org. Process Res. Dev.* 6(4): 509-519.
217. Mateo, C., Abian, O., Fernández-Lorente, G., Pedroche, J., Fernández-Lafuente, R. and Guisan, J. M. **(2002)**. "Epoxy sepabeads: a novel epoxy support for stabilization of industrial enzymes via very intense multipoint covalent attachment." *Biotechnol. Prog.* 18(3): 629-634.
218. Pessela, B. C. C., Fernández-Lafuente, R., Fuentes, M., Vián, A., García, J. L., Carrascosa, A. V., Mateo, C. and Guisán, J. M. **(2003)**. "Reversible immobilization of a thermophilic β -galactosidase via ionic adsorption on PEI-coated Sepabeads." *Enzym. Microb. Tech.* 32(3-4): 369-374.
219. Torres, R., Mateo, C., Fernández-Lorente, G., Ortiz, C., Fuentes, M., Palomo, J. M., Guisan, J. M. and Fernández-Lafuente, R. **(2003)**. "A novel heterofunctional epoxy-amino sepabeads for a new enzyme immobilization protocol: immobilization-stabilization of β -Galactosidase from *Aspergillus oryzae*." *Biotechnol. Prog.* 19(3): 1056-1060.
220. Lu, J. and Toy, P. H. **(2009)**. "Organic polymer supports for synthesis and for reagent and catalyst immobilization." *Chem. Rev.* 109(2): 815-838.
221. Fan, J., Lei, J., Wang, L., Yu, C., Tu, B. and Zhao, D. **(2003)**. "Rapid and high-capacity immobilization of enzymes based on mesoporous silicas with controlled morphologies." *Chem. Commun.*(17).
222. Wang, Y. and Caruso, F. **(2005)**. "Mesoporous silica spheres as supports for enzyme immobilization and encapsulation." *Chem. Mater.* 17(5): 953-961.
223. K. Besteman, J.-O Lee, F.G.M. Wiertz, H.A. Heering, C. Dekker **(2003)** "Enzyme-coated carbon nanotubes as single-molecule biosensors". *Nano Letters* . 3 (6): 727-730
224. Shi Kam N.W., Jessop T.C., Wender P.A., Dai H.J. **(2004)**. "Nanotube molecular transporters: internalization of carbon nanotube-protein conjugates into Mammalian cells". *Am Chem Soc.* 126(22):6850-1
225. Pantarotto D., Briand J.P., Prato M., Bianco A. **(2004)** Translocation of bioactive peptides across cell membranes by carbon nanotubes. *Chem Commun (Camb)*. 7;(1):16-7.
226. Asuri P., Karajanagi S.S., Sellitto E., Kim D.Y., Kane R.S., Dordick J.S. **(2006)** "Water-soluble carbon nanotube-enzyme conjugates as functional biocatalytic formulations". *Biotechnol Bioeng.* 5;95(5):804-11.
227. Barone, P. W.; Baik, S.; Heller, D. A.; Strano, M. S. **(2005)** "Near-infrared optical sensors based on single-walled carbon nanotubes". *Nature Materials*, 4, 86-92.

228. Chen R.J., S. Bangsaruntip, K. A. Drouvalakis, N.W.S. Kam, M. Shim, Y. Li, W. Kim, P.J. Utz and H. Dai, 2003. Noncovalent functionalization of carbon nanotubes for highly specific electronic sensors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:4984-4989
229. Zheng L.X., O`Connell M.J., Doorn S.K., Liao X.Z., Zhao Y.H., Akhadov E.A., Hoffbauer M.A., Roop B.J., Jia Q.X., dye R.C., Peterson D.E., Huang S.M., Liu j., Zhu y.T. (2004). "Ultralong single-wall carbon nanotubes". *Langmuir*. 23: 12318-12321.
230. Ji P., Tan H., Xu X., Feng W. (2010) " Lipase covalently attached to multiwalled carbon nanotubes as an efficiente catalyst in organic solvent". *AIChE Journal*, 56:3005–3011.
231. Asuri P., Bale S.S., Pangule R.C., Shah D.A., Kane R.S., Dordick J.S. (2007). "Structure, function and stability of enzymes covalently attached to single-walled carbon nanotubes". *Langmuir*. 23: 12318-12321.
232. Mateo, C. Bolivar, J. M. Godoy, C. A. Rocha-Martin, J. Pessela, B. C. Curiel, J. A. Muñoz, R. Guisan, J. M. Fernández-Lorente, G. (2010) "Improvement of enzyme properties with a two-step immobilization process on novel heterofunctional supports". *Biomacromolecules*, 11, (11), 3112-3117.
233. Vieille, C. Zeikus, G. J. (2001) Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 65, (1), 1-43
234. Sellek, G. A. Chaudhuri, J. B. Biocatalysis in organic media using enzymes from extremophiles. *Enzym. Microb. Tech.* 1999, 25, (6), 471-482.
235. Owusu, R. K. Cowan, D. A. (1989) Correlation between microbial protein thermostability and resistance to denaturation in aqueous organic solvent two-phase systems. *Enzym. Microb. Tech.* 11, 568-574.
236. Cowan, D. A. (1997) Thermophilic proteins: Stability and function in aqueous and organic solvents. *Comp. Biochem. Physiol., Part A: Mol. Integr. Physiol.* 118, (3), 429-438.
237. Faijes, M., Saura-Valls, M., Pérez, X., Conti, M. and Planas, A. (2006). "Acceptor-dependent regioselectivity of glycosynthase reactions by *Streptomyces* E383A β -glucosidase." *Carbohydr. Res.* 341(12): 2055-2065.
238. Maugard, T., Gaunt, D., Legoy, M. D. and Besson, T. (2003). "Microwave-assisted synthesis of galacto-oligosaccharides from lactose with immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*." *Biotechnol. Lett.* 25(8): 623-629.
239. Ponrasu, T., Manohar, B. and Divakar, S. (2009). "A response surface methodological study on prediction of glucosylation yields of thiamin using immobilized β -glucosidase." *Process Biochem.* 44(2): 251-255.
240. Hestrin, S., Feingold, D. S. and Schramm, M. (1995). " β -Glucosidase from sweet almond emulsin." *Methods Enzymol.* S. P. Colowick and N. O. Kaplan. New York . Academic Press: 234-240.
241. Won, K., Kim, S., Kim, K.-J., Park, H. W. and Moon, S.-J. (2005). "Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel beads." *Process Biochem.* 40(6): 2149-2154

