

Universidad de Granada
Puleva Biotech, S. A.

**ACILACIONES REGIOSELECTIVAS DE
OLIGOSACÁRIDOS CATALIZADAS POR
ENZIMAS: CARACTERIZACIÓN Y
PROPIEDADES DE LOS PRODUCTOS**

Ignacio Pérez-Victoria Moreno de Barreda

TESIS DOCTORAL

2006



**Departamento de Química Orgánica
Universidad de Granada**



Puleva Biotech, S. A.

**ACILACIONES REGIOSELECTIVAS DE
OLIGOSACÁRIDOS CATALIZADAS POR ENZIMAS:
CARACTERIZACIÓN Y PROPIEDADES DE LOS
PRODUCTOS**

**Memoria presentada por el Licenciado Ignacio Pérez-Victoria Moreno de Barreda
para optar al grado de Doctor por la Universidad de Granada.**

Granada, Junio de 2006

Director de Tesis

Dr. Juan Carlos Morales Sánchez

D. JUAN CARLOS MORALES SÁNCHEZ,

Investigador contratado del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en el Instituto de Investigaciones Químicas de Sevilla y antiguo director del Departamento de Química de Puleva Biotech, S. A.

CERTIFICA:

Que el trabajo titulado **“Acilaciones regioselectivas de oligosacáridos catalizadas por enzimas: Caracterización y propiedades de los productos”**, presentado por D. IGNACIO PÉREZ-VICTORIA MORENO DE BARREDA, Licenciado en Ciencias Químicas, para optar al grado de Doctor por la Universidad de Granada, ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento de Química de Puleva Biotech, S. A., con la tutela de D. Enrique Álvarez de Manzaneda Roldán, Catedrático del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Granada, y en colaboración con el Departamento de Bioquímica y Farmacología Molecular del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra” (CSIC, Granada) y el Departamento de Física Aplicada de la Universidad de Granada.

En Granada, a 8 de Mayo de 2006.

Dr. Juan Carlos Morales Sánchez

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento:

Al director de esta Tesis Doctoral, el Dr. Juan Carlos Morales, por haberme fichado para formar parte de su equipo, por su apoyo científico, por permitirme aportar ideas sin coartarme el trabajo y por haber apostado por mi formación, especialmente por promover mi estancia de investigación en el extranjero.

Al Dr. Enrique Álvarez de Manzaneda, por aceptar desde el principio la tutela de esta Tesis Doctoral y por sus enseñanzas durante mis comienzos en el mundo de la investigación. Al Dr. Rachid Chahboun por su continua alegría en el laboratorio del Departamento de Química Orgánica, por sus ayudas durante la primera etapa de mi doctorado y por su optimismo.

Al Dr. Tim Claridge por aceptarme en su grupo de investigación del Dyson Perrins Laboratory (Oxford University). Por sus magistrales enseñanzas sobre RMN teórica y práctica, por implicarme seriamente en sus proyectos de investigación y por ser un ejemplo de buen hacer científico. Al Profesor George Fleet por facilitar mi alojamiento en el St. John's College durante mi estancia en Oxford y por permitirme trabajar en los estudios estructurales de los carbopeptoides sintetizados en su grupo de investigación.

A los profesores del departamento de Física Aplicada de la Universidad de Granada: el Dr. José Callejas, el Dr. Miguel Ángel Cabrerizo y la Dra. María José Gálvez, por facilitarme su equipamiento para poder realizar las experiencias de tensión superficial y light scattering. A Julia Maldonado, por explicarme el funcionamiento del dispositivo de la gota pendiente y a Sándalo Roldán, por su ayuda con todos los experimentos con el láser, por sus fabulosas explicaciones y por confiar en mis ideas.

Al Dr. José María Pérez-Victoria, por dirigirme los experimentos de solubilización de la glicoproteína-P así como los ensayos de actividad biológica. Al Dr. Javier Pérez-Victoria, por su inestimable ayuda en todos estos experimentos. A los Doctores Francisco Gamarro y Santiago Castanys, por permitirme llevar a cabo el trabajo biológico de esta Tesis en el Departamento de Bioquímica y Farmacología Molecular del Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra" del CSIC.

A todos los antiguos compañeros de Puleva Biotech que en algún momento u otro me prestaron su ayuda. Especialmente al Dr. Alberto Zafra, por enseñarme a manejar el cromatógrafo LC/MS, por ser un ejemplo de rigor científico, por valorarme tanto, por sus sabios consejos y por su auténtica amistad. También al Dr. José María Corral, por escucharme tan atentamente durante nuestras discusiones científicas y por su actitud positiva ante la adversidad.

A mis padres y a toda mi familia, por la educación que me han dado, por todo su cariño, su paciencia y su apoyo. Está claro que sin la ayuda familiar esta Tesis no habría llegado a ninguna parte.

A mis amigos, muy especialmente a Ana y Eduardo, y a mi hermana Constanza.

A mi queridísima Ana. Gracias por tu continuo apoyo, por tu paciencia y tu bondad, por comprender mi continua falta de tiempo, por escucharme y por aguantar mis rarezas. Gracias por estar siempre ahí.

Por último pero no menos, gracias a Dios, porque después de todo es milagroso que esta Tesis haya salido adelante.

A mis padres
A Ana

Índice

| | |
|---|----|
| I. Resumen | 1 |
| II. Introducción | 5 |
| A. Catálisis enzimática en disolventes orgánicos | 5 |
| A.1. Estructura enzimática y estabilidad en disolventes orgánicos | 8 |
| A.2. Actividad enzimática en disolventes orgánicos | 10 |
| A.2.1. La importancia del agua y el control de su actividad termodinámica | 10 |
| A.2.2. Cinética | 13 |
| A.2.3. Valores de pH y su control. Efecto memoria | 16 |
| A.2.4. Forma enzimática | 17 |
| A.3. Selectividad enzimática en disolventes orgánicos. Ingeniería del medio ... | 24 |
| B. Hidrolasas | 27 |
| B.1. Introducción | 27 |
| B.2. Reacciones de transesterificación catalizadas por hidrolasas | 29 |
| B.2.1. Dadores de acilo activados | 30 |
| B.3. Lipasas | 32 |
| B.3.1. Fuentes naturales, producción y análisis de su actividad | 33 |
| B.3.2. Estructura y mecanismo de acción | 34 |
| B.3.3. Lipasas como biocatalizadores en síntesis orgánica | 38 |
| B.3.4. Lipasa de <i>Thermomyces lanuginosus</i> | 39 |
| B.3.5. Lipasa B de <i>Candida antarctica</i> | 43 |
| B.4. Proteasas | 47 |
| B.4.1. Proteasas como biocatalizadores en síntesis orgánica | 49 |
| B.4.2. Serina proteasas | 50 |
| B.4.2.1. Proteasa alcalina de <i>Bacillus licheniformis</i> (subtilisina Carlsberg) | 51 |
| B.4.3. Metaloproteasas | 54 |
| B.4.3.1. Metaloproteasa de <i>Bacillus thermoproteolyticus</i> (termolisina)..... | 55 |
| C. Ésteres de carbohidratos con ácidos grasos | 59 |
| C.1. Introducción general | 59 |
| C.2. Biosurfactantes basados en carbohidratos | 59 |
| C.3. Propiedades físicas de los SFAE | 65 |
| C.3.1. Balance HLB. Estabilización de emulsiones. Formación de espumas ... | 66 |
| C.3.2. Micelas | 69 |

| | |
|--|------------|
| C.3.3. Adsorción de SFAE en interfases | 72 |
| C.3.4. Propiedades de cristal líquido. Transiciones de fase | 76 |
| C.3.5. Microemulsiones | 77 |
| C.4. Actividad biológica | 78 |
| C.4.1. Actividad antimicrobiana | 78 |
| C.4.2. Actividad antitumoral | 79 |
| C.4.3. Estabilización de proteínas de membrana | 80 |
| C.4.4. Aplicaciones farmacéuticas | 81 |
| C.5. Preparación de SFAE | 82 |
| C.5.1. Síntesis química | 83 |
| C.5.2. Síntesis enzimática | 85 |
| C.5.2.1. Acilaciones de carbohidratos catalizadas por lipasas | 86 |
| C.5.2.2. Acilaciones de carbohidratos catalizadas por proteasas | 97 |
| C.5.2.3. Acilaciones regioselectivas complementarias de carbohidratos utilizando diferentes hidrolasas: el ejemplo de la sacarosa | 104 |
| III. Objetivos | 105 |
| IV. Anexo de resultados | |
| I. Desarrollo de un método LC/ESI/MS para el análisis de la distribución de regioisómeros en monoésteres de carbohidratos con ácidos grasos de cadena larga | 107 |
| II. Esterificaciones regioselectivas complementarias de oligosacáridos de oligosacáridos no reductores catalizadas por distintas hidrolasas | 125 |
| III. Regioselectividad en la acilación de oligosacáridos catalizada por la metaloproteasa termolisina | 141 |
| IV. Síntesis y estudio preliminar de propiedades fisicoquímicas de varias familias de monoésteres de rafinosa y melecitosa con ácidos grasos de distinto tamaño de cadena. Posibles aplicaciones de dichos compuestos en bioquímica | 153 |
| V. Ensayos de evaluación de la actividad biológica de todos los compuestos sintetizados en la memoria de tesis doctoral | 189 |
| V. Discusión | 205 |
| A. Acilaciones enzimáticas regioselectivas de carbohidratos | 205 |
| A.1. Oligosacáridos como sustratos de partida | 205 |

| | |
|---|------------|
| A.2. El problema de la solubilidad de los oligosacáridos en disolventes orgánicos | 208 |
| A.3. Empleo de diferentes hidrolasas como estrategia para conseguir regioselectividades complementarias | 210 |
| A.4. Posibles orígenes de las regioselectividades observadas | 212 |
| A.5. Dependencia del rendimiento de la reacción con el azúcar. Influencia del tamaño de cadena | 220 |
| B. Aplicaciones potenciales de los compuestos sintetizados, y de la metodología de acilación enzimática desarrollada | 222 |
| B.1. Protección selectiva de carbohidratos. Reactividades de los hidroxilos de cada oligosacárido | 222 |
| B.2. Preparación de monómeros polimerizables por vía radicalaria | 223 |
| B.3. Los monoésteres de oligosacáridos como surfactantes. Posibles aplicaciones tecnológicas. Limitaciones al escalado de su síntesis | 225 |
| C. Perspectivas | 228 |
| | |
| VI. Conclusiones | 229 |
| | |
| VII. Bibliografía | 231 |

Resumen

I. RESUMEN

Los ésteres de carbohidratos con ácidos grasos de cadena larga son surfactantes no iónicos con aplicaciones en las industrias de alimentación, cosmética y farmacéutica. A diferencia de los surfactantes de origen petroquímico, estos compuestos son biodegradables, carecen de toxicidad y se pueden preparar a partir de materias primas renovables. Las propiedades fisicoquímicas relacionadas con su naturaleza anfipática dependen del tipo de ácido graso utilizado, de la estructura del carbohidrato, del grado de esterificación y de la posición de acilación. Además, para algunos compuestos de esta clase se han descrito propiedades biológicas muy interesantes como pueden ser la actividad antimicrobiana o antitumoral. Sin duda, son los monoésteres, por su mayor solubilidad en agua, los productos en los que se ha enfocado la atención de las investigaciones llevadas a cabo en esta área durante las últimas décadas.

La monoacilación regioselectiva de los carbohidratos, en general no es sencilla debido a su multifuncionalidad, por lo que frecuentemente se tiene que recurrir a largas secuencias de protección/desprotección. El empleo de enzimas en disolventes orgánicos ha contribuido a resolver este problema, y tanto las lipasas como las proteasas se han utilizado para acilar carbohidratos de manera regioselectiva en una sola etapa. Distintos factores afectan la actividad, estabilidad y selectividad de las hidrolasas en medio acuoso. Entre ellos, la naturaleza del disolvente es particularmente importante ya que las condiciones óptimas de reacción suponen un compromiso entre la actividad de la enzima y la solubilidad del sustrato. Esta limitación es especialmente clara en el caso de las lipasas que muestran su máxima actividad en disolventes hidrofóbicos, por lo que su aplicación en la acilación de carbohidratos se ha limitado prácticamente a mono- y disacáridos.

En la presente memoria se desarrolla una metodología adecuada para acilar los trisacáridos rafinosa, melecitosa y 1-kestosa, y el tetrasacárido estaquirosa, empleando lipasas como biocatalizadores, y ésteres vinílicos derivados de ácidos grasos de cadena larga como agentes acilantes. Utilizando mezclas t-butanol/piridina a temperaturas en torno a los 60 °C, y empleando los oligosacáridos en forma amorfa en lugar de cómo hidratos cristalinos, se consigue su total solubilidad en el medio de reacción a concentraciones similares a las empleadas para otros carbohidratos en reacciones

análogas, lo que produce rendimientos de producto aislado muy satisfactorios. Las lipasas utilizadas han sido la lipasa B de *Candida antactica* y la lipasa de *Thermomyces lanuginosus*, ambas en forma inmovilizada y comercializadas por Novozymes A/S bajo los nombres Novozym 435 y Lipozyme TL IM, respectivamente. Estas lipasas, derivadas de extremófilos, son muy apropiadas para su utilización en biocatálisis debido, entre otros factores, a su termoestabilidad elevada.

De la misma manera, en la memoria se describe también la acilación de estos oligosacáridos mediante la transesterificación con ésteres vinílicos empleando como catalizador la proteasa subtilisina Carlsberg. La utilización de los carbohidratos en forma amorfa ha permitido llevar a cabo esta reacción en piridina en lugar de DMF, con las ventajas técnicas que esto supone a la hora de eliminar el disolvente de la reacción. Esta enzima se ha empleado en forma sólida coliofilizada con metil- β -ciclodextrina, lo que ha producido que tanto el rendimiento como la regioselectividad de las reacciones hayan sido mayores que los descritos en los correspondientes precedentes bibliográficos.

Para caracterizar de manera precisa la regioselectividad de todas estas acilaciones enzimáticas se ha desarrollado un nuevo método para analizar la distribución de regioisómeros en monoésteres de carbohidratos con ácidos grasos de cadena larga. El método en cuestión se basa en cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa con detección por espectrometría de masas ESI. Se caracteriza por su alta sensibilidad y precisión, lo que lo hace mucho más adecuado que la espectroscopía de RMN de ^{13}C , como metodología para la determinación de la regioselectividad de este tipo de reacciones.

El análisis con el nuevo método cromatográfico de los monoésteres obtenidos, y las experiencias de RMN mono- y bidimensionales para elucidar la posición de acilación en los regioisómeros mayoritarios demuestran que, como se preveía, estas enzimas acilan regioselectivamente los hidroxilos primarios de los distintos sustratos. Interesantemente, las hidrolasas utilizadas muestran una regioselectividad complementaria, es decir, sobre un oligosacárido determinado, la posición de acilación preferente difiere según la enzima utilizada.

Tras estos resultados, en una segunda etapa se planteó investigar la acilación regioselectiva de hidroxilos secundarios en estos oligosacáridos utilizando la metaloproteasa termolisina. El mecanismo de acción de esta metaloproteasa no implica la formación de un intermedio acil-enzima típico, por lo que se abren expectativas a nuevas regioselectividades. La selectividad obtenida muestra una correlación excelente con los resultados descritos previamente con la sacarosa, es decir, una preferencia clara por el hidroxilo en posición 2 de la unidad de glucosa. Este comportamiento probablemente es consecuencia de que los distintos oligosacáridos no son sino sacarosas glicosidadas de diferente manera, manteniendo todos ellos motivos estructurales comunes que parecen esenciales para que se de la catálisis, pues con otros carbohidratos diferentes estudiados no se produce la acilación.

Para realizar un estudio sobre las propiedades fisicoquímicas de esta clase de compuestos se han preparado familias homólogas de monoésteres de rafinosa y melecitosa con ácidos grasos de distinto tamaño de cadena utilizando Lipozyme TL IM y subtilisina Carlsberg. A través de estas reacciones se ha podido estudiar la especificidad de cada enzima respecto al tamaño de la cadena del agente acilante. Los productos obtenidos se han caracterizado con diversas técnicas demostrándose su capacidad tensioactiva y emulgente, y comprobándose que propiedades como la concentración micelar crítica pueden variar entre regioisómeros. También se ha estudiado la potencial aplicación de estos monoésteres de trisacáridos como detergentes en bioquímica de proteínas de membrana.

Finalmente, se han realizado ensayos de actividad biológica de todos los ésteres de oligosacáridos preparados a lo largo de la memoria. En concreto, se ha evaluado la actividad antitumoral, antimicrobiana y revertidora del fenotipo de multirresistencia a fármacos (MDR) conferido por la sobreexpresión de transportadores ABC. Los resultados obtenidos muestran que, en general, el comportamiento de todos los compuestos sintetizados es muy similar al monolaurato de sacarosa, que se incluyó como control comparativo en todos los experimentos, observándose toxicidad a las mayores concentraciones ensayadas, por encima de la CMC, lo que apunta a un mecanismo de acción inespecífico basado en la capacidad que como detergentes tienen estos compuestos para desintegrar la membrana plasmática.

Los resultados de esta tesis suponen en definitiva una nueva aportación al campo de las acilaciones enzimáticas de carbohidratos. Los nuevos productos obtenidos expanden el repertorio de surfactantes de esta clase existentes e invitan a profundizar en el estudio de sus potenciales aplicaciones.

Introducción

II. INTRODUCCIÓN

A. CATÁLISIS ENZIMÁTICA EN DISOLVENTES ORGÁNICOS.

Durante los últimos años, el empleo de biocatalizadores en síntesis orgánica se ha convertido en una alternativa muy atractiva respecto a los métodos químicos convencionales (Faber, 2004). En efecto, las enzimas presentan a menudo una alta quimio-, regio-, y enantioselectividad que las convierte en valiosos catalizadores en el campo de la química fina. Además, las reacciones catalizadas por enzimas normalmente se llevan a cabo en condiciones suaves, como temperatura ambiente y pH neutro. Las enzimas son biocatalizadores muy eficaces, capaces de aumentar las velocidades de reacción 10^{12} veces. Por último, los procesos biocatalíticos son menos peligrosos, contaminantes, y consumen menos energía que las metodologías químicas convencionales.

Todas estas razones han hecho de los biocatalizadores un tema de investigación muy popular tanto en el mundo académico como en la industria. Por ejemplo, la base de datos BioCatalysis, basada en 8000 artículos y patentes, describe 18500 biotransformaciones llevadas a cabo con enzimas, microorganismos y anticuerpos catalíticos (Jones et al., 1997). Obviamente, muchas de las conversiones descritas son meras curiosidades de laboratorio, pero una parte importante de ellas tiene, o tendrá, una aplicación industrial.

Por tanto, el tremendo potencial de las enzimas como catalizadores está ampliamente reconocido. Sin embargo, cuando su empleo se restringe a su medio natural acuoso, su utilidad y alcance está limitado por una serie de consideraciones. La mayoría de los compuestos orgánicos son insolubles en agua, y en ella pueden tener lugar reacciones colaterales no deseadas (hidrólisis, racemizaciones, etc.). El equilibrio termodinámico de muchos procesos es desfavorable en agua, y la recuperación de los productos no es trivial (el agua es un disolvente difícil de eliminar por su alto punto de ebullición y calor de vaporización).

En principio, muchos de estos problemas se resuelven usando disolventes orgánicos en lugar de agua como medio de reacción. A primera vista tal sustitución parecería imposible debido a la idea convencional de que las enzimas (en general las proteínas) se desnaturalizan (pierden su estructura nativa y su actividad catalítica) en disolventes orgánicos. Sin embargo, esta noción viene de examinar a las enzimas en mezclas de agua con disolventes orgánicos y no en disolventes orgánicos puros. En realidad, en ausencia de agua, que actúa como lubricante molecular (Rupley et al., 2001), las enzimas son muy rígidas. Por tanto, aunque en mezclas de agua con disolventes orgánicos las proteínas tienen tendencia a desnaturalizar y suficiente flexibilidad conformacional para hacerlo, en disolventes orgánicos “secos” su tendencia a desnaturalizar es mayor, pero la flexibilidad necesaria para hacerlo está ausente. Como consecuencia, la conformación nativa de las enzimas se retiene en gran medida en disolventes orgánicos y muchas enzimas son capaces de catalizar reacciones en medios no acuosos (Klibanov, 1989). Durante los últimos 20 años ha quedado bien demostrado que la utilidad tecnológica de las enzimas se puede aumentar dramáticamente empleándolas en disolventes orgánicos en lugar de en su entorno acuoso natural (Klibanov, 2001).

Existen distintos sistemas de disolventes orgánicos empleables en biocatálisis como se indica en la Figura II. A1.

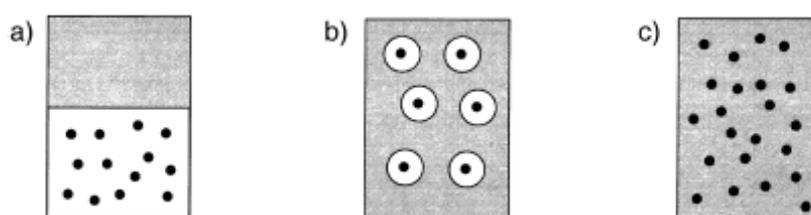


Figura II. A1. Representación de algunos de los distintos sistemas de disolventes orgánicos. a) Bifásico, b) micelar inverso, c) disolvente orgánico neto. Las áreas sombreadas corresponden a la fase orgánica, las blancas a la fase acuosa y los puntos negros al biocatalizador (tomado de Carrea et al., 2000).

En los sistemas bifásicos (a), las enzimas y los compuestos hidrófilos se encuentran en la fase acuosa, donde la reacción tiene lugar, mientras que los compuestos hidrófobos se encuentran en la fase orgánica. En los sistemas micelares inversos (b), las moléculas de enzima están solubilizadas en micelas inversas, hidratadas y discretas, compuestas por surfactantes e inmersas en una fase continua de disolvente

orgánico hidrofóbico. Bajo condiciones adecuadas, estos sistemas son termodinámicamente estables y óptimamente transparentes. Por último, en los sistemas formados únicamente por disolventes orgánicos (c), las preparaciones enzimáticas sólidas (por ejemplo enzimas liofilizadas o inmovilizadas en un soporte inerte) están suspendidas en el medio en presencia de suficiente cantidad de agua (como norma general < 5% v/v) para asegurar la actividad enzimática. Aunque cada uno de estos sistemas tiene sus ventajas e inconvenientes, el que se suele emplear más es el (c) -de hecho es el sistema utilizado en la presente memoria- y por tanto será en el que se enfoque este apartado de la introducción.

Las transformaciones biocatalizadas en disolventes orgánicos ofrecen, entre otras, las siguientes ventajas (Carrea et al., 2000):

- Es posible la catálisis de reacciones que son desfavorables en agua (por ejemplo, la reversión de la hidrólisis a favor de la síntesis).
- Reacciones colaterales inducidas por el agua como la hidrólisis de grupos lábiles (por ejemplo ésteres activados, epóxidos, etc.) son suprimidas al emplear un medio orgánico.
- Los sustratos hidrofóbicos se pueden solubilizar.
- Muchos productos se pueden recuperar del medio fácilmente debido a que no es necesaria una etapa de extracción en el procesado de la reacción.
- Los biocatalizadores al ser insolubles en disolventes orgánicos (tanto en forma libre como inmovilizada) se pueden recuperar fácilmente mediante una simple filtración, permitiéndose en muchos casos su reutilización y reciclado.
- La termoestabilidad del biocatalizador se incrementa, al menos mientras el contenido en agua se mantenga suficientemente bajo.
- La selectividad enzimática puede afectarse intensamente e incluso cambiarse según el disolvente empleado.

En los siguientes párrafos se examinarán distintas propiedades de las enzimas en disolventes orgánicos con objeto de intentar comprender mejor el fascinante mundo de la biocatálisis en medios no acuosos.

A. 1. Estructura enzimática y estabilidad en disolventes orgánicos.

Se pueden distinguir dos tipos de inestabilidad enzimática de origen térmico. El primer tipo consiste en la pérdida gradual e irreversible de la actividad enzimática al someter las enzimas a altas temperaturas. El segundo es el desplegamiento cooperativo (usualmente instantáneo y reversible) de las macromoléculas enzimáticas inducido por el calor. El agua es el participante pivote en ambos casos, al promover la movilidad conformacional de las proteínas (Rupley et al., 2001) así como procesos degradativos (Ahern et al., 1986). Por tanto, uno debería esperar que las enzimas fueran más termoestables en disolventes orgánicos que en agua.

Experimentalmente esta predicción queda constatada con ejemplos como el de la lipasa pancreática porcina, que tiene una vida media de varias horas a 100 °C en disolventes anhidros, cuando en agua se desactivaría en unos segundos a esa temperatura (Zaks et al. 1984). Interesantemente, la vida media de la enzima en un disolvente orgánico cae precipitadamente cuando se aumenta el contenido en agua. En la figura II. A2, se muestran gráficamente estos efectos observados en la lipasa pancreática porcina.

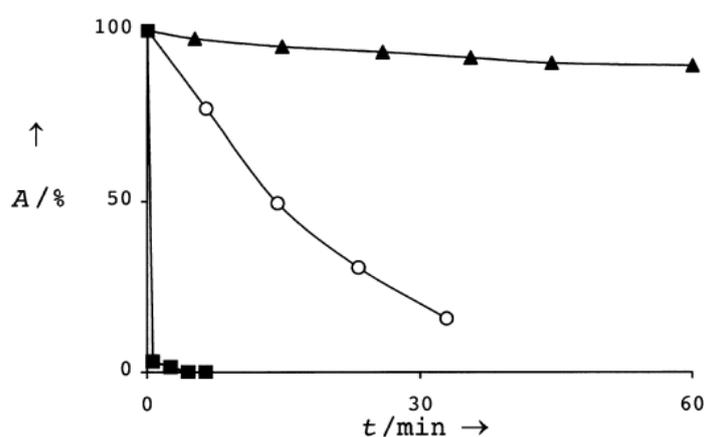


Figura II. A2. Decaimiento en el tiempo de la actividad enzimática de la lipasa pancreática porcina (polvo seco) a 100 °C en agua o tampón fosfato 0.1M (■) y en una solución 2M de heptanol en tributirina conteniendo 0.8% de agua (○) ó 0.015% de agua (▲), (tomado de Carrea et al., 2000).

Diversos estudios como el de la lipasa pancreática demuestran efectivamente que las enzimas son extremadamente termoestables en disolventes orgánicos anhidros debido a la rigidez conformacional en el estado deshidratado y a la ausencia de las

principales reacciones covalentes responsables de la inactivación térmica irreversible de las enzimas en disolución acuosa (hidrólisis de enlaces peptídicos, desamidaciones de residuos de Asn/Glu, intercambios de puentes disulfuro, β -eliminaciones en residuos de cisteína) (Zale et al., 1986).

Las enzimas son conformacionalmente rígidas en disolventes orgánicos lo cual les confiere estabilidad térmica en dicho medio pero, ¿qué estructura presentan en un medio tan diferente al agua?. Una imagen directa de la conformación de las enzimas en disolventes orgánicos la dio la estructura cristalina de rayos X de la subtilisina (en forma de “cross-linked enzyme crystals”, CLEC) en acetonitrilo. (Fitzpatrick et al., 1993). La estructura de esta proteasa en el disolvente orgánico es esencialmente idéntica a la estructura tridimensional de la proteína en agua (Fig.II. A3)



Figura II. A3. Estructura cristalina de rayos X de la proteasa subtilisina Carlsberg (CLEC) en acetonitrilo anhidro (izquierda) y agua (derecha). La similitud en la estructura tridimensional es evidente. Las estructuras se han generado a partir de los archivos PDB correspondientes (1SCB el de la izquierda y 1SCD el de la derecha) descritos por el grupo de Klibanov (Fitzpatrick et al., 1993).

Una de las formas típicas en las que se emplean las enzimas en medios no acuosos es como sólidos liofilizados. Estudios llevados a cabo con espectroscopía infrarroja FTIR demuestran que la liofilización (que implica una deshidratación) provoca cambios reversibles en la estructura secundaria de las proteínas produciéndose un incremento en el contenido en láminas β y bajando el contenido en α -hélices (Griebenow et al. 1995). Es importante tener en cuenta estos cambios producidos en la estructura secundaria a la hora de estudiar las diferencias en actividad catalítica de las enzimas en agua frente a los disolventes orgánicos.

La integridad estructural de proteínas liofilizadas ha sido estudiada también por RMN en medio no acuoso (Desai et al. 1995) poniéndose de manifiesto que disolventes como el acetonitrilo, tetrahidrofurano, acetato de etilo o butanol no afectan a la proteína (no causan desnaturalización aparte de la ya producida durante el proceso de liofilizado).

A. 2. Actividad enzimática en disolventes orgánicos.

La actividad enzimática en disolventes orgánicos depende dramáticamente de factores tales como la actividad termodinámica del agua, la solvatación del sustrato y el producto en el disolvente empleado, el control del pH, la forma enzimática, y la naturaleza del disolvente.

A. 2. 1. La importancia del agua y el control de su actividad termodinámica (a_w).

Hasta ahora se ha hablado de disolventes orgánicos sin especificar casos concretos, pero en realidad el espectro de polaridades, capacidad de solvatación, etc. es muy amplio. Este es el momento adecuado para indicar que, en términos generales, la actividad enzimática es mayor en disolventes orgánicos hidrofóbicos que en hidrofílicos; de hecho se puede establecer una correlación directa entre la actividad y la hidrofobicidad del disolvente, expresada como $\log P$ (donde P es el coeficiente de reparto de un disolvente dado entre n-octanol y agua -ver tabla II. A1-). Las razones de estas diferencias de actividad hay que buscarlas en la distinta capacidad de los disolventes orgánicos para distorsionar la capa de agua esencial que rodea al biocatalizador, capacidad que obviamente es mayor en los disolventes hidrofílicos (Laane et al., 1987).

No obstante, estudios con tres enzimas no relacionadas (la alcohol oxidasa de levadura, la polifenol oxidasa de champiñón, y la alcohol deshidrogenasa de hígado de caballo) han probado que la actividad enzimática en varios disolventes es más o menos similar siempre que la cantidad de agua asociada a la enzima se mantenga constante al pasar de un disolvente a otro (Zaks et al. 1988a). La figura II. A4 muestra que cuanto más hidrofílico sea el disolvente mayor tiene que ser el contenido en agua en el disolvente para alcanzar una actividad alta. Esto ocurre porque lo que realmente tiene

importancia para la actividad es el contenido en agua de la enzima (W_e en la figura II. A4b) y no el contenido en agua del disolvente (W_s en la figura II. A4a). Por eso, dependiendo de la hidrofobicidad del disolvente, el mismo contenido neto en agua resulta en cantidades totalmente diferentes de agua asociada a la enzima. Todo ello sugiere que los efectos de los disolventes orgánicos sobre la enzima se deben principalmente a las interacciones con la capa esencial de agua asociada a la enzima y no con la enzima en sí misma. El agua requerida por las enzimas en disolventes no acuosos (se estima en unas 1000 moléculas de agua por molécula de enzima, o sea, aproximadamente una monocapa) les confiere la suficiente flexibilidad conformacional necesaria para la catálisis.

Tabla II. A1. Valores de $\log P$ de disolventes orgánicos comunes (adaptado de Faber, 2004).

| Disolvente | $\log P$ | Disolvente | $\log P$ |
|------------------|----------|--------------------|----------|
| dimetilsulfóxido | -1.3 | acetato de propilo | 1.2 |
| dioxano | -1.1 | dipropiléter | 1.9 |
| dimetilformamida | -1.0 | cloroformo | 2.0 |
| metanol | -0.76 | acetato de pentilo | 2.2 |
| acetonitrilo | -0.33 | tolueno | 2.5 |
| etanol | -0.24 | octanol | 2.9 |
| acetona | -0.23 | pentano | 3.0 |
| tetrahidrofurano | 0.49 | ciclohexano | 3.2 |
| acetato de etilo | 0.68 | hexano | 3.5 |
| piridina | 0.71 | octano | 4.5 |
| butanol | 0.80 | decano | 5.6 |

Una manera más rigurosa de correlacionar la actividad enzimática con el agua presente en el medio se basa en utilizar la actividad termodinámica del agua en lugar de concentraciones totales. La actividad termodinámica del agua (a_w) se correlaciona con su fracción molar (χ_w) a través del coeficiente de actividad (γ_w) según la ecuación $a_w = \gamma_w \chi_w$. Dado que el coeficiente de actividad del agua (γ_w) aumenta al hacerlo la hidrofobicidad del disolvente, es obvio que un valor determinado de a_w se obtendrá a menor concentración neta de agua en un disolvente hidrofóbico que en uno hidrofílico. Por tanto, para conseguir el mismo nivel de hidratación de la enzima, o de a_w en la enzima, se requiere menos agua en un disolvente hidrofóbico que uno hidrofílico. El concepto de actividad termodinámica del agua se puede comparar con el de temperatura

(Bell et al., 1995). En el equilibrio, a_w será la misma para todos los componentes del sistema, es decir, el biocatalizador, la matriz (en el caso de enzimas inmovilizadas), los reactivos, y los disolventes. Esto facilita medir a_w en la fase que sea más conveniente (existen sensores de agua razonablemente precisos para fases gaseosas y en fase líquida se puede emplear el método colorimétrico de Karl Fischer).

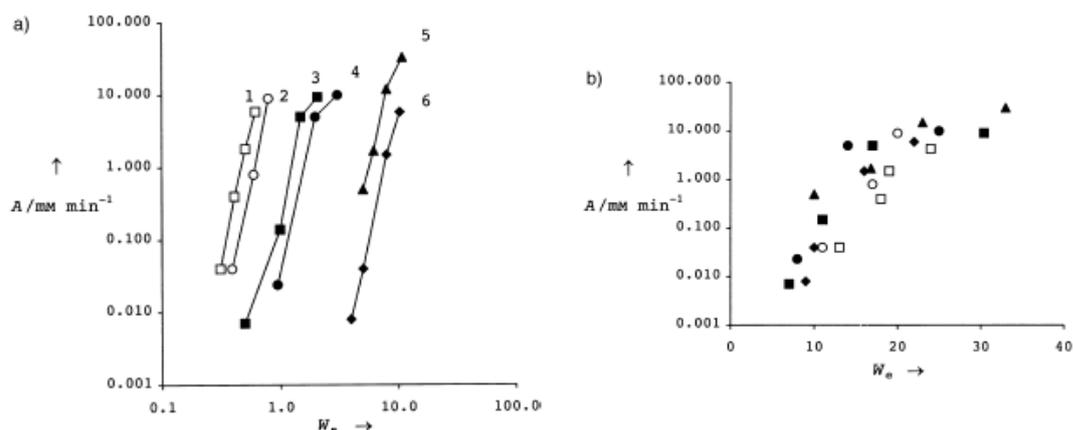


Figura II. A4. Dependencia de la actividad (A) de la alcohol oxidasa de levadura en función de: a) la concentración de agua en varios disolventes orgánicos (W_s , en % (v/v)), b) el contenido en agua de la enzima (W_e , en % (w/w)). Disolventes ensayados: éter dietílico (\square), acetato de butilo (\circ), acetato de etilo (\blacksquare), n-octanol (\bullet), alcohol t-amílico (\blacktriangle), isobutanol (\blacklozenge), (tomado de Carrea et al., 2000).

La correlación directa entre actividad enzimática y a_w del sistema ha quedado claramente demostrada en casos como el de la lipasa de *Mucor miehei* (Valivety et al., 1992a) que presenta una actividad óptima a $a_w = 0.55$ cuando se emplea en disolventes de polaridad creciente (de hexano a pentanona). En un estudio llevado a cabo con cinco lipasas de distinto origen se demostró que la dependencia de la actividad enzimática con a_w variaba significativamente de enzima a enzima, probablemente como consecuencia de diferencias estructurales entre las macromoléculas (Valivety et al. 1992b).

El incremento de a_w ó el contenido en agua puede inducir un incremento en los valores de K_m de nucleófilos en reacciones de esterificación y transesterificación catalizadas por hidrolasas (el tipo de reacciones empleado en la presente memoria), donde el agua actúa como inhibidor al competir con el sustrato por el intermedio acil-enzima. Igualmente, a_w influye en el equilibrio de las reacciones anteriores, ya que el agua favorece la reacción inversa (hidrólisis del producto) en el caso de esterificaciones

o la hidrólisis del agente acilante (ésteres activados) en el caso de transesterificaciones (ver apartado B de la introducción).

Debido al rol fundamental desempeñado por el agua, está claro que el control de a_w en reacciones enzimáticas llevadas a cabo en disolventes orgánicos es muy importante y, como consecuencia, se han desarrollado diferentes métodos para lograr este objetivo (Hutcheon et al. 1997). Uno de estos métodos consiste en preequilibrar el sistema con soluciones acuosas salinas saturadas que tienen una presión de vapor de agua bien definida a temperatura dada (Tabla II. A2). En los casos en los que se produzca o consuma agua durante el curso de la reacción, el sistema estará continuamente reequilibrando a un valor diferente de a_w . La solución a este problema está en la adición de pares de hidratos salinos sólidos a la mezcla de reacción que actúan como tampón acuoso, eliminando o donando agua según se requiera para mantener constante el valor de a_w (Tabla II. A3).

Tabla II. A2. Sales inorgánicas para la preparación de soluciones salina saturadas con un valor de a_w determinado.

| Sal inorgánica | a_w (25°C) |
|--------------------------------|--------------|
| LiBr | 0.07 |
| LiCl | 0.11 |
| Acetato potásico | 0.23 |
| K ₂ CO ₃ | 0.43 |
| NaBr | 0.58 |
| KI | 0.69 |
| NaCl | 0.75 |
| KCl | 0.84 |
| K ₂ SO ₄ | 0.97 |

Tabla II. A3. Pares de sales hidratadas recomendados como tampones acuosos (ambas tablas adaptadas de Hutcheon et al. 1997).

| Par de sales hidratadas | a_w (25°C) |
|---------------------------------------|--------------|
| NaI 2/0 | 0.07 |
| Na ₂ HPO ₄ 2/0 | 0.11 |
| Na Ac 3/0 | 0.23 |
| Na ₂ HPO ₄ 7/2 | 0.43 |
| Na ₂ HPO ₄ 12/7 | 0.58 |
| Na ₂ SO ₄ 10/0 | 0.69 |

A. 2. 2. Cinética.

Estudios sobre cinética llevados a cabo fundamentalmente con hidrolasas, han demostrado que las enzimas en disolventes orgánicos siguen modelos convencionales. Por ejemplo, las reacciones de transesterificación catalizadas por la lipasa pancreática porcina (PPL) en hexano obedecen la cinética de Michaelis-Menten (Zaks et al. 1985)

como se puede observar en la figura II. A5. El mismo comportamiento cinético se observa en las transesterificaciones catalizadas por las proteasas quimotripsina y subtilisina Carlsberg en una variedad de disolventes orgánicos (Zaks et al. 1988b). Por otro lado, el mecanismo bi-bi ping-pong con inhibición competitiva por el sustrato (los alcoholes empleados como aceptores de acilo) se ha observado en transesterificaciones catalizadas por la lipasa B de *Candida antarctica* en medio no acuoso (Martinelle et al. 1995a).

