

RESUMEN

Los glicósidos han despertado un gran interés debido a su participación en múltiples procesos biológicos. El uso de glicosidasas constituye una alternativa atractiva a su compleja síntesis química, permitiendo la formación de enlaces glicosídicos en un solo paso de reacción y con un control completo de la configuración del centro anomérico. Como la síntesis de glicósidos frecuentemente requiere el uso de solventes orgánicos, las glicosidasas a ser utilizadas deben ser estables en dichas condiciones. Una de las estrategias más utilizadas para la estabilización de enzimas es su inmovilización. Esto a su vez facilita la separación de la enzima del medio de reacción, propiedad esencial en procesos de síntesis cinéticamente controlados.

Se estudiaron dos estrategias de inmovilización de β -galactosidasas. La primera a través de la unión de grupos amino de la enzima con grupos aldehído del soporte, y la segunda mediante la formación de puentes disulfuro entre grupos tiol expuestos de la enzima y estructuras tiol-reactivas del soporte. La inmovilización sobre geles glutaraldehído generó derivados enzimáticos con rendimientos de inmovilización superiores al 60%, buenas actividades específicas y térmicamente más estables que la enzima soluble. Se logró la estabilización de la β -galactosidasa de *K. lactis* en presencia de acetona y DMF (18% v/v). La estabilidad del derivado de β -galactosidasa de *A. oryzae* frente al efecto de los cosolventes, aunque no logró mejorar la correspondiente estabilidad de la enzima soluble, fue superior a la del derivado de *K. lactis*. Esto lo hizo potencialmente aplicable a la síntesis enzimática en medio orgánico.

Las propiedades de los derivados obtenidos por inmovilización de la enzima sobre soportes tiolsulfonato-agarosa fueron diferentes, dependiendo del origen de la enzima y de la modificación química realizada previa a la inmovilización. Se obtuvieron derivados con buenas actividades específicas y rendimientos de inmovilización superiores al 60 %, pero sólo se logró una mayor estabilidad en presencia de cosolventes orgánicos para el caso del derivado de la β -galactosidasa de *K. lactis* obtenido con la enzima reducida.

Se estudió la síntesis de distintos galactósidos a partir de *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG) y lactosa como dadores del grupo galactosilo y distintos aceptores (4-metilumbeliferona, xilosa, etilenglicol). Se obtuvo 4-metilumbiliferil- β -D-galactopiranosido con un rendimiento muy bajo. Es destacable la síntesis de galactosil-xilosa con un rendimiento de un 16% para la enzima soluble, el que aumentó a un 28% cuando se utilizó la enzima inmovilizada, obteniéndose una mezcla de regioisómeros (β -D-galactopiranosil (1 \rightarrow 1) D-xilopiranososa y β -D-galactopiranosil (1 \rightarrow 4) D-xilopiranososa o β -D-galactopiranosil (1 \rightarrow 5) D-xilofuranosa). A su vez resultó interesante la producción de galactosil-etilenglicol con rendimientos de hasta un 70% y 100% de transglicosilación.