242. Hernaiz, M. J. and Crout, D. H. G. (2000b). "Immobilization/stabilization on Eupergit C of the β -galactosidase from *B. circulans* and an α -galactosidase from *Aspergillus oryzae*." *Enzym. Microbiol. Tech.* 27(1-2): 26-32.
243. Naundorf, A., Caussette, M. and Ajsaka, K. (1998). "Characterization of the immobilized β -galactosidase C from *Bacillus circulans* and the production of β (1-3)-linked disaccharides." *Bios. Biotech. Biochem.* 62(7): 1313-1317.
244. Anastas, P. T. K., Mary M. (2002). "Origins, current status, and future challenges of green chemistry." *Acc. Chem. Res.* 35(9): 686-694.
245. Horvath, I. T., Anastas, P. T. (2007). "Innovations and green chemistry." *Chem. Rev.* 107(6): 2169-2173.
246. Sheldon, R. A. (2000). "Chimie/Chemistry." *C. R. Acad. Sci.* 3: 541-551.
247. Kaupp, G. (2003). "Solvent-free organic synthesis. By Koichi Tanaka." *Angew. Chem. Int. Ed.* 42(40): 4851-4852.
248. Hernaiz, M. J., Alcántara, A. R., García, J. I. and Sinisterra, J. V. (2010). "Applied biotransformations in green solvents." *Chem. Eur. J.* 16: 9422-9437.
249. Pérez, M., Sinisterra, J. V. and Hernáiz, M. J. (2010). "Hydrolases in green solvent." *Curr. Org. Chem.* 14(20): 2366-2383.
250. Jessop, P. G., Trakhtenberg, S. and Warner, J. (2008). "The twelve principles of green chemistry." *Innovations in industrial and engineering chemistry.* Washington, DC, American Chemical Society: 401-436.
251. Capello, C., Fischer, U. and Hungerbuhler, K. (2007). "What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvents." *Green Chem.* 9(9): 927-934.
252. Sánchez-Vicente, Y., Cabañas, A., Renuncio, J. A. R. and Pando, C. (2009). "Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) seed oil using carbon dioxide and ethanol." *J. Supercrit. Fluids* 49(2): 167-173.
253. Morère, J., Tenorio, M. J., Torralvo, M. J., Pando, C., Renuncio, J. A. R. and Cabañas, A. (2011). "Deposition of Pd into mesoporous silica SBA-15 using supercritical carbon dioxide." *J. Supercrit. Fluids* 56(2): 213-222.
254. Ball, P. (2000). *H₂O: A Biography of Water.* London, Phoenix Press.
255. da Silva, G. P., Mack, M. and Contiero, J. (2009). "Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology." *Biotechnol. Adv.* 27(1): 30-39.
256. Dasari, M. A., Kiatsimkul, P. P., Sutterlin, W. R. and Suppes, G. J. (2005). "Low-pressure hydrogenolysis of glycerol to propylene glycol." *Appl. Catal. A* 281(1-2): 225-231.
257. Wolfson, A., Dlugy, C. and Shotland, Y. (2007). "Glycerol as a green solvent for high product yields and selectivities." *Environ. Chem. Lett.* 5(2): 67-71.
258. García, J. I., García-Marín, H., Mayoral, J. A. and Pérez, P. (2010). "Green solvents from glycerol. Synthesis and physico-chemical properties of alkyl glycerol ethers." *Green Chem.* 12: 426-434.
259. De Simone, J. M. (2002). "Practical approaches to green solvents." *Science* 297(5582): 799-803.
260. Horváth, I. T. and Rábai, J. (1994). "Facile catalyst separation without water: fluororous biphasic hydroformylation of olefins." *Science* 266(5182): 72-75.

261. Xiang, J., Orita, A. and Otera, J. (2002). "Fluorous biphasic esterification directed towards ultimate atom efficiency." *Angew. Chem. Int. Ed.* 41(21): 4117-4119.
262. Wende, M. and Gladysz, J. A. (2003). "Fluorous catalysis under homogeneous conditions without fluorinated solvents: A "Greener" catalyst recycling protocol based upon temperature-dependent solubilities and liquid/solid phase separation." *J. Am. Chem. Soc.* 125(19): 5861-5872.
263. Hobbs, H. R., Kirke, H. M., Poliakoff, M. and Thomas, N. R. (2007). "Homogeneous biocatalysis in both fluorinated biphasic and supercritical carbon dioxide systems." *Angew. Chem. Int. Ed.* 46: 7860-7863.
264. Correa da Costa, R., Buffeteau, T., Guerso, A. D., McClenaghan, N. D. and Vincent, J.-M. (2011). "Reversible hydrocarbon/perfluorocarbon phase-switching of [Ru(bipy)₃]²⁺ driven by supramolecular heteromeric fluorinated carboxylate-carboxylic acid H-bond interactions." *Chem. Commun.* 47(29): 8250-8252.
265. Khmelnitsky, Y. L., Mozhaev, V. V., Belova, A. B., Sergeeva, M. V. and Martinek, K. (1991). "Denaturation capacity—a new quantitative criterion for selection of organic-solvents as reaction media in biocatalysis." *Eur. J. Biochem.* 198(1): 31-41.
266. Hobbs, H. R. and Thomas, N. R. (2007). "Biocatalysis in supercritical fluids, in fluorinated solvents, and under solvent-free conditions." *Chem. Rev.* 107(6): 2786-2820.
267. Kragl, U., Eckstein, M. and Kaftzik, N. (2002). "Enzyme catalysis in ionic liquids." *Curr. Opin. Biotechnol.* 13(6): 565-571.
268. van Rantwijk, F., Lau, R. M. and Sheldon, R. A. (2003). "Biocatalytic transformations in ionic liquids." *Trends Biotechnol.* 21(3): 131-138.
269. Galinski, M., Lewandowski, A. and Stepniak, I. (2006). "Ionic liquids as electrolytes." *Electrochim. Acta* 51(26): 5567-5580.
270. van Rantwijk, F. and Sheldon, R. A. (2007). "Biocatalysis in ionic liquids." *Chem. Rev.* 107(6): 2757-2785
271. Kosmulski, M., Gustafsson, J. and Rosenholm, J. B. (2004). "Thermal stability of low temperature ionic liquids revisited." *Thermochim. Acta* 412(1-2): 47-53.
272. Dzyuba, S. V. and Bartsch, R. A. (2002). "Expanding the polarity range of ionic liquids." *Tetrahedron Lett.* 43(26): 4657-4659.
273. Chiappe, C. and Pieraccini, D. (2005). "Ionic liquids: solvent properties and organic reactivity." *J. Phys. Org. Chem.* 18(4): 275-297.
274. Earle, M. J., Esperanca, J. M. S. S., Gilea, M. A., Canongia Lopes, J. N., Rebelo, L. P. N., Magee, J. W., Seddon, K. R. and Widegren, J. A. (2006). "The distillation and volatility of ionic liquids." *Nature* 439(7078): 831-834.
275. Fox, D. M., Awad, W. H., Gilman, J. W., Maupin, P. H., De Long, H. C. and Trulove, P. C. (2003). "Flammability, thermal stability, and phase change characteristics of several trialkylimidazolium salts." *Green Chem.* 5(6).
276. Tsuzuki, S., Tokuda, H., Hayamizu, K. and Watanabe, M. (2005). "Magnitude and directionality of interaction in ion pairs of ionic liquids: relationship with ionic conductivity." *J. Phys. Chem. B.* 109(34): 16474-16481.
277. Wasserscheid, P. and Keim, W. (2000). "Ionic liquids: new "solutions" for transition metal catalysis." *Angew. Chem. Int. Ed.* 39(21): 3772-3789.