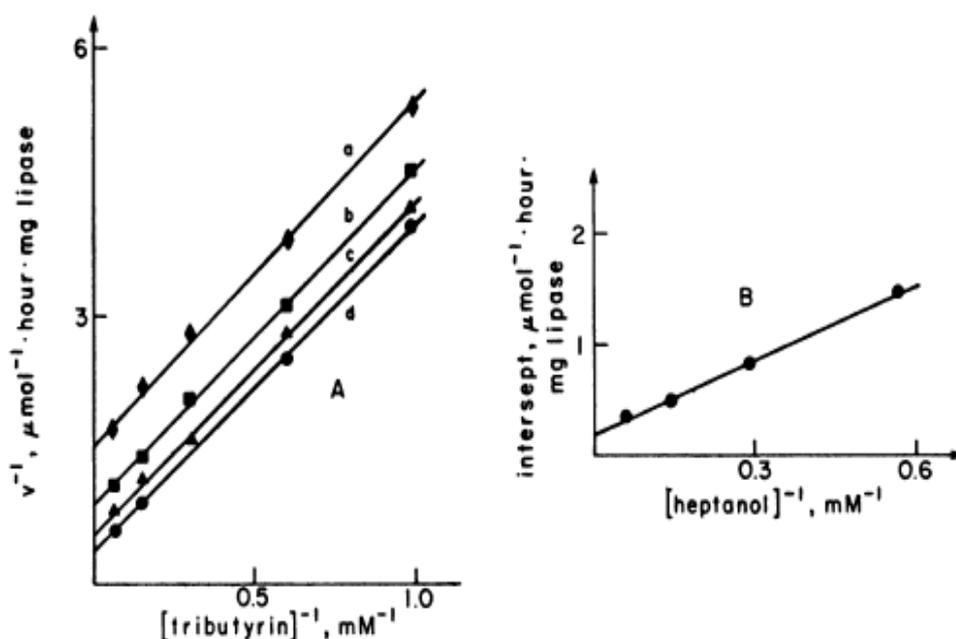


Figura II. A5. Velocidades iniciales de reacción en el estudio cinético de la reacción de transesterificación entre tributirina y heptanol catalizada por la lipasa pancreática porcina en hexano. (A) Velocidades recíprocas (v) vs. concentración recíproca de tributirina a diferentes concentraciones de heptanol: 1.77mM (a), 3.5 mM (b), 7.07 (c) y 16.6 mM (d). (B) Ordenadas en el origen del gráfico A vs. el recíproco de la concentración de heptanol. (tomado de Zaks et al. 1985)

Los parámetros cinéticos en medio no acuoso pueden variar mucho de disolvente a disolvente y ser muy distintos de los obtenidos en agua, principalmente debido a efectos de solvatación (Bell et al., 1995). La primera etapa de cualquier reacción enzimática consiste en la unión del sustrato al centro activo. Esto implica un paso de desolvatación previo en el que el sustrato se libera de las moléculas de disolvente asociadas a él. Cuanto más fuertemente este asociado el disolvente al sustrato, menos favorable será la unión. Generalmente se establece un equilibrio entre sustrato unido a la enzima y sustrato libre. La posición de este equilibrio depende de la energía libre de solvatación, y en muchos casos se puede aproximar a la constante de Michaelis-Menten,

K_m . En estos casos, K_m es una medida de la afinidad relativa del sustrato por el centro activo de la enzima en comparación con su afinidad por las moléculas de disolvente; así, un sustrato con poca afinidad por el disolvente se unirá fuertemente a la enzima (K_m baja) mientras que un sustrato con afinidad alta por el disolvente se unirá débilmente a la enzima (K_m alta). En medio orgánico K_m variará de disolvente a disolvente y se puede realizar la aproximación bastante burda de “similar prefiere a similar” para describir la solvatación. Por tanto, los sustratos polares por ejemplo, tendrán un valor de K_m mayor en disolventes polares que en apolares.

Cuando se estudian reacciones catalizadas por enzimas en disolventes orgánicos es importante asegurarse de que las variaciones en K_m se han tenido en cuenta antes de lanzar conclusiones sobre efectos directos del disolvente en la cinética y especificidad de la reacción. Existen diferentes métodos para corregir los efectos de solvatación de los sustratos (o productos) en distintos disolventes, aunque no se entrará en su descripción por no elongar demasiado este apartado (Carrea et al. 2000).

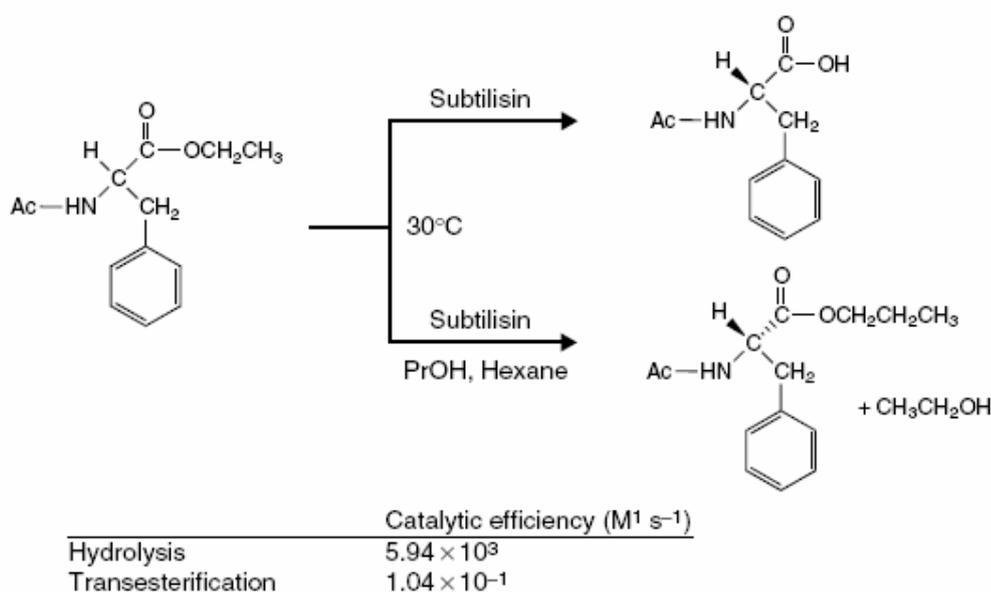


Figura II. A6. Diferencia de actividad en la proteasa subtilisina Carlsberg (liofilizado) cuando está suspendida en hexano (transesterificación) respecto a cuando está disuelta en tampón acuoso (hidrólisis), (tomado de Lee et al., 2002).

Para finalizar esta breve discusión sobre cinética se resumirán las razones (muchas de ellas ya apuntadas) por las cuales la actividad de una enzima determinada es menor en disolventes orgánicos que en agua (figura II. A6). El grupo de Klivanov

(Schmitke et al. 1996) ha realizado una fabulosa disección mecanística de porqué la proteasa subtilisina (en forma CLEC) tiene una actividad 7 órdenes de magnitud más baja suspendida en acetonitrilo que cuando la misma enzima (en forma liofilizada soluble) está disuelta en agua (en la reacción de transesterificación o hidrólisis del mismo éster respectivamente). Al ser la estructura tridimensional de esta enzima idéntica en ambos disolventes (ver apartado A.1) se elimina un posible factor. Las causas que estos autores elucidaron son: i) el desplazamiento del perfil de actividad vs. pH de la enzima (en forma CLEC) suspendida en agua respecto a la enzima disuelta en agua, ii) la energía de desolvatación del sustrato desfavorable en el disolvente orgánico respecto al agua, iii) la a_w tan baja en acetonitrilo que resulta en una enzima mucho más rígida que la disuelta en agua y por tanto menos activa.

A. 2. 3. Valores de pH y su control. Efecto memoria.

Indudablemente el estado de protonación de los distintos grupos ionizables de una enzima es importante para la actividad enzimática, tanto en medio acuoso como en disolventes orgánicos. En agua, la ionización se puede controlar mediante ajustes de pH pero en medio orgánico la situación es más complicada, de hecho, en disoluciones no acuosas el concepto de pH no tiene sentido. Lo que sí se ha demostrado es que en disolventes orgánicos las enzimas tienen “memoria de pH”: su actividad catalítica refleja el pH de la solución acuosa de la cual fueron recuperadas (mediante liofilización o precipitación) como se puede observar en la figura II. A7 (Zaks et al. 1985, Zaks et al. 1988b). Este fenómeno es debido al hecho de que los grupos ionizables de la proteína retienen su último estado de ionización en el proceso de deshidratación (o precipitación) y subsiguiente emplazamiento en disolventes orgánicos (de ahí que se emplee el término memoria). Consecuentemente, la actividad enzimática en disolventes orgánicos se puede mejorar mucho si la enzima se liofiliza (o precipita) a partir de su solución acuosa al pH óptimo para la catálisis.

Esta metodología es perfectamente aplicable a las reacciones donde no haya alteración de la concentración de ácido/base durante el curso de la reacción. Si éste no es el caso, la situación se complica. Para solventar este problema se ha propuesto el uso de sistemas tipo disoluciones tampón, formados por ácidos orgánicos muy hidrófobos y

sus sales sódicas, o bases muy hidrófobas y sus respectivos clorhidratos (Xu et al., 1996). El principal inconveniente de estos sistemas es que sólo son apreciablemente solubles en disolventes de polaridad elevada (como 3-pentanona, dioxano, DMF, THF).

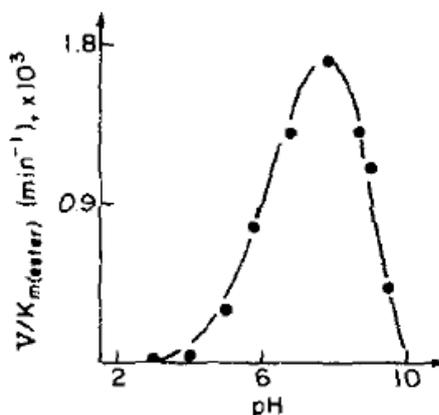


Figura II. A7. Dependencia de la actividad enzimática de la quimotripsina en octano (reacción de transesterificación del éster etílico de acetilfenilalanina con n-propanol) con el pH de la solución acuosa de la que fue liofilizada (tomado de Zaks et al., 1988b).

A. 2. 4. Forma enzimática.

Sin ningún tratamiento especial, las proteínas son prácticamente insolubles en la mayoría de los disolventes orgánicos, incluyendo sistemas anhidros y aquellos con un porcentaje pequeño de agua disuelta (algunos disolventes como el DMSO y la DMF pueden disolver proteínas ocasionando la pérdida de su conformación nativa). Por tanto, las enzimas se encuentran usualmente presentes en disolventes orgánicos como suspensiones bifásicas sólido-líquido. Esto simplifica la separación de producto-biocatalizador y la reutilización de la enzima. Las distintas formas en las que se puede emplear una enzima para biocatalizar procesos en medio no acuoso se discuten a continuación.

i) Polvo

La manera más simple de preparar un biocatalizador para su uso en un disolvente orgánico y, al mismo tiempo, ajustar parámetros clave como el pH, es mediante liofilización o precipitación de las correspondientes soluciones acuosas (por ejemplo por adición de acetona). Sin embargo, estas preparaciones pueden dar lugar a

limitaciones por difusión o impedir la interacción enzima-sustrato debido al apilamiento proteína-proteína. Para aliviar este inconveniente se recomienda la utilización de partículas pequeñas de enzima obtenidas por sonicación previa así como la agitación vigorosa durante la reacción.

La liofilización, sin duda el método más común de preparación de enzimas para su empleo en disolventes orgánicos, es un proceso fisicoquímico en el cual se elimina agua de una muestra congelada mediante sublimación y desorción. Puede visualizarse como un proceso en tres etapas consistentes en congelación, secado primario y secado secundario (Roy et al., 2004). Los cambios estructurales que se producen durante la liofilización de una enzima son los principales responsables de la menor actividad catalítica de estas preparaciones enzimáticas en medio orgánico respecto al agua. Estos cambios son reversibles (Griebenow et al. 1995) si la enzima liofilizada se vuelve a disolver en medio acuoso, pero no lo son (debido a la rigidez conformacional) si la enzima se suspende en disolventes orgánicos.

Este efecto no deseado de desnaturalización parcial de la enzima durante el proceso de liofilizado puede minimizarse o incluso prevenirse si se lleva a cabo la liofilización de la enzima en presencia de ciertos excipientes o aditivos (orgánicos e inorgánicos). Dichos excipientes promueven la activación de la enzima a través de diversos mecanismos (Lee et al., 2002), algunos ejemplos se indican en la tabla II. A4.

El grupo de Dordick, a mediados de los 90 demostró por vez primera que la coliofilización de una enzima en presencia de sales inorgánicas como el KCl, mejora muchísimo la actividad de la misma (Khmelnitsky et al., 1994). El aumento de la actividad catalítica en estos casos no se debe a una relajación de las limitaciones por difusión del sustrato (Bedell et al., 1998). El mecanismo de esta activación no está elucidado completamente todavía, una posible razón puede ser que la sal (que se usa en proporciones muy altas - >95% (w/w)-) proteja a la enzima de una posible desactivación por el contacto “directo” con el disolvente. Se ha correlacionado la activación producida por las sales con el coeficiente *B* de Jones-Dole, un parámetro termodinámico empleado para caracterizar la afinidad por el agua de una sal y su carácter caotrópico (los caótropos exhiben interacciones más débiles con el agua que las que el agua tiene consigo misma) o kosmotrópico (los kosmótropos exhiben interacciones relativamente fuertes con el agua), encontrándose que la actividad de la enzima aumenta al hacerlo la

kosmotropicidad de la sal; es posible que las sales kosmotrópicas estabilicen la estructura proteica contra la inactivación producida durante el proceso de liofilización (Ru et al., 2000).

Tabla II. A4. Algunos aditivos empleados para activar enzimas para uso en medio no acuoso (tomado de Roy et al., 2004).

| Enzyme | Solvent | Additive | Activation factor |
|--|--|---|-------------------|
| Protease (<i>Aspergillus oryzae</i>) | Anhydrous pyridine | Sorbitol | 64 |
| | | Sucrose | 38 |
| | | Xylitol | 32 |
| | | Trehalose | 26 |
| | | Mannitol | 20 |
| | | Poly(ethylene glycol) | 8 |
| α -Chymotrypsin | Anhydrous pyridine | Sorbitol | 19 |
| Subtilisin Carlsberg | Anhydrous pyridine | Sorbitol | 45 |
| | | 17- β -Oestradiol | 10 |
| | 2-methylbutan-2-ol ^a | | |
| | Hexane | KCl (98 %, v/v) | 1920 |
| Lipase | | | |
| <i>Pseudomonas cepacia</i> | Anhydrous pyridine | Sorbitol | 3 |
| <i>Mucor javanicus</i> | Toluene | KCl (98 %, v/v) | 5 |
| <i>Pseudomonas stutzeri</i> (lipase TL) | Anhydrous 2-methylbutan-2-ol | 17- β -Oestradiol 3-carboxymethyl ether | 26 |
| <i>Humicola lanuginosa</i> | Hexane | KCl (98 %, v/v) | 46 |
| <i>Humicola lanuginosa</i> | Hexane | 18-Crown-6 ^c | 40 |
| <i>Mucor javanicus</i> | Hexane | KCl (98 %, v/v) | 11 |
| Lipoprotein lipase (<i>Pseudomonas</i> sp.) | Anhydrous pyridine | Sorbitol | 8 |
| Horseradish peroxidase | Acetone (97 %, v/v) | <i>o</i> -Hydroxybenzyl alcohol | 62 |
| | Propan-2-ol ^b (99.4 %, v/v) | <i>o</i> -Hydroxybenzyl alcohol | 65 |
| | Acetone (97 %, v/v) | Urea (8 M) | 56 |
| | Water-saturated hexane | Urea (8 M) | 350 |
| Soybean peroxidase | Acetone (99.5 %, v/v) | <i>o</i> -Hydroxybenzyl alcohol | 400 |
| | | <i>m</i> -Hydroxybenzyl alcohol | 100 |
| | | <i>trans</i> -1,2-Cyclohexanediol | 110 |
| | | Guaiacol+ poly(ethylene glycol) | 450 |
| | | <i>trans</i> -1,2-Cyclohexanediol + poly(ethylene glycol) | 800 |
| Phospholipase D | Chloroform | KCl (98 %, v/v) | 10 |
| Penicillin amidase | Hexane | KCl (98 %, v/v) | 750 |
| | | Acetonitrile | KCl (98 %, v/v) |

^a Synonym *t*-amyl alcohol.

^b Synonym isopropanol.

^c A crown ether.

Otro grupo de excipientes engloba los conocidos como “lioprotectores” (a veces se incluye a las sales mencionadas dentro de este mismo grupo al ser sus efectos similares, aunque los mecanismos de acción sean diferentes). Entre ellos se encuentran carbohidratos (fundamentalmente disacáridos), polioles y macrociclos. Así el sorbitol por ejemplo, se ha empleado como excipiente en la liofilización de distintas hidrolasas obteniéndose una preparación enzimática mucho más activa que cuando la liofilización se realiza en ausencia del mismo (Dabulis et al., 1993). Parece ser que los lioprotectores previenen en cierta medida la desnaturalización parcial inducida por el propio proceso

de liofilización (especialmente debida a la deshidratación de la enzima), ayudando igualmente a la retención de la capa de agua esencial de la enzima en el medio orgánico. Los éteres corona también se han empleado para activar enzimas al coliofilizar las soluciones acuosas de éstas con aquéllos. Las enzimas así preparadas parecen mantener en disolventes orgánicos una estructura secundaria muy similar a la de la enzima nativa según han demostrado estudios por espectroscopía FTIR (Griebenow et al., 2001). Aparte de los éteres corona, otros macrociclos empleados como excipientes en la preparación de enzimas liofilizadas son las ciclodextrinas. La coliofilización de la proteasa subtilisina Carlsberg con metil- β -ciclodextrina (M β CD) aumenta la actividad de la enzima en reacciones de transesterificación llevadas a cabo en THF (Montañez-Clemente et al., 2002). En este último caso la enantioselectividad también se incrementa, lo cual, no es sorprendente ya que la M β CD es una molécula quiral y por lo tanto puede interaccionar con la enzima o el sustrato que difunde a través de la matriz de M β CD induciendo cambios en la enantioselectividad respecto a la observada con la enzima liofilizada en ausencia del excipiente. También se acepta generalmente que los lioprotectores (sobre todo aquellos capaces de formar enlaces de hidrógeno con la enzima) producen formas enzimáticas más activas en disolventes orgánicos debido a que hacen que la proteína sea bastante más flexible en el medio no acuoso, pues actúan como mímicos del agua a modo de lubricantes.

Otro grupo de aditivos (dependiente de la enzima) que hace uso del efecto memoria que tienen las enzimas en medios no acuosos como consecuencia de su rigidez conformacional (en medio orgánico las propiedades de la enzima dependen de su historia) (Klibanov, 1995), son los ligandos de la enzima. Por ejemplo, cuando la proteasa subtilisina se liofiliza a partir de una solución acuosa de la misma que también contenga varios inhibidores competitivos (que se eliminan tras la liofilización mediante extracción) no sólo se obtiene una forma enzimática 100 veces más activa que la preparada por liofilización en ausencia de ligandos, sino que también se modifica la estabilidad de la enzima y su especificidad de sustrato (Russell et al., 1988). Este efecto se puede explicar asumiendo que los ligandos (inhibidores) inducen cambios conformacionales en el centro activo de las enzimas y que incluso después de extraer el ligando, su huella (“imprint”) se retiene al colocar a la enzima en medio no acuoso debido a la rigidez provocada por la ausencia de agua (Fig. II. A8). Como la estructura

de la enzima preparada con ligandos es diferente a la preparada en ausencia de ligandos, las propiedades catalíticas también difieren entre ambos casos.

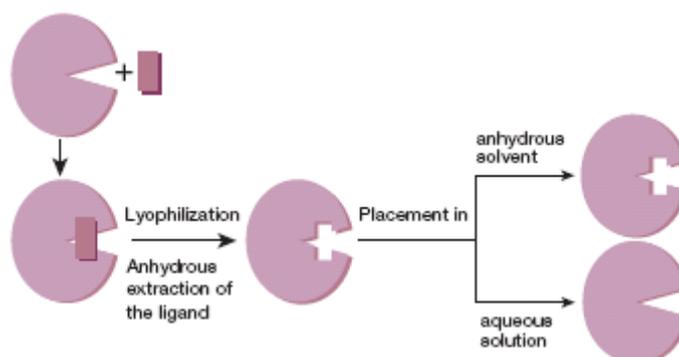


Figura II. A8. Representación esquemática del “imprinting” inducido por el ligando en el centro activo. Al enlazarse el ligando (por ejemplo un análogo del sustrato) al centro activo de la enzima en agua, tiene lugar un cambio conformacional. Esta conformación alterada del centro activo se retiene después de la liofilización tras extraer el ligando con un disolvente orgánico apropiado. De hecho, el “imprinting” inducido por el ligando persiste incluso después de suspender la enzima en un disolvente orgánico, debido a la rigidez estructural en ese medio. Por el contrario, al disolver la enzima en agua, donde las proteínas son más flexibles, el “imprinting” desaparece (tomado de Klibanov, 2001).

ii) Inmovilizada

Una manera de reducir las limitaciones por difusión que presentan las enzimas suspendidas en disolventes orgánicos es mediante inmovilización. Cuando la enzima está dispersa sobre la superficie del soporte sólido, el acceso a las moléculas individuales de proteína se mejora, a la vez que se reduce la agregación de partículas de proteína. Además, las enzimas que funcionan óptimamente en interfases como las lipasas se benefician del aumento de la superficie interfacial que conlleva la inmovilización de la proteína. La inmovilización es uno de los métodos más comúnmente empleados para estabilizar biocatalizadores (Illanes, 1999). Hoy día, la inmovilización enzimática es toda una disciplina científica que aún mantiene para muchos sus matices de arte (Cao, 2005).

La adsorción de una enzima en un soporte macroscópico es la manera más fácil y antigua de inmovilizar proteínas. Las fuerzas que intervienen en el proceso de adsorción son de distinta naturaleza incluyéndose fuerzas de van der Waals, interacciones electrostáticas (iónicas) y enlaces de hidrógeno, siendo todas ellas relativamente débiles (Faber, 2004). El principal atractivo de la inmovilización por

adsorción se halla en la sencillez del procedimiento experimental. Debido a las fuerzas débiles de interacción entre la proteína y el soporte, las pérdidas de actividad enzimática generalmente son leves. Además, la desorción de la proteína del soporte no puede ocurrir (al menos en disolventes no polares donde la proteína es totalmente insoluble). Se han empleado matrices con diferente tamaño de partícula, porosidad y composición como la tierra de diatomeas (Celita), alúmina, sílice, vidrio de poro controlado, celulosa y resinas sintéticas (poliamida, polipropileno, etc.). En contraste con la mayoría de las enzimas, que se adsorben preferiblemente en materiales que presenten una superficie polar, las lipasas se adsorben mejor en soportes lipofílicos debido a su particular naturaleza fisicoquímica (ver apartado B de la introducción). Aunque esta técnica de inmovilización sea tan sencilla, hay que tener el cuidado de optimizar la “carga” de enzima en el soporte (peso enzima / peso soporte) como se muestra gráficamente en la figura II. A9 para la lipasa de *Pseudomonas cepacia* inmovilizada sobre Celita. En efecto, si bien una carga baja de enzima puede ser perjudicial para la estabilidad del biocatalizador debido a que las interacciones con la matriz pueden causar desnaturalización parcial de la proteína, una carga demasiado alta daría lugar a una bajada en la actividad específica de la enzima (Bovara et al., 1993). Este último efecto se justifica debido a la formación de una multicapa de enzima sobre el soporte, lo cual impide o dificulta la accesibilidad del sustrato.

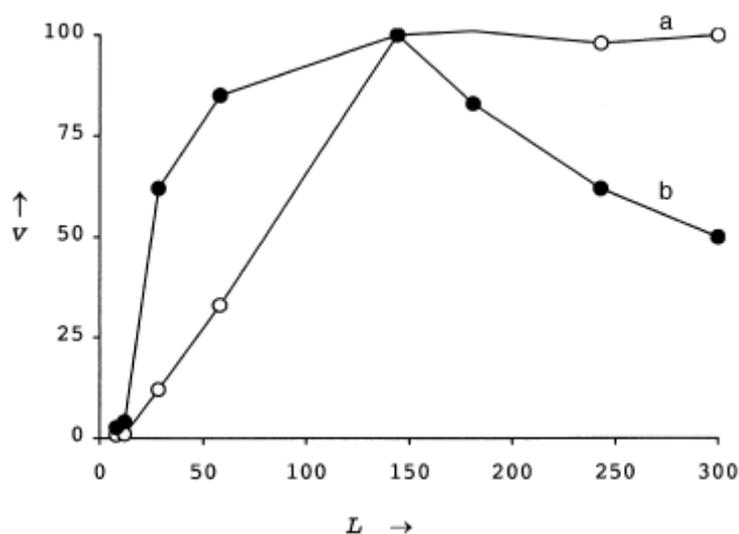


Figura II. A9. Velocidad relativa de transesterificación (v) de la lipasa de *Pseudomonas cepacia*, adsorbida sobre Celita, en función de la carga de enzima (L ; en mg de enzima por mg de Celita). La velocidad relativa está dada por mg de material total (lipasa más Celita, ○) y por mg de lipasa solamente (●). La transesterificación se llevó a cabo entre (\pm)-sulcatol y acetato de vinilo (tomado de Carrea et al., 2000).

La unión covalente de una enzima a un soporte macroscópico da lugar a la formación de enlaces químicos estables entre ambas entidades, lo cual evita completamente la separación de la enzima del soporte aunque el biocatalizador se encuentre en agua. En muchas ocasiones, se requieren condiciones relativamente drásticas para llevar a cabo la inmovilización lo que da lugar a pérdidas de actividad inevitables (son típicos los valores de actividad residual en torno al 50% respecto a la enzima nativa). Los grupos funcionales de la enzima implicados en la unión covalente son nucleófilos (grupos N-terminales y ϵ -amino de residuos de lisina, grupos carboxilo, hidroxilo, tiol y fenólicos). En general, la unión covalente de la enzima al soporte implica dos etapas: i) activación del soporte con un grupo espaciador reactivo y ii) unión química propiamente dicha (Faber, 2004). Los soportes sólidos empleados en la inmovilización covalente son de distinta naturaleza; los hay basados en polímeros naturales de tipo polisacárido (celulosa, dextrano, almidón, etc.) y los hay de tipo inorgánico (vidrio poroso, sílice y derivados).

El uso de enzimas en forma de cristales entrecruzados “cross-linked enzyme crystals” CLEC, es otra alternativa posible para la biocatálisis en disolventes orgánicos. Básicamente se trata de microcristales de enzima que son entrecruzados covalentemente “cross-linked” (típicamente con glutaraldehído). Se trata de preparaciones muy robustas y estables a altas temperaturas en medio acuoso (donde tampoco son solubles). Además, las enzimas en forma CLEC son resistentes a la proteólisis, ya que las proteasas no pueden penetrar la matriz del cristal. Actualmente existen enzimas preparadas como CLEC disponibles comercialmente, aunque su precio es muy caro (Margolin et al., 2001).

iii) Enzimas solubles

Para minimizar las limitaciones por difusión y maximizar las interacciones entre enzima y sustrato, se han empleado distintas estrategias para solubilizar biocatalizadores en disolventes orgánicos. El método más ampliamente empleado se basa en enlazar covalentemente el polímero anfílico polietilenglicol (PEG) a las moléculas de enzima (Matsushima et al., 1996). Los complejos enzima-PEG así preparados dan lugar a soluciones transparentes al disolverlos en diferentes disolventes orgánicos (Bovara et al, 1997). Soluciones de enzima transparentes se pueden obtener también empleando

complejos no covalentes enzima-PEG preparados simplemente mediante liofilización de una disolución acuosa de la enzima en exceso de PEG (Secundo et al., 1999).

A. 3. Selectividad enzimática en disolventes orgánicos. Ingeniería del medio.

La selectividad es una de las principales propiedades de la catálisis enzimática. Se considera una propiedad intrínseca de la enzima –para alterar la selectividad, la molécula de enzima debe ser modificada, por ejemplo mediante mutagénesis dirigida-. Este concepto es correcto mientras nos refiramos a una enzima que actúe en agua, pero deja de tener validez (en sentido parcial) si el proceso enzimático se lleva a cabo en disolventes orgánicos. Efectivamente, hay bastantes ejemplos bien documentados en los que distintos tipos de selectividad enzimática han sido cambiados al pasar de un disolvente orgánico a otro (Carrea et al., 1995) como la selectividad de sustrato, enantiomérica, proquiral y la quimio- y regioselectividades. El término “medium engineering” (ingeniería del medio), se refiere a esta posibilidad de modificar las propiedades de una enzima determinada mediante un simple cambio de la naturaleza del disolvente en el que la reacción se lleva a cabo. El amplio repertorio de disolventes orgánicos con distintas propiedades fisicoquímicas como el momento dipolar, solubilidad, punto de ebullición, constante dieléctrica, cadena lineal o cíclica, etc. permite llevar a cabo estas modificaciones en la naturaleza del medio de manera sencilla. Esta tecnología puede ser una buena alternativa o un complemento a la ingeniería de proteínas clásica (en medio acuoso). Algunos ejemplos representativos de “medium engineering” se discutirán brevemente a continuación.

La tabla II. A5 muestra como la enantioselectividad de la proteasa subtilisina Carlsberg en la resolución de (\pm)-1-feniletanol cambia en función de la naturaleza del disolvente. La relación enantiomérica E (se define como el cociente de las constantes de especificidad k_{cat} / K_m para los dos enantiómeros; mientras mayor sea E mayor será el exceso enantiomérico del producto y del sustrato residual) presenta una relación inversa con la constante dieléctrica del disolvente (Fitzpatrick et al., 1991). Esta correlación inversa se atribuye a un incremento en la flexibilidad de la proteína en disolventes con constantes dieléctricas mayores.

Tabla II. A5. Enantioselectividad (E) de la subtilisina en la transesterificación de (\pm)-1-feniletanol en varios disolventes orgánicos de con distintas constantes dieléctricas (ϵ_r), (tomado de Carrea et al., 2000).

| disolvente | ϵ_r | E | disolvente | ϵ_r | E |
|------------------|--------------|-----|------------------|--------------|-----|
| dioxano | 2.2 | 61 | dimetilformamida | 36.7 | 9 |
| benceno | 2.3 | 54 | nitrometano | 35.9 | 5 |
| trietilamina | 2.4 | 48 | acetonitrilo | 35.9 | 3 |
| tetrahidrofurano | 7.6 | 40 | metilacetamida | 191.3 | 3 |
| piridina | 12.9 | 31 | | | |

La selectividad proquiral de la lipasa de *Pseudomonas* sp. en la monohidrólisis del diéster 2-(1-naftoilamino)trimetilen dibutirato tiende, aproximadamente, a decrecer mientras aumenta la hidrofobicidad ($\log P$) del disolvente (Terradas et al., 1993). Se ha propuesto una explicación mecanística basada en dos modos de unión diferente entre el sustrato proquiral y el centro activo de la lipasa.

La regioselectividad también está controlada por el disolvente en muchos casos. Este tipo de selectividad se refiere a la preferencia de la enzima por uno entre varios grupos funcionales idénticos en la molécula de sustrato (la presente memoria explota esta propiedad). La influencia del disolvente en la regioselectividad se describió por primera vez con la lipasa de *Pseudomonas* sp., que es capaz de discriminar entre dos ésteres situados en posiciones diferentes de un anillo aromático en una reacción de transesterificación con n-butanol. En este caso se demuestra que la regioselectividad correlaciona bastante bien con la hidrofobicidad ($\log P$) del disolvente (Rubio et al., 1991).

La quimioselectividad se refiere a la extensión con la que una enzima favorece uno entre varios grupos funcionales diferentes en la molécula de sustrato. Se ha encontrado que para muchas hidrolasas, el grado de preferencia por un grupo hidroxilo respecto a un grupo amino en un sustrato dado como posición de acilación depende fuertemente del disolvente utilizado (Ebert et al., 1996).

Los datos descritos hasta la fecha muestran que, efectivamente, para modificar o mejorar la selectividad enzimática, la ingeniería del medio representa una alternativa o complemento válido a la ingeniería de proteínas y a la tediosa búsqueda de nuevos

biocatalizadores. En general se han planteado distintas hipótesis para racionalizar este fenómeno (Carrea et al., 2000). Por ejemplo, el disolvente, en función de su polaridad podría modificar la conformación de la enzima en cierto grado y, por tanto, influir en la selectividad al alterar el proceso de reconocimiento molecular entre la enzima y el sustrato. Otras hipótesis se basan en el hecho de que la selectividad depende de la energética de la solvatación del sustrato. Finalmente, también hay modelos que afirman que las moléculas de disolvente podrían unirse al centro activo y, dependiendo de su estructura, interferir con la asociación o transformación de, por ejemplo, un enantiómero más que el otro. A pesar de todo ello, existen casos como el presentado en la figura II. A10, difíciles de racionalizar, y se puede afirmar que los mecanismos que provocan el cambio de selectividad con el medio sólo están comenzando a ser elucidados, siendo difícil predecir los cambios que se van a producir al pasar de un disolvente a otro.

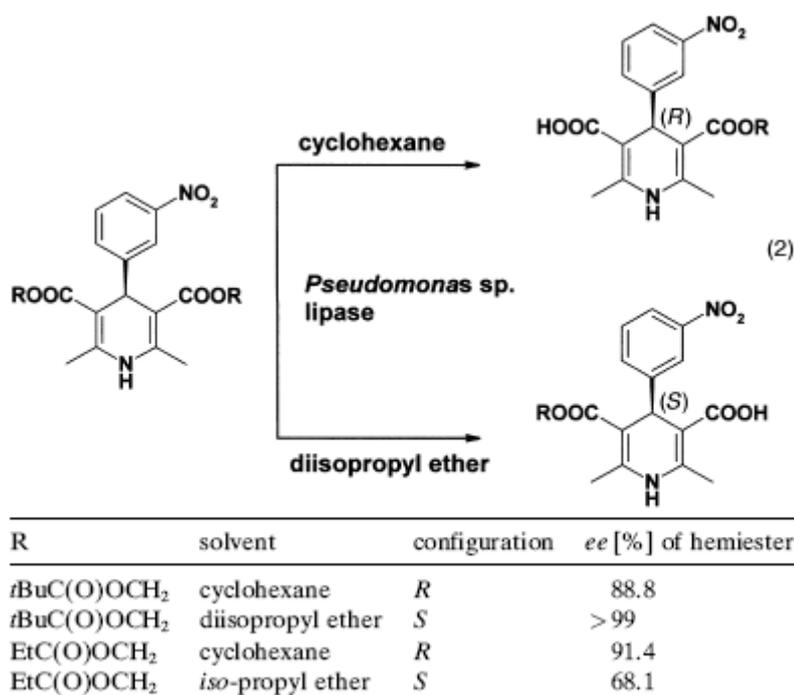


Figura II. A10. Hidrólisis asimétrica de dicarboxilatos de una dihidropiridina. Influencia del disolvente sobre la preferencia estereoquímica (tomado de Carrea et al., 2000)

B. HIDROLASAS.

B.1. Introducción.

Las hidrolasas son un grupo de enzimas que catalizan la ruptura de enlaces con la participación del agua. De acuerdo con la clasificación “EC” (basada en el tipo de reacción que cada enzima cataliza), las hidrolasas pertenecen a la familia número 3, distinguiéndose distintos grupos en función del tipo de enlace que hidrolizan. Estos grupos pueden subdividirse aún más dando lugar a números EC de cuatro dígitos. En la tabla II. B1 se presenta una clasificación de las hidrolasas más útiles en síntesis orgánica. Se puede encontrar más información sobre numeración y clasificación de enzimas en general en la página web <http://www.expasy.ch/enzyme>. La principal desventaja de este sistema de clasificación está en que todas las enzimas que catalizan la misma reacción tienen el mismo número, a pesar de que presenten estructuras diferentes, distinto origen, propiedades, etc. Por ejemplo, todas las lipasas tienen el número EC 3.1.1.3, y realmente hay descritas más de cien diferentes.

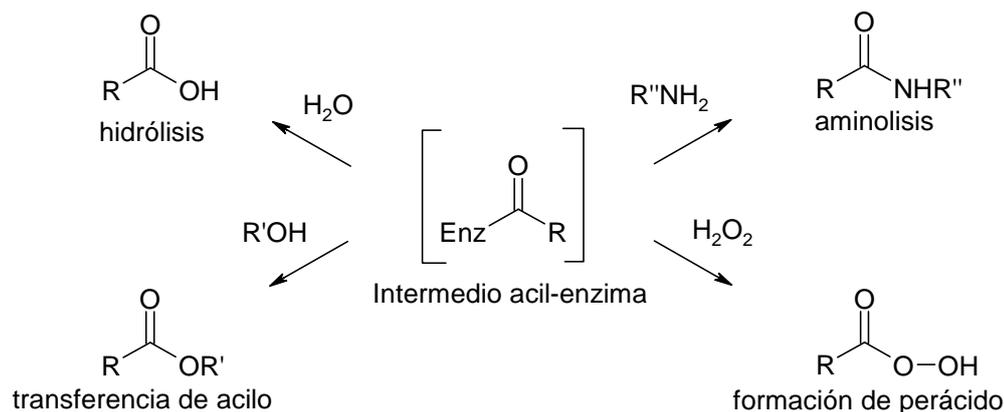
Tabla II. B1. Hidrolasas empleadas en síntesis orgánica (tomado de Bornscheuer et al., 2005).

| EC Number | Type of bond hydrolyzed | Examples |
|------------|--------------------------------------|---|
| 3.1 | Ester | |
| 3.1.1 | in carboxylic acid esters | triacylglycerol lipase, acetylcholine esterase, phospholipase A ₁ , phospholipase A ₂ , gluconolactonase, lipoprotein lipase |
| 3.1.3–4 | in phosphoric acid mono- or diesters | phospholipase C, phospholipase D |
| 3.2 | Glycosidic | |
| 3.2.1 | in <i>O</i> -glycosides | α -amylase, oligo-1,6-glucosidase, lysozyme, neuraminidase, α -glucosidase, β -galactosidase, α -mannosidase, N-acetyl- β -glucosaminidase, sucrose α -glucosidase, nucleosidases |
| 3.3 | Ether | |
| 3.3.2 | in epoxides | epoxide hydrolase |
| 3.4 | Peptide | |
| 3.4.11 | aminopeptidase | leucine aminopeptidase |
| 3.4.16, 21 | serine proteinase | subtilisin, chymotrypsin, thermitase |
| 3.4.18, 22 | cysteine proteinase | papain |
| 3.4.17, 24 | metalloproteinase | thermolysin |
| 3.5 | Other amides | |
| 3.5.1 | in linear amides | penicillin amidase (penicillin G acylase) |
| 3.5.2 | in cyclic amides | hydantoinase |
| 3.5.5 | in nitriles | nitrilase ^a |
| 3.8 | Halide bonds | |
| 3.8.1 | carbon-halide bonds | haloalkane dehalogenase |

Sólo se discutirán las lipasas y las proteasas, por ser éstas el tipo de hidrolasas empleado en la presente memoria. De hecho, casi toda la discusión y ejemplos del apartado anterior de esta introducción han hecho referencia a lipasas o a proteasas por el mismo motivo, y porque se trata también de las enzimas más comúnmente empleadas en síntesis orgánica. En adelante, cuando se emplee el término hidrolasa habrá que entender que el mismo se refiere a una lipasa o proteasa.

Hay diferentes características por las que las hidrolasas son atractivas para el químico orgánico. En primer lugar, debido a su amplia especificidad de sustrato, las hidrolasas son capaces de actuar sobre intermedios de síntesis. En segundo lugar, a menudo muestran una gran regioselectividad y estereoselectividad. En tercer lugar, las hidrolasas pueden llevar a cabo de manera sencilla reacciones inversas a las que catalizan en el entorno acuoso natural (hidrólisis) como es la condensación (esterificación), así como reacciones de alcoholisis (transesterificación). Muchas otras propiedades convierten a las hidrolasas en “reactivos” de síntesis muy convenientes. Hay un amplio repertorio de hidrolasas disponibles comercialmente. No requieren cofactores y son estables en la mayoría de los disolventes orgánicos donde no son solubles.

