

ABREVIATURAS.....	i
RESUMEN.....	ii
ABSTRACT.....	iii
OBJETIVOS.....	iv
<b>CAPITULO 1.- Introducción general.....</b>	<b>1</b>
1.1- Las enzimas son biocatalizadores altamente específicos.....	2
1.2- Biocatálisis en sistemas no acuosos.....	3
1.3- Inmovilización de enzimas.....	5
Inmovilización covalente.....	6
Inmovilización sobre soportes glutaraldehido-agarosa.....	10
Inmovilización sobre soportes tiol-reactivos (TSI-agarosa).....	10
1.4- Síntesis enzimática de glicósidos.....	11
Glicósidos.....	11
Glicosidasas.....	12
Mecanismo de transglicosilación.....	13
Requisitos para la obtención de buenos rendimientos en la síntesis enzimática de Glicósidos.....	14
Selección del solvente.....	15
Regioselectividad.....	16
1.5- Características de las $\beta$ - galactosidasas.....	17
$\beta$ -Galactosidasa de <i>Kluyveromices lactis</i> .....	17
$\beta$ -Galactosidasa de <i>Aspergillus oryzae</i> .....	17
<b>CAPÍTULO 2.- Materiales y métodos.....</b>	<b>18</b>
2.1- Síntesis de geles glutaraldehido- agarosa.....	19
2.2- Síntesis de geles TSI-agarosa.....	19
2.3- Determinación de proteínas.....	20
2.4- Actividad enzimática.....	20
2.5- Inmovilización de $\beta$ -galactosidasa sobre geles glutaraldehido-agarosa.....	20
2.6 - Reducción de las $\beta$ -galactosidasas de <i>K. lactis</i> y <i>A. oryzae</i> .....	21
2.7 - Estabilidad con el pH de la $\beta$ -galactosidasa de <i>K. lactis</i> .....	21
2.8 - Tiolación de $\beta$ -galactosidasa de <i>K. lactis</i> y <i>A. oryzae</i> .....	21

2.9 - Inmovilización de $\beta$ -galactosidasas reducidas y tioladas sobre geles TSI-agarosa .....	22
2.10 - Determinación de parámetros cinéticos.....	22
2.11 - Estabilidad térmica.....	23
2.12 - Estabilidad frente a los solventes.....	23
2.13 - Síntesis de enzimática de MUGal.....	23
2.14 - Síntesis enzimática de galactosil-xilosa.....	24
2.15 - Síntesis enzimática de galactosil-etilenglicol.....	24
2.16 - Seguimiento del avance de las síntesis de glicósidos.....	24
2.17 - Purificación de la galactosil-xilosa por cromatografía preparativa en capa fina.....	25
2.18 - Análisis químico de carbohidratos.....	25
2.19 - Análisis de los acetatos de alditol por GLC.....	26
2.20 - Análisis de acetatos de alditol parcialmente metilados por GLC-MS.....	27

**CAPÍTULO 3.- Inmovilización de  $\beta$ -galactosidasas de *K.lactis* y *A. oryzae* sobre soportes**

<b>glutaraldehido-agarosa.....</b>	<b>28</b>
3.1- Introducción.....	29
3.2- Resultados.....	32
Inmovilización de las $\beta$ -galactosidasas de <i>K. lactis</i> y <i>A. oryzae</i> sobre geles glutaraldehido	
agarosa.....	32
Estabilidad térmica.....	33
Efecto de la presencia de cosolventes.....	35
3.3 Discusión.....	40

**CAPÍTULO 4.- Estrategias de generación de grupos tiol para la inmovilización de  $\beta$ -**

<b>Galactosidasas sobre soportes tiol reactivos.....</b>	<b>42</b>
4.1- Introducción.....	43
4.2- Resultados.....	46
Modificación química.....	46
Inmovilización de $\beta$ -galactosidasa en TSI-agarosa.....	49
Estabilidad Térmica.....	51
Estabilidad frente al efecto de los cosolventes.....	52
4.3- Discusión.....	56

<b>CAPÍTULO 5.- Síntesis enzimática de galactósidos utilizando <math>\beta</math>- galactosidasa de <i>A. oryzae</i> soluble e inmovilizada.</b> .....	60
5.1- Introducción.....	61
5.2- Resultados.....	63
Síntesis de 4- metil umbeliferil $\beta$ -D-galactopiranosido.....	63
Síntesis de galactosil-xilosa.....	64
Purificación e identificación de la galactosil-xilosa.....	67
Síntesis de otros galactósidos.....	71
5.3.- Discusión.....	73
<b>CAPÍTULO 6.- Consideraciones finales.</b> .....	76
<b>BIBLIOGRAFÍA.</b> .....	80
<b>AGRADECIMIENTOS.</b> .....	88
<b>PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS.</b> .....	90