278. Hagiwara, R. and Ito, Y. (2000). "Room temperature ionic liquids of alkylimidazolium cations and fluoroanions." *J. Fluorine Chem.* 105(2): 221-227.
279. Welton, T. (2004). "Ionic liquids in catalysis." *Coord. Chem. Rev.* 248(21-24): 2459-2477.
280. Dupont, J. and Suarez, P. A. Z. (2006). "Physico-chemical processes in imidazolium ionic liquids." *Phys. Chem. Chem. Phys.* 8(21): 2441-2452.
281. Poole, C. F. (2004). "Chromatographic and spectroscopic methods for the determination of solvent properties of room temperature ionic liquids." *J. Chromatogr. A* 1037(1-2): 49-82.
282. Wasserscheid, P. and Welton, T. (2003) "Ionic liquids in synthesis". Wiley-VCH
283. Liu, Q., Janssen, M. H. A., Rantwijk, F. V. and Sheldon, R. A. (2005). "Room-temperature ionic liquids that dissolve carbohydrates in high concentrations" *Green Chem.* 7: 39-42.
284. Sheldon, R. (2001). "Catalytic reactions in ionic liquids." *Chem. Commun.:* 2399-2407.
285. Gathergood, N., Garcia, M. T. and Scammells, P. J. (2004). "Biodegradable ionic liquids: Part I. Concept, preliminary targets and evaluation" *Green Chem.* 6: 166-175.
286. Madeira Lau, R., van Rantwijk, F., Seddon, K. R. and Sheldon, R. A. (2000). "Lipase-catalyzed reactions in ionic liquids." *Org. Lett.* 2(26): 4189-4191.
287. Earle, M. J. and Seddon, K. R. (2002). "Ionic liquids: green solvents for the future". *Clean Solvents*. Washington, DC, American Chemical Society: 10-25.
288. Park, S. and Kazlauskas, R. J. (2003). "Biocatalysis in ionic liquids - advantages beyond green technology." *Curr. Opin. Biotechnol.* 14(4): 432-437.
289. García, M. T., Gathergood, N., Scammells, P.J., (2005). "Biodegradable ionic liquids. Part II. Effect of the anion and toxicology." *Green Chem.* 7: 9-14.
290. Jastorff, B., Störmann, R., Ranke, J., Mölter, K., Stock, F., Oberheitmann, B., Hoffmann, W., Hoffmann, J., Nüchter, M., Ondruschka, B. and Filser, J. (2003). "How hazardous are ionic liquids? Structure - activity relationships and biological testing as important elements for sustainability evaluation." *Green Chem.* 5: 136-142.
291. Yoon, J. H. and McKenzie, D. (2005). "A comparison of the activities of three β -galactosidases in aqueous-organic solvent mixtures." *Enzym. Microbiol. Tech.* 36(4): 439-446.
292. Majumder, A. B., Singh, B. and Gupta, M. N. (2008). "Diastereoselective synthesis of (R)-(alkyl)- β -D-galactopyranoside by using β -galactosidase (*Aspergillus oryzae*) in low-water media." *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18(1): 124-128.
293. Bridiau, N., Issaoui, N. and Maugard, T. (2010). "The effects of organic solvents on the efficiency and regioselectivity of *N*-acetyl-lactosamine synthesis, using the β -galactosidase from *Bacillus circulans* in hydro-organic media." *Biotechnol. Prog.* 26(5): 1278-1289.
294. Mori, T., Li, M., Kobayashi, A. and Okahata, Y. (2002). "Reversible control of enzymatic transglycosylations in supercritical fluoroform using a lipid-coated β -D-galactosidase." *J. Am. Chem. Soc.* 124(7): 1188-1189.
295. Horváth, I. T. (2005). *Multiphase homogeneous catalysis*. Weinheim Germany, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA.

296. Pérez-Sánchez, M., Cortés-Cabrera, Á., García-Martín, H., Sinisterra, J. V., García, J. I. and Hernaíz, M. J. (2011). "Improved synthesis of disaccharides with *Escherichia coli* β -galactosidase using bio-solvents derived from glycerol." *Tetrahedron* 67(40): 7708-7712.
297. Pérez-Sánchez, M., Sandoval, M. and Hernaíz, M. J. (2012). "Bio-solvents change regioselectivity in the synthesis of disaccharides using Biolacta β -galactosidase." *Tetrahedron* 68(9): 2141-2145.
298. Sheldon, R. A., Lau, R. M., Sorgedraeger, M. J., van Rantwijk, F. and Seddon, K. R. (2002). "Biocatalysis in ionic liquids." *Green Chem.* 4(2): 147-151.
299. Murugesan, S. and Linhardt, R. J. (2005). "Ionic liquids in carbohydrate chemistry - current trends and future directions." *Curr. Org. Chem.* 2: 437.
300. Prasad, V., Kale, R. R., Kumar, V. and Tiwari, V. K. (2010). "Carbohydrate chemistry and room temperature ionic liquids (RTILs): Recent trends, opportunities, challenges and future perspectives." *Curr. Org. Synth.* 7(5): 506-531.
301. Kaftzik, N., Wasserscheid, P. and Kragl, U. (2002). "Use of ionic liquids to increase the yield and enzyme stability in the β -galactosidase catalysed synthesis of *N*-acetyl-lactosamine." *Org. Process Res. Dev.* 6(4): 553-557.
302. Lang, M., Kamrat, T. and Nidetzky, B. (2006). "Influence of ionic liquid cosolvent on transgalactosylation reactions catalyzed by thermostable β -glycosylhydrolase celB from *Pyrococcus furiosus*." *Biotech. Bioeng.* 95(6): 1093 - 1100.
303. Singh, N. R., Narinesingh, D. and Singh, G. (2010). "Immobilization of β -galactosidase onto sepharose and stabilization in room temperature ionic liquids." *J. Mol. Liq.* 152(1-3): 19-27.
304. Sandoval, M., Cortés, A., Civera, C., Treviño, J., Ferreras, E., Vaultier, M., Berenguer, J., Lozano, P. and Hernaiz, M. J. (2012). "Efficient and selective enzymatic synthesis of *N*-acetyl-lactosamine in ionic liquid: a rational explanation." *RSC Adv.* 2: 6306-6314.
305. Trodler, P. Pleiss, J. (2008) "Modeling structure and flexibility of *Candida antarctica* lipase B in organic solvents". *BMC Struct. Biol.* 8, (1), 9.
306. Liu, B. Qian, X. Wu, Q. Lin, X. (2008) "Two lipase-catalyzed sequential synthesis of drug derivatives in organic media". *Enzym. Microb. Tech.* 43, (4-5), 375-380.
307. Krishna, S. H. Divakar, S. Prapulla, S. G. Karanth, N. G. (2001) "Enzymatic synthesis of isoamyl acetate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*". *J. Biotechnol.* 87, (3), 193-201.
308. Soumanou, M. M. Bornscheuer, U. T. (2003) "Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil". *Enzym. Microb. Tech.* 33, (1), 97-103.
309. Shipovskov, S. (2008) "Homogeneous esterification by lipase from *Burkholderia cepacia* in the fluorinated solvent". *Biotechnol. Prog.* 24, (6), 1262-1266.
310. Hungerhoff, B. Sonnenschein, H. Theil, F. (2002) "Combining lipase-catalyzed enantiomer-selective acylation with fluororous phase labeling: A new method for the resolution of racemic alcohols". *J. Org. Chem.* 67, (6), 1781-1785.

311. Simeo, Y. Sinisterra, J. V. Alcantara, A. R. (2009) "Regioselective enzymatic acylation of pharmacologically interesting nucleosides in 2-methyltetrahydrofuran, a greener substitute for THF". *Green Chem.* 11, (6), 855-862.
312. Ducret, A. Giroux, A. Trani, M. Lortie, R. (1995) "Enzymatic preparation of biosurfactants from sugars or sugar alcohols and fatty acids in organic media under reduced pressure". *Biotech. Bioeng.* 48, (3), 214-221.
313. Flores, M. V. Halling, P. J. (2002) "Full model for reversible kinetics of lipase-catalyzed sugar - ester synthesis in 2-methyl-2-butanol". *Biotech. Bioeng.* 78, (7), 795-801.
314. Degn, P. Zimmermann, W. (2001) "Optimization of carbohydrate fatty acid ester synthesis in organic media by a lipase from *Candida antarctica*". *Biotech. Bioeng.* 74, (6), 483-491.
315. Pedersen, N. R. Wimmer, R. Emmersen, J. Degn, P. Pedersen, L. H. (2002) "Effect of fatty acid chain length on initial reaction rates and regioselectivity of lipase-catalysed esterification of disaccharides". *Carbohydr. Res.* 337, (13), 1179-1184.
316. Oguntimein, G. B. Erdmann, H. Schmid, R. D. Lipase catalysed synthesis of sugar ester in organic solvents. *Biotech. Lett.* 1993, 15, (2), 175-180.
317. Ferrer, M. Soliveri, J. Plou, F. J. López-Cortés, N. Reyes-Duarte, D. Christensen, M. Copa-Patiño, J. L. Ballesteros, A. Synthesis of sugar esters in solvent mixtures by lipases from *Thermomyces lanuginosus* and *Candida antarctica B*, and their antimicrobial properties. *Enzym. Microb. Tech.* 2005, 36, (4), 391-398.
318. De Diego, T. Lozano, P. Abad, M. A. Steffensky, K. Vaultier, M. Iborra, J. L. (2009) "On the nature of ionic liquids and their effects on lipases that catalyze ester synthesis". *J. Biotechnol.* 140, (3-4), 234-241.
319. Kaar, J. L. Jesionowski, A. M. Berberich, J. A. Moulton, R. Russell, A. J. (2003) "Impact of ionic liquid physical properties on lipase activity and stability". *J. Am. Chem. Soc.* 125, (14), 4125-4131.
320. Tejo, B. A. Salleh, A. B. Pleiss, J. (2004) "Structure and dynamics of *Candida rugosa* lipase: the role of organic solvent". *J. Mol. Model.* 10, (5), 358-366.
321. Saifuddin, N. Raziah, A. Z. 2008, Enhancement of lipase enzyme activity in non-aqueous media through a rapid three phase partitioning and microwave irradiation. *Eur. J. Chem.* 5, (4), 864-871.
322. Kim, M.-J. Choi, M. Y. Lee, J. K. Ahn, Y. (2003) "Enzymatic selective acylation of glycosides in ionic liquids: significantly enhanced reactivity and regioselectivity". *J. Mol. Cat. B: Enz.* 26, (3-6), 115-118.
323. Ganske, F. Bornscheuer, U. T. (2005) "Optimization of lipase-catalyzed glucose fatty acid ester synthesis in a two-phase system containing ionic liquids and t-BuOH". *J. Mol. Cat. B: Enz.* 36, (1-6), 40-42.