El mecanismo general de acción de las lipasas y serina proteasas sobre sus sustratos naturales (ésteres o amidas) es muy similar (Faber, 2004). Se discutirá en detalle más adelante, pero básicamente consiste en el ataque de un grupo nucleofílico (concretamente un hidroxilo de una serina situada en el centro activo) de la enzima al grupo carbonilo del éster o la amida formándose un intermedio acil-enzima (a la vez que se produce la salida de un alcohol o amina) que es atacado por un nucleófilo externo (agua cuando la enzima actúa en el sentido hidrolítico natural y otros cuando la enzima opera en medio no acuoso) dando lugar a los productos que se indican en el esquema II. B1 (en el caso de las metaloproteasas el mecanismo difiere considerablemente, no formándose intermedio acil-enzima). En particular, la vía que interesa para la presente memoria es la transferencia del grupo acilo a un alcohol. Más concretamente, cuando el intermedio acil-enzima se ha formado por la acción de ésta sobre un éster, se aplica el término transesterificación para distinguirlo de la esterificación en la cual el intermedio se ha formado por la acción directa de la enzima sobre el ácido carboxílico (y por tanto el grupo saliente es el agua).



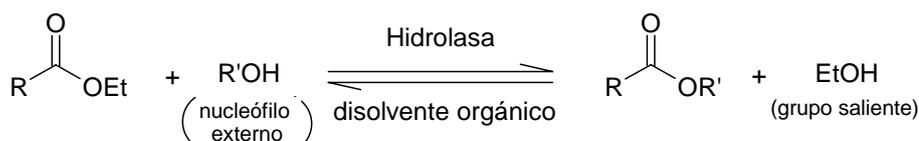
Esquema II. B1. Evolución del intermedio acil-enzima según el nucleófilo empleado (adaptado de Faber, 2004)

B. 2. Reacciones de transesterificación catalizadas por hidrolasas.

El trabajo desarrollado en el grupo de Klivanov ha demostrado sobradamente no sólo que las reacciones enzimáticas se puedan llevar a cabo en disolventes orgánicos, sino que además hay muchos casos donde es más conveniente hacerlo en este medio en lugar de en agua (Klivanov, 2001). Las reacciones de acilación catalizadas por hidrolasas son el ejemplo más claro. La esterificación directa entre un ácido y un alcohol es generalmente muy lenta (a pesar de la catálisis enzimática) y reversible con una constante de equilibrio cercana a la unidad (Bornscheuer et al., 2005). Para desplazar el equilibrio se suele recurrir a la eliminación del agua producida durante la reacción (grupo saliente) mediante evaporación a alto vacío, destilación azeotrópica o empleo de agentes secantes como los tamices moleculares. Este método se emplea generalmente cuando los sustratos son baratos (no preocupa demasiado su pérdida) y se pretende su escalado industrial.

En el campo de la química fina (donde en general los sustratos son más caros y el valor añadido del producto es mayor) y a escala de laboratorio, es preferible recurrir a reacciones de transesterificación para llevar a cabo una acilación biocatalizada. Como estas reacciones no liberan agua durante el curso de la reacción, son generalmente más sencillas de manipular. Además en este caso, la actividad del agua a_w permanece constante y por tanto sólo debe ser ajustada al comienzo de la reacción.

Contrariamente a las reacciones hidrolíticas en las que el nucleófilo externo (agua) está siempre en exceso (55M), la concentración de alcohol a acilar en las reacciones de transesterificación siempre es limitada. Las transesterificaciones en las que se emplean ésteres normales (metilo, etilo) como dadores de acilo son reversibles. Esto es debido a que la nucleofilicidad del nucleófilo externo y el grupo saliente (metanol, etanol) es muy similar y por tanto ambos compiten por el intermedio acil-enzima en ambos sentidos de la reacción (Esquema II. B2). Esto conduce a velocidades de reacción lentas que pueden provocar una pérdida importante de selectividad por razones cinéticas. Para desplazar el equilibrio de la reacción en el sentido que nos interesa se pueden emplear tres alternativas, usar exceso de agente acilante, evaporar el metanol o etanol producidos por evaporación a alto vacío (no aplicable si se usa un disolvente orgánico de bajo punto de ebullición que también se evaporará), o bien emplear dadores de acilo “activados” que favorezcan que la reacción sea más o menos irreversible. Esta última alternativa es la que se suele emplear.



Esquema II. B2. Transesterificación catalizada por una hidrolasa empleando un éster etílico como dador de acilo.

B. 2. 1. Dadores de acilo activados.

Aunque la transferencia de acilo empleando dadores activados es un proceso teóricamente reversible, la posición del equilibrio está tan desplazada hacia la formación de producto que a efectos preparativos se puede considerar como un proceso irreversible. La figura II. B1 muestra los distintos tipos de dadores de acilo comúnmente empleados en laboratorio.

Los trihaloetil ésteres y entre ellos, los trifluoroetil ésteres son uno de los ejemplos típicos. El grado de activación del éster es bastante alto, y el trifluoroetanol que se produce se puede eliminar por evaporación, lo que facilita el procesado de la reacción. Los anhídridos de ácido también se han empleado para acilar alcoholes (Bianchi et al., 1988), la enzima no se modifica químicamente por el anhídrido pero el

ácido carboxílico que se libera puede hacer que disminuya la enantioselectividad de la reacción.

Se considera a los enol ésteres como los dadores de acilo activados más útiles (Bornscheuer et al., 2005). El alcohol que se produce como grupo saliente tautomeriza al correspondiente compuesto carbonílico, que ya no es nucleófilo, desplazando el equilibrio de la reacción en el sentido que interesa. Además en el caso de los ésteres vinílicos (acetato de vinilo por ejemplo) el producto de tautomerización (acetaldehído) es volátil convirtiendo el proceso virtualmente en irreversible y facilitando aún más el aislamiento del producto de la reacción (Esquema II. B3). El grupo de Wong fue el primero en aplicar esta metodología para transesterificaciones catalizadas por lipasas (Wang et al., 1988), extendiéndose rápidamente su uso a las proteasas (Fang et al., 1994).

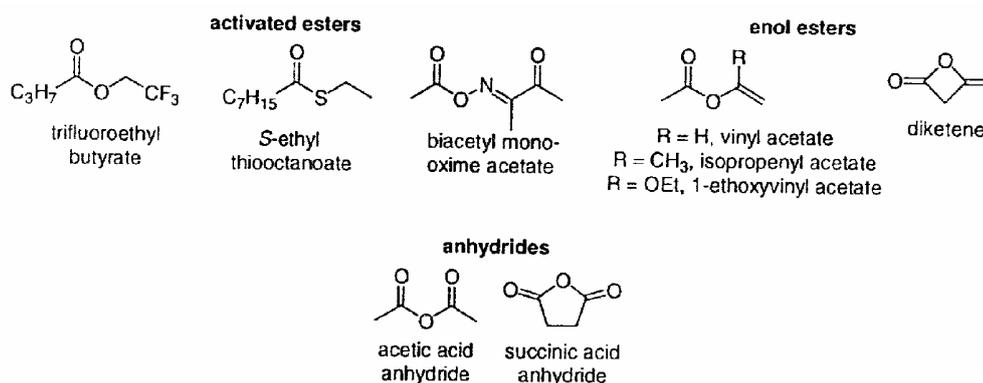
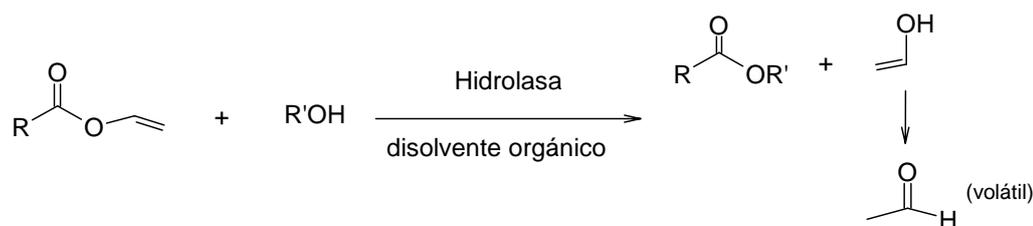


Figura II. B1. Ejemplo de dadores de acilo activados para la acilación irreversible de alcoholes (tomado de Bornscheuer et al., 2005).



Esquema II. B3. Transesterificación irreversible catalizada por una hidrolasa empleando un éster vinílico como dador de acilo.

La transesterificación de alcoholes catalizada por hidrolasas empleando dadores de acilo activados (fundamentalmente enol ésteres como el acetato de vinilo) es una de las principales técnicas enzimáticas de protección de grupos funcionales en síntesis orgánica (Kadereit et al., 2001) debido fundamentalmente a la quimioselectividad, muy útil para casos como el de los aminoalcoholes, y sobre todo al alto nivel de regioselectividad alcanzable gracias a la biocatálisis, de gran valor para el caso de compuestos polihidroxilados. También, es ésta una reacción básica para la resolución cinética de mezclas racémicas de alcoholes (Carrea et al., 2000). En la presente memoria se han empleado ésteres vinílicos como agentes acilantes.

B. 3. Lipasas.

Las lipasas (triacilglicerol acilhidrolasas, EC 3.1.1.3) son enzimas que catalizan la hidrólisis y la síntesis de ésteres formados por el glicerol y ácidos grasos de cadena larga. Las lipasas tienen diversas funciones en la degradación de los alimentos y las grasas. Tienen importantes aplicaciones en biotecnología y como catalizadores en síntesis orgánica. De hecho, alrededor del 40% de todas las biotransformaciones descritas en bibliografía hasta la fecha se han llevado a cabo con lipasas (Faber, 2004). Su alto potencial sintético se debe fundamentalmente a que, contrariamente a la mayoría de las enzimas, acepta un rango muy amplio de sustratos. Son estables en muchos disolventes orgánicos (salvo los más hidrofílicos como el DMSO), y pueden emplearse tanto para reacciones de hidrólisis de ésteres como de síntesis (esquema II. B1). Sobre mezclas racémicas de alcoholes o compuestos polihidroxilados (como los carbohidratos utilizados en la presente memoria) las lipasas actúan con alta regioselectividad y enantioselectividad (Schmid et al., 1998).

Las lipasas en medio acuoso no presentan apenas actividad cuando el sustrato está disuelto en estado monomérico, sin embargo cuando el sustrato se encuentra presente en el medio por encima de su límite de solubilidad formando una segunda fase (lipofílica), se produce un aumento drástico de la actividad de la lipasa. El hecho de que las lipasas no hidrolicen a sus sustratos si se encuentran por debajo de una concentración crítica, denominada concentración de agregación crítica CAC, pero que muestren alta actividad por encima de ella, se denomina “activación interfacial”. Es decir las lipasas actúan -en su función hidrolítica natural- en la interfase acuosa/lipídica.

B. 3. 1. Fuentes naturales, producción y análisis de su actividad.

Las lipasas son enzimas universales y se pueden encontrar en el reino animal, vegetal y microbiano. En el campo de la biotecnología todos los esfuerzos se han enfocado a las de origen microbiano (Pandey et al., 1999). La mayoría de bacterias, hongos y levaduras secretan las lipasas al medio de cultivo lo que supone una gran ventaja desde el punto de vista técnico. Con el advenimiento de la ingeniería genética se está produciendo un número creciente de lipasas a escala comercial a partir de levaduras y bacterias recombinantes. Por ejemplo, la lipasa de *Thermomyces lanuginosus* (anteriormente conocido como *Humicola lanuginosa*) empleada en detergentes, se produce a gran escala (varios cientos de toneladas al año) a través de la fermentación de una cepa de *Aspergillus orizae* en la que se ha clonado el gen que codifica para la lipasa de *T. lanuginosus* (Boel et al., 1996). En los últimos años, se ha incrementado la búsqueda de lipasas de microorganismos extremófilos para obtener, por ejemplo, enzimas más estables a altas temperaturas (Bóday et al., 2003; Maheshwari et al., 2000). La mayoría de las lipasas son producidas por los microorganismos en dos isoformas (isoenzimas), denominadas A y B. Ambas isoenzimas son muy similares mostrando la misma preferencia enantiomérica, pero con ligeras diferencias estructurales que pueden conducir a diferencias de enantioselectividad. Casi todas las preparaciones de lipasas contienen ambas isoenzimas; la única excepción reseñable es la de la lipasa de *Candida antarctica* (CAL) para la que ambas isoenzimas están disponibles gracias a la ingeniería genética (Faber, 2004)

Los protocolos de purificación de lipasas suelen ser bastante tediosos, empleándose técnicas no específicas como la precipitación, cromatografías de interacción hidrofóbica, exclusión por tamaño o intercambio iónico (Sharma et al., 2001). La cromatografía de afinidad se ha empleado en algunos casos para reducir el número de etapas individuales de purificación. Afortunadamente, hoy día muchas lipasas purificadas son comerciales (obtenidas casi siempre mediante tecnología recombinante) (Tabla II. B2).

En la presente memoria se han empleado las lipasas de *Thermomyces lanuginosus* y de *Candida antarctica* (isoenzima B), ambas en la forma inmovilizada comercializada por la empresa biotecnológica Novozymes A/S (antes Novo Nordisk)

bajo los nombres Lipozyme TL IM[®] y Novozym 435[®] respectivamente (ver apartados B. 3.3 y B. 3.4.).

Tabla II. B2. Lipasas importantes disponibles comercialmente (adaptado de Jaeger et al., 1998).

| Tipo | Fuente | Aplicación principal | Compañía productora |
|------------|-----------------------------|------------------------|---|
| Fúngica | <i>C. rugosa</i> | síntesis orgánica | Amano, Biocatalysts, Boehringer Mannheim, Fluka, Genzyme, Sigma |
| | <i>C. antarctica</i> | síntesis orgánica | Boehringer Mannheim, Novo Nordisk |
| | <i>T. lanuginosus</i> | aditivo de detergentes | Boehringer Mannheim, Novo Nordisk |
| | <i>R. miehei</i> | procesado de alimentos | Novo Nordisk, Biocatalysts, Amano |
| Bacteriana | <i>Burkholderia cepacia</i> | síntesis orgánica | Amano, Fluka, Boehringer Mannheim |
| | <i>P. alcaligenes</i> | aditivo de detergentes | Genencor |
| | <i>P. mendocina</i> | aditivo de detergentes | Genencor |
| | <i>Ch. viscosum</i> | síntesis orgánica | Asahi, Biocatlysts |

El análisis de la actividad lipasa se puede llevar a cabo por diversos medios. Todos los ensayos se basan en medidas de la actividad hidrolítica natural (se realizan en medio acuoso) y son muy importantes como herramienta en biotecnología para la detección de microorganismos lipolíticos, en los métodos de screening aplicados a la evolución dirigida de estas enzimas y para la determinación de la actividad de preparaciones de lipasa crudas o purificadas (Thomson et al., 1999). Cada método tiene sus ventajas y también limitaciones, algunos son más adecuados para hacer ensayos múltiples (HTS) aunque sean menos exactos que otros (Beisson et al., 2000).

Para analizar la actividad sintética de una lipasa en reacciones de transesterificación el método más rápido es el fluorimétrico desarrollado en el grupo de Bornscheuer (Konarzycka-Bessler et al., 2003). No obstante, el análisis cromatográfico (HPLC o GC) sigue siendo el método más extendido.

B. 3. 2. Estructura y mecanismo de acción.

A partir de los años 90 comenzaron a resolverse las primeras estructuras de lipasas por cristalografía de rayos X (hoy día se han resuelto más de una docena, casi todas de origen microbiano). La estructura tridimensional sugiere que la activación

interfacial puede ser el resultado de la presencia de un “loop” peptídico que cubre el centro activo de la enzima en disolución, a modo de tapadera (“lid”). A partir de las estructuras de rayos X de lipasas cristalizadas con análogos del sustrato, hay evidencias de que cuando tiene lugar el contacto en la interfase acuosa/lipídica (o si la enzima se halla en un disolvente orgánico), esta tapadera sufre un reordenamiento conformacional que hace al centro activo accesible al sustrato (Fig. II. B2). Este reajuste conformacional durante la activación de la lipasa se ha estudiado también con técnicas computacionales (Jääkeläinen et al., 1998).

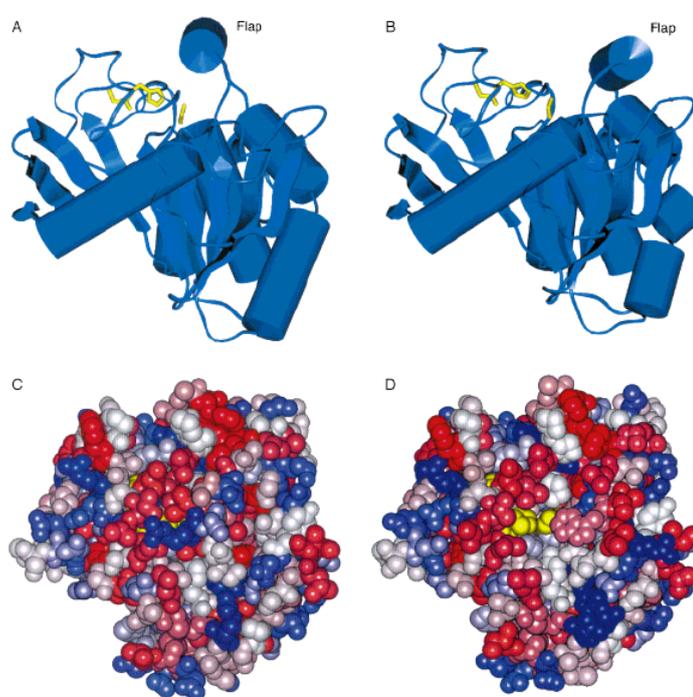


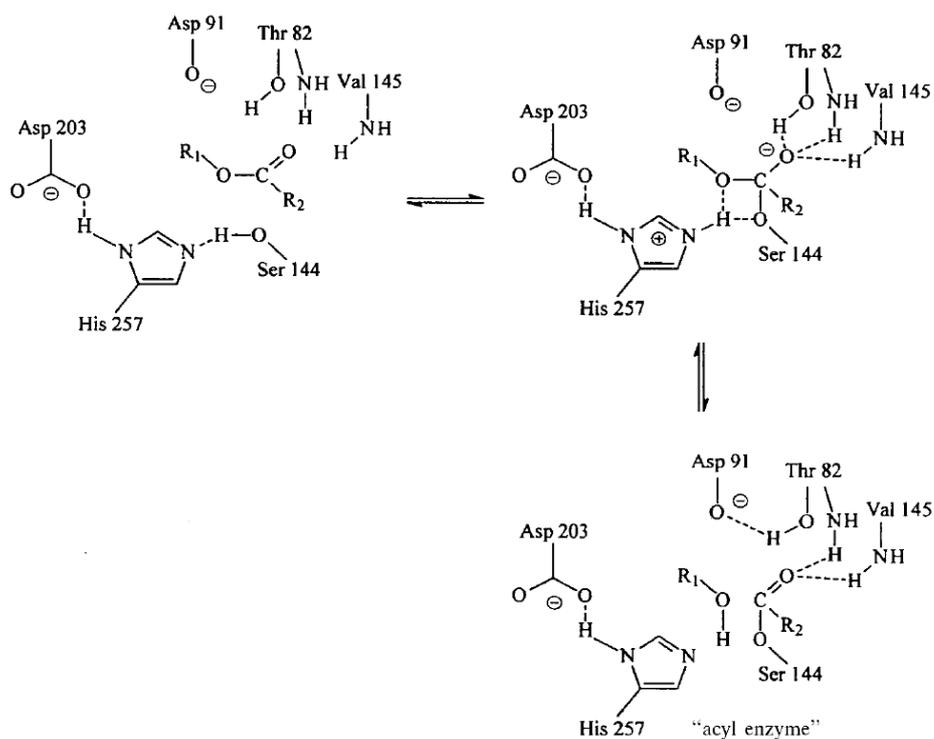
Fig. II. B2. Estructura de la lipasa de *Mucor miehei* en forma cerrada (A, C) y abierta (B, D). A y B (vista lateral): la triada catalítica (amarillo) y los elementos de estructura secundaria mostrando el plegamiento α/β hidrolasa común a todas las lipasas. C y D (vista desde arriba): modelo “space-filling”, coloreado por polaridad decreciente (azul marino-celeste-blanco-rosa-rojo). Tras la apertura de la tapadera, la triada catalítica (amarillo) es ahora accesible (D), y la región uniéndose a la interfase disminuye significativamente su polaridad (tomado de Schmid et al., 1998).

Todas las lipasas cuyas estructuras han sido resueltas son miembros de la familia de plegamiento α/β hidrolasa con una arquitectura común compuesta de un núcleo de láminas β más o menos paralelas rodeadas de una secuencia específica de hélices α . Hidrolizan los enlaces éster gracias a una tríada catalítica situada en el centro activo compuesta de un residuo nucleófilo de serina activado mediante una red de enlaces de

hidrógeno cooperativa con una histidina y un aspartato o glutamato (Esquema II. B4). Las serina proteasas siguen esencialmente el mismo mecanismo (Silverman, 2002).

Todas las lipasas investigadas hasta la fecha exhiben un grado sorprendente de similitud estructural y funcional, independientemente del organismo del que se aislaron e incluso aunque las homologías en la secuencia de aminoácidos sean bajas (Schmid, 1998).

No obstante, a pesar de estas similitudes, variaciones sutiles en la estructura del centro activo pueden tener grandes efectos en las propiedades catalíticas y la estabilidad de la lipasa en un disolvente determinado.



Esquema II. B4. Mecanismo catalítico de las lipasas basado en la triada catalítica con la serina actuando como nucleófilo. El intermedio tetraédrico es estabilizado por el “agujero oxianión”. Los números de los residuos en este ejemplo corresponden a la lipasa de *Rhizopus orizae* (tomado de Schmid et al., 1998).

Todas las lipasas aceptan ésteres de ácidos grasos de cadena mediana (de cuatro átomos de carbono, C4) a larga (C16), algunas son incluso capaces de hidrolizar ésteres de ácidos grasos muy largos (C22). La especificidad de sustrato (referida a la unidad de

acilo) de las lipasas está determinada por la forma del centro activo que impone las preferencias de tamaño de cadena que presenta cada lipasa (Figura II. B3).

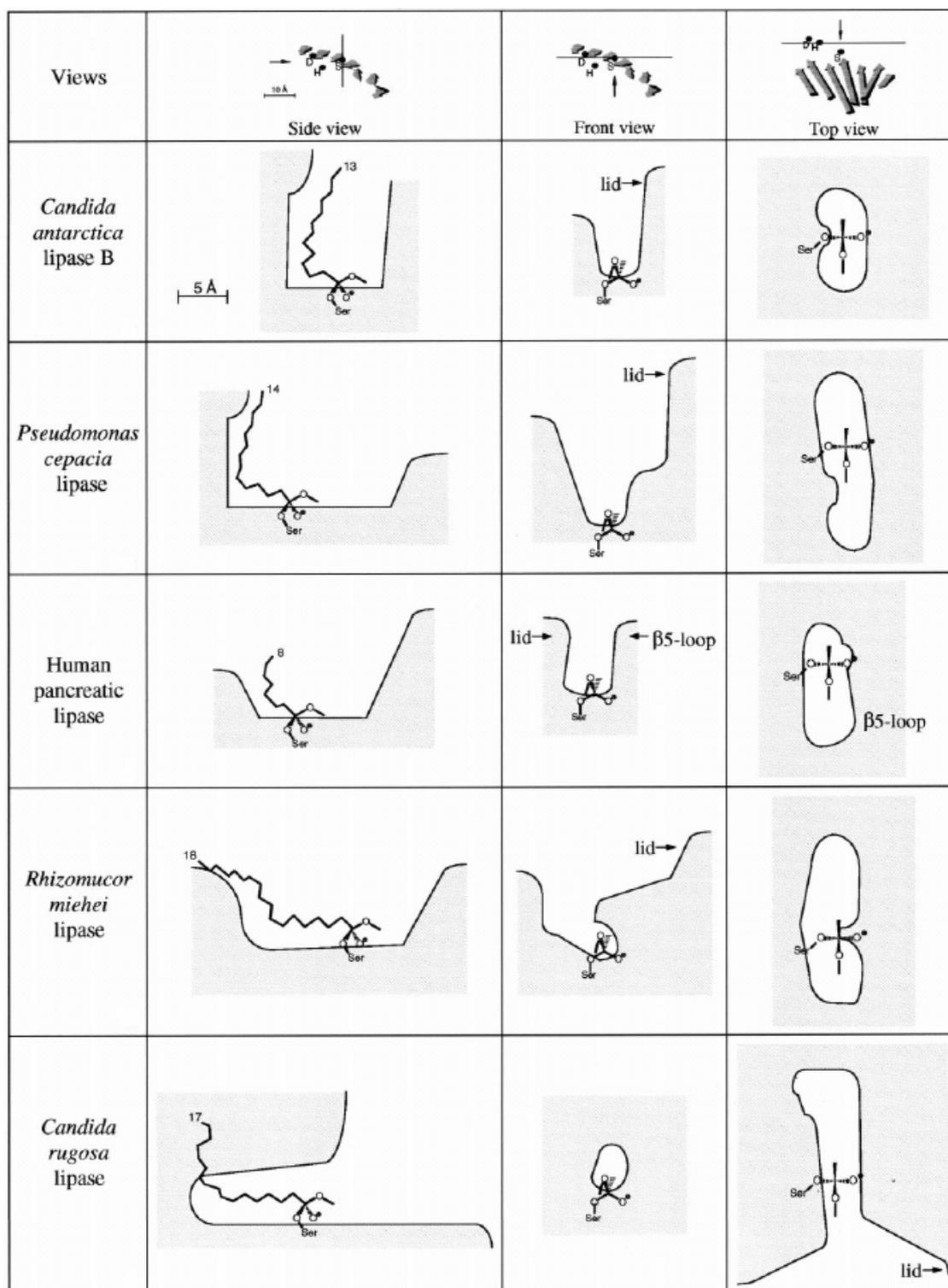


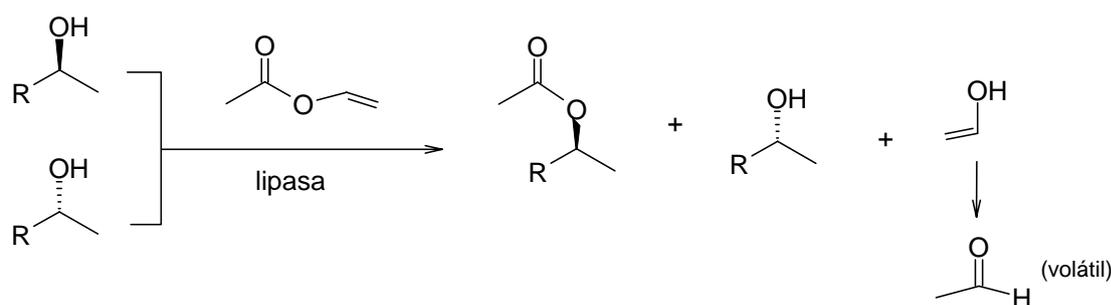
Figura II. B3. Forma del centro activo de varias lipasas. La unidad de alcohol del sustrato (éster) no se muestra por claridad. El número indica la longitud del ácido graso más largo que puede unirse completamente en el centro activo (tomado de Pleiss et al., 1998). Nota: la lipasa de *Thermomices lanuginosus* es totalmente homóloga en su arquitectura a la lipasa de *Rhizomucor miehei*.

B. 3. 3. Lipasas como biocatalizadores en síntesis orgánica.

Aparte de su aplicación en las industrias de grasas y aceites, detergentes, papel y alimentación, las lipasas encuentran una utilidad primordial en el campo de la química orgánica. Sin duda, son las enzimas más empleadas en síntesis debido a su versatilidad (Reetz, 2002).

Algunas lipasas pueden trabajar en disolventes orgánicos con una a_w muy baja (Valivety et al., 1992c) lo cual es muy atractivo pues se evita la posible hidrólisis del agente acilante. No obstante, presentan un perfil de actividad catalítica frente a a_w diferente según su origen como ya se indicó con anterioridad (Valivety et al., 1992b).

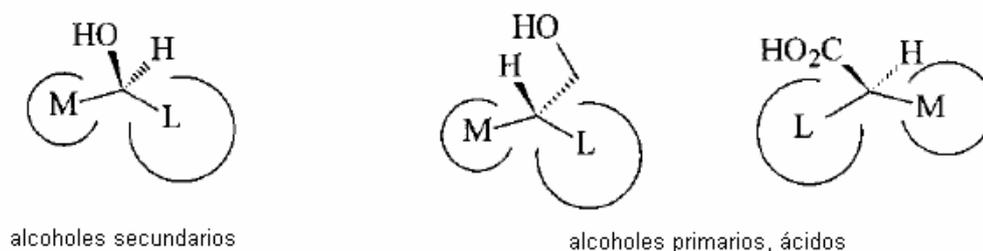
Al poder actuar sobre sustratos distintos a los glicéridos, las lipasas se han empleado mucho en resoluciones cinéticas de alcoholes mediante transesterificaciones con enol-ésteres (Esquema II. B5). Según un estudio desarrollado en el grupo de Faber, se pueden emplear ésteres vinílicos como agentes acilantes para todas las lipasas salvo las de *Candida rugosa* y *Geotrichum candidum* que pierden casi toda su actividad catalítica al ser expuestas al acetaldehído que se libera en la reacción de transesterificación (Weber et al., 1995; Weber et al., 1997)



Esquema II. B5. Resolución cinética de una mezcla racémica de alcoholes secundarios con acetato de vinilo como agente acilante.

Con propósitos de predicción, se ha intentado racionalizar la preferencia enantiomérica de las lipasas basandose en los requerimientos estéricos de los sustituyentes. Las denominadas “reglas de Kazlauskas“ se resumen en el esquema II. B6 (Kazlauskas et al., 1991). La experiencia ha demostrado que la regla es bastante

predictiva para la acción de lipasas sobre alcoholes secundarios, pero menos para las transformaciones de alcoholes primarios y ácidos carboxílicos.



Esquema II. B6. “Reglas de Kazlauskas” (M = sustituyente de tamaño medio, L= sustituyente grande). En reacciones de acilación, el enantiómero mostrado reacciona más rápido, en reacciones de hidrólisis el éster del enantiómero mostrado reacciona más rápido (tomado de Kazlauskas et al., 1991).

Cuando una lipasa es prometedora para el sector de la química fina, se puede mejorar su enantioselectividad en reacciones hidrolíticas o en transesterificaciones mediante evolución dirigida (Jaeger et al., 1998).

En el caso de compuestos polihidroxilados (como los carbohidratos) las lipasas son una herramienta fundamental para la acilación regioselectiva de determinados hidroxilos. En estos casos, cuando hay presentes tanto hidroxilos primarios como secundarios, las lipasas (y las serina proteasas) acilan preferentemente los primarios por estar menos impedidos estéricamente (Plou et al., 2002). A lo largo de la presente memoria se verán bastantes ejemplos de aplicación de esta propiedad.

B. 3. 4. Lipasa de *Thermomyces lanuginosus*.

Thermomyces lanuginosus (anteriormente denominado *Humicola lanuginosa*) es un hongo filamentoso termofílico que crece de manera óptima entre 48-52 °C, aunque se puede cultivar a temperaturas entre 30-55 °C. Este hongo extremófilo puede tolerar la exposición durante unos instantes a temperaturas tan altas como 68 °C y sus esporas pueden sobrevivir hasta 5 minutos en agua hirviendo. Se encuentra frecuentemente en suelos ricos en materia orgánica, materia vegetal en descomposición, compost, etc. (<https://fungalgenomics.concordia.ca/fungi>).

Este microorganismo secreta una variedad de enzimas degradativas muy interesantes debido a su termoestabilidad elevada. La que aquí nos ocupa es su lipasa

(Arima et al., 1972). Su expresión heteróloga se lleva a cabo empleando *Aspergillus oryzae* (Yaver et al., 2000) produciéndose en la actualidad a escala industrial como se indicó previamente (Boel et al., 1996). La lipasa expresada así se ha podido obtener con gran pureza mediante un procedimiento en dos etapas que implican cromatografía de interacción hidrofóbica y cromatografía de intercambio iónico (Peters et al., 1998)

La lipasa de *T. lanuginosus* (TLL) aislada por el grupo de Arima es un polipéptido de cadena única con un peso molecular de 27500 Daltons, presenta su actividad hidrolítica óptima a pH 8.0 siendo estable en el rango de pH 4 a 11. Muestra su actividad máxima a una temperatura de 60 °C. Tiene actividad apreciable a 65 °C aunque es inactivada tras ser calentada a 80 °C durante 20 minutos (Liu et al., 1973). La estructura de TLL es muy similar a la de la lipasa de *R. miehei* (Derewenda et al., 1994). El centro activo (Ser146, His258, Asp201) se encuentra enterrado bajo un tramo corto de hélice que actúa como tapadera. Se ha resuelto la estructura tanto de la forma cerrada como de la abierta, mostrando claramente el movimiento de la tapadera para exponer al centro activo a potenciales sustratos. Respecto a la hidrólisis de triglicéridos esta lipasa no presenta especificidad de posición.

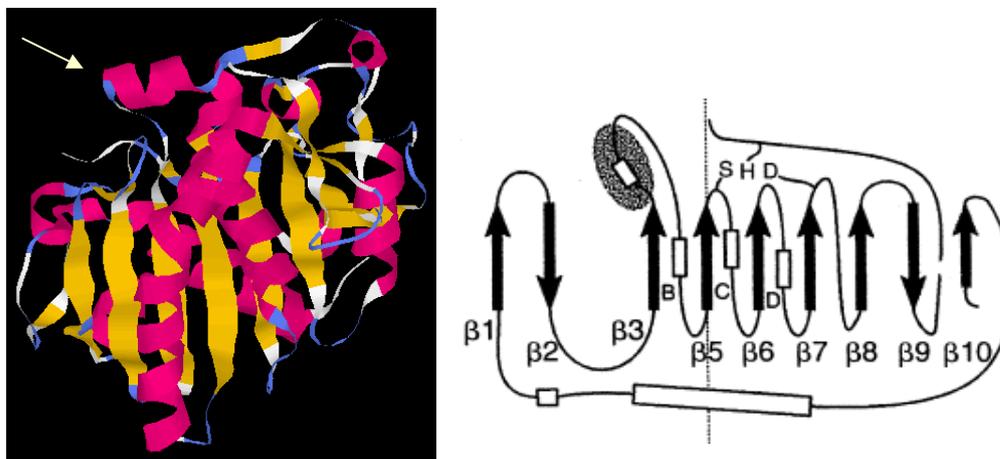


Figura II. B4. Estructura tridimensional (izquierda) de la lipasa de *Thermomyces lanuginosus* resuelta por cristalografía de rayos X con indicación de la región de la tapadera. La estructura se ha generado a partir del archivo pdb correspondiente (1DTEA) (Brozozowski et al, 2000). A la derecha se representa la localización topológica de la misma lipasa, indicándose la zona de la tapadera en gris (tomado de Muralidhar et al., 2002).

Aunque la principal aplicación industrial de esta lipasa sea como aditivo en detergentes (se emplea para facilitar la disolución de las grasas), su empleo como “reactivo” en síntesis orgánica en medio no acuoso se está generalizando cada vez más.

Para estos fines se suele emplear la lipasa en forma liofilizada o inmovilizada. El grupo de Adlercreutz ha realizado un estudio interesantísimo sobre los factores que gobiernan la actividad en disolventes orgánicos de una preparación liofilizada y otra inmovilizada de la lipasa de *Thermomyces lanuginosus* que se describirá escuetamente a continuación (Persson et al., 2002). Para ello emplean lo que se conoce como “active site titration” (titulación de centros activos). Este método es muy valioso para elucidar los cambios producidos en la actividad enzimática al cambiar la propia formulación (preparación) de la misma o las condiciones de reacción. Se puede obtener información sobre si un incremento o descenso en la actividad es debido a un cambio en el número total de moléculas de enzima activas o si es el resultado de diferencias en la actividad catalítica por molécula de enzima activa. Estos autores han realizado medidas de actividad y “titulación de centros activos” (con un método colorimétrico) en hexano para preparaciones de TLL liofilizada con distintas cantidades de tampón fosfato, e inmovilizada sobre polipropileno poroso (Accurel EP-100, un soporte hidrofóbico). Demuestran que la actividad de TLL coliofilizada con gran cantidad de sales fosfato (200 mM) incrementa la actividad específica cuatro veces, y el número de centros activos rápidamente titulables se incrementa un 50% (ambas cifras en comparación con el liofilizado simple en ausencia de ningún excipiente). Parece ser que el tampón fosfato actúa como matriz de inmovilización para la lipasa, y que el aumento en la actividad específica se debe parcialmente a una reducción de las limitaciones por difusión. En el estudio con TLL inmovilizada sobre polipropileno poroso, la actividad específica resultó ser 770 veces más alta que la mejor preparación liofilizada. Cuando la carga de enzima en el soporte es óptima, el 93% de las moléculas de enzima se titulan a gran velocidad; esto indica que la adsorción en una superficie hidrofóbica es una manera muy eficaz de reducir las limitaciones por difusión y de inmovilizar las enzimas en su conformación activa (con la tapadera abierta) para su empleo en disolventes orgánicos. La tabla II. B3 resume los datos obtenidos por el grupo de Adlercreutz.

La inmovilización de la lipasa de *T. lanuginosus* en sílice granulada porosa es un método muy sencillo y más barato que los basados en materiales poliméricos hidrofóbicos. Debido a la facilidad de manipulación de los gránulos formados, el biocatalizador es fácil de separar de las mezclas de reacción (en disolventes orgánicos) mediante simple decantación facilitándose su reutilización (Pedersen et al., 1998). Actualmente Novozymes A/S comercializa esta preparación de la lipasa bajo el nombre

Lipozyme TL IM[®]. Esta versión de la lipasa de *T. lanuginosus* es la que se ha empleado en la presente memoria. A continuación se indicarán algunas de sus especificaciones según el fabricante (recogidas de Lipozyme TL IM[®] product sheet, Novozymes.)

Tabla II. B3. Actividad específica y cantidad de centros activos (% de contenido en proteína) para preparaciones liofilizadas e inmovilizadas de la lipasa de *Thermomyces lanuginosus*^[a] (tomado de Persson et al., 2002).

| Preparation | Protein loading [mg per g of preparation] | Specific activity ^[b] [U per g of protein] | Active sites accessible [%] | Specific activity ^[b] [U per g of active enzyme] | Specific activity ^[c] [U per g of protein] | Activity ratio ^[d] |
|------------------|--|--|--------------------------------|--|--|-------------------------------|
| EP-100 | 55 | 7.2 | 93 | 7.7 | 7344 | 1020 |
| EP-100 | 6.6 | 3.0 | 70 | 4.2 | n.d. ^[e] | n.d. ^[e] |
| 200 mM phosphate | 100 | 0.12 | ≥ 50 ^[f] | ≤ 0.24 | 9.5 | 79 |
| 100 mM phosphate | 209 | 0.089 | ≥ 46 ^[f] | ≤ 0.19 | 4.9 | 55 |
| 20 mM phosphate | 630 | 0.05 | ≥ 13 ^[f] | ≤ 0.38 | 2.2 | 44 |
| crude | 700 | 0.017 | ≥ 3.5 ^[f] | ≤ 0.49 | n.d. ^[e] | n.d. ^[e] |

[a] The titrations were performed for 24 h in hexane/diethyl ether (97:3) at a water activity (a_w) = 0.33. The *p*-nitrophenol released was extracted with 200 mM phosphate buffer (pH 7.0) in the case of freeze-dried preparations and with 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) in the case of immobilised preparations. The specific activity was measured in the esterification of 50 mM 1-phenylethanol with 100 mM caproic acid or in the esterification of 50 mM dodecanol with 100 mM decanoic acid in hexane at a_w = 0.33. [b] Esterification of 1-phenylethanol. [c] Esterification of dodecanol. [d] Ratio in specific activity between dodecanol/1-phenylethanol esterification. [e] n.d. = not determined. [f] Probably not the final value.