324. Bornscheuer, U. Kazlauskas, R. (1999) "Hydrolases in organic synthesis regio- and stereoselective biotransformations". *Weinheim:Wiley/VCH*
325. Halling, P. J. (1994) "Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventional media: Theory, tests, and recommendations for experimental design and analysis". *Enzym. Microb. Tech* 16, 178-206.
326. Lee, S. H. Ha, S. H. Dang, D. T. Chang, W. J. Koo, Y. M. (2008) "Lipase-catalyzed synthesis of fatty acid sugar ester using supersaturated sugar solution in ionic liquids". *Biotech. Bioeng* 99, (1), 1-8.
327. Lee, S. H. Ha, S. H. Hiep, N. M. Chang, W.-J. Koo, Y.-M. (2008) "Lipase-catalyzed synthesis of glucose fatty acid ester using ionic liquids mixtures". *J. Biotechnol.* 133, (4), 486-489.
328. Lee, S. H. Nguyen, H. M. Koo, Y.-M. Ha, S. H. (2008) "Ultrasound-enhanced lipase activity in the synthesis of sugar ester using ionic liquids". *Process Biochem.* 43, (9), 1009-1012.
329. Cardin, A. and Weintraub, H. (1989). "Molecular modeling of protein-glycosaminoglycan interactions." *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 9(1): 21-32.
330. Uppenberg, J., Oehrner, N., Norin, M., Hult, K., Kleywegt, G. J., Patkar, S., Waagen, V., Anthonsen, T. and Jones, T. A. (1995). "Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols." *Biochemistry* 34(51): 16838-16851.
331. Fotin, A., Cheng, Y., Sliz, P., Grigorieff, N., Harrison, S. C., Kirchhausen, T. and Walz, T. (2004). "Molecular model for a complete clathrin lattice from electron cryomicroscopy." *Nature* 432(7017): 573-579.
332. Stone, J. E., Phillips, J. C., Freddolino, P. L., Hardy, D. J., Trabuco, L. G. and Schulten, K. (2007). "Accelerating molecular modeling applications with graphics processors." *J. Comput. Chem.* 28(16): 2618-2640.
333. Hovius, R., Vallotton, P., Wohland, T. and Vogel, H. (2000). "Fluorescence techniques: shedding light on ligand-receptor interactions." *Trends Pharmacol. Sci.* 21: 266-273.
334. Michalet, X., Weiss, S. and Jäger, M. (2006). "Single-molecule fluorescence studies of protein folding and conformational dynamics." *Chem. Rev.* 106(5): 1785-1813.
335. Vivian, J. T. and Callis, P. R. (2001). "Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins." *Biophys. J.* 80(5): 2093-2109.
336. Peng, Z. G., Hidajat, K. and Uddin, M. S. (2004). "Conformational change of adsorbed and desorbed bovine serum albumin on nano-sized magnetic particles." *Colloids Surf. B* 33(1): 15-21.
337. Colombo, G., Ottolina, G. and Carrea, G. (2000). "Modelling of enzyme properties in organic solvents." *Monatsh. Chem.* 131(527-547): 527-547.
338. Colombo, G. and Carrea, G. (2002). "Modeling enzyme reactivity in organic solvents and water through computer simulations." *J. Biotechnol.* 96(1): 23-33.
339. Eswar, N., John, B., Mirkovic, N., Fiser, A., Ilyin, V. A., Pieper, U., Stuart, A. C., Marti-Renom, M. A., Madhusudhan, M. S., Yerkovich, B. and Sali, A. (2003).

- "Tools for comparative protein structure modeling and analysis." *Nucleic Acids Res.* 31(13): 3375-3380.
340. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J. (1990). "Basic local alignment search tool." *J. Mol. Biol.* 215(3): 403-410.
341. Bernstein, F. C., Koetzle, T. F., Williams, G. J. B., Meyer Jr, E. F., Brice, M. D., Rodgers, J. R., Kennard, O., Shimanouchi, T. and Tasumi, M. (1977). "The protein data bank: A computer-based archival file for macromolecular structures." *J. Mol. Biol.* 112(3): 535-542
342. Pearson, W. R. and Lipman, D. J. (1988). "Improved tools for biological sequence comparison." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85(8): 2444-2448.
343. Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D. and Bairoch, A. (2005). "Protein identification and analysis tools on the ExPASy server." *The proteomics protocols handbook.* J. M. Walker, Humana Press: pp. 571-607
344. Boeckmann, B., Bairoch, A., Apweiler, R., Blatter, M. C., Estreicher, A., Gasteiger, E., Martin, M. J., Michoud, K., O'Donovan, C., Phan, I., Pilbout, S. and Schneider, M. (2003). "The SWISS-PROT protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003." *Nucleic Acids Res.* 31(1): 365-370.
345. Cantarel, B. L., Coutinho, P. M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V. and Henrissat, B. (2009). "The carbohydrate-active enzymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics." *Nucleic Acids Res.* 37(D): 233-238.
346. Klein, J., Meinecke, R., Mayer, M. and Meyer, B. (1999). "Detecting binding affinity to immobilized receptor proteins in compound libraries by HR-MAS STD NMR." *J. Am. Chem. Soc.* 121(22): 5336-5337.
347. Wang, Y.-S., Liu, D. and Wyss, D. F. (2004). "Competition STD NMR for the detection of high-affinity ligands and NMR-based screening." *Magn. Reson. Chem.* 42(6): 485-489.
348. Wen, X., Yuan, Y., Kuntz, D. A., Rose, D. R. and Pinto, B. M. (2005). "A combined STD-NMR/Molecular modeling protocol for predicting the binding modes of the glycosidase inhibitors kifunensine and salacinol to Golgi α -Mannosidase II." *Biochemistry* 44(18): 6729-6737.
349. D. G. Myszka 1997;
350. Myszka, D. G. and Rich, R. L. (2000). "Implementing surface plasmon resonance biosensors in drug discovery." *Pharm. Sci. Technol. Today* 3(9): 310-317.
351. Rich, R. and Myszka, D. (2000). "Advances in surface plasmon resonance biosensor analysis." *Curr. Opin. Biotechnol.* 11: 54-61.
352. Homola, J. (2003). "Present and future of surface plasmon resonance biosensors." *Anal. Bioanal. Chem.* 377(3): 528-539.
353. Karlsson, R. (2004). "SPR for molecular interaction analysis: a review of emerging application areas." *J. Mol. Recognit.* 17(3): 151-161.
354. Pattnaik, P. (2005). "Surface plasmon resonance: applications in understanding receptor-ligand interaction". *Appl. Biochem. Biotechnol.* 126:79-92.
355. Rich, D.G., Papalia, G., Flynn, P., Furneisen, J., Muñoz, F.J., Hernáiz, M.J. and Myszka, D.G. (2009). "A global benchmark study using affinity-based biosensors". *Anal. Biochem.* 386:194-216.