Lipozyme TL IM[®] tiene una actividad catalítica de 250 IUN/g, un diámetro de partícula de 0.3-1.0 mm, un contenido en agua del 5% (w/w) y una dosis de enzima del 10% (w/w). La actividad de interesterificación se define como la velocidad de conversión de triestearina en condiciones estándar (sustrato: aceite de soja totalmente hidrogenado/aceite de soja, 27/73 w/w, 70 °C, sin disolventes adicionales y a 200 rpm). 1 IUN corresponde a una velocidad de conversión de 0.01g triestearina/l/minuto/gramo de enzima inmovilizada. Lipozyme TL IM[®] presenta su actividad máxima en el rango de temperaturas 55-70 °C y es mecánicamente estable para emplearla en operaciones “batch” o “fixed-bed”. Lipozyme TL IM[®] esta diseñada para emplearla en medio no acuoso únicamente ya que los gránulos se desintegrarían en agua.

Entre las aplicaciones sintéticas de Lipozyme TL IM[®] (y otros formulaciones de la lipasa de *T. lanuginosus*) se ha descrito su empleo en la catálisis de etapas clave en la síntesis de vitaminas a gran escala (Bonrath et al., 2002), la transesterificación de esteroides vegetales con oleato de metilo (Weber et al., 2003), resoluciones de intermedios en la síntesis de compuestos antihipertensivos (Schnell et al., 2000) o la acilación regioselectiva de carbohidratos (como se verá en el apartado de resultados de la presente memoria) por citar unos ejemplos.

B. 3. 5. Lipasa B de *Candida antarctica*.

Candida antarctica es una levadura basidiomiceto que, como su nombre indica, se aisló en la Antártida con el propósito de encontrar enzimas capaces de operar en condiciones extremas para poder usarlas en formulaciones de detergentes. Su lipasa (CAL) es probablemente la más versátil de todas las lipasas empleadas en biotransformaciones preparativas. Como otros microorganismos, produce dos isoenzimas A y B, que difieren en cierta medida: mientras la isoenzima A es dependiente de Ca^{2+} y más termoestable, la B es menos termoestable (aunque lo es mucho más que la mayoría de las lipasas) y no dependiente de cationes metálicos. En lo que respecta a las aplicaciones preparativas, la especificidad de sustrato varía bastante, ya que la isoenzima A es altamente activa de manera no específica sobre triglicéridos, mostrando preferencia por el grupo éster en posición *sn*-2 (Rogalska et al., 1993). Por el contrario, la isoenzima B presenta especificidad *sn*-1,3 respecto a triglicéridos y es muy activa sobre un rango muy amplio de ésteres no naturales. Ambas isoenzimas se han producido de manera pura a través del clonaje y sobreexpresión heteróloga en *Aspergillus oryzae*, y distintas preparaciones de las mismas son comercializadas por Novozymes A/S (www.novozymes.com). La discusión que sigue se centrará en la lipasa B de *C. antarctica* (CALB) por ser la que se ha empleado en la presente memoria.

CALB tiene un peso molecular en torno a los 33 KDa (Uppenberg et al., 1994a,b). En agua es una proteína excepcionalmente robusta que se desactiva sólo a 50-60 °C (en forma inmovilizada, el límite operacional aumenta a 60-80 °C), y también muestra una resistencia elevada a la desnaturalización por adición de disolventes orgánicos (Salis et al., 2003). En contraste con muchas otras lipasas como la de *T. lanuginosus*, esta enzima parece ser bastante rígida y no muestra un efecto pronunciado de activación interfacial (Martinelle et al., 1995a) lo que la convierte en una especie de intermedio entre una esterasa y una lipasa típica. La falta de activación interfacial en CALB es consistente con la ausencia de cambios estructurales observados en las estructuras cristalinas de rayos X con y sin inhibidor (análogo del estado de transición). Por tanto, es posible que realmente CALB no tenga región de tapadera (fig. II B5) que regule el acceso al centro activo, de ahí que la lipasa muestre una actividad similar frente a sustratos monoméricos en disolución o sustratos agregados adsorbidos en una interfase (Muralidhar et al., 2002). La estructura es como si estuviese siempre en conformación “abierta” con una entrada bastante restringida al centro activo (triada catalítica: Ser105, Asp187, His224) como se puede ver en la figura II. B5 (Uppenberg et al., 1994a,b, McCabe et al., 2004). La ausencia de tapadera facilita que se pueda

predecir su selectividad mediante cálculos computacionales (Uppenberg et al., 1995), y la mayoría de las reglas de Kazlauskas (esquema II. B6) se pueden aplicar.



Figura II. B5. Estructura tridimensional (izquierda) de la lipasa B de *Candida antarctica* resuelta por cristalografía de rayos X. La estructura se ha generado a partir del archivo pdb correspondiente (1TCA) (Uppenberg et al., 1994a). A la derecha se representa la localización topológica de la zona de la tapadera (región en gris ténue) que prácticamente es inexistente (tomado de Muralidhar et al., 2002).

Estudios sobre la cinética de reacciones de transesterificación en disolventes orgánicos catalizadas por CALB demuestran que la lipasa sigue un mecanismo bi-bi ping-pong con inhibición competitiva por el sustrato –los alcoholes empleados como aceptores de acilo- (Martinelle et al., 1995b). Las figuras II. B6 y II. B7 lo muestran gráficamente.

CALB muestra alta enantioselectividad sobre un rango amplio de sustratos, lo que la convierte en un valioso biocatalizador en síntesis orgánica asimétrica. En los últimos años, se han desarrollado una serie de proyectos basados en ingeniería de proteínas racional (mutagénesis dirigida) y combinatorial (evolución dirigida) para extender y modelar las propiedades catalíticas y físicas de CALB (Luntz, 2004). Por ejemplo, el bolsillo de estereoespecificidad (Thr42, Ser47, Trp104) situado en el centro activo tiene un tamaño que sólo acomoda confortablemente un sustituyente etilo u otro más pequeño (Esquema II. B7). Mutaciones dirigidas en las que se cambian uno de los aminoácidos de este bolsillo por uno poco voluminoso como la alanina crean espacio suficiente para poder alojar sustituyentes más grandes y así expandir la utilidad de CALB en acilaciones de alcoholes secundarios (Magnusson et al., 2005).

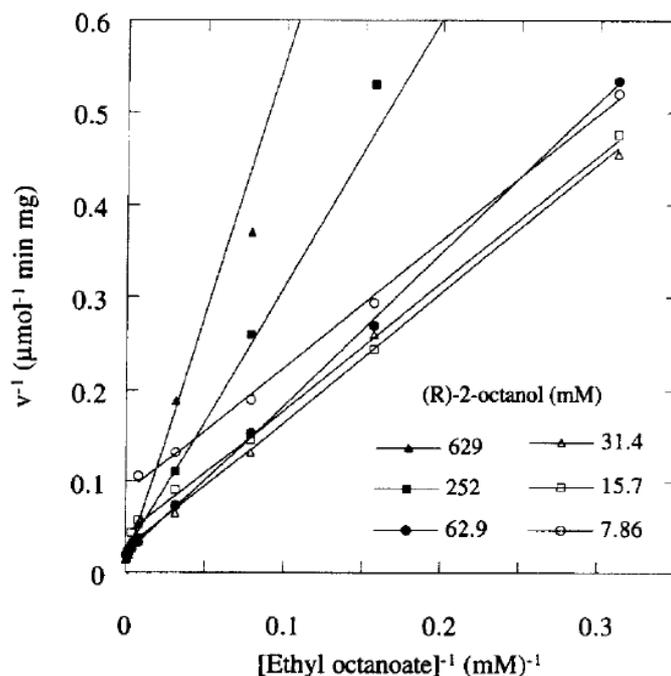


Figura II. B6. Representación doble recíproca de las velocidades iniciales de formación de (*R*)-2-octil octanoato a partir de octanoato de etilo y (*R*)-2-octanol con catálisis por CALB. La reacción se llevó a cabo a 25 °C en heptano y a una a_w de 0.1 (tomado de Martinelle et al., 1995b)

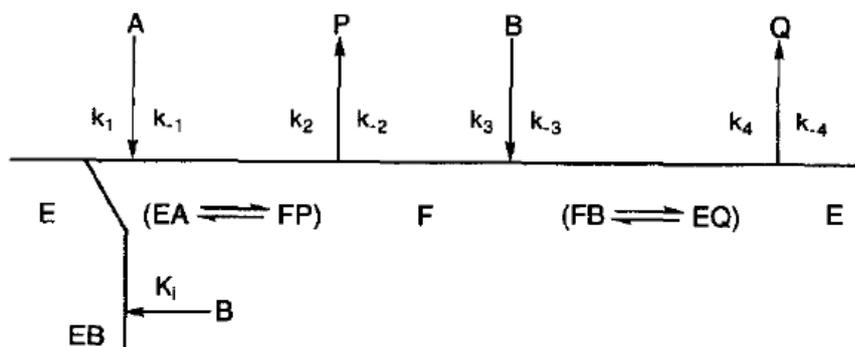
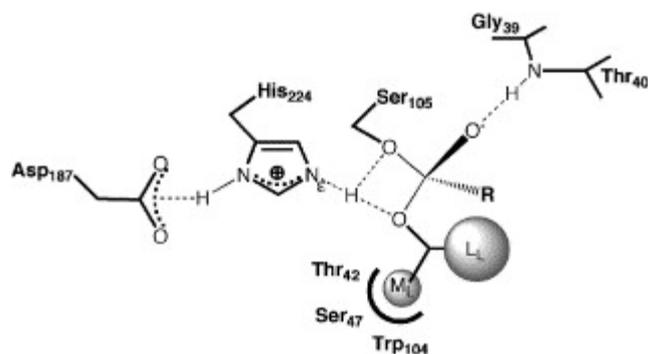


Figura II. B7. Representación esquemática del modelo bi-bi ping-pong, incluyendo las constantes de velocidad individuales, con inhibición competitiva por el sustrato (aceptor de acilo). A y B son el dador y el aceptor de acilo respectivamente, P y Q son los productos, E y F son la lipasa libre y la acil-lipasa, EA, EB y EQ son complejos de la lipasa con sustrato/producto y FB y FP son complejos del sustrato con la acil-lipasa (tomado de Martinelle et al., 1995b)



Esquema II. B7. Intermedio de la reacción de esterificación (o hidrólisis) de un hidroxilo secundario mostrando las limitaciones que impone el bolsillo de estereoespecificidad de CALB (tomado de Luntz, 2004)

CALB se suele emplear en forma inmovilizada. Novozymes A/S comercializa la enzima adsorbida en una resina acrílica macroporosa con el nombre Novozym[®] 435. Esta versión de CALB es la que se ha empleado en la presente memoria. A continuación se indicarán algunas de sus especificaciones según el fabricante (recogidas de Novozym[®] 435 product sheet, Novozymes.)

Novozym[®] 435 tienen un diámetro de 0.3-0.9 mm, una actividad catalítica de 10000 PLU/g , un diámetro de partícula (que tienen forma de perlititas) de 0.3-0.9 mm y un contenido máximo en agua del 3% (w/w). La actividad está expresada en “propil laurate units” (PLU) por gramo. Novozym[®] 435 es muy tolerante al calor con una actividad máxima en el rango de temperaturas 70-80 °C, aunque se recomienda su uso entre 40-60 °C para una productividad óptima.

Novozym[®] 435 es probablemente la lipasa más empleada en biocatálisis. Se emplea en procesos industriales como catalizador para la síntesis de ésteres sencillos, amidas, alcoholes, aminas y ácidos carboxílicos óptimamente activos. En bibliografía encontramos numerosos ejemplos de su aplicación en síntesis orgánica (Anderson et al., 1998). Por citar algunos, indicar que se ha empleado para la acilación regioselectiva de productos naturales como la digitonina (Danieli et al., 1999), para la síntesis de derivados hidrosolubles del retinol (vitamina A) (Rejasse et al., 2003) o la transesterificación de carbohidratos (como se verá en el apartado de resultados de la presente memoria).

B. 4. Proteasas.

Las proteasas son enzimas proteolíticas que catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos. Son por tanto, enzimas degradativas que hidrolizan proteínas. Estas enzimas son altamente estereo- y regioespecíficas, usualmente actúan en condiciones suaves de reacción con un pH óptimo entre 6 y 8 en casi todos los casos, son fáciles de manejar, no requieren cofactores, son bastante estables y, en general, relativamente simples en su arquitectura molecular. Las proteasas representan uno de los grupos más grandes de enzimas industriales y suponen el 60% de la venta total mundial de enzimas (Rao et al., 1998).

Las proteasas tienen una larga tradición de aplicación en las industrias de alimentación y detergentes. Su aplicación en el curtido de pieles sustituyendo a los reactivos químicos tóxicos tradicionales es relativamente reciente y les ha conferido mayor importancia si cabe en el sector biotecnológico (Polderman, 1990). Los principales productores de proteasas a nivel mundial se indican en la tabla II. B4.

Tabla II. B4. Principales productores de proteasas (adaptado de Rao et al., 1998).

| Compañía | País | Cuota de mercado (%) |
|------------------------|----------------|----------------------|
| Novo Industries | Dinamarca | 40 |
| Gist-Brocades | Holanda | 20 |
| Genencor Internacional | Estados Unidos | 10 |
| Miles Laboratories | Estados Unidos | 10 |
| Otras | | 20 |

De acuerdo con la clasificación EC, las proteasas pertenecen al subgrupo 4 del grupo 3 (hidrolasas). Sin embargo, las proteasas no se adaptan fácilmente al sistema de nomenclatura enzimática debido a su gran diversidad de acción y estructura. Actualmente, las proteasas se clasifican en base a tres criterios principales: (i) tipo de reacción que catalizan, (ii) naturaleza química del centro activo, y (iii) relaciones evolutivas en referencia al sustrato (Barett, 1994).

Las proteasas se dividen en dos grupos fundamentales, exo- y endopeptidasas, según su sitio de acción. En función de los grupos funcionales del centro activo tenemos serina proteasas, aspártico proteasas, cisteína proteasas y metaloproteasas. La Tabla II. B5 resume la clasificación de esta clase de enzimas.

Tabla II. B5. Clasificación de las proteasas (tomado de Rao et al., 1998).

| Protease | Mode of action ^a | EC no. |
|---|-------------------------------|---------------|
| Exopeptidasas | | |
| Aminopeptidasas | ● ↓ ○ - ○ - ○ - ○ --- | 3.4.11 |
| Dipeptidyl peptidase | ● - ● ↓ ○ - ○ - ○ --- | 3.4.14 |
| Tripeptidyl peptidase | ● - ● - ● ↓ ○ - ○ --- | 3.4.14 |
| Carboxypeptidase | --- ○ - ○ - ○ - ○ - ○ ↓ ● | 3.4.16–3.4.18 |
| Serine type protease | | 3.4.16 |
| Metalloprotease | | 3.4.17 |
| Cysteine type protease | | 3.4.18 |
| Peptidyl dipeptidase | --- ○ - ○ - ○ - ○ ↓ ● - ● | 3.4.15 |
| Dipeptidasas | ● ↓ ● | 3.4.13 |
| Omega peptidasas | * - ● ↓ ○ - ○ --- | 3.4.19 |
| | --- ○ - ○ - ○ ↓ ● - * | 3.4.19 |
| Endopeptidasas | | |
| Serine protease | --- ○ - ○ - ○ ↓ ○ - ○ - ○ --- | 3.4.21–3.4.34 |
| Cysteine protease | | 3.4.21 |
| Aspartic protease | | 3.4.22 |
| Metalloprotease | | 3.4.23 |
| Endopeptidasas of unknown catalytic mechanism | | 3.4.24 |
| | | 3.4.99 |

^a Open circles represent the amino acid residues in the polypeptide chain. Solid circles indicate the terminal amino acids, and stars signify the blocked termini. Arrows show the sites of action of the enzyme.

Fuentes naturales

Al ser unas enzimas necesarias desde el punto de vista fisiológico para los seres vivos, las encontramos extendidas en una gran diversidad de fuentes.

Plantas: en ellas se encuentran por ejemplo la papaína, bromealina y las queratinasas.

Animales: las proteasas más familiares son de origen animal como la tripsina, quimotripsina o la pepsina.

Microorganismos: los microorganismos representan una fuente excelente de proteasas debido a su gran diversidad bioquímica y a que son susceptibles de ser manipulados genéticamente. Las proteasas de origen microbiano son preferidas a las de origen animal o vegetal ya que poseen casi todas las características deseables para aplicaciones biotecnológicas. Las bacterias son el principal grupo de microorganismos empleados para tales fines. La mayoría de las proteasas comerciales, principalmente neutras y

alcalinas, son producidas por bacterias del género *Bacillus*. Las proteasas neutras bacterianas son activas en un rango estrecho de pH (5 a 8) y tienen una termotolerancia relativamente baja. Las proteasas alcalinas bacterianas se caracterizan por su alta actividad a pH alcalino (por encima de pH 10) y su amplia especificidad de sustrato. Su temperatura óptima de funcionamiento está en torno a los 60 °C. Estas propiedades las hacen muy útiles para la industria de detergentes (Rao et al., 1998).

Las principales aplicaciones son como aditivo en detergentes, en la industria de pieles, en industrias de alimentación (fabricación de queso, mejora de la calidad del pan, preparación de hidrolizados de proteínas de soja, reducción del amargor de hidrolizados de proteínas, síntesis del edulcorante “aspartamo”), industria farmacéutica, etc. (Rao et al., 1998).

B. 4. 1. Proteasas como biocatalizadores en síntesis orgánica.

Al igual que las lipasas, las proteasas se han aplicado con éxito en el campo de la síntesis química debido a su capacidad para catalizar la “reacción inversa a la hidrólisis” en medios no acuosos. Muchos de los avances que se han realizado en el campo de las enzimas en disolventes orgánicos se han derivado de estudios con proteasas como se ha mostrado en distintos ejemplos del apartado A de esta introducción.

Actualmente las proteasas son un “reactivo” más en el laboratorio de química orgánica (Bordusa, 2002). Entre sus aplicaciones encontramos la síntesis de péptidos, la catálisis de reacciones de esterificación/transesterificación, la síntesis de glicoconjugados (acilaciones regioselectivas de carbohidratos) y por supuesto, las resoluciones cinéticas de mezclas racémicas. Salvo la primera, el resto de aplicaciones sintéticas también las comparten las lipasas. De hecho ambas clases de enzimas se complementan en numerosos procesos de síntesis (por ejemplo, al presentar regioselectividades diferentes respecto al mismo sustrato).

Se mostrarán algunos ejemplos de estas aplicaciones en los siguientes apartados cuando se describan las dos proteasas concretas empleadas en la presente memoria: la serina proteasa alcalina de *Bacillus licheniformis*, denominada subtilisina Carlsberg, y la metaloproteasa de *Bacillus thermoproteolyticus*, denominada termolisina.

B. 4. 2. Serina proteasas

Estas proteasas, como su nombre indica, se caracterizan por la presencia de un grupo serina en el centro activo que incluye una tríada catalítica de tres aminoácidos, serina (nucleófilo), aspartato (electrófilo) e histidina (base), lo cual en seguida nos recuerda a una lipasa. Existen múltiples variedades, atendiendo a las similitudes estructurales se agrupan en unas 20 familias, que se han subdividido en 6 clanes con un ancestro común (Barett, 1994).

Las serina proteasas son generalmente activas a pH neutro y alcalino, con un óptimo entre pH 7 y 11. Tienen una amplia especificidad de sustrato incluyendo actividad esterolítica y amidasa. Sus pesos moleculares suelen ir de 18 a 35 kDa. Las serina proteasas alcalinas, que son activas a pH muy básico, representan el subgrupo más grande de las serina proteasas, el segundo corresponde a las subtilisinas de origen *Bacillus* (Rao et al., 1998).

El estudio del mecanismo de acción de las proteasas en general ha sido un tema de gran interés para los investigadores. La purificación previa de las proteasas es un prerrequisito para poder estudiar su mecanismo de acción. Se han descrito numerosos procedimientos de purificación para proteasas que incluyen cromatografía de afinidad e intercambio iónico, cromatografía de gel-filtración y electroforesis preparativa entre otras técnicas.

El centro catalítico de las proteasas está flanqueado en uno o ambos lados por subsitios de especificidad, cada uno capaz de acomodar la cadena lateral de un determinado residuo de aminoácido del sustrato. Estos sitios se numeran S1 a Sn en sentido del centro activo al extremo N terminal de la enzima y S1' a Sn' en sentido hacia el extremo C Terminal. Los residuos del sustrato que estos “bolsillos” acomodan se numeran P1 a Pn y P1' a Pn' respectivamente (Fig. II. B8).

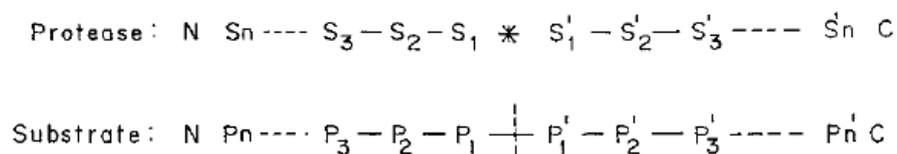


Figura II. B8. Subsitos de especificidad de las proteasas. El centro catalítico está indicado por * y el enlace hidrolizable por † (tomado de Rao et al., 1998).

Las serina proteasas siguen un mecanismo hidrolítico en dos pasos en el que un intermedio enzima-péptido unido covalentemente se forma con la pérdida de un aminoácido o fragmento peptídico (Fasterz et al., 1973). El mecanismo es totalmente análogo al de las lipasas (esquema II. B4) con el intermedio tetraédrico producido tras el ataque nucleofílico de la serina estabilizado por el “agujero oxianión” (Lizbeth, 2002). A esta etapa de acilación le sigue un proceso de desacilación que ocurre a través del ataque nucleofílico del agua sobre el intermedio, dando lugar a la hidrólisis del péptido. Obviamente, si el intermedio acil-enzima se ha formado en medio no acuoso, y se permite la acción de un nucleófilo externo tipo alcohol, estaríamos ante la acilación de éste catalizada por la proteasa siguiendo la vía que ya se señaló en el esquema II. B1. Como muchas serina proteasas pueden catalizar la hidrólisis de ésteres (Jones 1980) resulta evidente que puedan catalizar reacciones de transesterificación en disolventes orgánicos (la mayoría de los estudios con proteasas citados en el apartado A de la introducción se basan en este tipo de reacción). De aquí deriva su utilidad en síntesis orgánica.

B. 4. 2. 1. Proteasa alcalina de *Bacillus licheniformis* (subtilisina Carlsberg).

La proteasa alcalina de *Bacillus licheniformis*, denominada subtilisina Carlsberg o subtilisina A (EC 3.4.21.62), fue descubierta en 1947 por Linderstrom-Lang y Ottesen en el laboratorio Carlsberg, de ahí su nombre. Es una endopeptidasa con un peso molecular de 27.5 kDa, una temperatura óptima de trabajo de 60 °C y un pH óptimo de 10. Presenta una amplia especificidad de sustrato, lo que le confiere gran utilidad sintética. La tríada catalítica del centro activo la componen los residuos Ser221, His64 y Asp32. Un catión de calcio está presente en su estructura, aunque no depende de él para su estabilidad. El patrón de plegamiento es tipo “sandwich” con una capa de laminas β entre dos de hélices α . Esta enzima fue la primera en la que se demostró que sus cristales (CLEC) en disolventes orgánicos mostraban la misma estructura de rayos X que en medio acuoso.



Figura II. B9. Estructura cristalina de rayos X de la subtilisina Carlsberg (la imagen se ha generado a partir del archivo pdb 1SBC; Neidhart et al., 1988).

La acción de esta enzima en disolventes orgánicos se puede modular de diversas maneras, variando su formulación o bien mediante “ingeniería del medio”. Así por ejemplo, se puede controlar su actividad y selectividad en reacciones de acilación de nucleósidos mediante “imprinting” molecular. En este caso, aparte de mejorar la actividad respecto a la enzima liofilizada en ausencia de ligandos, también se puede discriminar por ejemplo, entre nucleósidos relacionados estructuralmente (timidina frente a desoxiadenosina) simplemente seleccionando el adecuado como aditivo en el liofilizado de la proteasa. Estudios de modelado molecular sugieren que los cambios estructurales que se producen en la triada catalítica son los responsables de los efectos señalados (Rich et al., 1997). Otro ejemplo típico es el incremento en la enantioselectividad en reacciones de transesterificación en disolventes orgánicos al emplear KCl como excipiente en la liofilización de la proteína (Hsu et al., 2001). La actividad catalítica y la enantioselectividad de la subtilisina Carlsberg en disolventes orgánicos también mejora ostensiblemente al coliofilizarla con metil- β -ciclodextrina (Griebenow et al., 1999), superando a la preparación liofilizada simple y a la forma CLEC (Montañez-Clemente et al., 2002). Más curioso aún resulta la regioselectividad observada en la acilación del flavonoide citotóxico doxorubicina (aplicado en tratamientos de quimioterapia del cáncer) que es diferente cuando se emplea la proteasa solubilizada en el disolvente orgánico (formando un par iónico con un surfactante) a cuando se emplea como liofilizado activado con KCl (Altreuter et al., 2002).

Al igual que con las lipasas, la subtilisina Carlsberg se emplea en resoluciones cinéticas y se ha intentado racionalizar su preferencia enantiomérica respecto a

alcoholes (en reacciones de transesterificación), obteniéndose el modelo de la fig. II. B10.

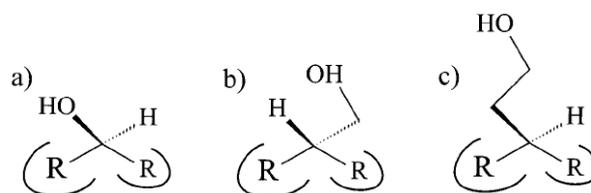


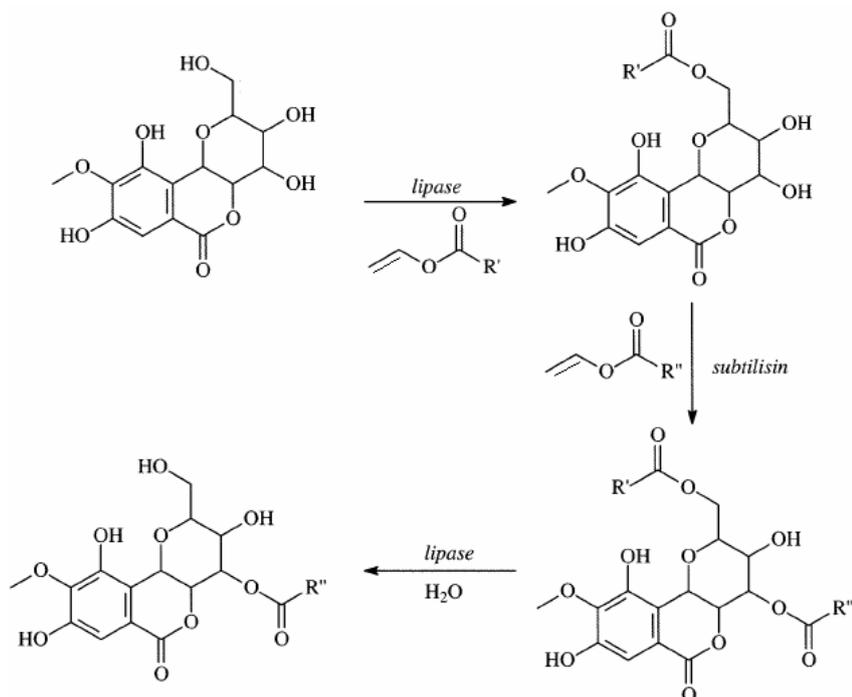
Figura II. B10. Modelo para la predicción y explicación de la especificidad de la subtilisina por (a) alcoholes secundarios, (b) alcoholes primarios β -ramificados, (c) alcoholes primarios γ -ramificados. El tamaño del radical “R” denota el tamaño relativo de los sustituyentes (tomado de Lloyd et al., 1998). Nota: Aunque el modelo se basa en un estudio de la subtilisina de *Bacillus lentus*, la similitud estructural permite extrapolarlo a la subtilisina Carlsberg.

La proteasa subtilisina Carlsberg se ha empleado en combinación con lipasas en una estrategia combinatorial sencilla para la heteroacilación secuencial regioselectiva de compuestos como el flavonoide polihidroxilado bergenina (Esquema II. B8) (Mozhaev et al., 1998).

En la presente memoria se ha empleado la subtilisina Carlsberg (“subtilisin A”) de la casa Novozymes A/S. A continuación se indicarán algunas de sus especificaciones según el fabricante (recogidas de subtilisin A product sheet, Novozymes).

Esta enzima se produce mediante fermentación de una bacteria del género *Bacillus* modificada genéticamente. Es un polvo blanco cristalino con una actividad de 25 AU/g (AU: Anson Units). En medio acuoso, su temperatura óptima de trabajo está en torno a los 60 °C y el pH óptimo entre 8 y 10.

Para los fines sintéticos de la presente memoria se ha utilizado esta enzima coliofilizada con metil- β -ciclodextrina, como se describirá en el apartado de resultados.



Esquema II. B8. Estrategia sintética para la producción de derivados acilados de la bergenia mediante un proceso en tres etapas secuenciales de acilación/hidrólisis regioselectivas (tomado de Mozhaev et al., 1998).

B. 4. 3. Metaloproteasas

Las metaloproteasas son las enzimas más diversas entre los distintos tipos de proteasas (Barett, 1995). Se caracterizan por el requerimiento de un catión metálico divalente en su centro activo para poder ejercer su actividad, lo cual las diferencia considerablemente de las serina proteasas. Tienen una gran variedad de orígenes como las colagenasas de los organismos superiores o las termolisinas de bacterias. Se han reconocido unas 30 familias de metaloproteasas, las cuales se han agrupado en diferentes clanes de acuerdo con el aminoácido que completa el centro activo; por ejemplo, el clan MA tiene la secuencia HEXXH-E y el clan MB corresponde al motivo HEXXH-H.

Basándose en la especificidad de su acción, las metaloproteasas se pueden dividir en cuatro grupos, (i) neutras, (ii) alcalinas, (iii) *Myxobacter* I, (iv) *Myxobacter* II. Las metaloproteasas neutras muestran especificidad por aminoácidos hidrofóbicos, mientras que las alcalinas poseen una especificidad mucho más amplia. Las metaloproteasas *Myxobacter* I son específicas para residuos de aminoácidos pequeños a ambos lados del enlace peptídico a hidrolizar, mientras que el grupo II es específico

para residuos de lisina en la parte de aminoácido del enlace peptídico. Agentes quelantes como el EDTA inhiben la actividad de todas estas metaloproteasas (Rao et al., 1998).

Los mecanismos de acción son variados aunque en todos juega un papel fundamental el catión metálico del centro activo. El mecanismo de la termolisina se describirá en el siguiente apartado.

B.4.3.1 Metaloproteasa de *Bacillus thermoproteolyticus* (termolisina).

La metaloproteasa termolisina (TLN) es una endopeptidasa extracelular termoestable (tiene una vida media de 1h en solución acuosa a 80 °C) de 316 aminoácidos (34600 Daltons) aislada de *Bacillus thermoproteolyticus* (Endo, 1962). La enzima (EC 3.4.24.27) compleja un ión zinc, necesario para su actividad (Latt et al., 1969), y cuatro iones calcio que son necesarios para una termoestabilidad óptima (Feder et al., 1971). Los estudios cinéticos muestran que TLN hidroliza específicamente los enlaces peptídicos en el lado imino de residuos hidrofóbicos grandes como leucina, isoleucina, y fenilalanina y que la hidrólisis de enlaces peptídicos entre dos residuos hidrofóbicos sucesivos es la más eficaz (Moriyama et al., 1970). Esta metaloproteasa neutra, es la más caracterizada entre todos los miembros del clan MA. Los residuos de histidina del motivo HEXXH actúan como ligandos del Zn, mientras que el glutamato cumple una función catalítica (Weaver et al., 1977). La estructura cristalina de rayos x de TLN (de hecho una de las primeras proteínas cuya estructura fue resuelta) muestra dos dominios principales (Holmes, 1982). El dominio N-terminal consiste fundamentalmente en láminas β mientras que el C-terminal contiene predominantemente hélices α . El centro activo está localizado en una hendidura entre ambos dominios (Fig. II. B11). El ión Zn^{2+} está localizado en el fondo de este hueco (Fig. II. B11). En aquellos casos donde se ha cocrystalizado TLN con un inhibidor, se han podido identificar los residuos involucrados en la catálisis.

La estructura del complejo entre TLN y el fosforamidón (un inhibidor que se une fuertemente a la enzima (esquema II. B9) se ha resuelto por cristalografía de rayos X (Tronrud et al., 1986).

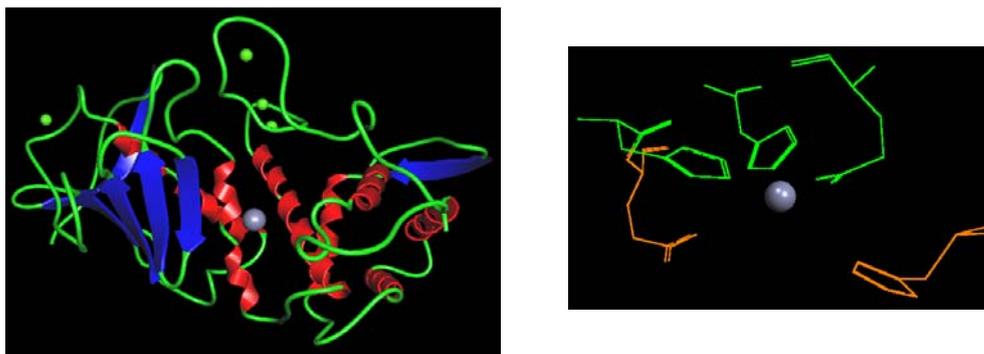
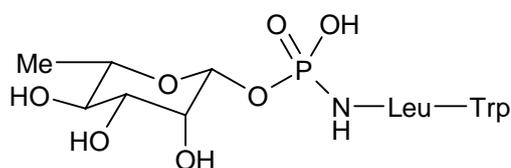


Figura II. B11. Estructura cristalina de rayos X de TLN (izquierda) mostrando los dos dominios principales y el ión Zn^{2+} (en gris) del centro activo entre ambos (generado a partir del archivo pdb 1KEI). A la derecha se muestran los residuos del centro activo. His142, His146 y Glu166 (todos en verde) actúan como ligandos del Zn^{2+} que está tetracoordinado; el cuarto ligando en la función hidrolítica es el agua, que no aparece porque la estructura se ha generado a partir de un complejo de TLN con un inhibidor (omitido por claridad) que coordina con el Zn^{2+} desplazando al agua. Los residuos Glu143 e His231 (naranja) juegan un rol fundamental de catálisis ácido-base en el mecanismo de la reacción (imagen generada a partir del archivo pdb 1TLP).

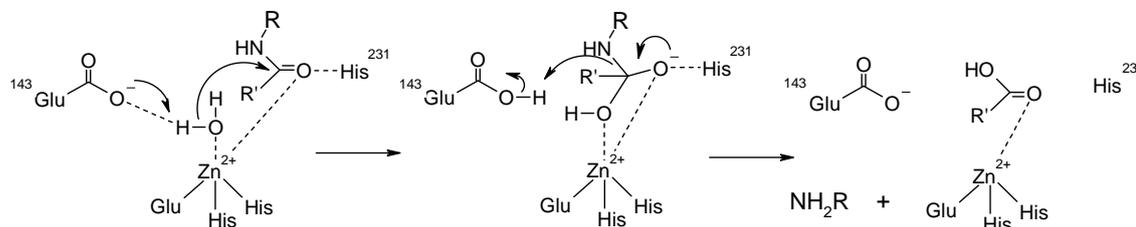


Esquema II. B9. Estructura química del fosforamidón.

El grupo fosforilo actúa imitando un grupo carbonilo atacado nucleofílicamente por agua generando un intermedio tetraédrico. El oxígeno del fosforilo desplaza a la molécula de agua previamente unida al ión Zn^{2+} y se convierte en su cuarto ligando, a una distancia de unos 2.0 Å. El hidroxilo unido al átomo de fósforo está a 2.6 Å del átomo de oxígeno de Glu143 formando enlace de hidrógeno con él. El nitrógeno fosforamida está a 4.1 Å del átomo de nitrógeno de His231.

A partir de estas observaciones se ha propuesto un mecanismo para la acción catalítica de TLN (Esquema II. B10). En este mecanismo, el sustrato se une al residuo His231, resultando en la polarización del carbonilo del enlace a hidrolizar para aumentar la electrofilicidad del carbono carbonílico. La nucleofilicidad del agua que hidrolizará el enlace amida y que está unida al ión zinc se incrementa por el aminoácido Glu143, que actúa como catalizador general básico (GBC) en la reacción. El ión zinc en

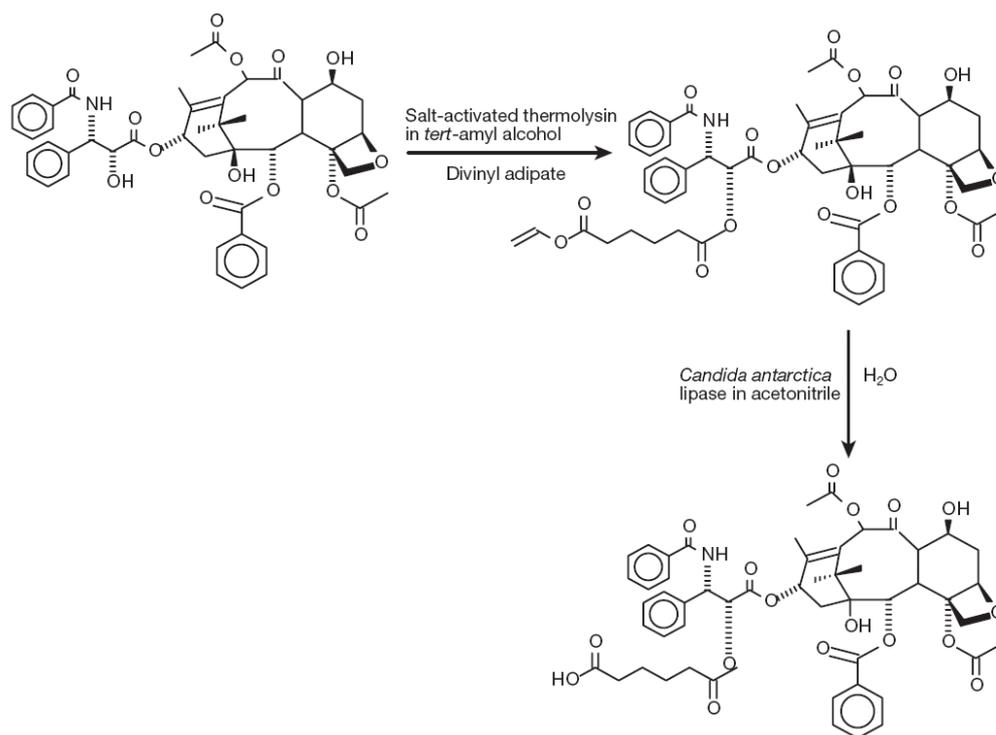
combinación con el residuo His 231 estabiliza el estado de transición. El colapso del intermedio tetraédrico es facilitado por la protonación del grupo saliente amino por Glu143 que ahora actúa como catalizador general ácido (GAC).



Esquema II. B10. Mecanismo catalítico de la termolisina (adaptado de Hernick et al., 2005).

Al igual que las serina proteasas, TLN puede catalizar la reacción inversa a la hidrólisis y puede actuar en medio no acuoso (el ataque sobre el carbonilo en lugar del agua es realizado por un nucleófilo externo tipo alcohol, amina, etc.) Es más, como el resto de las hidrolasas descritas, puede catalizar reacciones de transesterificación y es por tanto un biocatalizador muy atractivo en síntesis orgánica.

La principal aplicación sintética industrial de TLN es la fabricación de aspartamo, un edulcorante artificial de amplio uso en alimentación. El aspartamo es un dipéptido compuesto de L-aspartico y el metil éster de L-fenilalanina. Para su síntesis se emplea una preparación inmovilizada de TLN (la empresa DSM es la mayor fabricante de aspartamo en Europa). Recientemente se ha descrito un proceso para la síntesis de este compuesto en tolueno empleando TLN inmovilizada sobre celita. Controlando el valor de a_w se obtiene un rendimiento de producto aislado muy alto. Esto demuestra la utilidad de TLN inmovilizada para preparar péptidos bioactivos en disolventes orgánicos (De Martin et al., 2001). De modo análogo a la subtilisina Carlsberg, TLN también se ha empleado en conjunción con lipasas para determinados procesos sintéticos. La acilación del fármaco paclitaxol en dos etapas enzimáticas, para mejorar su solubilidad en agua y aumentar la biodisponibilidad de este poderoso agente antimetabólico es un ejemplo muy atractivo (esquema II. B11). El derivado del fármaco acilado con el ácido adípico es unas 1700 veces más soluble en agua que la molécula original; aquí se empleó una forma activada de TLN por liofilización con KCl (Khmelnitsky et al., 1997).



Esquema. II B11. Síntesis enzimática de derivados del paclitaxol (tomado de Khmelnsky et al., 1997).

En la presente memoria se ha empleado termolisina de *Bacillus thermoproteolyticus rokko* de la casa SIGMA inmovilizada sobre celita (Clapés et al., 1995).

C. ÉSTERES DE CARBOHIDRATOS CON ÁCIDOS GRASOS.

C. 1. Introducción general.

Los ésteres de carbohidratos con ácidos grasos (SFAE, “sugar fatty acid esters”) son un grupo de surfactantes no iónicos que contienen una unidad de carbohidrato como cabeza hidrofílica y uno o más ácidos grasos como componente lipofílico. Se pueden preparar SFAE con un espectro amplio de propiedades fisicoquímicas variando el grado y las posiciones de esterificación, la naturaleza del ácido graso y el azúcar (Garofalakis et al., 2000). Las principales propiedades de estos compuestos en comparación con otros surfactantes típicos derivados del petróleo son su biodegradabilidad y ausencia de toxicidad, además de poder producirse a partir de fuentes naturales renovables como son los ácidos grasos y los carbohidratos (Allen et al., 1999). Por ello se emplean a menudo como surfactantes y emulgentes en las industrias farmacéutica, cosmética y de alimentación (Watanabe, 1999). Además, sus propiedades biológicas (ver apartado C.4) le pueden abrir nuevos mercados. La producción actual de ésteres de sacarosa, con diferencia los derivados más desarrollados de entre todos los SFAE, se estima en 4000 Tm al año (Hill et al., 1999).

En los próximos apartados se expondrán ejemplos de SFAE que se pueden encontrar en la naturaleza, se describirán también las propiedades físicas de estos biosurfactantes así como su actividad biológica para finalizar exponiendo sus métodos de síntesis química y, sobre todo, enzimática.

C. 2. Biosurfactantes basados en carbohidratos.

El término “surfactante natural” tiene bastante ambigüedad. En el sentido más estricto, un surfactante natural se obtiene directamente de una fuente natural (planta, animal, microorganismo, etc.) mediante técnicas de separación preparativas (extracción, precipitación, destilación, cromatografía, etc.) sin que ninguna etapa de síntesis orgánica esté involucrada en el proceso (Holmberg, 2001). En la actualidad no se emplean demasiados surfactantes que cumplan este requisito. Quizás la lecitina de soja sea el ejemplo más familiar de un surfactante natural en este sentido.

La principal razón por la que los surfactantes naturales en sentido estricto son tan escasos es su viabilidad. En la naturaleza los compuestos anfifílicos son muy abundantes, cumpliendo en los sistemas biológicos el mismo rol que los surfactantes “técnicos” cotidianos (emulgentes, dispersantes, etc.). El factor por el que no se producen es el alto coste de su aislamiento. En casi todos los casos es mucho más caro el proceso de separación/purificación que la elaboración de un “análogo” sintético. No obstante, se están desarrollando procesos biotecnológicos para la producción de surfactantes con alto rendimiento mediante fermentación (Holmberg, 2001).

Generalmente, el término “surfactante natural” se emplea en un sentido mucho más amplio que el señalado arriba. Cualquier surfactante sintetizado a partir de materiales de partida naturales suele clasificarse como un surfactante natural o “biosurfactante”. Los surfactantes derivados de carbohidratos pueden calificarse pues como biosurfactantes. En ellos la cabeza polar está constituida por un carbohidrato y la cola hidrófoba por una cadena de longitud variable de ácido graso (mediante enlaces éster, SFAE) o alcoholes (mediante enlaces éter o glicosídicos).

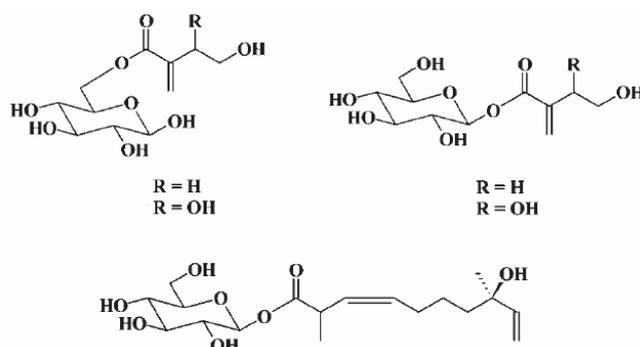
Los surfactantes derivados de carbohidratos, estrictamente naturales presentan una diversidad de estructuras demasiado amplia para incluirla en esta breve exposición (Dembitsky, 2004). Fundamentalmente se estudian en el ámbito de la química de productos naturales por su novedad y porque en algunos casos presentan propiedades físicas y biológicas interesantes. A continuación a modo ilustrativo se presentan algunos ejemplos.

Acilpolioles

Generalmente suelen ser ácidos grasos hidroxilados conectados a mono- o disacáridos mediante enlaces éster. Suelen ser compuestos extracelulares producidos por actinomicetos como *Mycobacterium*, *Corynebacterium* y *Brevibacterium* (Hanferburg et al., 1986). Los acilpolioles son abundantes en las paredes celulares de bacterias y también se pueden encontrar en plantas.

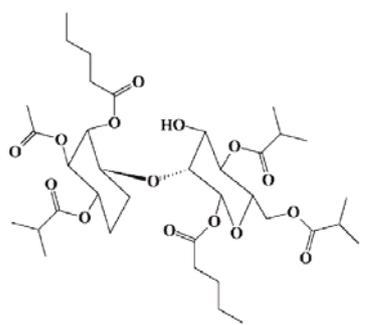
Las estructuras de arriba en el esquema II. C1 fueron aisladas en el período de maduración de los frutos de *Persoonia linearis* x *pinifolia* que crece en Australia y

presentan actividad antimicrobiana (MacLeod et al., 1997). El éster monoterpénico de abajo en el mismo esquema, se ha aislado de las hojas de la planta medicinal *Lantana lilacia*, empleada en el tratamiento de la bronquitis (Takeda et al., 1998).



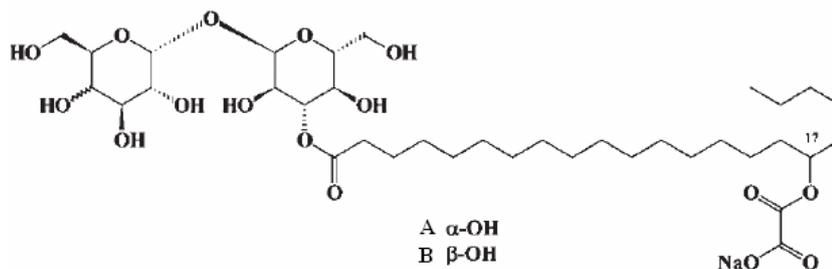
Esquema II. C1.

El fraccionamiento de *Geranium caespitosum* en busca de inhibidores de la bomba de multiresistencia de *Staphylococcus aureus* dio lugar al aislamiento de nuevos neohesperidósidos (esquema II. C2) (Stermitz et al., 2003). Los compuestos más acilados no mostraron actividad directa frente a *S. aureus*, pero potenciaron la actividad de distintos antibióticos al aumentar sus concentraciones intracelulares (por inhibición de la bomba de multiresistencia).



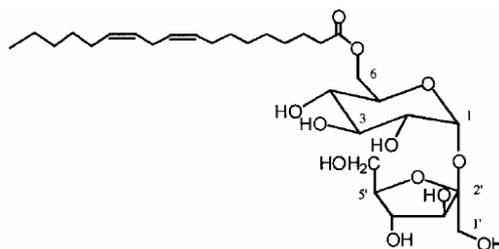
Esquema II. C2. Neohesperidósido aislado de *Geranium caespitosum* (tomado de Stermitz et al., 2003)

Los dos glicolípidos, emmyguyacina A y emmyguyacina B (esquema II. C3) se aislaron de la fermentación de una especie de hongos estériles sobre un agar de dextrosa de patata. Los compuestos inhiben la replicación del virus influenza A en células MDCK al inhibir el cambio conformacional dependiente del pH de la hemaglutinina A (IC_{50} 9 μ M) (Boros et al., 2002).



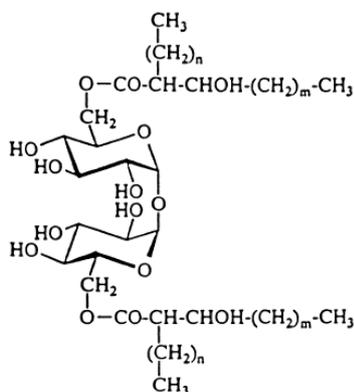
Esquema II. C3. Estructura de emmyguyacina A y emmyguyacina B (tomado de Boros et al., 2002).

Muchos ésteres de sacarosa o glucosa con ácidos grasos de distinto tamaño de cadena son secretados por las hojas del tabaco y muestran actividad biológica frente a otras plantas y microorganismos (Matsuzaki et al., 1988). El monolinoleato de sacarosa (esquema II. C4) por ejemplo, es un inhibidor de la germinación de semillas (Everton-Warburton et al., 2001).



Esquema II. C4. Linoleato de sacarosa (regioisómero en 6) (tomado de Warbuton et al., 2001).

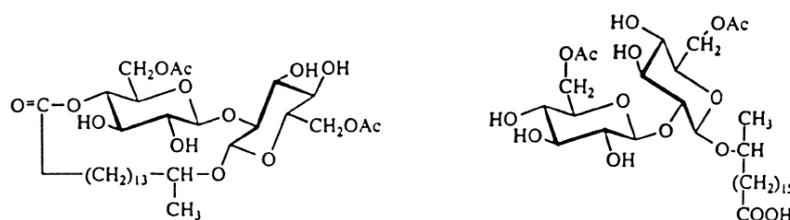
Los ésteres del disacárido no reductor α -D-trehalosa (esquema II. C5) son muy comunes y se encuentran fundamentalmente en bacterias, hongos, algas e insectos, en los que parece tener un rol como compuesto de reserva energética (Asselineau et al., 1978).



Esquema II. C5. Ejemplo de un diéster simétrico de trehalosa (tomado de Holmberg et al., 2001).

Glicolípidos

Los glicolípidos no derivados del glicerol son generalmente ácidos grasos hidroxilados unidos al azúcar mediante enlaces glicosídicos. Los soforolípidos y los ramnolípidos producidos por *Candida* y *Pseudomonas* respectivamente, son los ejemplos mejor conocidos (Holmberg, 2001). El esquema II. C6 muestra un soforolípidos cíclico y otro acíclico. Los ramnolípidos son biosurfactantes que contienen ramnosa y ácido β -hidroxidecanóico. Son muy atractivos desde el punto de vista que se producen de manera muy eficaz en procesos de fermentación y presentan aplicaciones potenciales como el combate de la polución marina causada por petróleos y aceites o actuando contra fitopatógenos. También son una fuente valiosa de la propia ramnosa, que se emplea industrialmente en la fabricación de algunos componentes de perfumes de alta calidad (Lang et al., 1999).

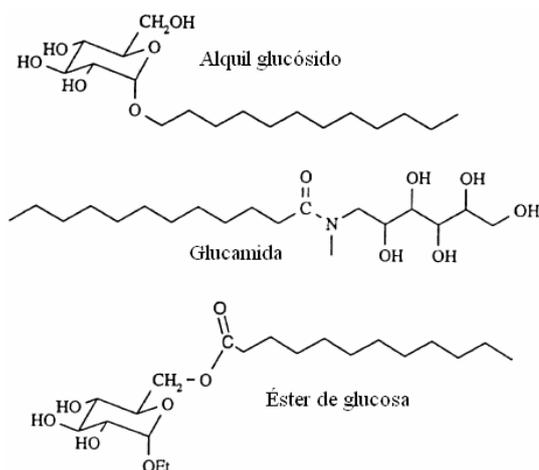


Esquema II. C6. Ejemplo de un soforolípidos cíclico y otro acíclico (tomado de Holmberg, 2001).

En lo que respecta a los biosurfactantes sintéticos con cabeza polar tipo carbohidrato o derivado de carbohidrato, hay que indicar que llevan empleándose años. Los alcanosatos y etoxialcanosatos de sorbitano, conocidos bajo los nombres comerciales de [®]Span y [®]Tween, son un ejemplo representativo. En los últimos años los esfuerzos se han enfocado en tres clases de surfactantes con azúcares o polioles derivados de azúcares como cabeza polar: los alquil poliglucósidos (APGs), las alquil glucamidas y los ésteres de azúcares con ácidos grasos (SFAE) (esquema II. C7).

Los APGs se preparan mediante reacción directa entre la glucosa y el alcohol graso, empleando un exceso grande de éste para minimizar la oligomerización del azúcar. Los alquil glucósidos son estables a pH elevado pero sensibles a pH ácido en el que se hidrolizan liberando el azúcar y el alcohol graso. Presentan propiedades interesantes desde el punto de vista fisicoquímico y tienen importantes aplicaciones (von Rybinski, 1996; von Ribinski et al., 1998). Por ejemplo, el anómero β del *n*-octil

glucósido es un surfactante muy empleado en bioquímica. Aunque la mayoría de los alquil glicósidos se preparan con glucosa, también comienzan a ser comunes los surfactantes de este tipo preparados con glucosa ligeramente oligomerizada como cabeza polar. Los alquil maltósidos son el principal ejemplo.



Esquema II. C7. Tipos de biosurfactantes sintéticos derivados de carbohidratos (tomado de Holmberg et al., 2001)

Las alquilglucamidas, más estrictamente nombradas *N*-alcanoil-*N*-metilglucaminas, son productos comerciales importantes. El producto que más se vende al sector de detergentes es el derivado de dodecanoilo. Se prepara a partir de glucosa, metil amina, hidrógeno y laurato de metilo en una reacción en dos etapas (Holmberg, 2001). También presentan propiedades físicas interesantes (Zhu et al., 1999).

En la actualidad hay un interés considerable en los ésteres de azúcares con ácidos grasos (SFAE) (Allen et al., 1999). Sus propiedades físicas, biológicas y sus métodos de síntesis química y enzimática así como algunas de sus aplicaciones serán descritos en los próximos apartados. Mucha de su utilidad se debe a que son inodoros, insípidos, no irritan los ojos ni la piel y sobre todo son perfectamente biodegradables. Respecto a su biodegradabilidad, el grupo de Drummond (Baker et al., 2000b) ha realizado unos estudios muy interesantes. Para ello sintetizaron una serie de SFAE con distintas cabezas polares (glucosa, sacarosa y rafinosa) y diferentes cadenas de ácido graso, concretamente láurico (C12) y palmítico (C16). A través de un test estándar de biodegradabilidad aeróbica demuestran que todos ellos son perfectamente biodegradables y que el tamaño de la cabeza de carbohidrato o la longitud de la cadena del grupo acilo no afectan de manera significativa a la biodegradabilidad pues apenas se

notan diferencias entre los distintos ésteres preparados. Los mismos autores han demostrado mediante estudios por HPLC y RMN que el mecanismo de la biodegradación de estos SFAE transcurre a través de una hidrólisis inicial del enlace éster (Baker et al., 2000c). De manera análoga, también han constatado que la estabilidad de estos compuestos es baja a pH alcalino como era de esperar debido a la saponificación del mismo enlace (Baker et al., 2000a).

C. 3. Propiedades físicas de los SFAE.

Un surfactante se define como una sustancia que, cuando está presente a concentraciones bajas en un sistema, tiene la propiedad de adsorberse preferentemente en las interfases del mismo alterando de manera significativa la energía libre interfacial de dichas interfases. Se entiende por interfase a la frontera entre dos fases inmiscibles. La energía libre interfacial es el trabajo mínimo requerido para crear una interfase, $W_{\min} = \gamma \times A$, donde γ es la denominada tensión interfacial o superficial si la interfase es agua/aire y A es el área de la interfase. Un compuesto surfactante, al adsorberse en una interfase de un sistema (a baja concentración) modifica la cantidad de trabajo necesaria para expandir dicha interfase. El ejemplo típico es la bajada de la tensión superficial del agua al añadir un detergente a ésta, de ahí que también se les llamen tensioactivos. Los compuestos surfactantes también se denominan compuestos anfífilicos o anfipáticos en referencia a la naturaleza de su estructura molecular caracterizada por tener una parte hidrofílica y otra lipofílica. La estructura molecular concreta de un surfactante y su carga (los hay catiónicos, aniónicos, zwitteriónicos y no-iónicos) determinan sus propiedades físicas, como la capacidad para reducir la tensión superficial del agua, la capacidad para formar espumas o estabilizar emulsiones, la capacidad detergente, etc. (Rosen, 1972).

Los biosurfactantes sintéticos derivados de carbohidratos son del tipo no iónico y su comportamiento suele compararse frente al de los éteres de alquilpoliglicol C_iE_j típicos. Se diferencian de estos últimos en que presentan mucha mayor lipofilicidad e hidrofiliicidad y además, sus propiedades fisicoquímicas son insensibles a la temperatura. Esta insensibilidad es el resultado de la fuerza de los enlaces de hidrógeno entre los hidroxilos del carbohidrato y el agua, que previenen cualquier deshidratación significativa de la cabeza polar en el rango de temperaturas relevante

experimentalmente (Söderman et al., 2000; Stubenrauch, 2001). A continuación se describirán algunas de las propiedades fisicoquímicas que presentan los biosurfactantes sintéticos tipo SFAE.

C. 3. 1. Balance HLB. Estabilización de emulsiones. Formación de espumas.

El término balance hidrofílico-lipofílico o HLB (de “hydrophilic-lipophilic balance”) hace referencia al balance entre tamaño y “fuerza” entre cada una de las dos partes constituyentes de un surfactante. Poco después de la introducción de este término (Clayton, 1943) se desarrolló un concepto empírico de HLB para surfactantes y emulgentes en base a la propia solubilidad de éstos en agua (Griffin, 1949). Clasificar los surfactantes en base a su HLB permite poder realizar predicciones sobre su comportamiento y hacer las selecciones adecuadas para las aplicaciones concretas (tabla II. C1). Así, cuanto más bajo sea el HLB mayor será la lipofilidad del surfactante y cuanto mayor sea el HLB mayor será su hidrofiliidad. El HLB de surfactantes no iónicos se puede calcular a partir de la estructura molecular utilizando la siguiente fórmula empírica (Griffin, 1954):

$$\text{HLB} = 20 (\text{Peso molecular grupo hidrofílico})/(\text{Peso molecular total del surfactante})$$

Tabla II. C1. Correlación HLB/aplicación (de Griffin, 1949).

| Rango HLB | Aplicación |
|-----------|-------------------|
| 4-6 | Emulgentes W/O |
| 7-9 | Agentes de mojado |
| 8-18 | Emulgentes O/W |
| 13-15 | Detergentes |
| 15-18 | Solubilizantes |

En el caso de los SFAE el valor de HLB está modulado por el tipo de grupo acilo (cadena simple o ramificada, hidroxilada o puramente alquílica, etc.), el grado de sustitución (mono-, di-, triésteres, etc.) y el grado de polimerización del carbohidrato (monosacárido, disacárido, trisacárido, etc.). En contraste con los emulgentes convencionales empleados en alimentación, los SFAE se pueden producir para cubrir un rango amplísimo de valores HLB (de 2 a 18). Los ésteres de sacarosa comercializados por Mitsubishi-Kagaku Foods Corporation son un buen ejemplo de ello (Fig. II. C1).

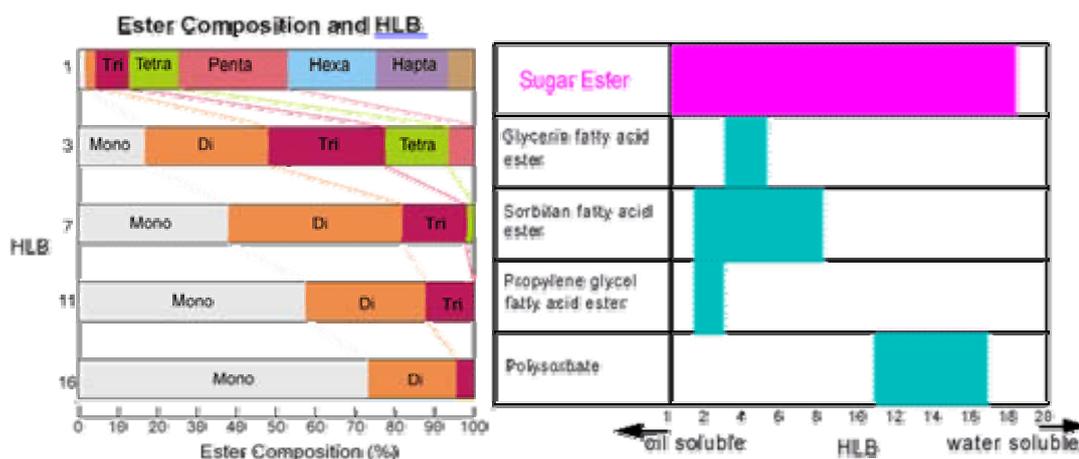


Figura II. C1. Valor de HLB de ésteres de sacarosa en función del grado de sustitución (izquierda) y comparación con el rango disponible para otros emulgentes comerciales utilizados en alimentación (tomado de Mitsubishi-Kagaku Foods Corporation).

Los SFAE tienen la capacidad de estabilizar emulsiones. Una emulsión es un coloide liófilo. Los líquidos de la mayoría de las emulsiones se componen de agua y algún aceite (o líquido orgánico esencialmente insoluble en agua). Estas emulsiones se clasifican como emulsiones de aceite en agua (O/W), en las que el agua es la fase continua y el aceite la fase dispersa, y emulsiones de agua en aceite (W/O), en las que el aceite constituye la fase continua. El emulgente forma una película superficial sobre la interfase existente entre cada gota coloidal y el medio de dispersión, reduciendo de esta forma la tensión interfacial e impidiendo la coagulación (Levine, 1996). El grupo de Ghoul ha realizado un estudio comparativo de diversas propiedades físicas de ésteres de sacarosa comerciales y mono- y diésteres de fructosa sintetizados en su laboratorio (Soultani et al., 2003). Para los ésteres de fructosa encontraron que al aumentar el tamaño de la cadena de ácido graso o el porcentaje de diéster, bajaba la estabilidad de la emulsión O/W (ya que los HLB de los distintos compuestos son mayores de 6) observando que el monocaprato de fructosa es el que consigue una estabilización más eficaz (Fig. II. C2). Para estos mismos ésteres de fructosa parece que la capacidad de formación de espuma disminuye al aumentar tanto el tamaño de la cadena de acilo como el grado de sustitución.

El estudio de la capacidad de formación y estabilización de espumas de monoésteres (mezclas de regioisómeros) de lactosa y lactitol con cadenas C8, C12 y C16 (Fig. II C3) muestra que por encima de la concentración micelar crítica “CMC” (a

menor tamaño de cadena mayor CMC como se verá en el siguiente apartado) todas las espumas formadas son bastante estables. La altura inicial de la espuma para un tamaño de cadena es casi la misma con ambas cabezas polares (Drummond et al., 1998).

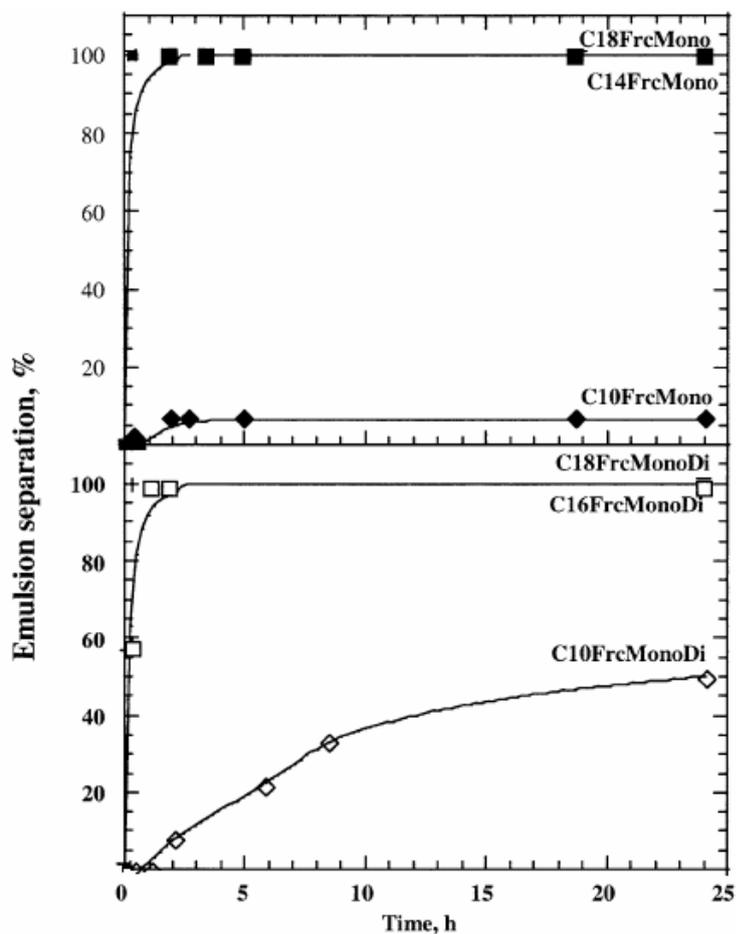


Figura II. C2. Estabilidad de emulsiones O/W a 20 °C con 0.05 % de monoésteres de fructosa y mezclas de mono- y diésteres de fructosa (tomado de Sultani et al., 2003).

A partir de estudios reológicos de emulsiones O/W preparadas con monolaurato de sacarosa (mezcla de regioisómeros) y con dodecilsulfato sódico (SDS) se ha puesto de manifiesto la superioridad en el comportamiento surfactante del tensioactivo derivado del disacárido sobre el aniónico (Niraula et al., 2004).

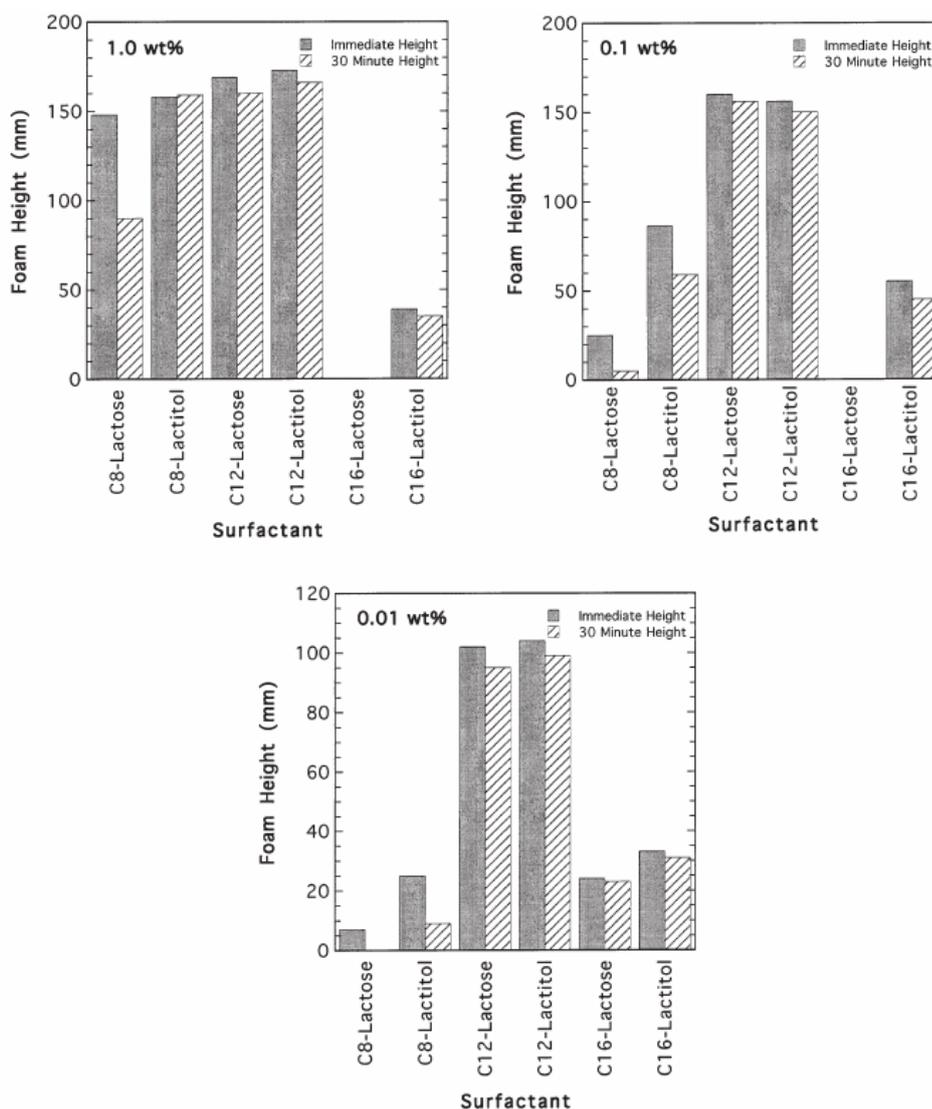


Figura II. C3. Alturas de espuma “Ross-Miles” a tiempo cero y tras 30 minutos. Empleando tres concentraciones diferentes de surfactante (tomado de Drummond et al., 1998).

C. 3. 2. Micelas.

Las moléculas de SFAE al igual que otros surfactantes se autoasocian en disolución acuosa dando lugar a agregados supramoleculares denominados micelas. En el modelo clásico de micela esférica, las colas hidrofóbicas quedan localizadas hacia el interior, con las cabezas polares en la superficie en contacto con el agua. Por tanto, las soluciones micelares son sistemas microheterogéneos, en los que el núcleo de la micela de surfactante forma una pseudofase tipo aceite dispersa microscópicamente. La formación de micelas sólo ocurre cuando se supera un límite en la concentración de surfactante denominado concentración micelar crítica (CMC). A mayor tendencia de un surfactante a formar micelas, menor será su CMC y viceversa. Si representamos por S a

la molécula de surfactante, podemos esquematizar el proceso de micelización (que es reversible) de manera análoga a un equilibrio químico: $nS \rightleftharpoons S_n$; donde S_n es la micela de surfactante con un número de agregación “n”. Para surfactantes no iónicos como los SFAE el número de agregación “n” aumenta al incrementarse la longitud de la cadena hidrocarbonada. Los factores que provocan un aumento en “n” tienden a bajar la CMC. Si se aumenta mucho la concentración del surfactante por encima de la CMC las micelas originales de forma más o menos esférica comienzan a transformarse en agregados elipsoidales y cilíndricos. Este cambio está asociado con una segunda CMC. A concentraciones aún más grandes estas micelas distorsionadas tienden a coagular, y tras alcanzar una tercera CMC, se forman mesofases de cristal líquido con estructuras nemáticas fundamentalmente. La fuerza impulsora de la formación de micelas es de origen entrópico y se basa en el denominado efecto hidrófobo de manera análoga a como ocurre en el plegamiento de las proteínas (Vögtle, 1993).

La formación de micelas se puede detectar a partir de la medida de diversas magnitudes físicas como la tensión superficial (ver siguiente apartado). También se han desarrollado métodos colorimétricos basados en la solubilización de colorantes hidrófobos dentro de las micelas. Usando uno de estos métodos (Vulliez-Le Normand et al., 1993), se ha determinado la CMC de los monoésteres de sacarosa regioisoméricos que aparecen en la tabla II. C2, demostrándose que la posición de acilación del carbohidrato puede tener influencia en propiedades macroscópicas (Polat et al., 2001).

Tabla II. C2. CMC de monoésteres de sacarosa (adaptado de Polat et al., 2001).

| Compuesto | CMC (mM) |
|---------------------------------|----------|
| 1'- <i>O</i> -lauroilsacarosa | 0.15 |
| 1'- <i>O</i> -miristoilsacarosa | 0.091 |
| 1'- <i>O</i> -estearoilsacarosa | ns |
| 6- <i>O</i> -lauroilsacarosa | 0.40 |
| 6- <i>O</i> -miristoilsacarosa | 0.13 |
| 6- <i>O</i> -estearoilsacarosa | ns |

ns = insoluble

Para determinar la estructura de la micela y su número de agregación se recurre a diversas técnicas basadas en la caracterización de la propia difusión de la micela. Así, mediante estudios de dispersión (scattering) de rayos X se han caracterizado micelas de

monolaurato y monoestearato de sacarosa (ambos como mezclas regioisoméricas), asignándose una agregación de 83 y 151 respectivamente y unos radios hidrodinámicos de 26.8 Å y 34.2 Å para las micelas que, según los autores (Kawaguchi et al., 1983), se desvían poco del modelo ideal esférico en forma y monodisperso. No deja de sorprender que se llevase a cabo el estudio con el monoestearato de sacarosa, un SFAE insoluble en agua según la mayoría de los autores. La misma clase de información puede obtenerse con estudios de dispersión dinámica de luz láser (“dynamic light scattering”, DLS) y estática (“static light scattering”, SLS). Para el monolaurato de sacarosa (mezcla de regioisómeros) se ha obtenido un radio micelar de 29.2 Å a partir de medidas de DLS y un número de agregación de 98 moléculas por micela según los resultados de las medidas de SLS. Además, la independencia de la intensidad de la señal en función del ángulo en las medidas de SLS indica que se trata de micelas cuasi esféricas (Lerk et al., 1996).

La difusión de un surfactante (tanto en estado monomérico como micelar) también puede caracterizarse a través de técnicas de RMN empleando secuencias PFGE (“pulse field gradient spin echo”). La información que se obtiene es análoga a la que proporciona el DLS (CMC, coeficiente de difusión micelar y radio micelar). Empleando esta técnica se ha determinado una CMC de 0.24 mM y un radio micelar de 28 Å para 6'-*O*-lauroilmaltosa (Kjellin et al., 2003). El grupo del profesor Queneau ha utilizado la misma aproximación para estudiar una serie homóloga de monoésteres de sacarosa (Molinier et al., 2005). A partir de las medidas del coeficiente de difusión determinan la CMC (sólo si se encuentra por encima de 0.1 mM debido a las propias limitaciones de sensibilidad que presenta la RMN), y el radio hidrodinámico (R_h) de las micelas (Figura II. C4). Los datos que aparecen en la figura corresponden a mezclas de regioisómeros; el aumento lineal del radio hidrodinámico al aumentar el tamaño de la cadena es el que cabría esperar a partir de un modelo micelar esférico en el que el radio de la esfera tuviese la longitud de la molécula de sucroéster en conformación extendida. Para determinar el efecto de la posición de sustitución del grupo acilo en el sucroéster sobre la estructura de la micela seleccionaron los regioisómeros en 6, 6' y 1' del monopalmitato de sacarosa. Observaron en primer lugar que sólo el regioisómero en 6 es soluble en agua a 25 °C, por lo que hicieron las medidas a 40 °C (temperatura a la que todos los regioisómeros son solubles). Mientras los regioisómeros en 6 y 6' dieron el mismo $R_h = 40$ Å, el regioisómero en 1' dio un valor anómalo de 206 Å. Este valor se

puede justificar considerando que este regioisómero no forma micelas esféricas, sino cilíndricas de una longitud de unos 1200 Å (suponiendo un radio para el cilindro de 40 Å). El comportamiento diferente del regioisómero en 1' respecto a los regioisómeros en 6 y 6' tiene su origen en la conformación particular de la molécula, debido a que la acilación en 1' provoca la ruptura del enlace de hidrógeno intramolecular HO-2..HO-1' y por tanto la forma global es diferente a la que presentan los otros dos regioisómeros.

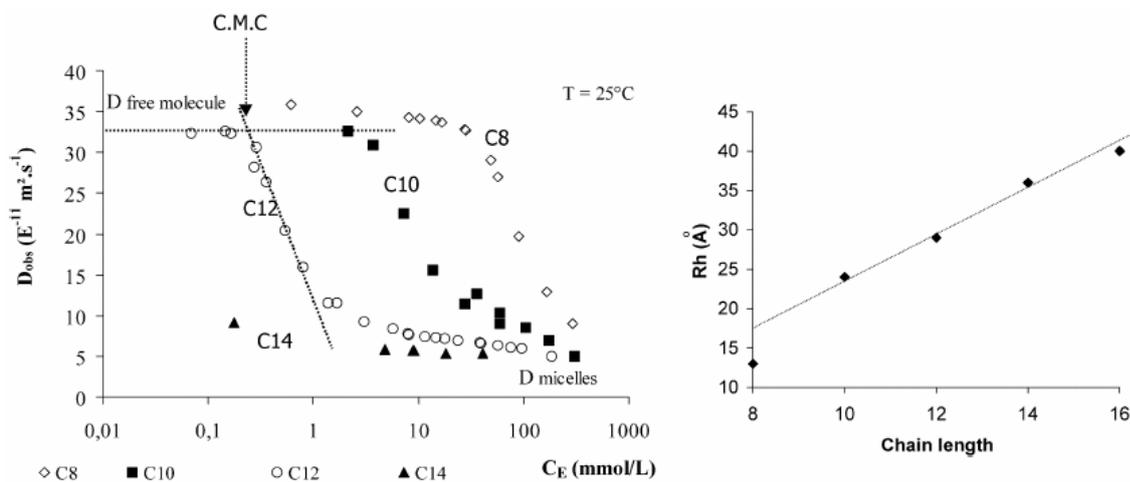


Figura II. C4. Coeficientes de difusión de los monoésteres de sacarosa en función de la concentración total de surfactante (izquierda). A la derecha se muestra la progresión del radio hidrodinámico de las micelas de monoésteres de sacarosa en función del tamaño de la cadena de acilo (tomado de Molinier et al., 2005).

C. 3. 3. Adsorción de SFAE en interfases.

La interfase más frecuentemente investigada es la de aire/agua. La adsorción del surfactante reduce la tensión superficial (cuando la interfase es de esta naturaleza se prefiere el término superficial al término interfacial) de la solución acuosa del mismo en comparación con la del agua pura, y su variación con el tiempo refleja la cinética del proceso de adsorción. La adsorción del surfactante en la interfase aire/agua se investiga respecto a: i) la actividad superficial (γ_{cmc}) del surfactante, es decir, su eficacia en la reducción de la tensión superficial del agua; ii) su concentración micelar crítica (CMC), iii) el área mínima / molécula (A_0) en la interfase; y iv) la energía libre de formación de micelas (ΔG°_{mic}). Toda esta información se puede deducir a partir de las medidas de tensión superficial a concentraciones variables de surfactante, en concreto a partir de curvas como la de la figura II. C5, obtenidas en este caso fruto de un estudio de

propiedades físicas de monoésteres de algunos disacáridos y del trisacárido maltotriosa (Ferrer et al., 2002).