356. Homola, J. (2008). "Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological Species." *Chem. Rev.* 108(2): 462-493.
357. Smith, E. A., Thomas, W. D., Kiessling, L. L. and Corn, R. M. (2003). "Surface plasmon resonance imaging studies of protein-carbohydrate interactions." *J. Am. Chem. Soc.* 125(20): 6140-6148
358. Suda, Y., Arano, A., Fukui, Y., Koshida, S., Wakao, M., Nishimura, T., Kusumoto, S. and Sobel, M. (2006). "Immobilization and clustering of structurally defined oligosaccharides for sugar chips: an improved method for surface plasmon resonance analysis of protein-carbohydrate interactions." *Bioconjugate Chem.* 17(5): 1125-1135.
359. Linman, M. J., Taylor, J. D., Yu, H., Chen, X. and Cheng, Q. (2008). "Surface plasmon resonance study of protein-carbohydrate interactions using biotinylated sialosides." *Anal. Biochem.* 80(11): 4007-4013.
360. Muñoz, F., Rumbero, A., Sinisterra, J. V., Santos, J., André, S., Gabius, H. J., Jiménez-Barbero, J. and Hernáiz, M. J. (2008). "Versatile strategy for the synthesis of biotin-labelled glycans, their immobilization to establish a bioactive surface and interaction studies with a lectin on a biochip." *Glycoconjugate J.* 25(7): 633-646.
361. Munoz, J. F., Andre, S., Gabius, H.-J., Sinisterra, J. V., Hernaiz, M. J. and Linhardt, R. J. (2009). "Green glycosylation using ionic liquid to prepare alkyl glycosides for studying carbohydrate-protein interactions by SPR." *Green Chem.* 11(3): 373-379.
362. Duverger, E., Frison, N., Roche, A.C. and Monsigny, M. (2003). "Carbohydrate-lectin interactions assessed by surface plasmon resonance". *Biochimie* 85 (1-2): 167-179.
363. Fernández-González, A., Rychlowska, J., Badía, R. and Salzer, R. (2007) "SPR imaging as a tool for detecting mucin-anti mucin interaction. Outline of the development of a sensor for near-patient testing for mucin". *Microchim. Acta* 158(3): 219-225.
364. Hurtado-Gómez, E., Abián, O., Muñoz, F.J., Hernáiz, M.J., Velázquez-Campoy, A. and Neira, J.L. (2008). "Defining the epitope region of a peptide from the *Streptomyces coelicolor* phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system able to bind to the enzyme I". *Biophysical J.* 95(3): 1336-1348.
365. Karamanska, R., Clarke, J., Blixt, O., MacRae, J., Zhang, J., Crocker, P., Laurent, N., Wright, A., Flitsch, S., Russell, D. and Field, R. (2008). "Surface plasmon resonance imaging for real-time, label-free analysis of protein interactions with carbohydrate microarrays". *Glycoconjugate J.* 25(1): 69-74.
366. Muñoz, F.J., Pérez, J., Rumbero, A., Santos, J.I., Cañada, F.J., André, S., Gabius, H.J., Jiménez-Barbero, J., Sinisterra, J.V. and Hernaiz, M.J. (2009). "Glycan tagging to produce bioactive ligands for a surface plasmon resonance (SPR) study via immobilization on different surfaces". *Bioconjugate Chem.* 20(4):673-682.
367. Muñoz, F.J., Santos, J.I., Arda, A., André, S., Gabius, H.J., Sinisterra, J.V., Jiménez-Barbero, J. and Hernáiz, M.J. (2010). "Binding studies of adhesion/growth-regulatory galectins with glycoconjugates monitored by surface plasmon resonance and NMR spectroscopy" *Org. Biomol.Chem.* 8(13):2986-2992.

368. Safina, G., Duran, I.B., Alasel, M. and Danielsson, B. (2011). "Surface plasmon resonance for real-time study of lectin-carbohydrate interactions for the differentiation and identification of glycoproteins". *Talanta*. 84(5):1284-1290.
369. Shinohara, Y., Hasegawa, Y., Kaku, H. and Shibuya, N. (1997). "Elucidation of the mechanism enhancing the avidity of lectin with oligosaccharides on the solid phase surface." *Glycobiology*. 7(8): 1201-1208.
370. Capilla I. and Linhardt R.J. (2002) Heparin-protein interactions. *Angewandte chemie international edition*. 41: 390-412.
371. Rabenstein D. L. (2002) Heparin and heparan sulfate: structure and function. *Nat Prod Rep*. 19: 312-331.
372. Peterson, S.; Frick, A.; Liu, J. (2009) " Design of biologically active heparan sulfate and heparin using an enzyme-based approach" *Natural Product Reports* 26: 610-627.
373. Park, P. W.; Reizes, O.; Bernfield, M. J. (2000) " Cell surface heparan sulfate proteo-glycans: selective regulators of ligand-receptor encounters". *J. of Biological Chemistry* 275: 29923-29926.
374. Linhardt, R. J. (2003) "Heparin structure and activity" *Journal of Medicinal Chemistry* 46:2551-2564.
375. Linhardt, R. J.; Liu, (2012) "Synthetic heparin" *J. Current Opinion in Pharmacology* 12:217-219.
376. Petitou, M.; Casu, B.; Lindahl, U. (2003) "1976-1983, a critical period in the history of heparin: the discovery of the antithrombin binding site". *Biochimie* , 85:83-89.
377. Capila I., Hernáiz M.J., Mo Y.D., Mealy T.R., Campos B., Dedman J.R., Linhardt R.J., Seaton B.A. (2001). "Annexin V-heparin oligosaccharide complex suggest heparan sulfate-mediated assembly on cell surfaces". *Structure*. 9: 57-64.
378. Hernáiz M.J., Liu J., Rosenberg R.D. and Linhardt R.J. (2000). "Enzymatic modification of heparan sulfate on a biochip promotes its interaction with ATIII". *Biochemical and biophysical*. 276: 292-297.
379. Libeu C.P. et al. (2001) "New insights into the heparan sulfate proteoglycan-binding activity of Apolipoprotein E". *The Journal of Biological chemistry*. 276: 39138-39144.
380. Cochran S., Li C.P., Ferro V. (2008) "A surface plasmon resonance-based solution affinity assay for heparan sulphate-binding proteins". *Glycoconjugated journal*.
381. Osmond R. i. W., Kett W.C., Skett S.E., Coombe D.R. (2002). "Protein-heparin interactions measured by BIAcore 2000 are affected by the method of heparin immobilization". *Analytical biochemistry*. 310: 199-207.
382. Miller, J. (1972). *Experiments in Molecular Genetics Manual*. New York., Cold Spring Harbor Laboratory.
383. Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal. Biochem*. 72(1-2): 248-254.