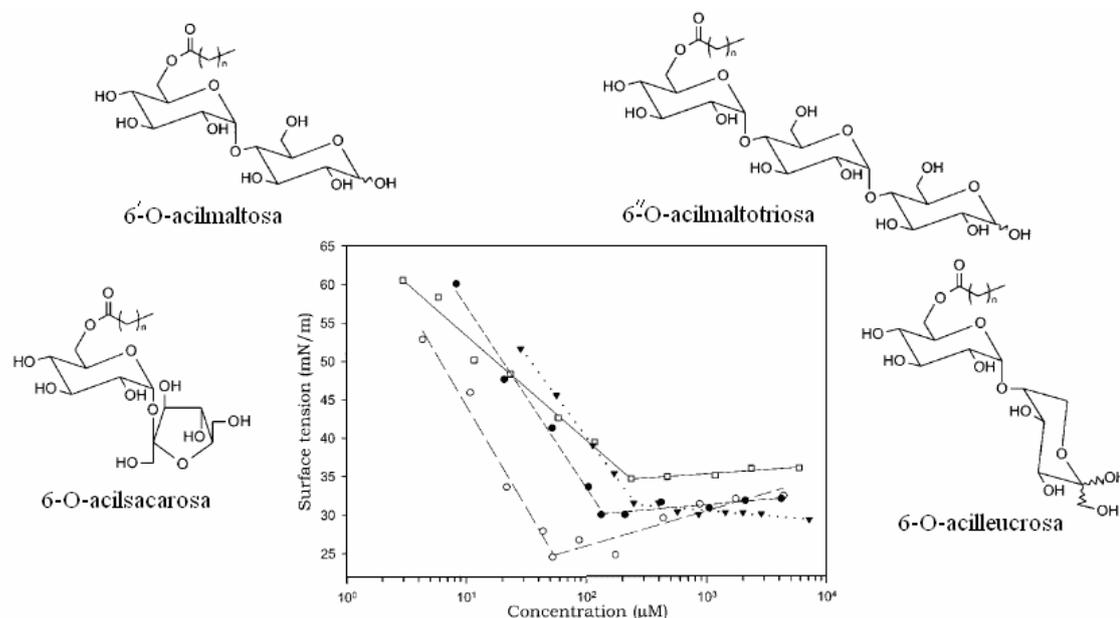


Figura II. C5. Influencia de la cabeza polar de carbohidrato en SFAE sobre su capacidad para reducir la tensión superficial del agua a 25 °C, para monolauratos ($n = 10$) de sacarosa (\blacktriangledown), leucrosa (\bullet), maltosa (\square) y maltotriosa (\circ). Se trata de regioisómeros puros con las estructuras indicadas alrededor de la curva (tomado de Ferrer et al., 2002).

En las tablas II. C3, C4 y C5 se recoge una recopilación de los valores de CMC, γ_{cmc} , A_0 y $\Delta G_{\text{mic}}^{\circ}$ obtenidos para una serie de monoésteres de ácidos grasos de distinto tamaño de cadena con mono-, di- y oligosacáridos según diversos autores. En la mayoría de los ejemplos se trata de regioisómeros puros (>95%) y en algunos casos de mezclas regioisoméricas. Para algunos compuestos se observan discrepancias entre distintos autores. Esto se debe a utilizar métodos de medida de tensión superficial (γ) diferentes (Du Noüy, Wilhelmy, etc.), a realizar estas medidas antes de haber alcanzado el equilibrio de adsorción del surfactante en la interfase, a llevarlas a cabo a temperaturas por debajo del punto de Krafft y, sobre todo, a que todos estos parámetros al obtenerse a partir de la curva (en concreto a partir de la pendiente inmediata antes de alcanzar la CMC) son muy dependientes de cómo se ha realizado el ajuste de los datos experimentales. Por tanto hay que ser muy cauteloso a la hora de sacar conclusiones definitivas sobre el comportamiento interfacial de estos SFAE y sobre todo al comparar los resultados obtenidos en laboratorios diferentes (Stuberauch, 2001).

Tabla II. C3. Datos obtenidos de las medidas de tensión superficial con monoésteres de monosacáridos.

| Compuesto | Temperatura (°C) | CMC (mM) | γ_{cmc} (mN/M) | A_0 (Å ²) | ΔG°_{mic} (kJ/mol) | Referencia bibliográfica |
|--|---------------------|-------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------------------|-----------------------------|
| 6- <i>O</i> -decanoilglucosa | 42 | 2.5 | - | 37 | -26.7 | A |
| 6- <i>O</i> -estearoilglucosa | 42 | 0.091 | - | 35 | -34.9 | A |
| 6- <i>O</i> -oleoilglucosa | 42 | 0.21 | - | 35 | -33.7 | A |
| Monocaprato de fructosa ^a | 20 | 0.22 | 26 | 6 | -30.3 | B |
| Monomiristato de fructosa ^a | 20 | 0.04 | 30 | 17.6 | -35.0 | B |
| Monoestearato de fructosa ^a | 20 | 0.16 | 31.8 | 19.5 | -31.1 | B |
| 5- <i>O</i> -lauroilxilosa | 32 | 0.041 | 28.9 | 34 | - | C |
| 5- <i>O</i> -miristoilxilosa ^b | 32 | 0.015 | 36.0 | 32 | - | C |
| 5- <i>O</i> -palmitoilxilosa ^c | 32 | 0.022 | 41.0 | 31 | - | C |
| 6- <i>O</i> -miristoilgalactosa ^a | 32 | 0.020 | 35.5 | 33 | - | C |
| 6- <i>O</i> -palmitoilgalactosa ^c | 32 | 0.15 | 43.0 | 35 | - | C |
| 6- <i>O</i> -oleoilgalactosa | 32 | 0.023 | 31.0 | 29 | - | C |
| 6- <i>O</i> -lauroilglucosa ^b | 20 | 2.0 | 26.0 | 37 | - | D |

^a Mezcla de regioisómeros. ^b La solución se vuelve turbia a concentraciones cercanas a la CMC y por encima de ella. ^c Solución completamente turbia con precipitado cristalino.

Referencias: A (Coppola et al., 2002); B (Soultani et al., 2003); C (Garofalakis et al., 2000); D (Söderberg et al., 1995)

Tabla II. C4. Datos obtenidos de las medidas de tensión superficial con monoésteres de disacáridos.

| Compuesto | Temperatura (°C) | CMC (mM) | γ_{cmc} (mN/M) | A_0 (Å ²) | ΔG°_{mic} (kJ/mol) | Referencia bibliográfica |
|--|---------------------|-------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------------------|-----------------------------|
| Monooctanoato de lactosa ^a | 25 | 2.63 | 33.7 | 32 | -24.7 | A |
| Monooctanoato de lactitol ^a | 25 | 2.75 | 33.1 | 36 | -24.6 | A |
| Monolaurato de lactosa ^a | 25 | 0.427 | 35.0 | 41 | -29.2 | A |
| Monolaurato de lactitol ^a | 25 | 0.427 | 34.0 | 43 | -29.2 | A |
| Monopalmitato de lactosa ^a | 25 | 0.955 | 38.4 | 36 | -38.6 | A |
| Monopalmitato de lactitol ^a | 25 | 0.795 | 39.3 | 22 | -39.2 | A |
| 6'- <i>O</i> -miristoil-lactosa ^b | 32 | 0.043 | 38.6 | 60 | - | B |
| 6'- <i>O</i> -palmitoil-lactosa ^b | 32 | 0.011 | 39.5 | 68 | - | B |
| 6'- <i>O</i> -lauroilsacarosa | 32 | 0.21 | 35.9 | 54 | - | B |
| 6'- <i>O</i> -miristoilsacarosa | 32 | 0.021 | 36.0 | 57 | - | B |
| 6'- <i>O</i> -palmitoilsacarosa | 32 | 0.0041 | 35.3 | 53 | - | B |
| 6- <i>O</i> -lauroilsacarosa | 20 | 0.455 | 37.4 | 56 | -28.5 | C |
| 6- <i>O</i> -lauroilsacarosa | 25 | 0.250 | 31.5 | 44 | - | D |
| 6- <i>O</i> -palmitoilsacarosa | 25 | 0.028 | 35.3 | 91 | - | D |
| 6- <i>O</i> -lauroil-leucrosa | 25 | 0.135 | 30.0 | 40 | - | D |

| | | | | | | |
|--------------------------------|----|-------|------|----|-------|---|
| 6'- <i>O</i> -lauroilmaltosa | 22 | 0.33 | 36.5 | 50 | -29.5 | E |
| 6'- <i>O</i> -lauroilmaltosa | 25 | 0.240 | 34.7 | 64 | - | D |
| 6'- <i>O</i> -miristoilmaltosa | 25 | 0.037 | 35.0 | 78 | - | D |
| 6'- <i>O</i> -palmitoilmaltosa | 25 | 0.006 | 32.5 | 26 | - | D |
| 6'- <i>O</i> -estearoilmaltosa | 25 | 0.032 | 32.5 | 49 | - | D |

^a Mezcla de regioisómeros. ^b La solución se vuelve turbia a concentraciones cercanas a la CMC y por encima de ella.

Referencias: A (Drummond et al., 1998); B (Garofalakis et al., 2000); C (Söderberg et al., 1995); D (Ferrer et al., 2002), E (Kjellin et al., 2001).

Tabla II. C5. Datos obtenidos de las medidas de tensión superficial con monoésteres de oligosacáridos.

| Compuesto | Temperatura (°C) | CMC (mM) | γ_{cmc} (mN/M) | A_0 (Å ²) | ΔG_{mic}^0 (kJ/mol) | Referencia bibliográfica |
|--|---------------------|-------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| 6''- <i>O</i> -lauroilmaltotriosa | 25 | 0.052 | 24.5 | 34 | - | A |
| 6''- <i>O</i> -miristoilmaltotriosa | 25 | 0.028 | 36.5 | 75 | - | A |
| 6''- <i>O</i> -palmitoilmaltotriosa | 25 | 0.013 | 35.0 | 77 | - | A |
| 6''- <i>O</i> -estearoilmaltotriosa | 25 | 0.002 | 35.5 | 21 | - | A |
| Monolaurato de rafinosa ^a | 20 | 0.948 | 44.1 | 67 | -26.7 | B |
| Monolaurato de estaquiosa ^a | 20 | 2.26 | 43.0 | 72 | -24.6 | B |

^a Mezcla de regioisómeros.

Referencias: A (Ferrer et al., 2002); B (Söderberg et al., 1995).

Teniendo en cuenta estas discrepancias se pueden hacer, siempre con cautela, las siguientes generalizaciones: para un carbohidrato determinado, la CMC de su monoéster baja al aumentar el tamaño de la cadena de ácido graso; para un ácido graso determinado, la CMC del correspondiente monoéster con el carbohidrato baja al aumentar el grado de polimerización del azúcar en series homólogas como glucosa, maltosa, maltotriosa; los valores de los distintos parámetros son más o menos similares para un tamaño de cadena de ácido graso y grado de polimerización del carbohidrato determinados (6'-*O*-lauroilmaltosa vs. 6'-*O*-lauroilsacarosa por ejemplo).

Los estudios de tensión interfacial en sistema agua/aceite con SFAE son escasos debido sobre todo a la mayor complejidad técnica de las medidas experimentales. Generalmente los datos obtenidos sirven para seleccionar surfactantes adecuados para estabilizar emulsiones W/O. Por ejemplo se ha demostrado que los diésteres de sacarosa reducen más la tensión interfacial agua/aceite que los correspondientes monoésteres

(Ferrer et al., 2002), lo cual es lógico teniendo en cuenta los valores respectivos de HLB.

El conocimiento del comportamiento de adsorción de un surfactante en superficies sólidas es necesario para poder controlar procesos de mojado, dispersión y detergencia. No hay estudios con SFAE aunque su comportamiento en principio debería ser similar al que presentan otros surfactantes análogos no iónicos de base glicosídica como el *n*-dodecil- β -D-maltósido (Zhang et al., 1997).

C. 3. 4. Propiedades de cristal líquido. Transiciones de fase.

Los surfactantes tipo SFAE forman fases de cristal líquido termotrópicas cuando se calientan en estado puro, y fases de cristal líquido liotrópico cuando se le adiciona un disolvente. Las transiciones de fase termotrópicas suelen caracterizarse por calorimetría diferencial de barrido (DSC); para SFAE formados por un disacárido y una cadena de longitud media (C8-C16) se ha visto que las fase de cristal líquido anisotrópico es una mesofase esméctica (SmA^*).

El grupo de Queneau ha comprobado que el SFAE 6,6'-di-*O*-estearoilsacarosa funde a 109.8 °C para dar lugar a una mesofase esméctica A^* , mientras que a 164.3 °C tiene lugar una segunda transición para dar lugar a un líquido amorfo (Molinier et al., 2003). El enfriamiento de la fase líquida isotrópica vuelve a producir la transición a la fase SmA^* . A través de técnicas de difracción de rayos X han demostrado que el material presenta polimorfismo (hay dos fases SmA^* diferentes según la temperatura) y proponen un cambio en la conformación de la estructura para explicarlo (Fig. II. C6). Este ejemplo muestra el atractivo de los SFAE en ciencia de materiales.

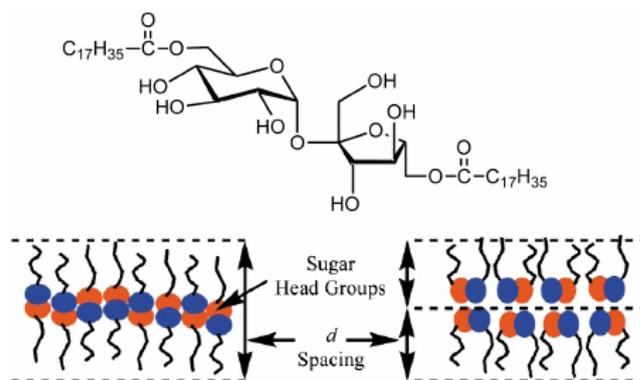


Figura II. C6. Las fases SmA^* de 6,6'-di-*O*-estearoilsacarosa (tomado de Molinier et al., 2003).

Los diagramas de fase liotrópica de mezclas binarias agua/SFAE suelen presentar distintas regiones en función de la proporción de surfactante y de la temperatura. Las diferencias que se pueden observar en la figura II. C7 entre los diagramas correspondientes a 6-*O*-lauroilsacarosa y monolaurato de rafinosa (mezcla de regioisómeros) se pueden interpretar en términos de simples restricciones geométricas en el empaquetamiento ocasionadas en última instancia por la estructura molecular del SFAE en cuestión (Södeberg et al., 1995).

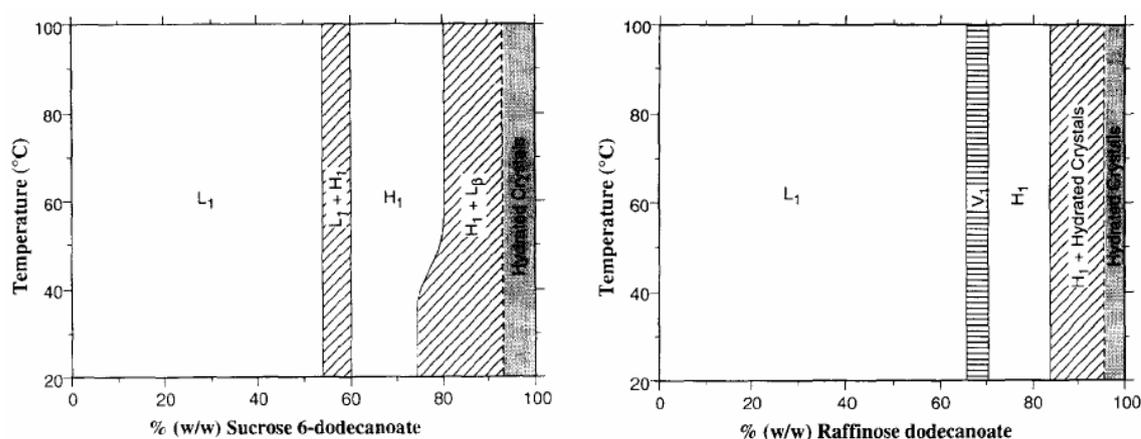


Figura II. C7. Diagrama parcial de fases aproximado para el sistema 6-*O*-lauroilsacarosa/agua (izquierda) y monolaurato de rafinosa/agua (derecha). L_1 , V_1 , H_1 , L_β , representan fases micelar, cúbica discreta, hexagonal y lamelar respectivamente (tomado de Södeberg et al., 1995).

También se han estudiado sistemas más complejos con sucroésteres en mezclas pseudoternarias dando lugar a un comportamiento “Winsor” diferente según el sucroéster empleado (Muller et al., 2002).

C. 3. 5. Microemulsiones

Una propiedad importante de los surfactantes es su capacidad para estabilizar soluciones de sustancias hidrófobas en agua (dando lugar a una sola fase). A estas soluciones isotrópicas y termodinámicamente estables se les denomina microemulsiones. Los SFAE son en general demasiado hidrofílicos para formar microemulsiones de tres componentes. Por tanto se emplean dos rutas para formar microemulsiones con SFAE. En la primera, se utiliza un cosurfactante, y la fracción del mismo en la mezcla cosurfactante/SFAE es el parámetro de “ajuste” de la película de surfactante en estas microemulsiones. En la segunda aproximación se emplean aceites polares (Söderman et al., 2000).

Las microemulsiones formadas con ésteres de sacarosa han sido estudiadas de modo sistemático (Garti et al., 1999). Su aplicabilidad en alimentación es uno de los factores que más han promovido el estudio de estos sistemas (Garti et al 2000). Para su caracterización se han empleado técnicas diversas como la dispersión de neutrones (en concreto “small angle neutron scattering”, SANS), la microscopía electrónica (Bolzinger-Thevenin et al., 1999) o la dispersión de rayos X (Glatter et al., 2001).

C. 4. Actividad biológica. Aplicaciones bioquímicas y farmacéuticas.

C. 4. 1. Actividad antimicrobiana.

Se ha descrito que el monolaurato de sacarosa (mezcla de regioisómeros) inhibe el crecimiento de *Escherichia coli* a una concentración de 0.1 mg/ml, llegando también a parar dicho crecimiento bacteriano cuando se añade a distintos tiempos con el cultivo ya evolucionado (Kato et al, 1971). La misma inhibición se ha observado sobre *Staphylococcus aureus*, sugiriéndose que la acción antimicrobiana se inicia probablemente al adsorberse el monolaurato de sacarosa en la cobertura celular, ocasionando una disrupción de los procesos fisiológicos (Kato et al., 1987). El mismo compuesto parece inhibir también el crecimiento y la actividad metabólica de *Streptococcus mutants* procedente la placa bacteriana dental (Hayes, 1984). En este caso parece que el monolaurato de sacarosa inhibe *S. mutants* al modificar la permeabilidad de la membrana celular y causar la pérdida de metabolitos esenciales (Iwami et al., 1995). Curiosamente en un estudio más reciente (Watanabe et al., 2000), el monolaurato de sacarosa no mostró inhibición alguna del crecimiento de *S. mutants* y los monolauratos de fructosa y galactosa (ambos como mezclas regioisoméricas) sí presentaron actividad antibacteriana; la ausencia de actividad para otros monolauratos de hexosa análogos en el mismo estudio demuestra la importancia de la configuración de los hidroxilos en la unidad de carbohidrato sobre la actividad biológica.

Recientemente se ha descrito que 6'-*O*-lauroilmaltosa y 6'-*O*-lauroilmaltotriosa provocan una inhibición completa de *Streptococcus sobrinus* en placas de agar a 0.1 mg/ml y por tanto podrían aplicarse en productos de higiene oral para destruir la placa dental y prevenir la caries (Devulapalle et al., 2004).

Los SFAE también presentan un efecto antimicrobiano sinérgico cuando se emplean en combinación con otros agentes. Así la adición de EDTA a cultivos de *Listeria monocytogenes* y *S. aureus* que contienen monolaurato de sacarosa inhibe totalmente el crecimiento de ambos organismos (Monk et al., 1996). La misma combinación sinérgica se ha empleado para inhibir el crecimiento de bacterias Gram-negativas que suelen ser menos sensibles a los SFAE (Hathcox et al., 1996). Algunos monoésteres de sacarosa como el palmitato aumentan de manera sinérgica la actividad antibiótica del polipéptido nisina sobre bacterias Gram-positivas (Thomas et al., 1998).

El mecanismo de acción de los SFAE sobre distintos microorganismos parece tener su diana en la membrana celular, promoviendo modificaciones en la organización de la misma (alterando su permeabilidad) y en última instancia induciendo la autólisis celular de manera análoga a como se ha descrito para otros surfactantes (Cho et al., 1990; Mellor et al., 2003).

C. 4. 2. Actividad antitumoral.

Más atractivo aún que la actividad antimicrobiana, resulta la actividad antitumoral descrita para algunos SFAE. Los monoésteres de sacarosa (mezclas de regioisómeros) con el ácido láurico, palmítico y mirístico ejercen una marcada inhibición del crecimiento tumoral con prolongación del tiempo de supervivencia en un estudio *in vivo* usando tumores de Ehrlich en ratones (Kato et al., 1969). Para el monoestearato de sacarosa se ha sugerido que la perturbación del metabolismo de poliamina y del tráfico de fosfatidilinositol está involucrado en el mecanismo de su actividad antitumoral en células tumorales Ehrlich (Matsui-Yuasa et al., 1994).

Otros SFAE como las 6,6'-diaciltrehalosas (con cadenas de ácido graso C8, C10 y C12) representan una clase de compuestos antitumorales de acción preventiva al inhibir la liberación del factor tumoral de necrosis α (TNF- α) y la expresión del gen *TNF- α* (Okabe et al., 1999).

Recientemente se ha demostrado el potencial antitumoral de 6''-O-palmitoil maltotriosa frente a las líneas celulares cancerígenas humanas Hep-G2 y HeLa,

encontrándose unos valores de IC_{50} de 2.37 μ M (1.7 μ g/ml) para Hep-G2 y 3.6 μ M (2.7 μ g/ml) para HeLa. Además, el compuesto presenta una citotoxicidad marginal para hepatocitos de rata (Ferrer et al., 2005a).

Los carbohidratos juegan un papel fundamental en el reconocimiento celular a través de receptores como las lectinas. En general, las interacciones carbohidrato-receptor son débiles y por tanto poco específicas. La naturaleza resuelve esta baja afinidad de unión a través de interacciones polivalentes. Una manera de promover la multivalencia de modo artificial consiste en aprovechar la autoasociación de los surfactantes derivados de carbohidratos. Aprovechando esta propiedad, el grupo de Ueoka ha desarrollado nuevos inhibidores del crecimiento de células tumorales (Matsumoto et al., 2000; Ueoka et al., 2002). Se trata de liposomas multicomponentes híbridos, en concreto consisten en tres moléculas anfifílicas: L- α -dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), un surfactante no iónico (Tween 20) y un monoéster de sacarosa (C10 y C12). Mientras que la ausencia de uno o dos de los componentes resulta en una pérdida total de efecto inhibitorio, la mezcla de los tres produce una inhibición *in vitro* del crecimiento de los tumores de glioma y hematoma humanos. Dado que los liposomas en los que está el SFAE sólo no presentan actividad, parece ser que el espaciado de los ligandos en la superficie del liposoma es un factor fundamental en la inhibición a nivel celular.

C. 4. 3. Estabilización de proteínas de membrana.

Los detergentes son herramientas indispensables como agentes solubilizantes en el aislamiento y purificación de proteínas integrales de membranas biológicas para poder estudiar sus propiedades estructurales y funcionales (le Maire et al., 2000). Para preservar la integridad de una proteína de membrana, lo mejor que se puede hacer es proporcionarle un entorno lo más similar al de la bicapa fosfolipídica (Bowie et al., 2001). La elección del detergente adecuado para una proteína de membrana determinada no es sencilla y en muchos casos es difícil hacer predicciones, requiriéndose realizar pruebas de ensayo y error hasta encontrar el adecuado. No obstante los detergentes no iónicos se consideran como agentes “suaves” y muy apropiados para la estabilización de este tipo de proteínas. Los SFAE han expandido el repertorio de detergentes no iónicos disponibles para el bioquímico.

A principios de los 80 se demostró la utilidad de los monoésteres de sacarosa (con ácidos caprílico, cáprico y láurico) para estudios con proteínas de membrana (Makino et al., 1983). Se ha comprobado por ejemplo que los monoésteres de sacarosa de cadena larga (en especial el monoestearato) son capaces de estabilizar la proteína rodoposina, implicada en el proceso de visión, produciendo un estado muy similar al entorno lipídico nativo de la proteína (Abran et al., 1989).

En la actualidad el monolaurato y el monodecanoato de sacarosa (mezclas de regioisómeros) de alta pureza son disponibles comercialmente y son muy numerosas las publicaciones sobre bioquímica de proteínas integrales de membrana en las que se han utilizado estos detergentes.

C. 4. 4. Aplicaciones farmacéuticas.

La aplicación de los SFAE en el mundo farmacéutico era muy previsible dado las propiedades fisicoquímicas de estos compuestos y sobre todo su biodegradabilidad y ausencia de toxicidad. Al emplearlos como ingredientes en distintas formulaciones se consigue mejorar la acción del principio activo al aumentar su biodisponibilidad o al potenciar su actividad por diversos mecanismos. A continuación se indican algunos ejemplos.

La anfotericina B (Am B) combinada con deoxicolato (Fungizone) es el principal agente antifúngico utilizado en la mayoría de las infecciones sistémicas fúngicas. No obstante, la toxicidad significativa asociada a su empleo impone necesariamente límites a su eficacia clínica. Se cree que esta toxicidad tiene su origen en la unión de Am B a los esteroides de membrana. Los monoésteres de sacarosa (C10, C12, C14, C16) inhiben esta unión y reducen la toxicidad de Am B en ratones y se han propuesto como posible vehículo de este fármaco para el tratamiento de micosis (Gruda et al., 1991).

Los SFAE se pueden emplear para solubilizar fármacos hidrófobos. Se han preparado soluciones sólidas de ciclosporina en monoésteres de sacarosa y rafinosa (con ácido láurico y oleico), que tras la adición de agua atrapan al fármaco en las micelas de

surfactante mejorando de manera drástica la solubilidad del principio activo hidrófobo en el agua dando lugar, en teoría, a una mejor biodisponibilidad (Hahn et al., 1989).

También se ha estudiado la capacidad de los monoésteres de sacarosa para mejorar la penetración de principios activos en formulaciones transdérmicas y mejorar la absorción nasal y ocular de los mismos (Ayala-Bravo et al., 2003; Ahsan et al., 2003).

Por último los ésteres de sacarosa se han empleado también para la microencapsulación de proteínas (Rentel et al., 1999).

C. 5. Preparación de SFAE.

Debido a sus interesantes propiedades expuestas en los apartados anteriores, el desarrollo de métodos sintéticos eficaces para la producción de SFAE es un área de investigación relativamente dinámica en la actualidad. En un mundo cada vez más concienciado de los problemas medioambientales interesan mucho los productos que sean biodegradables. Además, es importante que dichos productos se puedan preparar a partir de materiales renovables. En este sentido los carbohidratos de bajo peso molecular constituyen una materia prima orgánica excelente que presenta un bajo coste y puede transformarse en productos de alto valor añadido (Lichtenthaler et al., 1997).

Existen diversas aproximaciones para la síntesis de SFAE, unas químicas, otras enzimáticas y algunas una combinación de las mismas. Hay métodos más selectivos que otros en cuanto a grado de sustitución (mono-, di-, triésteres, etc) y regioselectividad, los hay susceptibles de escalado industrial y los hay limitados a escala de laboratorio. Cada vez interesan más los monoésteres (por su mayor solubilidad en agua) regioisoméricos puros ya que, por una parte muchas propiedades dependen del regioisómero concreto y, por otro lado, es preferible realizar los distintos estudios (fisicoquímicos, biológicos, etc.) sin mezclas para poder establecer más fácilmente el origen de las propiedades observadas. También el desarrollo de métodos de síntesis de SFAE regioselectivos constituye *per se* una contribución valiosísima para la química orgánica como estrategia de protección selectiva en compuestos polihidroxilados. En los

próximos apartados se describirán los principales métodos de síntesis química y enzimática haciendo especial énfasis en aquellos que sean regioselectivos.

C. 5.1. Síntesis química.

El método tradicional de síntesis de ésteres de sacarosa se basa en una transesterificación entre un metil o etil éster de un ácido graso y el disacárido, en un disolvente polar aprótico como la DMF o el DMSO con catálisis básica (carbonato potásico) a alta temperatura y baja presión. En función de la cantidad de agente acilante y el tiempo de reacción se obtienen sucroésteres con distinto grado de sustitución. Por supuesto la reacción produce una mezcla de regioisómeros y el rendimiento de producto es medio, por debajo del 50% (Osipow, 1956). Éste, es el proceso que se suele emplear industrialmente. Tiene el problema de formar derivados coloreados como subproductos y que, para poder aplicarlos en alimentación se debe asegurar la eliminación total de los disolventes tóxicos empleados (lo cual no es sencillo debido a los altos puntos de ebullición que presentan) (Nakamura, 1997).

En general, la monoacilación selectiva de carbohidratos no es sencilla debido a: i) la multifuncionalidad de estos compuestos (las diferencias de reactividad relativa de los distintos hidroxilos son similares en bastantes casos) (Haines, 1976) y ii) a las fáciles migraciones intramoleculares de acilo (Molinier et al., 2003). Por eso, frecuentemente se recurre a metodologías tediosas de protección/desprotección por otra parte usuales en química de azúcares (Haines, 1981). No obstante, existen algunos métodos de acilación química directa con cierta selectividad.

Se puede conseguir la acilación regioselectiva de los hidroxilos primarios menos impedidos empleando condiciones de reacción a temperaturas muy bajas y utilizando reactivos impedidos estéricamente como los derivados de ácido pivaloílico; claro que si lo que se pretende es la acilación con un ácido graso de cadena larga no ramificado la discriminación por motivos estéricos desaparece. La aplicación de la reacción de Mitsunobu a temperaturas también muy bajas es una posible solución. Empleando esta última metodología se han preparado el 6,6'-dipalmitato de trehalosa y el 6,6'-dipalmitato de sacarosa utilizando el ácido graso como agente acilante (Bottle et al., 1984), y se ha conseguido la monoesterificación selectiva de algunos monosacáridos y

disacáridos totalmente desprotegidos (Bourhim et al., 1993). No obstante la reacción de Mitsunobu como método de acilación regioselectiva de carbohidratos no se ha generalizado probablemente debido a las condiciones de reacción extremas necesarias (muchas veces por debajo de los $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) y a que no siempre transcurre con la regioselectividad deseada.

Otra aproximación consiste en la acilación regioselectiva del hidroxilo más ácido del carbohidrato. Cuanto mayor sea la diferencia en acidez relativa de este hidroxilo respecto a los restantes, mayor será la regioselectividad (ya que es más sencilla la discriminación entre las distintas posiciones). Para algunos azúcares estas diferencias son despreciables desde un punto de vista práctico, en otros casos sí que existe claramente un hidroxilo con un pKa bastante menor que el resto de los hidroxilos. Esto es lo que ocurre por ejemplo con la sacarosa, cuyo 2-OH de la unidad de glucosa (un hidroxilo secundario) es el más ácido según cálculos computacionales (Houdier et al., 1995) por actuar como aceptor de enlace de hidrógeno intramolecular (con el 1'-OH de la unidad de fructosa) incluso en disolventes polares apróticos (Christofides et al., 1985). En este caso, la adición gradual de una base a una solución que contenga el disacárido y un agente acilante adecuado (que no reaccione con la base) debería activar el hidroxilo más ácido al convertirlo en un alcóxido nucleofílico. Con esta metodología se han preparado 2-*O*-acilsacarosas empleando como base hidruro sódico en DMF y aciltiazolidinona como agente acilante (Chauvin et al., 1993). También se han preparado 2-*O*-acilsacarosas con una regioselectividad por encima del 60% usando Na_2HPO_4 como catalizador alcalino en DMSO y ésteres vinílicos como agentes acilantes (Cruces et al., 2001). Para evitar la disustitución (o polisustitución en general) se emplea exceso de sacarosa.

La catálisis básica es un aspecto a tener muy en cuenta en las transesterificaciones de carbohidratos catalizadas por enzimas. Se ha demostrado que el propio soporte empleado en la inmovilización de hidrolasas puede interferir en este tipo de reacciones al catalizar *per se* la acilación (Plou et al., 1999). El tampón empleado en la liofilización (Ferro et al., 1994) o inmovilización (Pedersen et al., 2003) de la enzima puede ser el responsable ulterior de la catálisis del proceso de acilación del carbohidrato (especialmente cuando se trata de tampones inorgánicos). Por este motivo es importante no olvidar estos efectos de catálisis química cuando la regioselectividad de la

transesterificación de un carbohidrato no sea la que se espere para la enzima empleada (en forma inmovilizada o liofilizada), a pesar de que algunos autores lo obvian.

C. 5. 2 Síntesis enzimática.

Desde que el grupo de Klibanov publicara las primeras transesterificaciones de monosacáridos con tricloroetilésteres de ácidos grasos catalizadas por la lipasa pancreática (Therisod et al., 1986), las acilaciones de carbohidratos catalizadas por lipasas se han extendido de forma considerable. En el mismo grupo de investigación se aplicó poco después la misma filosofía pero empleando proteasas como biocatalizador (Riva et al., 1988). Hoy día se podría decir que la acilación de carbohidratos (especialmente mono- y disacáridos) catalizada por hidrolasas es una técnica bastante bien establecida (Plou et al., 2002) que se ha añadido al repertorio de aplicaciones sintéticas de las enzimas en química de carbohidratos (Thiem, 1995).

La principal ventaja de la acilación enzimática de carbohidratos respecto a la vía química es su alta regioselectividad que evita el tener que recurrir a las típicas secuencias largas de protección/desprotección. Además, las condiciones de reacción son suaves mientras que las acilaciones químicas directas suelen emplear condiciones extremas. Por otra parte se puede controlar de manera más sencilla el grado de sustitución y limitar la acilación a la producción de monoéster. Desde el punto de vista del “marketing” hay que añadir otra ventaja más y es que un SFAE preparado enzimáticamente se puede etiquetar como surfactante “natural” (Sarney et al., 1995).

La actividad y especificidad de las hidrolasas está muy influenciada por la naturaleza del disolvente orgánico. Las lipasas muestran su mayor actividad en disolventes de alto valor de logP (hidrófobos), y en este tipo de medio los carbohidratos son poco, o nada solubles. Las condiciones de reacción óptimas suponen un compromiso entre la actividad enzimática máxima alcanzable y la solubilidad del sustrato. La dificultad del problema crece en el sentido monosacáridos < disacáridos < trisacáridos < oligosacáridos mayores. Fundamentalmente, se han empleado dos estrategias para superar estas limitaciones. La primera consiste en la elección de un disolvente/s adecuado/s para solubilizar tanto el carbohidrato como el agente acilante y en el que la lipasa presente una actividad razonable. La segunda consiste en la

hidrofobización del azúcar por diversos métodos como la complejación con ácidos borónicos (Ikeda et al., 1993) o la formación de acetales (Sarney et al., 1994). Esta segunda alternativa habría que definirla como químico-enzimática, y por lo tanto no se discutirá más. Cuando se emplean proteasas el compromiso es mucho menos drástico, ya que muchas de ellas son capaces de catalizar acilaciones en disolventes como DMF (hay algún caso descrito también con DMSO) donde incluso los trisacáridos y oligosacáridos de tamaño medio son solubles a concentraciones relativamente altas. El estudio de la regioselectividad y el comportamiento en general de las hidrolasas en las acilaciones de carbohidratos en medio no acuoso también supone una contribución muy valiosa para conocer mejor la enzimología de estas enzimas en disolventes orgánicos.

En los siguientes apartados se describe la acilación de carbohidratos nativos sin protección o modificación química alguna (como pueda ser la alquilglicosidación) en una sola etapa empleando como biocatalizadores distintas hidrolasas, básicamente mediante transesterificaciones con ésteres de ácidos grasos activados.

C. 5. 2. 1. Acilaciones de carbohidratos catalizadas por lipasas.

Monosacáridos

Como se indicó anteriormente el grupo de Klibanov fue el primero en publicar la acilación de distintos monosacáridos mediante catálisis enzimática (Therisod et al., 1986), para ello emplearon tricloroetil ésteres como agentes acilantes y la lipasa pancreática porcina (PPL) como biocatalizador en piridina a 45 °C. Por ejemplo, con D-glucopiranososa, D-galactopiranososa y D-manopiranososa produjeron el correspondiente 6-*O*-acil derivado con una regioselectividad excelente (82-100%). En el caso de la fructosa al haber dos hidroxilos primarios de similares características, se forma una mezcla de 1-*O*-acil y 6-*O*-acil derivados.

Aunque los disolventes orgánicos polares como DMSO, DMF y la propia piridina suelen inactivar a las lipasas, hay algunas excepciones como la PPL ya mencionada y las lipasas de *Candida antarctica* (CALB), *C. cylindracea* (CCL, denominada también *C. rugosa*) y la lipasa de *Pseudomonas cepacia* (PSL), que

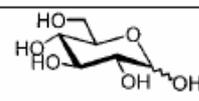
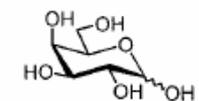
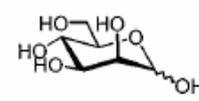
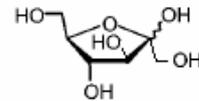
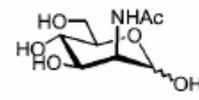
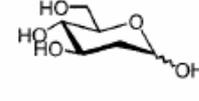
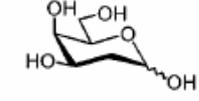
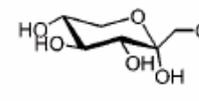
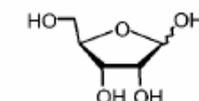
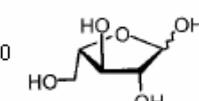
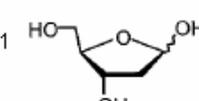
mantienen su actividad catalítica (total o parcialmente) en piridina (Watanabe et al., 1995).

En el grupo de Wong se comprobó que la velocidad de acilación de una serie de monosacáridos catalizada por CCL mejoraba con la adición de un codisolvente (Wang et al., 1988). Empleando acetato de vinilo en mezclas benceno-piridina obtuvieron el 6-*O*-acil derivado de D-manopiranososa y *N*-acetilmanosamina con > 90 % de regioselectividad. Esto demuestra que reduciendo la polaridad del medio (en este caso añadiendo benceno a la piridina) mejora el comportamiento de la lipasa como era de esperar. Por eso, empleando disolventes menos polares como el THF se podría ampliar el abanico de lipasas utilizables aunque la solubilidad de los monosacáridos sea muy baja. No obstante, la glucosa suspendida en THF se ha podido acilar utilizando CAL (Haase et al., 1998). El grupo de Gotor, a la hora de acilar monosacáridos con ésteres de oxima como agentes acilantes en dioxano empleando formas inmovilizadas de CAL termoestables, eleva la temperatura a 60 °C para mejorar la solubilidad del carbohidrato (Pulido et al., 1993). El resultado de la acilación de distintos monosacáridos catalizada por las lipasas mencionadas se resume en la tabla II. C6.

Más conveniente resultan sin embargo otro tipo de disolventes más “suaves” como la acetona y los alcoholes terciarios que debido a su impedimento estérico no pueden ser sustrato de la enzima (t-butanol, alcohol t-amílico, etc.). Las lipasas en general tienen mayor actividad catalítica en estos disolventes que los mencionados antes (más polares). Tienen la ventaja de que se pueden eliminar fácilmente en el procesado de la reacción (la acetona tiene un punto de ebullición de 56 °C frente a los 115 °C de la piridina) y además son menos tóxicos, de hecho, la misma acetona esta aceptada en la Unión Europea para emplearla en la manufacturación de alimentos o aditivos alimentarios. Aunque los monosacáridos sólo se disuelvan parcialmente en ellos, se han empleado con éxito como medio de reacción para la acilación de estos azúcares catalizada por lipasas. La formación de producto promueve la disolución del azúcar en suspensión, por otra parte el empleo de enzimas termoestables permite elevar la temperatura de modo que aumente en cierta medida la solubilidad del monosacárido en el disolvente.

Tabla II. C6. Acilación regioselectiva de hidroxilos primarios de monosacáridos catalizada por lipasas (adaptado de Kadereit et al., 2001).

Introducción

| Compound No. | Structure | Enzyme | Solvent | Acyl Donor | Position | Yield (%) | Ref. |
|--------------|---|--------|----------------------|--|----------|-----------|------|
| 1 |  | PPL | pyridine | $\text{RCO}_2\text{CH}_2\text{CCl}_3$ | 6 | 19-35 | A |
| | | CAL | dioxane | $\text{ROCO}_2\text{N}=\text{CMe}_2$ | 6 | 15-72 | B |
| | | CAL | THF | $\text{RCO}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ | 6 | | C |
| | | PSL | pyridine | $\text{MeCO}_2\text{CH}_2\text{CCl}_3$ | 6 | 79 | D |
| | | PSL | pyridine | $\text{EtCO}_2\text{CH}_2\text{CCl}_3$ | 6 | 29 | D |
| 2 |  | PPL | pyridine | $\text{MeCO}_2\text{CH}_2\text{CCl}_3$ | 6 | 57 | A |
| | | PSL | pyridine | $\text{RCO}_2\text{N}=\text{CMe}_2$ | 6 | 70-85 | E |
| | | CAL | dioxane | $\text{ROCO}_2\text{N}=\text{CMe}_2$ | 6 | 43-68 | B |
| 3 |  | PPL | pyridine | $\text{MeCO}_2\text{CH}_2\text{CCl}_3$ | 6 | 36 | A |
| | | CCL | benzene/pyridine 2:1 | $\text{MeCO}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ | 6 | | F |
| | | PSL | pyridine | $\text{RCO}_2\text{N}=\text{CMe}_2$ | 6 | 65-80 | E |
| | | CAL | dioxane | $\text{ROCO}_2\text{N}=\text{CMe}_2$ | 6 | 44-53 | B |
| 4 |  | PPL | pyridine | $\text{MeCO}_2\text{CH}_2\text{CCl}_3$ | 1 | 20 | A |
| | | | | | 6 | 8 | |
| 5 |  | CCL | benzene/pyridine 2:1 | $\text{MeCO}_2\text{C}(\text{Me})=\text{CH}_2$ | 6 | | F |
| 6 |  | CAL | pyridine | $\text{RCO}_2\text{N}=\text{CMe}_2$ | 6 | 45-83 | G |
| | | PSL | dioxane | $\text{RCO}_2\text{N}=\text{CMe}_2$ | 6 | 50-72 | G |
| 7 |  | CAL | pyridine | $\text{RCO}_2\text{N}=\text{CMe}_2$ | 6 | 57-81 | G |
| | | PSL | dioxane | $\text{RCO}_2\text{N}=\text{CMe}_2$ | 6 | 47-62 | G |
| 8 |  | PSL | pyridine | $\text{RCO}_2\text{N}=\text{CMe}_2$ | 1 | 68-86 | E |
| 9 |  | CAL | pyridine | $\text{RCO}_2\text{N}=\text{CMe}_2$ | 5 | 50-64 | E |
| | | CAL | dioxane | $\text{ROCO}_2\text{N}=\text{CMe}_2$ | 5 | 37-52 | B |
| | | CAL | THF | Pr_2O | 5 | | H |
| 10 |  | CAL | pyridine | $\text{RCO}_2\text{N}=\text{CMe}_2$ | 5 | 45-70 | E |
| | | CAL | dioxane | $\text{ROCO}_2\text{N}=\text{CMe}_2$ | 5 | 38-49 | B |
| 11 |  | CAL | THF | Pr_2O | 5 | | H |

Monosacáridos: 1 (D-glucopiranososa), 2 (D-galactopiranososa), 3 (D-manopiranososa), 4 (D-fructosuranososa), 5 (N-acetilmanosamina), 6 (2-deoxiglucopiranososa), 7 (2-deoxigalactopiranososa), 8 (L-sorbopiranososa), 9 (D-ribofuranosa), 10 (L-arabinofuranosa), 11 (2-deoxiribofuranosa). Referencias: A (Therisod et al., 1986), B (Pulido et al., 1993), C (Haase et al., 1998), D (Watanabe et al., 1995), E (Pulido et al., 1992), F (Wang et al., 1988), G (Pulido et al., 1994), H (Prasad et al., 1995).

El t-butanol a 30 °C se ha empleado en la esterificación de la fructosa y la glucosa con ácido linoléico catalizada por la lipasa de *Byssochlamys fulva* (Ku et al., 88

1995). El mismo disolvente a 45 °C se ha utilizado en un estudio comparativo del comportamiento catalítico de dos lipasas inmovilizadas, Novozym 435 (CALB) y Lipozyme IM (lipasa de *Mucor miehei*), respecto al tamaño de cadena del ácido graso (de 4 a 20 carbonos) en la reacción de esterificación de la D-glucopiranososa (Degn et al., 1999). En todos los casos se acila el hidroxilo primario, siendo la velocidad inicial de reacción independiente del tamaño de cadena en el caso de Novozym 435, mientras que ésta crece linealmente con la longitud del ácido graso en el caso de Lipozyme IM. Interesantemente, el exceso de glucosa no solubilizada al comienzo de la reacción se transforma casi cuantitativamente.

Otro alcohol terciario muy empleado como disolvente es el alcohol t-amílico (2-metil-2-butanol), que al tener un punto de ebullición más elevado que el t-butanol permite llevar a cabo las acilaciones a mayor temperatura. En este solvente a 55 °C se ha utilizado Lipozyme TL IM para esterificar fructosa con ácidos grasos de cadena larga obteniéndose una mezcla de los productos monoacilados en 1 y en 6 (Scheckermann et al., 1995). Condiciones similares se han empleado para la misma reacción pero catalizada por Novozym 435 (Soultani et al., 2001).

La acetona permite la conversión casi total (98%) a monoéster de la glucosa en 2-3 días a 40 °C en la reacción de esterificación con ácidos grasos de cadena larga (mayor de C12) catalizada por Novozym 435. La 6-*O*-acilglucosa que se produce va precipitando facilitando la conversión del monosacárido (al ayudar a desplazar el equilibrio) que puede añadirse a concentraciones mayores de 100 mg/ml aunque no se disuelva totalmente (Arcos et al., 1998). La reacción sigue un mecanismo bi-bi ping-pong como ocurre con las transesterificaciones en general catalizadas por CALB (Arcos et al., 2001).

La etilmetilcetona comparte muchas de las ventajas de la acetona y se emplea como medio de reacción en las esterificaciones de monosacáridos con ácidos grasos (o transesterificaciones con los correspondientes ésteres metílicos) para poder eliminar los subproductos de la reacción (agua o metanol) mediante destilación azeotrópica (normalmente de eliminan con tamices moleculares), y así desplazar el equilibrio a la formación de producto. Esta metodología se ha utilizado por ejemplo para obtener 6-*O*-

acil monoésteres de glucosa a 60 °C y presión reducida con catálisis de CALB inmovilizada en polipropileno EP 100 (Yan et al., 1999).

Este tipo de disolventes (donde las lipasas son estables) se ha combinado con otros polares (donde los monosacáridos son más solubles) para obtener mezclas de reacción óptimas para la síntesis enzimática de SFAE. La velocidad de formación de 6-*O*-acilglucosa en la reacción de esterificación entre el monosacárido y el ácido graso catalizada por Novozym 435, aumenta de 3.7 a 20.2 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ al pasar de *t*-butanol puro a una mezcla *t*-butanol/piridina (55:45, v/v) e incrementar la temperatura de 45 °C a 60 °C (Degn et al., 2001).

Salvo casos como el de la fructosa, que presenta dos hidroxilos primarios, la regioselectividad de las acilaciones de monosacáridos catalizadas por lipasas es fácilmente predecible teniendo lugar en el único hidroxilo primario, que obviamente es el menos impedido del carbohidrato. La acilación regioselectiva de hidroxilos secundarios de monosacáridos y carbohidratos en general sólo es posible que la catalicen las lipasas si el hidroxilo primario se encuentra protegido, por lo que estaríamos en un proceso químico-enzimático en varias etapas (Therisod et al, 1987)

Disacáridos

El salto cualitativo de “dificultad” en la acilación de carbohidratos catalizada por lipasas al pasar de monosacáridos a di- y oligosacáridos en general es muy grande. Por un lado, en los disolventes “benignos” tipo alcohol terciario o cetona la solubilidad de estos azúcares es poca o nula (mucho menor que la de los monosacáridos que suelen disolverse parcialmente), lo cual no permite obtener rendimientos notables en la reacción de acilación. Por otra parte al haber más de un hidroxilo primario, la regioselectividad de la reacción no resulta tan obvia y hay casos en los que se obtienen mezclas de isómeros de posición y otros en los que afortunadamente la lipasa selecciona selectivamente uno sólo de estos hidroxilos.

El grupo de Sheldon ha utilizado *t*-butanol como medio en la transesterificación de algunos disacáridos con butanoato de etilo y laurato de etilo catalizada por Novozym 435 (Woudenbergh-van Oosterom et al., 1996). En su estudio demuestran que, como

cabría esperar, la solubilidad del disacárido gobierna la velocidad de reacción: cuanto más soluble sea el sustrato, mayor es la velocidad de reacción (Tabla II. C7). La solubilidad de un carbohidrato está determinada por su energía de red cristalina y su energía de solvatación. El punto de fusión, que puede dar una idea orientativa de la energía de red cristalina, varía de 98 °C para la trehalosa·H₂O a la descomposición a 204 °C de la lactosa·H₂O. Esto representa un rango amplio en la solubilidad de los disacáridos estudiados, lo que se refleja en la extensión de su conversión.

Tabla II. C7. Acilación de varios disacáridos con butanoato de etilo en t-butanol a 40 °C durante 24h ^a (adaptado de Woudenberg-van Oosterom et al., 1996).

| Disacárido | Conversión (%) | Solubilidad relativa ^b | Punto de fusión (°C) |
|----------------------------|----------------|-----------------------------------|----------------------|
| Lactosa·H ₂ O | 2/0 | <0.1 | 204 (descomp.) |
| Sacarosa | 1/0 | 1 | 185-186 |
| Maltulosa | 9/8 | 4 | 122-125 |
| Maltosa·H ₂ O | 17/0 | 7 | 102 |
| Isomaltulosa | 18/15 | 8 | 120-122 |
| Trehalosa·H ₂ O | 32/34 | 6 | 98-99 |

^a Conversión en relación mono/diéster

^b Determinado por GC respecto a la sacarosa

Para mejorar la solubilidad de los disacáridos llevaron a cabo las reacciones en el mismo disolvente a reflujo (82 °C), también mejoraron la velocidad de disolución de la sacarosa al añadirla a la mezcla de reacción como sólido amorfo (Tabla II. C8). La lactosa es virtualmente no reactiva en estas condiciones, pero la maltosa y la trehalosa se convierten de manera casi cuantitativa.

El esquema II C8 muestra la regioselectividad de la reacción. La trehalosa al ser simétrica sólo admite una posible posición (ambas son equivalentes y por eso forma más diéster), la maltosa se acila exclusivamente en el hidroxilo primario del extremo no reductor (6'-OH), la sacarosa produce sustitución 1:1 en las posiciones 6/6'. En general, cuanto menos selectiva sea la acilación más formación de diéster se observa.

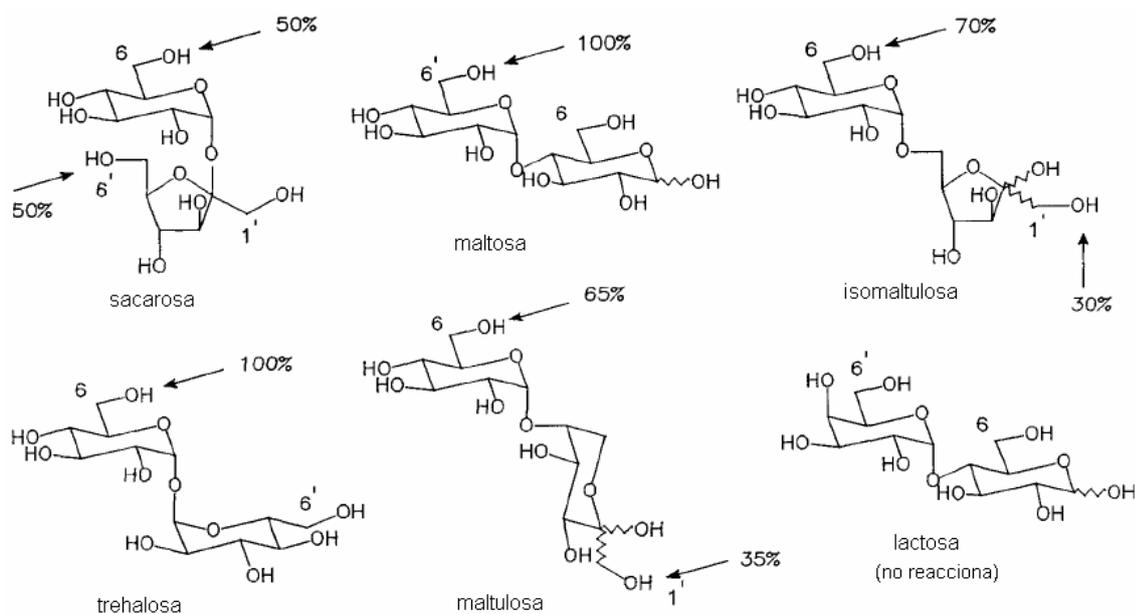
Tabla II. C8. Acilación de varios disacáridos en t-butanol a reflujo durante 24h ^a (adaptado de Woudenberg-van Oosterom et al., 1996).

| Disacárido | Butanoato de etilo ^b | | Laurato de etilo ^c | |
|-----------------------|---------------------------------|-------|-------------------------------|----------|
| | Conversión (%) | | | |
| | 48.5 eq. | 2 eq. | 10 eq. | 48.5 eq. |
| Lactosa | 1 | | | |
| Sacarosa (cristalina) | 14/4 | 5/3 | 8/7 | 6/6 |
| Sacarosa (amorfa) | 32/8 | 3/3 | 3/4 | 2/4 |
| Maltosa | 93/3 | 8/0 | 13/0 | 31/1 |
| Trehalosa | 12/72 | 18/15 | 14/36 | 3/80 |

^a Conversión en relación mono/diéster; eq = equivalente

^b Conversión determinada por GC.

^c Conversión determinada por GPC



Esquema II. C8. Estructura de los disacáridos acilados con Novozym 435 en t-butanol a reflujo con indicación de la posición de la primera acilación (adaptado de Woudenberg-van Oosterom et al., 1996).

La lipasa de *Mucor miehei* se ha utilizado para obtener regioselectivamente el monocaprato de sacarosa en posición 6 (Kim et al., 1998). Curiosamente, la esterificación se lleva a cabo en ausencia de disolvente, mezclando el disacárido, la enzima y el ácido graso en presencia de un par de sales hidratadas que regulan la a_w , todo a 50 °C. No obstante el bajo rendimiento y las condiciones de reacción en general (proporción de reactivos, enzima, etc.) no hacen que esta reacción sea atractiva desde el punto de vista preparativo.

Al igual que se ha indicado con los monosacáridos, la estrategia basada en emplear mezclas de disolventes capaces de disolver el disacárido y preservar una actividad catalítica razonable en la lipasa parece ser, hasta la fecha, la mejor solución para poder acilar estos sustratos utilizando lipasas.

El grupo de Ballesteros ha utilizado mezclas de alcohol t-amílico y DMSO (en proporción menor al 20%) a 40 °C para acilar la sacarosa mediante transesterificación con ésteres vinílicos de ácidos grasos de cadena larga en presencia de tamices moleculares y catálisis con diferentes lipasas inmovilizadas (Ferrer et al., 1999). El DMSO es un disolvente excelente para disolver carbohidratos y como el medio de reacción está mayoritariamente compuesto por alcohol t-amílico (donde la mayoría de las lipasas presentan una actividad elevada), la inactivación del biocatalizador (las lipasas pierden toda su actividad en DMSO) se reduce enormemente. Comparada con la reacción en alcohol t-amílico puro, la adición de DMSO acelera drásticamente el proceso debido a la mejor solubilización de la sacarosa. La utilización de ésteres vinílicos favorece la transesterificación, de 20 a 100 veces más rápida que con los correspondientes ésteres alquílicos. Entre las distintas proporciones que ensayaron encontraron que con un 20% de DMSO la producción de diéster es despreciable. Con Novozym 435 se obtiene una conversión alta de sacarosa pero se produce una mezcla aproximadamente equimolar de los regioisómeros en 6 y 6'. Con la lipasa de *Thermomices lanuginosus* (TLL) adsorbida sobre celita la conversión es mayor y se produce exclusivamente el regioisómero en 6. Los mismos autores han extendido el uso de esta última lipasa en las mismas condiciones de reacción para acilar maltosa, leucrosa y maltotriosa con cadenas de ácido graso largas (C12 a C18) (Ferrer et al., 2000). Para los disacáridos obtienen un rendimiento de monoéster en torno al 70 % con una regioselectividad total en el caso de la maltosa (se produce exclusivamente la 6'-O-acilmaltosa) como ocurre cuando se cataliza con Novozym 435, y bastante elevada para leucrosa (92 % de 6-O-acil-leucrosa y un 8% de dos regioisómeros no identificados), lo que significa mayor regioselectividad que con Novozym 435. Una de las ventajas de este método, según sus autores, es la sencillez, ya que el monoéster formado se puede precipitar del medio de reacción por adición de heptano (lo que facilita el procesado) y posteriormente purificar por cromatografía en columna o cristalización.

En el mismo grupo de investigación se ha estudiado el efecto de distintos soportes en la inmovilización de TLL a la hora de aplicar la forma inmovilizada de la lipasa a la acilación de la sacarosa con la metodología descrita en el párrafo anterior (Ferrer et al., 2002). La comparación de los resultados obtenidos con la enzima inmovilizada por adsorción en polipropileno (Accurel EP100), en sílice granulada, en celita, y por unión covalente a Eupergit C, muestra que la inmovilización en sílice granulada produce la forma de la enzima más selectiva hacia la producción de monoéster, teniendo además una estabilidad operacional notable. Actualmente esta forma de la lipasa se comercializa por Novozymes bajo el nombre Lipozyme TL IM[®] y se ha empleado para acilar algunos de los disacáridos antes mencionados en las mismas mezclas alcohol t-amílico/DMSO obteniéndose la misma regioselectividad que cuando la lipasa está inmovilizada sobre celita (Ferrer et al., 2005b).

Los mismos autores han demostrado en un estudio sobre la transesterificación de sacarosa con palmitato de etilo (o metilo) y palmitato de vinilo con catálisis por Novozym 435 en mezclas de alcohol t-amílico/DMSO a 60 °C, que el modo de preparar la mezcla de reacción puede influir en la velocidad de acilación (Fig. II. C8) (Reyes-Duarte et al., 2005)

Otra mezcla de disolventes empleada para disacáridos es t-butanol/piridina 9:11 (v/v) a 45 °C. En este medio, utilizando Novozym 435, se han esterificado maltosa y sacarosa directamente con ácidos grasos de distinto tamaño (C4 a C12) (Pedersen et al., 2002). Lactosa y celobiosa no dieron reacción alguna al ser menos solubles en este medio (Tabla II. C9). La velocidad inicial de reacción en estas condiciones es mayor al decrecer el tamaño de cadena del ácido graso. Aunque CALB es de las pocas lipasas capaces de esterificar sustratos utilizando ácidos grasos libres como agentes acilantes, el empleo de ésteres vinílicos permitiría aumentar la velocidad de reacción.

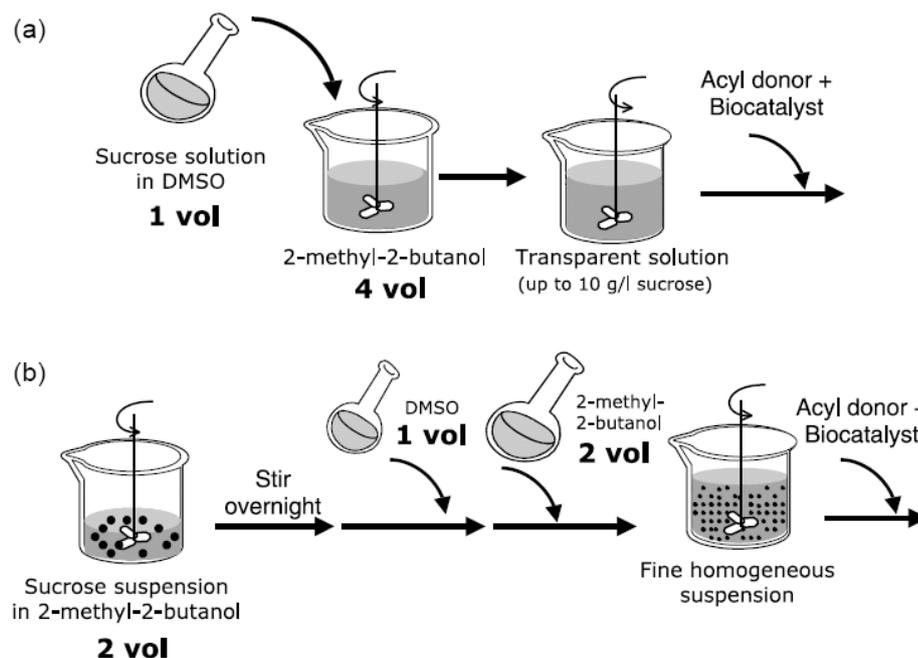


Figura II. C8. Distintas maneras de preparar la mezcla de reacción. La (b) produce mayor velocidad de reacción (tomado de Reyes-Duarte et al., 2005).

Tabla II. C9. Solubilidad de distintos disacáridos en t-BuOH y t-BuOH/Piridina 9:11 (v/v) a 45 °C (adaptado de Pedersen et al., 2002).

| Disolvente | Lactosa (mM) | Celobiosa (mM) | Maltosa (mM) | Sacarosa (mM) |
|------------|--------------|----------------|--------------|---------------|
| t-BuOH | - | - | 12 | 4 |
| t-BuOH/Py | 18 | 2 | 215 | 27 |

Trisacáridos y oligosacáridos

Hasta el trabajo de esta tesis únicamente había dos ejemplos descritos en bibliografía sobre acilación de tri- y oligosacáridos mediante catálisis con lipasas. La mezcla t-butanol/piridina (55:45, v/v) a 45 °C fracasó con la maltotriosa (en este medio este carbohidrato tiene una solubilidad máxima de 22 mM) (Degn et al., 2001).

En la mezcla alcohol t-amílico/DMSO comentada para los disacáridos sí se ha conseguido acilar la maltotriosa mediante transesterificación con ésteres vinílicos de ácidos grasos de cadena larga (C12 a C18) y empleando TLL inmovilizada sobre celita (Ferrer et al., 2000). Los rendimientos de monoéster obtenidos en torno al 20 % son

bastante menores que con la maltosa. Se produce la acilación regioselectiva del hidroxilo primario del extremo no reductor (6''-OH) del carbohidrato. El menor impedimento estérico de este hidroxilo primario en maltosa y maltotriosa permite su acilación selectiva con TLL.

El otro ejemplo descrito en bibliografía ha empleado CALB inmovilizada sobre polipropileno macro poroso (Accurel EP 100), para acilar mezclas de oligosacáridos procedentes de la hidrólisis del xiloglucano (XGOs), mediante transesterificación con estearato de vinilo (Gustavsson et al., 2005). El medio de reacción es similar al desarrollado en el grupo de Ballesteros, empleando la misma mezcla de disolventes, pero encuentran que la concentración óptima de DMSO en el alcohol t-amílico es del 35% (la temperatura la mantienen a 60 °C). Obtienen tras 96 h un 14 % de XGOs acilados de los cuales menos del 10 % eran diésteres mientras que los triésteres sólo los observaron en cantidades traza por espectrometría de masas MALDI-TOF (la Tabla II. C10 muestra el análisis ESI-MS de los XGOs y sus correspondientes monoésteres). El grado de acilación de las distintas variantes de XGOs corresponde bastante bien al número de hidroxilos primarios en cada molécula de carbohidrato (Esquema II. C9).

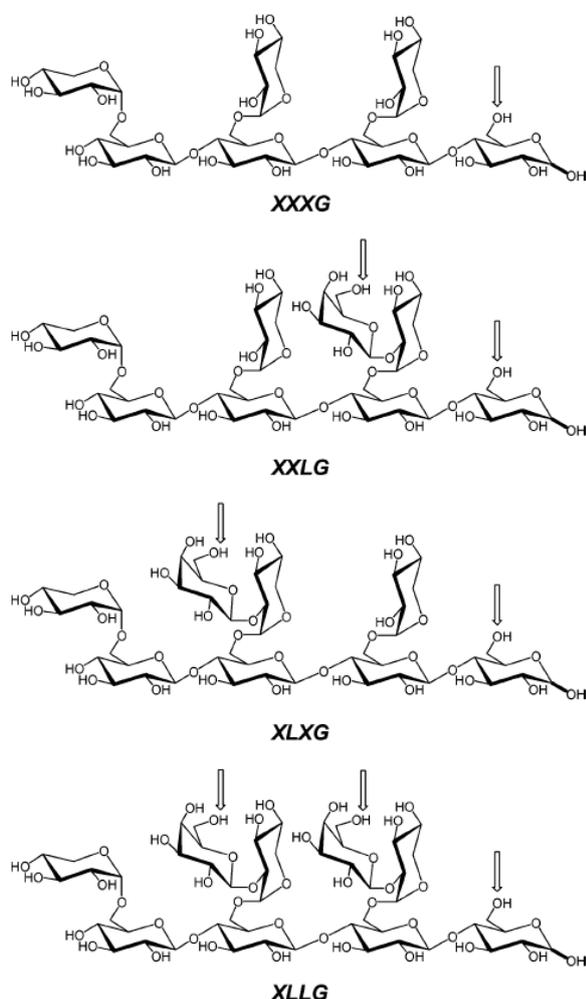
Tabla II. C10. Análisis ESI-MS de los monoésteres de XGOs (adaptado de Gustavsson et al., 2005)

| Oligosacáridos de xiloglucano | Peso molecular calculado | Peso molecular observado ^a |
|-------------------------------|--------------------------|---------------------------------------|
| XXXG | 1062.35 | 1062.29 |
| XLXG/XXLG | 1224.40 | 1224.41 |
| XLLG | 1386.45 | 1386.46 |
| Monoestearoil XXXG | 1328.61 | 1328.53 |
| Monoestearoil XLXG/XXLG | 1490.66 | 1490.59 |
| Monoestearoil XLLG | 1652.72 | 1652.71 |

^a Típicamente observados como aductos $[M+Na]^+$ y $[M+2Na]^{2+}$

Los compuestos individuales fueron detectados por HPLC pero debido al bajo rendimiento de la reacción y a las cantidades tan pequeñas manejadas no pudieron aislarse para poder realizar su elucidación estructural completa y así establecer la regioselectividad de la lipasa. De todas formas es probable que en los XGOs con más de

un hidroxilo primario (esquema II. C9), la acilación se produzca preferentemente en los situados en alguno de los extremos no reductores, por su menor impedimento estérico.



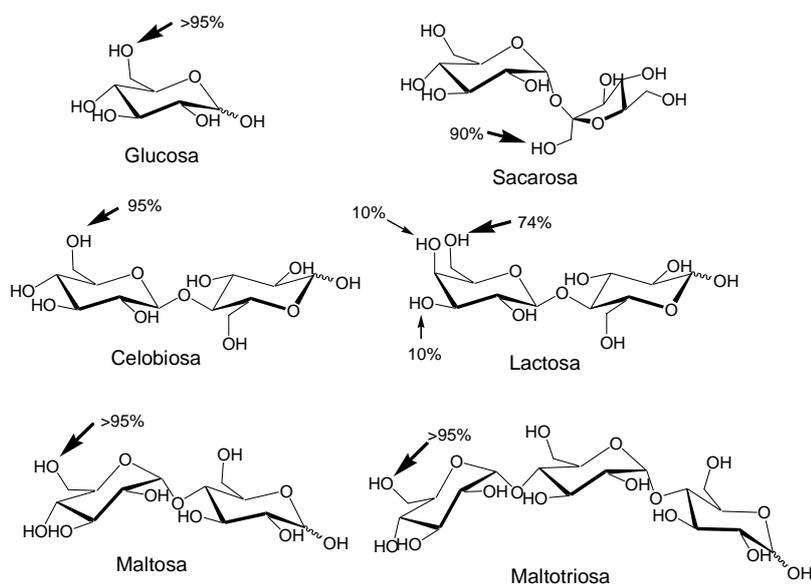
Esquema II. C9. Estructura de los distintos XGOs. Las posiciones de los hidroxilos primarios, que son las susceptibles de acilación catalizada por CALB, están indicadas con flechas (de Gustavsson et al., 2005).

C. 5. 2. 2. Acilaciones de carbohidratos catalizadas por proteasas.

Como se apuntó anteriormente, cuando se utilizan proteasas para catalizar la acilación de carbohidratos en disolventes orgánicos, el problema de la solubilidad del azúcar prácticamente desaparece ya que algunas de estas enzimas preservan su actividad en disolventes como DMF, capaz de solubilizar oligosacáridos a una concentración razonablemente alta. La mayoría de las enzimas no tienen actividad catalítica en este disolvente simplemente porque se desnaturalizan al disolverse en el mismo, las proteasas que se mencionarán a continuación son una excepción.

Acilación de hidroxilos primarios

Nuevamente el grupo de Klibanov fue el primero en aplicar las proteasas para biocatalizar la acilación de carbohidratos (Riva et al., 1988). Utilizaron la proteasa de *Bacillus subtilis* (subtilisina) para transesterificar distintos azúcares con tricloroetil butirato en piridina y en DMF a 45 °C con rendimientos en torno al 50% y una regioselectividad excelente (esquema II. C10). De manera análoga a lo que ocurre con lipasas, esta serina proteasa muestra preferencia por los hidroxilos primarios del extremo no reductor (en el caso de azúcares reductores). También notaron que se obtenían los mismos resultados con la proteasa altamente purificada o en forma de crudo enzimático (mucho más barato).



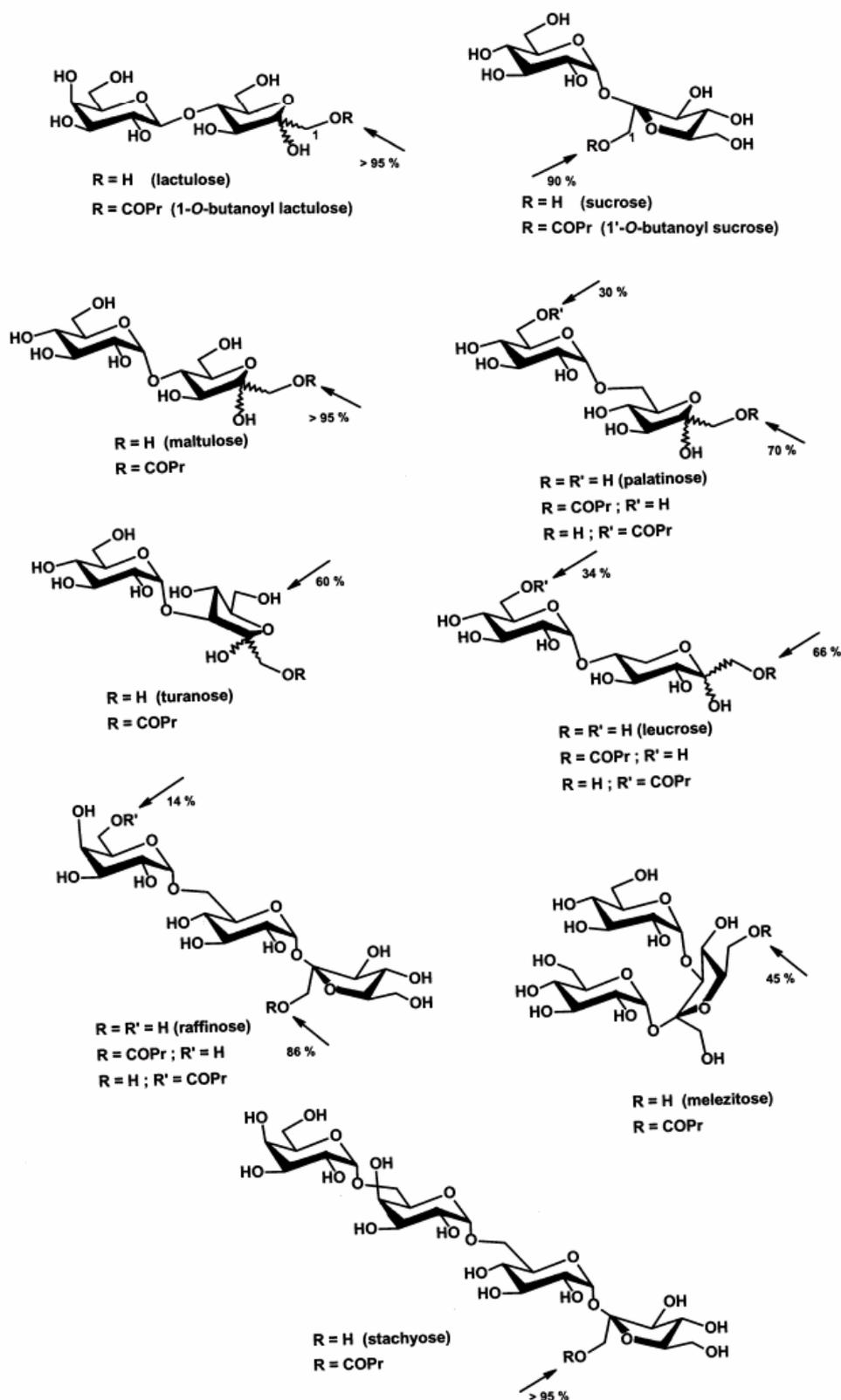
Esquema II. C10. Estructura de los carbohidratos utilizados como sustrato en la acilación catalizada por subtilina en DMF. Las flechas indican la posición de acilación y el porcentaje de regioselectividad (adaptado de Riva et al., 1988).

El grupo de Carrea. también han empleado una preparación cruda barata de esta enzima (protease N de Amano) para transesterificar la sacarosa con trifluoroetil ésteres de distinto tamaño de cadena (C4 a C10) en las mismas condiciones de reacción (Carrea et al., 1989). Aunque el orden de reactividad química de los hidroxilos primarios de la sacarosa es $6\text{-OH} \approx 6'\text{-OH} > 1'\text{-OH}$, con esta enzima se acila regioselectivamente el $1'\text{-OH}$. No obstante, estos autores observaron que tanto el rendimiento como la regioselectividad decrecen al aumentar el tamaño de la cadena del agente acilante. De

modo análogo, se ha observado que la transesterificación de la sacarosa con ésteres vinílicos de ácidos grasos de cadena larga ($\geq C10$) en piridina utilizando como biocatalizador la subtilisina BPN y la subtilisina Carlsberg, transcurre con dificultad como consecuencia del tamaño de cadena largo (Rich et al., 1995). Con una preparación cruda de subtilisina Carlsberg (Alcalase 2.0T de Novozymes) actuando en el mismo disolvente, se ha observado un descenso en el rendimiento (del 70 al 49%) de monoéster de sacarosa al pasar de la tributirina al laurato de vinilo como agente acilante (Soedjak et al., 1994). Por otra parte, en el grupo de Linhardt observaron la misma regioselectividad ($>95\%$) y rendimiento de monoéster aislado (60%) independientemente del tamaño cadena (Polat et al., 1997) al utilizar la subtilisina Carlsberg en forma CLEC (ChiroCLEC-BL de Altus Biologics Inc.) en piridina a 40 °C para catalizar la transesterificación del mismo disacárido con ésteres vinílicos de ácidos grasos de cadena larga (C12, C14 y C18). Este resultado implica un efecto importante de la forma de preparación enzimática (CLEC vs liofilizado a pH óptimo) en el comportamiento de las proteasas en la reacción de transesterificación de carbohidratos.

El grupo de Riva ha empleado la subtilisina Carlsberg en DMF en torno a 40 °C para transesterificar oligosacáridos que contienen una unidad de fructosa con trifluoroetil butanoato (Riva et al., 1998). Obtienen los correspondientes monobutanoatos con un $\sim 50\%$ de rendimiento de producto aislado. La enzima muestra preferencia hacia la acilación regioselectiva de los hidroxilos primarios de la unidad de fructosa (esquema II. C11).

La proteasa de *Bacillus subtilis* también puede actuar con ácidos grasos que posean insaturaciones. Se ha descrito la transesterificación regioselectiva de glucosa, sacarosa y trehalosa con el vinil éster del ácido 10-undecilénico empleando una preparación cruda de esta enzima (Biopraxe conc. De Nagase Chemtex Co.) en DMF a 30 °C, obteniéndose 6-*O*-(10-undecilenoil)glucosa, 6-*O*-(10-undecilenoil)trehalosa y 1'-*O*-(10-undecilenoil)sacarosa con un rendimiento de producto aislado en torno al 50 % (Raku et al., 2003).



Esquema II. C11. Di- y oligosacáridos acilados por la subtilisina Carlsberg en DMF. Las flechas indican la posición de acilación. Los números indican el porcentaje de regioselectividad (adaptado de Riva et al., 1998).

El grupo de Queneau describió por primera vez la acilación de la sacarosa catalizada por una proteasa en DMSO (Potier et al., 2000). Concretamente llevaron a cabo la transesterificación del disacárido con el trifluoroetil éster del ácido metacrílico utilizando una preparación enzimática cruda de la proteasa de *B. subtilis* (Proteinase N, Fluka) con una cantidad mínima de DMSO (con un 2.2% de agua) para formar una pasta (slurry) del sustrato, enzima y agente acilante. Los mismos autores han estudiado los efectos de la temperatura, contenido en agua y pH de liofilizado de la enzima sobre el comportamiento de la reacción de transesterificación de sacarosa y trehalosa con trifluoroetil butanoato y laurato de vinilo catalizado por la proteasa antes mencionada en DMF (Potier et al., 2001).

Otro ejemplo en el que se ha utilizado DMSO en el medio de reacción es la acilación de *N*-acetilhexoaminas catalizada por subtilisina Carlsberg (Simerska et al., 2004). Concretamente el disolvente es una mezcla acetonitrilo/DMSO (8:2, v/v) a 45 °C y el agente acilante es el acetato de trifluoroetilo. La acilación se produce regioselectivamente en el hidroxilo primario.

Las distintas variantes de subtilisina (subtilisina Carlsberg, proteasa de *B. subtilis*, etc.), como serina proteasas que son, comparten el mecanismo hidrolítico de las lipasas y al igual que éstas muestran una preferencia clara por los hidroxilos primarios en la acilación de carbohidratos.

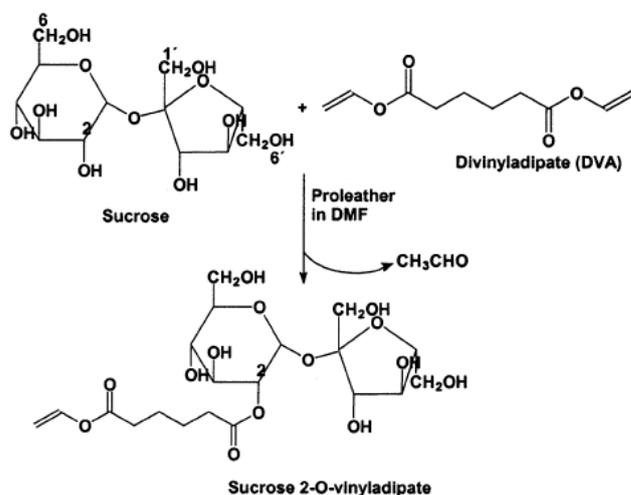
Acilación de hidroxilos secundarios

Aunque *a priori* no es de esperar que con una serina proteasa se pueda acilar regioselectivamente un hidroxilo secundario de un carbohidrato nativo (sin sus hidroxilos primarios bloqueados con algún grupo protector) existen cuatro ejemplos en bibliografía que describen este tipo de regioselección.