384. Fourage, L., Helbert, M., Nicolet, P. and Colas, B. (1999). "Temperature dependence of the ultraviolet-visible spectra of ionized and un-ionized forms of nitrophenol: consequence for the determination of enzymatic activities using nitrophenyl derivatives. a warning." *Anal. Biochem.* 270(1): 184-185.
385. Dion, M., Fourage, L., Hallet, J. N. and Colas, B. (1999). "Cloning and expression of a β -glycosidase gene from *Thermus thermophilus*. Sequence and biochemical characterization of the encoded enzyme." *Glycoconjugate. J.* 16(1): 27-37.
386. Bayón, C. (2013). "Obtención de biocatalizadores para la síntesis enzimática de glicoestructuras de interés biológico en condiciones sostenibles". Tesis Doctoral. Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica. Universidad Complutense de Madrid.
387. Madigan, M. T., Martinko, J. M. and Parker, J. (2003). *Brock Biology of Microorganisms*. Prentice Hall/Pearson Education.
388. Nord, C. E. and Wadstrom, T. (1972). "Formation of -L- and -D-fucosidase in cultures of *Streptococcus mitis*." *Med. Microbiol. Immunol.* 158(2): 95-103.
389. Wiederschain, G. Y. and Prokopenkov, A. A. (1973). " β -D-Galactosidase and β -D-fucosidase of pig kidney." *Arch. Biochem. Biophys.* 158(2): 539-543.
390. Calvo, P., Santamaria, M. G., Melgar, M. J. and Cabezas, J. A. (1983). "Kinetic evidence for two active sites in beta-D-fucosidase of *Helicella ericetorum*." *Int. J. Biochem.* 15(5): 685-693.
391. Melgar, M. J., Cabezas, J. A. and Calvo, P. (1985). "Kinetic studies on β -D-fucosidase of *Littorina littorea* L." *Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.* 80(1): 149-156.
392. Den Tandt, W. R. (1987). "Human leukocyte and plasma beta-D-fucosidase: identity with β -D-galactosidase." *Biochem. Med. Metab. Biol.* 38(3): 331-337.
393. Nunoura, N., Ohdan, K., Yano, T., Yamamoto, K. and Kumagai, H. (1996). "Purification and characterization of β -D-glucosidase (β -D-fucosidase) from *Bifidobacterium breve* clb acclimated to cellobiose." *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60(2): 188-193.
394. Srisomsap, C., Svasti, J., Surarit, R., Champattanachai, V., Sawangareetrakul, P., Boonpuan, K., Subhasitanont, P. and Chokchaichamnankit, D. (1996). "Isolation and characterization of an enzyme with β -glucosidase and β -fucosidase activities from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre." *J. Biochem.* 119(3): 585-590.
395. Mathews, C. K., Ahern, K. G., Van Holde, K. E. and de Buitrago, J. M. G. (2003). *Biochemistry*. Addison Wesley.
396. García-Burgos C. (2004). "Desarrollo de nuevos geles de agarosa y agar para preparar catalizadores de células inmovilizadas. Tesis Doctoral Universidad Complutense de Madrid.
397. Sandoval, M. (2012). "Nuevas estrategias sostenibles para la síntesis enzimática de oligosacáridos y glicoconjugados de interés biológico". Tesis Doctoral. Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica. Universidad Complutense de Madrid

398. Pérez, M. (2009). Tesis Doctoral. Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica. Universidad Complutense de Madrid
399. Hernaiz, M. J. Crout, D. H. G. (2000) "A highly selective synthesis of N-acetylactosamine catalyzed by immobilised β -galactosidase from *Bacillus circulans*". *J. Mol. Catal. B. Enzym.* 10(4): 403-408.
400. Farkas, E. Thiem, J. (1999) "Enzymatic synthesis of galactose-containing disaccharides employing beta-galactosidase from *Bacillus circulans*". *Eur. J. Org. Chem.* (11): 3073-3077.
401. Yanahira, S. Yabe, Y. Nakakoshi, M. Miura, S. Matsubara, N. Ishikawa, H. (1998) "Structures of novel acidic galactooligosaccharides synthesized by *Bacillus circulans* β -Galactosidase". *Bios. Biotech. Biochem.* 62(9): 1791-1794.
402. Risse, B. Stempfer, G. Rudolph, R. Schumacher, G. Jaenicke, R. (1992) "Characterization of the stabilizing effect of point mutations of pyruvate oxidase from *Lactobacillus plantarum*: Protection of the native state by modulating coenzyme binding and subunit interaction". *Protein Sci.* 1(12): 1710-1718.
403. Tello-Solis, S. R. Jimenez-Guzman, J. Sarabia-Leos, C. Gomez-Ruiz, L. Cruz-Guerrero, A. E. Rodriguez-Serrano, G. M. Garcia-Garibay, M. (2005) "Determination of the secondary structure of *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase by circular dichroism and its structure-Activity relationship as a function of the pH". *J. Agric. Food Chem.* 53(26):10200-10204.
404. Jain, A. and Ashbaugh, H. S. (2011). "Helix stabilization of poly(ethylene glycol)-peptide conjugates." *Biomacromolecules* 12(7): 2729-2734.
405. Attri, P., Venkatesu, P. and Kumar, A. (2012). "Water and a protic ionic liquid acted as refolding additives for chemically denatured enzymes." *Org. Biomol. Chem.* 10(37): 7475-7478.
406. Qiang, S., Yubo, F., Lijiang, Y. and Yi Qin, G. (2012). "From protein denaturant to protectant: comparative molecular dynamics study of alcohol/protein interactions." *J. Chem. Phys.* 136(11): 115101-115109.
407. Romeo, G. (2012). "Thermal motions quantification of lysozyme in aqueous mixtures with different co-solvent: glycerol [C₃H₅(OH)₃], trehalose [C₁₂H₂₂O₁₁], sucrose [C₁₂H₂₂O₁₁], and a chaotropic agent [CO(NH₂)₂] by osiris near-backscattering crystal analyser spectrometer." *Appl. Phys. A: Mater. Sci. Process.* 106(4): 893-900.
408. Moreno, J. M., Arroyo, M., Hernáiz, M. J. and Sinisterra, J. V. (1997a). "Covalent immobilization of pure isoenzymes from lipase of *Candida rugosa*." *Enzym. Microb. Tech.* 31: 552-558.
409. Moreno, J. M., Hernáiz, M. J., Sánchez-Montero, J. M., Sinisterra, J. V., Bustos, M. T., Sanchez, M. E. and Bello, J. F. (1997b). "Immobilization of pure lipases A and B from *Candida cylindracea* increase the enantioselectivity and the thermostability." *J. Mol. Catal. B: Enz.* 2: 177-184.
410. Bernal, C., Marciello, M., Mesa, M., Sierra, L., Fernandez-Lorente, G., Mateo, C. and Guisan, J. M. (2013). "Immobilisation and stabilisation of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* using a glyoxyl support." *Int. Dairy J.* 28(2): 76-82.
411. Pedroche, J., del Mar Yust, M., Mateo, C., Fernández-Lafuente, R., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Vioque, J., Guisán, J. M. and Millán, F. (2007). "Effect of the support and experimental conditions in the intensity of the multipoint covalent

- attachment of proteins on glyoxyl-agarose supports: Correlation between enzyme–support linkages and thermal stability." *Enzyme Microb. Technol.* 40(5): 1160-1166.
412. (2002) "The protein recombinant handbook: protein amplification and simple purification". Amersham Pharmacia Biotech. , 18-1142-75, pp. 41–58
413. Baneyx F. (1999) "Recombinant protein expression in *E. coli*". *Curr Opin Biotechnol.* 10(5):411-21.
414. Sørensen H. P. and Mortense K.K. (2005) Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotech.* 115: 113–128
415. Gumel, A. M. Annuar, M. S. M. Heidelberg, T. Chisti, Y. (2011)" Lipase mediated synthesis of sugar fatty acid esters". *Process Biochem.* 46(11): 2079-2090.
416. Iñigo, S. Porro, M. T. Montserrat, J. M. Iglesias, L. E. Iribarren, A. M. (2005) "Deprotection of peracetylated methyl D-ribosides through enzymatic alcoholysis: Different recognition of the anomers". *J. Mol. Cat. B: Enz.* 35(1-3): 70-73.
417. Nicolosi, G. Spatafora, C. Tringali, C. (1999). "Enzymatic procedure catalysed by lipase from *Candida antarctica* for the regioprotection-deprotection of glucosamine". *Tetrahedron: Asymmetry.* 10(15):2891-2897.
418. Cabrera, Z. Fernandez-Lorente, G. Fernandez-Lafuente, R. Palomo, J. M. Guisan, J. M. (2009). "Novozym 435 displays very different selectivity compared to lipase from *Candida antarctica* B adsorbed on other hydrophobic supports". *J. Mol. Cat. B: Enz.* 57(1-4): 171-176.
419. Biacore, A. B. s. h., version 3.0 (1997). "Biacore, A. BIAevaluation software handbook, version 3.0."

VII. ABSTRACT

ABSTRACT

Design and optimization of Biocatalysts for their application on the Synthesis of carbohydrates in sustainable conditions**(Diseño y optimización de biocatalizadores para su aplicación en la síntesis de carbohidratos en condiciones)****Introduction**

Cell surface carbohydrates are involved in many biological processes such as cell-cell recognition and communication, growth regulation and antibody interaction, bacterial and viral infection and other crucial intercellular recognition events. In most of them, the carbohydrate binds to selectins, galectins, and other carbohydrate-binding proteins.¹⁻³ Since individual protein-carbohydrate interactions are usually weak, multivalency is often required to achieve biologically relevant binding affinities and selectivities.⁴ The study of molecular processes involving carbohydrates requires the development of tools for multivalent presentation of carbohydrate.

An example of a key carbohydrate structure is galacto-*N*-biose [Gal- β (1-3)-GalNAc] which is integrated in the Tn antigen associated with carcinoma cells, or lacto-*N*-biose [Gal- β (1-3)-GlcNAc], the critical disaccharide of Lewis antigen (sLea), which has been reported to act as a ligand in metastasis of cancer cells.⁵⁻¹¹ Due to its important biological functions, these molecules have attracted considerable interest and they have been a valuable resource with an increasing demand in both medicine and biotechnology.¹²

There is a great interest in the synthesis of glycostructures (monovalent or multivalent) in order to deepen our knowledge of their biological functions. Organic chemical methods for obtaining them have been developed, but they involve several elaborate protection and deprotection procedures and the use of toxic reagents.¹³⁻¹⁸ Furthermore, biocatalysis is an attractive prospect for the synthesis of compounds in mild reaction conditions, biodegradable and environmentally acceptable catalysts.

Also these reactions proceed with high regio-, chemo- and stereoselectivity.¹⁹⁻²⁰ To perform the enzymatic synthesis of oligosaccharides and glycoconjugates mainly three types of enzymes, glycosidases, glycosynthases and glycosyltransferases, can be used.²¹

At the same time, recently, green solvents have received increasing attention as new co-solvents for biocatalytic organic synthesis in general, and in carbohydrate chemistry in particular because of their lower toxicity. It has been shown that the use of solvents derived from biomass, or ionic liquids (ILs) as co-solvents in enzymatic reactions, lead to a variation of the enzyme activity.²²⁻²⁷

Main purposes of this research:

1. Search for glycosidase producing mesophilic microorganisms useful in the synthesis of biologically interesting oligosaccharides.
2. Enzymatic synthesis of biologically interesting disaccharides (Gal- β (1-4)-GlcNAc and Gal- β (1-6)-GlcNAc) using *Bacillus circulans* ATCC 31382 in the presence of green solvents.
3. Enzymatic synthesis of biologically interesting disaccharides (Gal- β (1-4)-GlcNAc and Gal- β (1-6)-GlcNAc) using *Bacillus circulans* ATCC 31382 semi purified in the presence of green solvents.
4. Enzymatic synthesis of biologically interesting disaccharides (Gal- β (1-3)-GlcNAc and Gal- β (1-3)-GalNAc) using β -Gal-3 from *Bacillus circulans* ATCC 31382 immobilized using different approaches in the presence of green solvents.
5. Enzymatic synthesis of biologically interesting disaccharides (*p*NF-Gluc-(1,2)-Fuc and *p*NF-Gluc-(1,3)-Fuc) using α -Fuc from *Sulfolobus sulfataricus* P2 in the presence of green solvents.
6. Structural analysis by fluorescence spectrometry and molecular modelling of the effect of green solvents in reactions catalyzed by the α -Fuc enzyme from *Sulfolobus sulfataricus* P2.
7. Enzymatic synthesis of biologically interesting disaccharides using immobilized lipases in the presence of green solvents.

8. Study of proteins interactions with heparin and heparan sulphate through different immobilization approaches.

Chapter 1: Search for glycosidases useful for the synthesis of biologically interesting oligosaccharides

A screening for glycosidase producing microorganisms has been developed from yeast collection composed by 80 mesophilic organisms. An α -glucosidase was and characterized. The production of this enzyme was induced by sucrose and maltose and showed high activity for the hydrolysis of α -glucose residues in mesophilic conditions.

An optimization of reactions conditions with *Bacillus circulans* USA was performed. Catalytic constants, pH optimization and induction studies were carried out in order to find optimal conditions. K_m 1,43 mM and V_{max} 0,012 mM s⁻¹ were obtained as results, as well as pH optimal of 6,0, and no induction activity. Transglycosylation reactions were performed using cells from *Bacillus circulans* culture, showing a yield of 52% in the synthesis of Gal- β (1-3)-GlcNAc.

Chapter 2: Synthesis of biologically interesting disaccharides using Glycosidases

The glycosidase from Biolacta commercial product was semipurified using different approaches as fractioned precipitation with ammonium sulphate and gel filtration. Two fractions were obtained, and their transglycosylation activity was assayed in the presence of green solvents.

The β -Gal-3 enzyme from *Bacillus circulans* ATCC 31382 has been immobilized in carbon nanotubes, phenolic polymers and glyoxyl agaroses.

In transglycosylation reactions, the enzyme immobilized in glyoxil agarose was able to synthesize Gal- β (1-3)-GlcNAc and Gal- β (1-3)-GalNAc using *p*NP- β -Gal as donor and GlcNAc or GalNAc as acceptors, showing a maximum yield of 25% and 43% respectively for each disaccharide after 3 h. The effect of green solvents derived from biomass and ionic liquids (ILs) as reaction co-solvents was analyzed. Solvents derived from biomass enhanced the specificity of the transglycosylation reaction

catalyzed by β -Gal-3, with yields of Gal- β (1-3)-GlcNAc and Gal- β (1-3)-GalNAc of 18,5 and 26,1% respectively with solvent **DMA1** (a dimethylamide derivative), being the optimal concentration of co-solvent of 2 M. Moreover, ILs used as co-solvents in transglycosylation reactions also increased the yield of Gal- β (1-3)-GlcNAc and Gal- β (1-3)-GalNAc, obtaining the best result with **[Bmim][PF6]**, with a 18,5% and 14,51% respectively yield, being the optimal concentration of the co-solvent of 30%.

In transglycosylation reactions, the enzyme immobilized in carbon nanotubes was able to synthesize Gal- β (1-3)-GlcNAc and Gal- β (1-3)-GalNAc using *p*NP- β -Gal as donor and GlcNAc or GalNAc as acceptors, showing a maximum yield of 24% and 8,4% respectively for each disaccharide after 3 h. The effect of green solvents derived from biomass and ionic liquids (ILs) as reaction co-solvents was analyzed. Solvents derived from biomass enhanced the specificity of the transglycosylation reaction catalyzed by β -Gal-3, with yields of Gal- β (1-3)-GlcNAc and Gal- β (1-3)-GalNAc of 4,5 and 10,5% respectively with solvent **DMA1** (a dimethylamide derivative), being the optimal concentration of co-solvent of 2 M. Moreover, ILs used as co-solvents in transglycosylation reactions also increased the yield of Gal- β (1-3)-GlcNAc and Gal- β (1-3)-GalNAc, obtaining the best result with **[Bmim][PF6]**, with a 13,2% and 3,05% respectively yield, being the optimal concentration of the co-solvent of 30%.

In transglycosylation reactions, the enzyme immobilized in phenolic polymers was able to synthesize Gal- β (1-3)-GlcNAc using *p*NP- β -Gal as donor and GlcNAc as acceptor, showing a maximum yield of 100% after 5 h.

The α -fucosidase from *Sulfolobus sulfataricus* was purified from a culture cell using GST fusion protein. The enzyme was employed to perform transglycosylation reaction of the following disaccharides: *p*NF-Gluc-(1,-2)-Fuc, *p*NF-Gluc-(1,-3)-Fuc and *p*NF-Fuc-(1,-3)-Fuc.

Reactions were made in the presence of green solvents. **G2** decreased yield, **G3** produced regioselectivity changes and **DMA1** inactivated the enzyme.

The effects of different sustainable solvents were **DMA1** and **GC4** on the α -Fuc structure was studied by fluorescence spectroscopy. Using concentrations of 2 M, these co-solvents cause structural modifications which increase or decrease the affinity of the substrate for the active site of the enzyme, and decrease the affinity of the aqueous phase for them, increasing the time that they remain located in optimal reaction distance.

Finally, lipases have been immobilized using two different strategies: macroporous polymers and carbon nanotubes, obtaining the best results with the latter. Deacetylation reactions have been performed using immobilization complex. Best result was obtained with celite support and PSL enzyme. In all cases, activity retained was higher than 20% compared to the free enzyme.

Chapter 3: Study of interactions of heparin and heparan sulphate by SPR

Heparin and heparan sulphate were immobilized using two strategies. Antithrombin III has been using as protein model for the kinetic analysis of the interaction by SPR shows a recognition sequence presence is necessary for interaction between molecules.

References

1. Lingwood, C. A. (1998). "Oligosaccharide receptors for bacteria: a view to a kill." *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2(6): 695-700.
2. Schmidt, M. A., Riley, L. W. and Benz, I. (2003). "Sweet new world: glycoproteins in bacterial pathogens." *Trends Microbiol.* 11: 554-561.
3. Rudd, P. M., Wormald, M. R. and Dwek, R. A. (2004). "Sugar-mediated ligandreceptor interactions in the immune system." *Trends Biotechnol.* 22(10): 524- 530.
4. Krishnamurthy, V. M., Estroff, L. A. and Whitesides, G. M. (2006). Multivalency in ligand design. *Fragment-based approaches in drug discovery.* Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 11-53.
5. Springer, G. F. (1984). "T and Tn, general carcinoma autoantigens." *Science* 224: 1198-1206.

6. Takada, A., Ohmori, K., Yoneda, T., Tsuyuoka, K., Hasegawa, A., Kiso, M. and Kannagi, R. (1993). "Contribution of carbohydrate antigens sialyl Lewis A and sialyl Lewis X to adhesion of human cancer cells to vascular endothelium." *Cancer Res.* 53(2): 354-361.
7. Rapoport, E., Khaidukov, S., Baidina, O., Bojenko, V., Moiseeva, E., Pasytnina, G., Karsten, U., Nifant'ev, N., LePendou, J. and Bovin, N. (2003). "Involvement of the Gal- β (1-3)-GalNac β structure in the recognition of apoptotic bodies by THP-1 cells." *Eur. J. Cell. Biol.* 82(6): 295-302.
8. Hölemann, A., Seeberger, P.H. (2004). "Carbohydrate diversity: synthesis of glycoconjugates and complex carbohydrates." *Curr. Opin. Biotechnol.* 15: 615-622.
9. Caines, M. E. C., Zhu, H., Vuckovic, M., Willis, L. M., Withers, S. G., Wakarchuk, W. W. and Strynadka, N. C. J. (2008). "The structural basis for T-antigen hydrolysis by *Streptococcus pneumoniae*." *J. Biol. Chem.* 283(46): 31279- 31283.
10. Shirato, H., Ogawa, S., Ito, H., Sato, T., Kameyama, A., Narimatsu, H., Xiaofan, Z., Miyamura, T., Wakita, T., Ishii, K. and Takeda, N. (2008). "Noroviruses distinguish between type 1 and type 2 histo-blood group antigens for binding." *J. Virol.* 82(21): 10756-10767.
11. Mandal, P. K. and Turnbull, W. B. (2010). "Studies on the synthesis of Lewis-y oligosaccharides." *Carbohydr. Res.* 346(14): 2113-2120.
12. Schauer, R. (1982). "Chemistry, metabolism, and biological functions of sialic acids." *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 40: 131-234.
13. Lemieux, R. U. and Driguez, H. (1975). "Chemical synthesis of 2-acetamido-2-deoxy-4-O-(α -L-fucopyranosyl)-3-O-(β -D-galactopyranosyl)-D-glucose. Lewis a blood-group antigenic determinant." *J. Am. Chem. Soc.* 97(14): 4063-4069.
14. Schmidt, R. R. and Rücker, E. (1980). "Stereoselective glycosidations of uronic acids." *Tetrahedron Lett.* 21(15): 1421-1424.
15. Paulsen, H. (1982). "Advances in selective chemical syntheses of complex oligosaccharides." *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 21(3): 155-173.

16. Khare, D. P., Hindsgaul, O. and Lemieux, R. U. (1985). "The synthesis of monodeoxy derivatives of lacto-*N*-biose I and *N*-acetyl-lactosamine to serve as substrates for the differentiation of α -L-fucosyltransferases." *Carbohydr. Res.* 136(0): 285-308.
17. Schmidt, R. R. (1986). "New methods for the synthesis of glycosides and oligosaccharides- are there alternatives to de Koenigs-Knorr method?" *Angew. Chem. Int. Ed.* 25: 212-235.
18. Wilstermann, M. and Magnusson, G. (1995). "Synthesis of disaccharide glycosyl donors suitable for introduction of the β -D-Gal p-(1-3)- α -and- β -d-Gal pNAc groups." *Carbohydr. Res.* 272(1): 1-7.
19. Sheldon, R. A. and van Rantwijk, F. (2004). "Biocatalysis for sustainable organic synthesis." *Aust. J. Chem.* 57(4): 281-289.
20. Alcalde, M., Ferrer, M., Plou, F. J. and Ballesteros, A. (2006). "Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes." *Trends Biotechnol.* 24: 281-287.
21. Perugino, G., Trincone, A., Rossi, M. and Moracci, M. (2004). "Oligosaccharide synthesis by glycosynthases." *Trends Biotechnol.* 22(1): 31-37.
22. Hernaiz, M. J., Alcántara, A. R., García, J. I. and Sinisterra, J. V. (2010). "Applied biotransformations in green solvents." *Chem. Eur. J.* 16: 9422-9437.
23. Pérez, M., Sinisterra, J. V. and Hernáiz, M. J. (2010). "Hydrolases in green solvent." *Curr. Org. Chem.* 14(20): 2366-2383.
24. Pérez-Sánchez, M., Cortés-Cabrera, Á., García-Martín, H., Sinisterra, J. V., García, J. I. and Hernáiz, M. J. (2011a). "Improved synthesis of disaccharides with *Escherichia coli* β -galactosidase using bio-solvents derived from glycerol." *Tetrahedron* 67(40): 7708-7712.
25. Pérez-Sánchez, M., Sandoval, M., Cortés-Cabrera, A., García-Marín, H., Sinisterra, J. V., García, J. I. and Hernaiz, M. J. (2011b). "Solvents derived from glycerol modify classical regioselectivity in the enzymatic synthesis of disaccharides with *Biolacta* β -galactosidase." *Green Chem.* 13: 2810-2817.

26. Pérez-Sánchez, M., Sandoval, M. and Hernáiz, M. J. (2012). "Bio-solvents change regioselectivity in the synthesis of disaccharides using Biolacta β -galactosidase." *Tetrahedron* 68(9): 2141-2145.
27. Sandoval, M., Cortés, A., Civera, C., Treviño, J., Ferreras, E., Vaultier, M., Berenguer, J., Lozano, P. and Hernaiz, M. J. (2012). "Efficient and selective enzymatic synthesis of *N*-acetyl-lactosamine in ionic liquid: a rational explanation." *RSC Adv.* 2: 6306-6314.