El primer caso se observó con la proteasa alcalina de *Streptomyces sp.* en la reacción de transesterificación de monosacáridos con adipato de divinilo (Kitagawa et al., 1999). En DMF esta enzima cataliza la síntesis de 6-*O*-viniladipoilgalactosa, mientras que en DMF/DMSO (4:1, v/v) la galactosa se esterifica exclusivamente en la posición C2, lo que indica claramente que la regioselectividad de esta proteasa viene

afectada por la naturaleza del medio de reacción (es probable que el DMSO produzca cambios significativos en la conformación proteica según los autores)

El segundo ejemplo fue publicado por el grupo de Dordick (Ferreira et al., 2002). En la reacción de transesterificación de la sacarosa con adipato de divinilo en DMF a 45 °C con catálisis de la proteasa de *B. subtilis* (Proleather FG-F de Amano) encontraron que el monoéster producido (con un 22% de rendimiento) correspondía a 2-*O*-viniladipilsacarosa (esquema II. C12). Curiosamente, en el mismo grupo de investigación se había descrito con anterioridad que la acilación de la sacarosa con acrilato de vinilo catalizada por exactamente la misma enzima en piridina a la misma temperatura produce 1'-*O*-acrililsacarosa como producto principal (Patil et al., 1991). Los autores concluyen que la regioselectividad de la proteasa concreta que emplean es dependiente del disolvente empleado. Por otra parte, aunque estos autores no hayan realizado ninguna observación, el liofilizado de la proteína lo hacen en un tampón fosfato y no habría que descartar una posible interferencia de catálisis química por la base inorgánica ya que precisamente se acila regioselectivamente el hidroxilo más ácido del disacárido.



Esquema II. C12. Síntesis enzimática de 2-*O*-viniladipilsacarosa catalizada por Proleather en DMF (de Ferreira et al., 2002).

El tercer caso que aparece en bibliografía es el de la proteasa alcalina de *Bacillus pseudofornis* AL-89. Esta enzima cataliza la transesterificación de la sacarosa con laurato de vinilo en DMF/piridina (1:1, v/v) a 45 °C; el 60% de los monoésteres regioisoméricos producidos corresponde al 2-*O*-lauroil éster (Pedersen et al., 2003). Los autores también comprobaron que en ausencia de enzima el tampón empleado en la

inmovilización de la misma promueve la transesterificación aunque se obtiene polisustitución (en la acilación enzimática se produce exclusivamente monoéster).

El último caso se observó nuevamente con la proteasa alcalina de *B. subtilis* en la transesterificación de β -ciclodextrina con divinil butanodiato, divinil hexanodiato y divinil decanodiato en DMF a 50 °C (Xiao et al., 2004). Los productos acilados se obtuvieron con rendimiento muy bajo (<20%); de ellos el 80% es monoéster y el 20% productos de polisustitución. La elucidación estructural del monoéster demuestra que la acilación se produce regioselectivamente en C-2 (nuevamente sobre el hidroxilo más ácido del oligosacárido), desgraciadamente los autores no revelan ningún detalle sobre el método de ajuste de pH de la enzima por lo que no se puede establecer si hay algún efecto de catálisis química colateral o no.

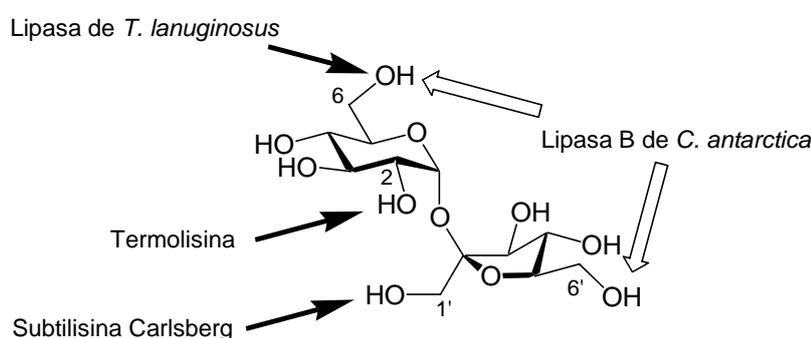
Las metaloproteasas presentan un mecanismo hidrolítico diferente al de las serina proteasas que no implica la formación de un intermedio acil-enzima. Por este motivo son buenas candidatas a la hora de buscar regioselectividades diferentes a las típicas observadas para las lipasas y serina proteasas en la acilación enzimática de carbohidratos. La termolisina, una metaloproteasa termoestable de *Bacillus thermoproteolyticus*, es una enzima muy prometedora en este sentido. El grupo de Pedersen introdujo la aplicación de esta enzima en la acilación de azúcares. En el artículo original investigaron la transesterificación de la sacarosa con laurato de vinilo en DMSO a 45 °C utilizando la metaloproteasa inmovilizada sobre celita (Pedersen et al., 2002). Obtienen un rendimiento de producto del 44% del que 2-*O*-lauroilsacarosa representa el 90%. Demuestran que la catálisis es netamente enzimática ya que no se produce reacción cuando se emplea la celita sin enzima (tratada con el mismo tampón), no se observa producto cuando se lleva a cabo la reacción con otras proteínas inmovilizadas sobre la celita (por ejemplo la ovoalbúmina), lo que elimina un posible efecto de catálisis debido a los grupos funcionales típicos de las proteínas, y por último la reacción es zinc-dependiente. El poder utilizar DMSO neto como medio de reacción es una ventaja indudable ya que permite solubilizar fácilmente oligosacáridos de peso molecular elevado.

En el mismo grupo de investigación han extendido el uso de la termolisina para preparar ésteres de ciclodextrinas empleando esencialmente las mismas condiciones

(Pedersen et al., 2005). Observan que la regioselectividad va dirigida principalmente hacia el hidroxilo en C-2 con un grado de sustitución medio en torno a siete -la heptakis(2-*O*-decanoil)- β -ciclodextrina es el producto principal-. No obstante con agentes acilantes de distinto tamaño de cadena (C4, C12) obtienen resultados diferentes (por ejemplo con el butirato de vinilo el grado medio de sustitución es nueve).

C. 5. 2. 3. Acilaciones regioselectivas complementarias de carbohidratos utilizando diferentes hidrolasas: el ejemplo de la sacarosa.

Los distintos ejemplos recogidos en los puntos anteriores muestran que con las hidrolasas se pueden preparar SFAE con una regioselectividad muy alta en una única etapa. Además en ocasiones, sobre un sustrato dado, según la hidrolasa utilizada se produce la acilación en posiciones diferentes del carbohidrato, lo que confiere un atractivo muy importante a esta metodología. El esquema II. C13 muestra gráficamente esta complementariedad sobre el sustrato más estudiado: la sacarosa.



Esquema II. C13. Posiciones preferentes de acilación en la sacarosa obtenidas con diferentes hidrolasas. CALB muestra similar preferencia por los hidroxilos 6/6'.

Objetivos

III. OBJETIVOS

Los ésteres de carbohidratos con ácidos grasos de cadena larga son compuestos surfactantes de alto interés por sus aplicaciones en alimentación, farmacia y cosmética, además de por la actividad biológica descrita para algunos de ellos. Estos compuestos se pueden preparar empleando catálisis química o enzimática. Aunque actualmente para su producción a nivel industrial se use la vía química -catálisis básica a altas temperaturas-, la baja selectividad, la costosa purificación y la formación de impurezas coloreadas han enfocado la atención en las últimas décadas hacia los procesos enzimáticos, mucho más selectivos, en los que se emplean lipasas y proteasas.

Mientras que la acilación regioselectiva tradicional de un carbohidrato por vía química suele requerir el empleo de largas secuencias de protección/desprotección, el empleo de hidrolasas permite conseguir la selectividad de una manera directa. No obstante, los sustratos empleados hasta la fecha, salvo excepciones, se han limitado a monosacáridos y disacáridos, debido fundamentalmente a que las lipasas se inactivan en los disolventes orgánicos polares en los que se pueden disolver oligosacáridos de mayor tamaño. Se hace necesario por tanto encontrar condiciones de reacción en las que se pueda llevar a cabo de manera satisfactoria la acilación de oligosacáridos catalizada por lipasas.

El **objetivo principal** de esta tesis ha sido encontrar condiciones adecuadas para la acilación enzimática directa de distintos oligosacáridos comerciales empleando para ello lipasas y proteasas.

Los **objetivos específicos** propuestos durante el desarrollo del trabajo han sido:

- i) Obtener rendimientos aceptables en la preparación de monoésteres de tri- y tetrasacáridos con ácidos grasos de cadena larga.
- ii) Investigar la regioselectividad de la acilación en función de la hidrolasa utilizada.

- iii) Desarrollar un método cromatográfico eficaz para poder determinar de manera rápida y precisa, con pequeñas cantidades de material, la regioselectividad obtenida en la acilación enzimática de los oligosacáridos.
- iv) Elucidar la posición de acilación en el regioisómero mayoritario obtenido en cada reacción usando experimentos de RMN mono- y bidimensionales.
- v) Preparar familias homólogas de monoésteres de trisacáridos con ácidos grasos de distinto tamaño de cadena. Estudiar la influencia del tamaño de la cadena de ácido graso en la especificidad enzimática.
- vi) Estudiar las propiedades fisicoquímicas de estos nuevos surfactantes para poder evaluar sus posibles aplicaciones, tanto en la industria como en investigación básica.
- vii) Realizar ensayos de actividad biológica con todos los monoésteres sintetizados.

Anexo resultados

ANEXO I

Desarrollo de un método LC/ESI/MS para el análisis de la distribución de regioisómeros en monoésteres de carbohidratos con ácidos grasos de cadena larga.

Resumen

En este trabajo se presenta un nuevo método para caracterizar la distribución de regioisómeros en monoésteres de carbohidratos con ácidos grasos de cadena larga basado en LC/ESI/MS. La naturaleza surfactante y la alta polaridad de estos compuestos los convierte en analitos excelentes para ser detectados por espectrometría de masas con ionización electrospray. A pesar de la similitud estructural de todos los regioisómeros, trabajando en cromatografía líquida en fase reversa y en condiciones isocráticas con mezclas acetonitrilo/agua, se consigue una resolución adecuada de todos los regioisómeros presentes en las distintas muestras. Por último, se discute la superioridad del método desarrollado en comparación con la metodología clásica basada en espectroscopía RMN de ^{13}C , para determinar la regioselectividad en reacciones de acilación de carbohidratos catalizadas por enzimas.

Introducción

Muchas de las propiedades de los surfactantes tipo monoéster de carbohidrato con ácido graso de cadena larga dependen de la posición de acilación. Así, por ejemplo, desde el punto de vista fisicoquímico, diferentes monoésteres regioisoméricos de sacarosa presentan valores distintos de CMC (Garofalakis et al., 2000; Polat et al., 2001). Por otra parte, es preferible realizar los estudios de bioactividad de esta clase de compuestos con regioisómeros puros para no dificultar el establecimiento del origen de los efectos que se observen (Ferrer et al., 2005). Cuando la monoacilación de un carbohidrato es una etapa de protección en una secuencia sintética, la búsqueda de la máxima regioselectividad es un objetivo obvio (Kadereit et al., 2001).

Por tanto es importante disponer de métodos analíticos fiables y precisos para la determinación de la distribución de regioisómeros en los monoésteres de carbohidratos preparados por vía química (Cruces et al., 2001) o enzimática (Plou et al., 2002). Este tipo de análisis es el que informa sobre la regioselectividad de la reacción de acilación.

Tradicionalmente se ha utilizado la cromatografía de gases (GC) para obtener esta información. Los principales inconvenientes de esta técnica son, por un lado, la inevitable derivatización previa de los compuestos a analizar para incrementar su volatilidad y, por otra parte, su limitación a ésteres de monosacáridos y disacáridos, en el caso de estos últimos se requieren además condiciones extremas de temperatura en el equipo para poder analizar los ésteres derivados de ácidos grasos de cadena larga (Karrer et al., 1992).

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) permite el análisis directo sin tener que recurrir a la derivatización, lo que supone una ventaja en términos de economía de tiempo y trabajo, aunque la técnica sea menos sensible que la GC. Dado que se trata de compuestos no detectables mediante absorción UV, se suele recurrir al empleo de detectores diferenciales de índice de refracción (RI). Curiosamente sin embargo, la mayoría de los métodos que aparecen en los trabajos sobre síntesis de este tipo de compuestos se enfocan más en la monitorización de la conversión del carbohidrato de partida y en el análisis del grado de sustitución que en el análisis de los regioisómeros (ver por ejemplo Ferrer et al., 1999). El grupo del Profesor Queneau es el único que ha descrito con cierto detalle el análisis por HPLC de distintos monoésteres de sacarosa regioisoméricos en un estudio sobre las migraciones del grupo acilo en medio básico (Molinier et al., 2003). La mayoría de los autores sin embargo, ofrecen datos aproximados sobre la regioselectividad enzimática en reacciones de acilación de carbohidratos basándose exclusivamente en espectros RMN de ^{13}C de rutina (ver por ejemplo Riva et al., 1998).

En este trabajo se describe un método nuevo de análisis de monoésteres de carbohidratos con ácidos grasos de cadena larga mediante HPLC con detección por espectrometría de masas con ionización electrospray (ESI). También se discute la superioridad de este método en la determinación de la regioselectividad de un proceso

de acilación enzimática de carbohidratos con respecto a la metodología clásica basada en RMN de ^{13}C de rutina.

Materiales y métodos

Patrones, analitos y disolventes

Se utilizaron las siguientes muestras comerciales: monolaurato de sacarosa y monodecanoato de sacarosa de Fluka, monolaurato de sacarosa y monopalmitato de sacarosa purificados en columna según se ha descrito anteriormente (Lerk et al., 1996) a partir de los sucroésteres L-1695 y D-1615 de Mitsubishi Kagaku Foods Corporation. Las otras muestras de monoésteres de sacarosa se prepararon según procedimientos previamente descritos: monolaurato de sacarosa preparado con la lipasa de *Thermomyces lanuginosus* (Ferrer et al., 2005), monolaurato de sacarosa preparado con la lipasa B de *Candida antarctica* (Woudenberg-van Oosterom et al., 1996), monolaurato de sacarosa preparado con la proteasa cruda de *Bacillus subtilis* (Potier et al., 2001) y monolaurato de sacarosa preparado con catálisis básica (Cruces et al., 2001). La muestra de monolaurato de melecitosa se preparó como se indica en el Anexo II. Para la fase móvil cromatográfica se utilizó acetonitrilo calidad HPLC-gradiente de Scharlau y agua ultrapura Milli-Q[®]. Para la espectroscopía RMN se utilizó metanol deuterado (99.9 atom % D) de Aldrich.

Cromatografía LC/ESI/MS

El análisis LC-MS se llevó a cabo con un modulo de separación Waters Alliance 2695 acoplado a un espectrómetro de masas tipo cuadrupolo simple Waters Micromass ZQ. La sonda de interfase ESI operó en modo de ionización positivo. Los cromatogramas se registraron en modo Scan (rango m/z que aparece en las figuras) y en modo SIR (seleccionando las masas que aparecen en las figuras). El flujo de gas de nebulización (N_2 de un generador de gases) se fijó a 60 L/Hr. El gas de desolvatación (el mismo N_2) se utilizó a 300 L/Hr y 200 °C. El voltaje del capilar se fijó a 2.75kV y los voltajes del cono de extracción y de las lentes de enfoque precuadrupolo se fijaron a 4V y 0.5 V respectivamente. Al cono de muestra se le aplicaron distintos voltajes como se indica en las figuras. La temperatura de la fuente y del cono de muestra se fijó a 120 °C y 20 °C

respectivamente. Para el resto de parámetros del espectrómetro se utilizaron los valores fijados para la calibración del instrumento. La separación cromatográfica se llevó a cabo en fase reversa y en condiciones isocráticas, empleando como fase estacionaria una columna Spherisorb ODS2, 3 μm (4.6 \times 250 mm) de Waters y como eluyente, mezclas acetonitrilo:H₂O con las proporciones que se indican en las figuras. El flujo de fase móvil se fijó a 0.3 ml/min y a 1.1 ml/min (con división de flujo postcolumna, en este último caso, de modo que el detector sólo reciba 0.2 ml/min). La temperatura del horno de columna se fijó a 40 °C. Las muestras se prepararon como soluciones acuosas diluidas (ca. 1ppm), se filtraron a través de filtros de nylon Millipore de 3 μm y se analizaron inmediatamente inyectándose en el equipo un volumen de 10 μl . Se utilizó el software MassLynx versión 3.5 para la adquisición y procesado de datos.

Espectroscopía RMN

Los espectros RMN del monolaurato de melecitosa se adquirieron a partir de una solución en CD₃OD (20 mg de producto en 0.75ml de disolvente deuterado) preparada en un tubo de 5mm de diámetro. Se utilizó un espectrómetro Bruker ARX 400 [400 MHz (¹H) y 100MHz (¹³C)] con la sonda operando a temperatura ambiente (~298K). Los espectros de rutina de protón y carbono se adquirieron utilizando las secuencias de pulsos y los parámetros estándar del instrumento. En concreto se utilizaron para el espectro RMN-¹H, 16 scans de una secuencia estándar compuesta de un pulso de excitación de 90° durante 10 μs , un delay de 1.5 s y un tiempo de adquisición de 3.5 s. Para el espectro RMN-¹³C se usaron 1200 scans de una secuencia compuesta por un pulso de excitación de 90° durante 7 μs , un delay de 1.5 s y un tiempo de adquisición de 2 s (con aplicación de desacoplamiento continuo de protones durante 100 μs).

Resultados y Discusión

La HPLC acoplada a la detección por espectrometría de masas es una técnica analítica cada vez más extendida debido, entre otros factores, a su elevada sensibilidad y a la información que proporciona sobre los analitos (de Hoffmann et al., 2001). La interfase electrospray (ESI) es muy adecuada para el análisis de compuestos polares no volátiles. Como consecuencia del mecanismo de ionización en electrospray, los analitos de naturaleza surfactante presentan una respuesta muy alta en esta clase de detectores lo

cual permite alcanzar límites de detección considerablemente bajos (Cech et al., 2001). Por ejemplo, se ha empleado con éxito la técnica HPLC/MS con interfase ESI para analizar surfactantes no iónicos de la familia de los poliéteres (Zhu et al., 2003). Los monoésteres de carbohidratos con ácidos grasos de cadena larga también son surfactantes no iónicos y por tanto, su análisis por HPLC/ESI/MS es muy apropiado presentando ventajas de operatividad y sensibilidad obvias respecto a la detección RI.

El desarrollo de un método HPLC/ESI/MS para caracterizar la distribución de regioisómeros en esta clase de compuestos implica resolver dos aspectos diferentes: i) las condiciones de ionización óptima de los analitos en la fuente ESI y ii) las condiciones óptimas de separación cromatográfica de los distintos regioisómeros.

Para el desarrollo del método se utilizaron dos monolauratos de sacarosa comerciales, cada uno constituido por una mezcla de regioisómeros, y monolauratos de sacarosa sintetizados en laboratorio por vía química y enzimática según procedimientos previamente descritos.

Optimización de las condiciones de ionización

Para encontrar las condiciones óptimas se realizó la inyección directa de una solución acuosa diluida (ca. 0.1 ppm) de monolaurato de sacarosa (Fluka) en el espectrómetro de masas con la sonda ESI operando en modo de ionización positiva. En estas condiciones, los analitos polares que no poseen grupos funcionales básicos, suelen detectarse típicamente como aductos del analito con cationes sodio, incluso aunque no se hayan añadido sales sódicas para dopar la muestra (Cech et al., 2001). La formación de aductos con sodio estables se ha observado por ejemplo, en estudios LC/MS de oligosacáridos (Liu et al., 2005). Por tanto, es de esperar que el principal ión molecular observable para el monolaurato de sacarosa tenga una relación $m/z = 547$ ($[M+Na]^+ = 524 + 23$).

La figura 1 confirma como efectivamente, en ausencia de sales dopantes, el monolaurato de sacarosa forma un aducto con sodio. En el espectro se puede observar también el aducto con potasio ($[M+K]^+ = 524 + 39 = 563$) aunque con una abundancia casi despreciable en relación al aducto con sodio. La técnica de ionización ESI produce

iones pseudomoleculares y poca o nula fragmentación ya que es un método de ionización suave (de Hoffmann et al., 2001). No obstante se puede inducir la fragmentación en la fuente ESI mediante disociación inducida por colisión (CID) aumentando el voltaje del cono de muestra. Las colisiones en la región CID (entre el cono de muestra y el cono de extracción en el espectrómetro de masas Waters Micromass ZQ) imparten cantidades relativamente pequeñas de energía a los iones y por tanto los que se fragmentan más son aquellos que poseen enlaces débiles y producen productos estables (Ashcroft, 1997). En el caso del monolaurato de sacarosa, en la figura 1 se observa claramente el efecto de la fragmentación al aumentar el voltaje de cono.

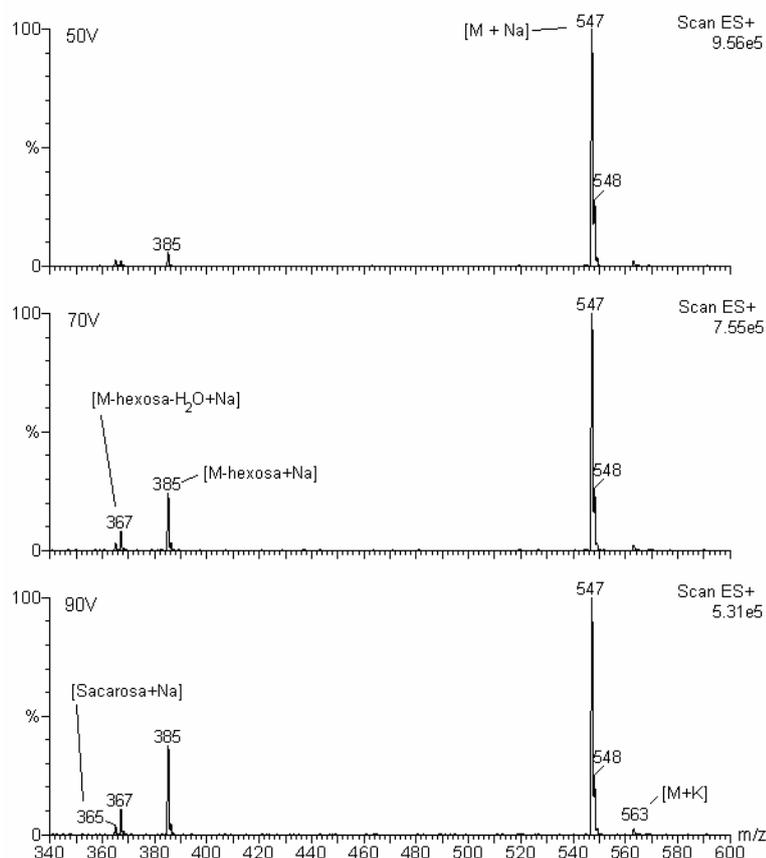
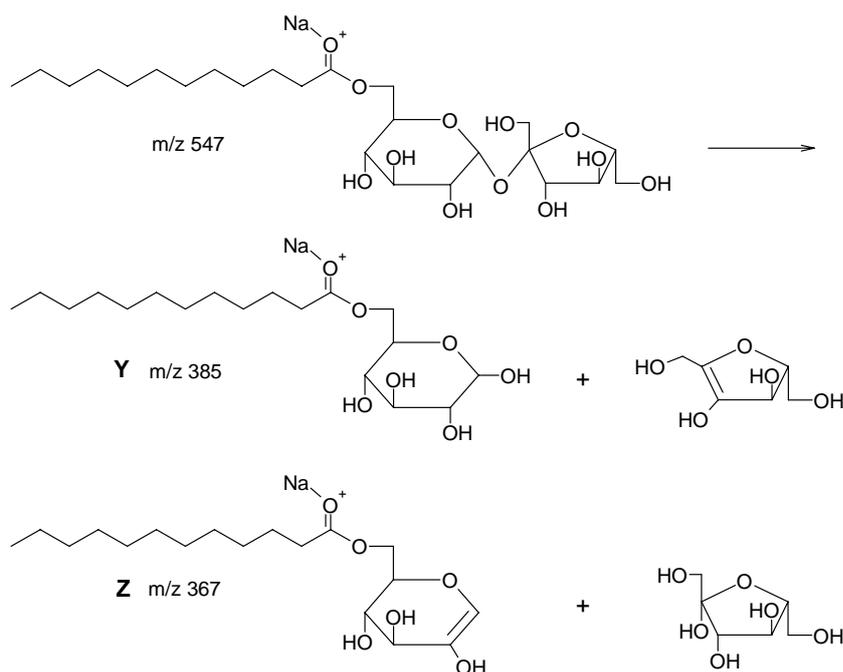


Figura 1. Espectros de masas ESI+ del monolaurato de sacarosa (Fluka) a distintos voltajes de cono.

Los iones de m/z 385 y 367 se originan a partir del ión $[M+Na]^+$ por pérdida de una hexosa o (hexosa - H₂O) neutras. Esta fragmentación es la misma que se ha observado para el mismo compuesto (de la misma casa comercial) por espectrometría de masas FAB con activación por colisión (de Koster et al., 1993). La principal reacción de fragmentación es la pérdida de C₆H₁₀O₅ dando lugar a la formación del catión m/z 385 (esquema 1). En esta reacción se rompe el enlace glicosídico entre las unidades de

fructosa y glucosa, con transferencia de hidrógeno concomitante y retención del átomo de O glicosídico en el ión que contiene el aglicón del sucroéster. Este proceso realmente es una reacción de fragmentación común en los espectros de masas CID de glicoconjugados. Según la nomenclatura de Domon y Costello (Domon et al., 1988), estos iones se asignan como iones fragmento Y. El ión m/z 367, ión fragmento Z, se origina de la ruptura del enlace glicosídico con retención del átomo de oxígeno en la hexosa neutra que se libera (esquema 1). Este fragmento también puede producirse en un proceso en dos etapas a partir de la pérdida de H_2O del correspondiente ión Y. Es importante indicar que la abundancia de los fragmentos en los espectros de la figura 1 es mucho menor que la que podría observarse en un equipo capaz de realizar espectros de masas en tándem, equipado con cámara de colisión (capaz de proporcionar mucha mayor energía a los iones que el simple aumento del voltaje del cono de muestra). El ión que aparece en el espectro con m/z 365 corresponde al aducto con sodio de la sacarosa que se encuentra como impureza en la muestra comercial (Cruces et al., 2001)

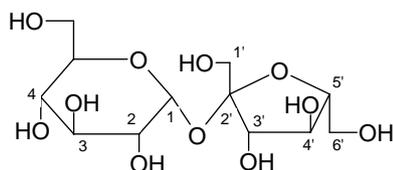


Esquema 1. Fragmentación del aducto con sodio del monolaurato de sacarosa (ejemplo del regioisómero en 6) a través del enlace glicosídico (según de Koster et al., 1993).

Obviamente el espectro de la figura 1 corresponde a una mezcla de regioisómeros y por tanto, a la hora de desarrollar el método de detección cromatográfica hay que ser cautos y tener en cuenta que la abundancia de los fragmentos puede diferir ligeramente entre distintos regioisómeros.

Optimización de la separación cromatográfica y desarrollo del método LC/ESI/MS

La sacarosa posee ocho grupos hidroxilo (esquema 2) y por tanto existen ocho posibles regioisómeros de un monoéster del disacárido con un ácido graso de cadena larga determinado.



Esquema 2. Estructura de la sacarosa. Existen ocho posiciones de acilación diferentes

El grupo del profesor Queneau ha planteado la separación de los monoésteres regioisoméricos de sacarosa empleando una columna de HPLC tipo amino (Moliner et al., 2003). Desafortunadamente en la publicación no muestran ningún cromatograma ni aparece ningún comentario sobre la resolución que consiguen –se supone que es más que suficiente para el estudio que describen sobre las migraciones del grupo acilo en medio básico–. Este tipo de fase estacionaria se emplea típicamente para separar oligosacáridos y es bastante específica, mientras que las columnas de fase reversa son más comunes (entre otras razones por ser más económicas) en un laboratorio de análisis general. En este trabajo se planteó la separación de los regioisómeros en una columna de las empleadas habitualmente en fase reversa (ver materiales y métodos).

Dado que formalmente los distintos regioisómeros tienen el mismo balance hidrofílico-lipofílico (HLB) y estructuralmente son muy similares, es evidente que conseguir una resolución satisfactoria en la separación de los mismos no es una tarea sencilla. Para optimizar las condiciones de separación se utilizó nuevamente el monolaurato de sacarosa de Fluka. Para poder establecer la abundancia relativa de cada regioisómero en la muestra se requiere que todos ellos tengan la misma respuesta en el detector, es decir, que presenten la misma ionización. Este requisito fundamental obliga a utilizar la fase móvil en condiciones isocráticas y a flujo constante para eliminar cualquier posible diferencia en la ionización de distintos regioisómeros por efecto del disolvente. Dado que en ausencia de aditivos estos compuestos forman fácilmente aductos con cationes sodio, detectables en modo ESI positivo, no es necesario añadir ningún tipo de sal a la fase móvil para fomentar la ionización de los analitos lo cuál es una gran ventaja desde

el punto de vista técnico. Por otra parte si se emplearan tampones ligeramente básicos se podrían producir migraciones del grupo acilo intramoleculares durante la propia elución lo que desvirtuaría el resultado (Molinier et al., 2003). Como la sensibilidad en LC/ESI/MS depende de la velocidad de flujo de eluyente (es mayor cuanto menor sea el flujo), ésta se fijó a 0.3 ml/min. Tras realizar distintos ensayos con mezclas metanol/agua y acetonitrilo/agua se encontró que la composición óptima de la fase móvil para la separación de los distintos regioisómeros presentes en el monolaurato de sacarosa de Fluka era acetonitrilo/agua 48:52 (v/v). La resolución alcanzada en estas condiciones es muy satisfactoria (figura 2).

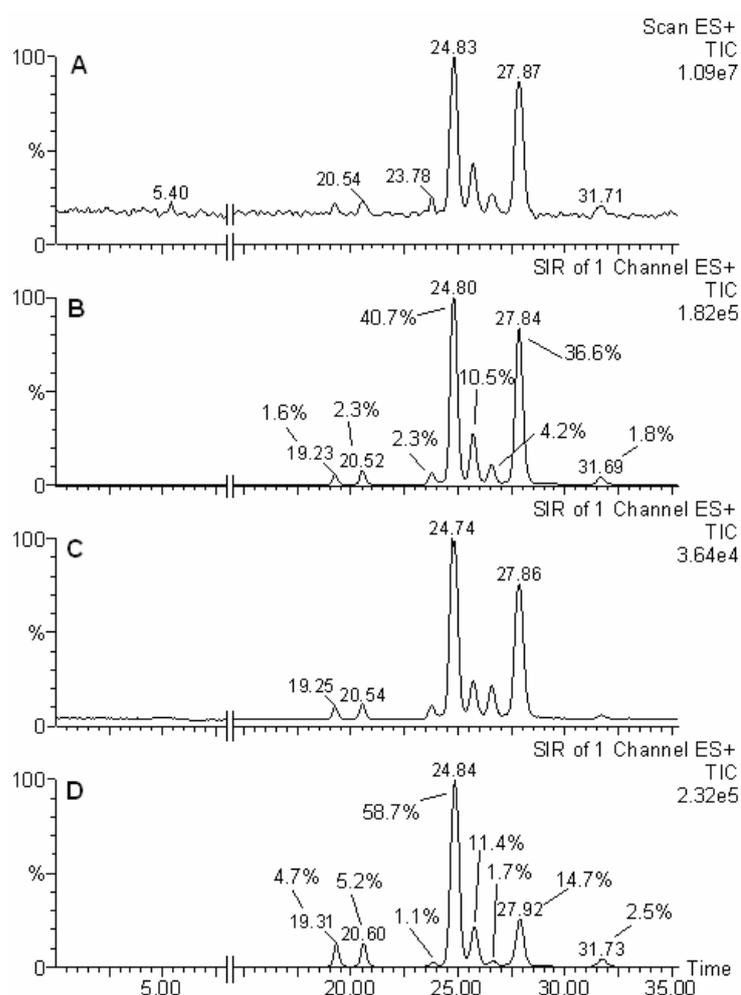


Figura 2. Cromatograma del monolaurato de sacarosa de Fluka (A, B y C) y el purificado a partir de L-1695 de Mitsubishi Kagaku Foods Corp. (D). Se utilizó como fase móvil acetonitrilo/agua (48:52, v/v) a 0.3 ml/min. La detección se hizo en modo Scan (barrido de m/z de 350 a 570) con un voltaje de cono de 50V en el cromatograma A y en modo SIR en el resto seleccionando los siguientes iones: m/z 547 a 50V (B y D) y m/z 385 a 90V (C).

En los cromatogramas de la figura 2 se aprecian perfectamente ocho picos diferentes correspondientes a los ocho posibles regioisómeros (el pequeño pico que puede observarse a 5.40 min. en el cromatograma A corresponde a la sacarosa presente como impureza en la muestra). Los cromatogramas adquiridos en modo SIR tienen una relación señal/ruido mucho mayor que el adquirido en modo Scan y por tanto son más adecuados para realizar la integración de los picos. Las posibles diferencias comentadas anteriormente en la intensidad de los fragmentos para distintos regioisómeros se ponen de manifiesto al comparar el cromatograma B (seleccionando el ión molecular m/z 547, a un voltaje de cono de 50V) con el cromatograma C (seleccionando el fragmento m/z 385, a un voltaje de cono de 90V), especialmente si nos fijamos en los dos picos entre 25.5 y 27 minutos. Por tanto, es más fiable realizar la integración sobre el cromatograma adquirido en modo SIR seleccionando el ión molecular $[M+Na]^+$ trabajando a un voltaje de cono de 50V en el que se obtiene la máxima intensidad para el ión molecular y apenas se produce fragmentación y como consecuencia se elimina este posible factor diferencial en la respuesta de distintos regioisómeros.

Cumpliendo el requisito de igual respuesta en el detector, se puede determinar la abundancia relativa de cada regioisómero en la muestra mediante integración según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ regioisómero "X"} = [(\text{Área pico regioisómero "X"})/(\Sigma \text{Área todos los picos})] \times 100\%$$

Así se ha determinado la distribución de regioisómeros en el monolaurato de Fluka (cromatograma B) y en el de Mitsubishi Kagaku Food Corp (cromatograma D). Se utilizó en todos los casos el algoritmo de integración automática del software MassLynx 3.5.

Para identificar los regioisómeros concretos que corresponden a algunos picos en los cromatogramas de las muestras comerciales del monoéster se compararon los tiempos de retención con los obtenidos en el cromatograma de distintas muestras de monolaurato de sacarosa en las que predomina un regioisómero determinado debido a la regioselectividad de la reacción de acilación mediante la cual se han preparado. Según se ha descrito en bibliografía en la síntesis de monolaurato de sacarosa se obtienen predominantemente los siguientes regioisómeros según el tipo de biocatalizador empleado: 6-O-lauroilsacarosa con catálisis por la lipasa de *Thermomyces lanuginosus*,

Lipozyme TL IM de Novozymes (Ferrer et al., 2005); 1'-O-lauroilsacarosa con catálisis de la proteasa cruda de *Bacillus subtilis*, Proteinase N de Fluka (Potier et al., 2001); 6-O-lauroilsacarosa y 6'-O-lauroilsacarosa (en relación casi equimolar) con catálisis por la lipasa B de *Candida Antarctica*, Novozym 435 de Novozymes (Woudenberg-van Oosterom et al., 1996). También se ha descrito que con catálisis básica utilizando Na_2HPO_4 , el principal regioisómero obtenido es 2-O-lauroilsacarosa, ya que el hidroxilo en posición 2 es el más ácido del disacárido (Cruces et al., 2001). La figura 3 muestra la comparación del cromatograma obtenido con el monolaurato de sacarosa de Fluka y las distintas muestras sintetizadas en laboratorio.

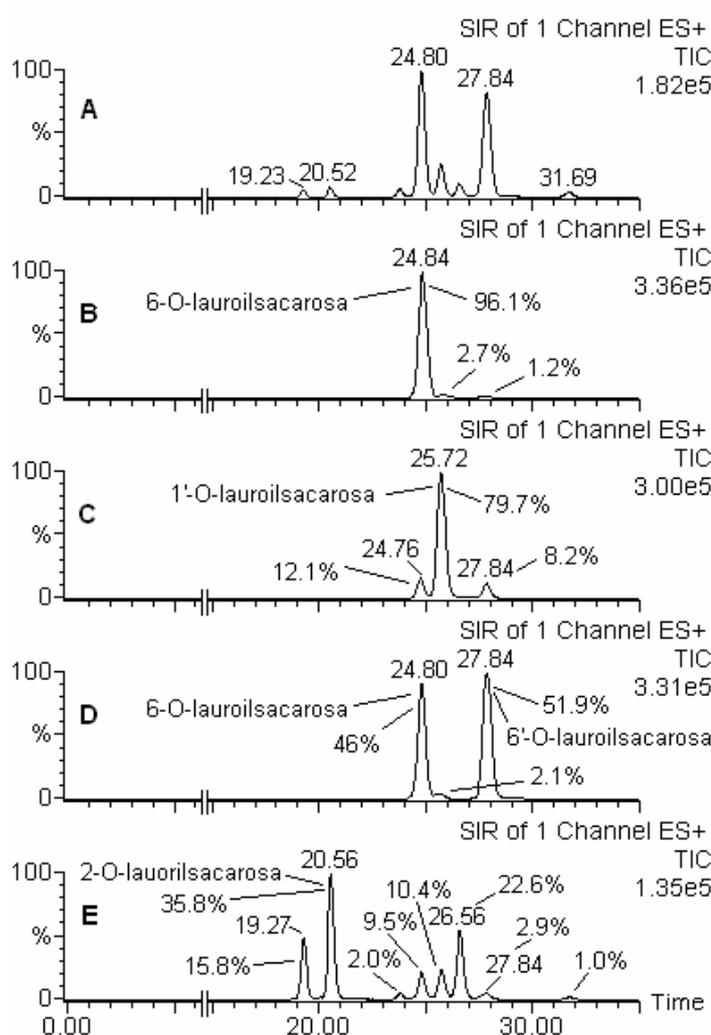


Figura 3. Comparación del cromatograma del monolaurato de sacarosa de Fluka (A) con los obtenidos para las muestras sintetizadas empleando como biocatalizadores las lipasas de *T. lanuginosus* (B) y *C. antarctica* (D), la proteasa de *B. subtilis* (B) y Na_2HPO_4 como catalizador básico (E). Se indica la asignación del regioisómero principal de cada muestra y también se muestra la abundancia relativa de todos los componentes de la misma. Se utilizó como fase móvil acetonitrilo/agua (48:52, v/v) a 0.3 ml/min y la detección se hizo en modo SIR seleccionando el ión m/z 547 a un voltaje de cono de 50V.

La reproducibilidad en los tiempos de retención es excelente lo cuál permite identificar a 6-O-lauroilsacarosa y 6'-O-lauroilsacarosa como los principales regioisómeros presentes en la muestra de monolaurato de sacarosa de Fluka; en la correspondiente muestra de Mitsubishi Kagaku Food Corp. el regioisómero en 6 es el principal componente. Los cromatogramas B a D en la figura 3 demuestran que el método cromatográfico desarrollado es una manera muy poderosa para determinar la regioselectividad enzimática en la reacción de acilación de la sacarosa.

Para mostrar como el método LC/ESI/MS se puede adaptar fácilmente a otros monoésteres de sacarosa de diferente balance HLB se analizó la distribución de regioisómeros en una muestra comercial de monodecanoato de sacarosa (Fluka) y otra muestra de monopalmitato de sacarosa purificado a partir del sucroéster comercial D-1615 de Mitsubishi Kagaku Food Corp. Las únicas modificaciones que se requieren son unas ligeras variaciones en la composición de la fase móvil (mayor proporción de acetonitrilo cuanto mayor sea el tamaño de la cadena de ácido graso en el sucroéster), obviamente seleccionando el ión $[M+Na]^+$ que aplique para cada caso en función del peso molecular del analito. La figura 4 muestra la separación de los ocho regioisómeros presentes en ambas muestras. La similitud en el perfil de cada cromatograma con el de los correspondientes monolauratos de las mismas casas comerciales demuestra que se ha empleado el mismo procedimiento de acilación de la sacarosa en cada caso.

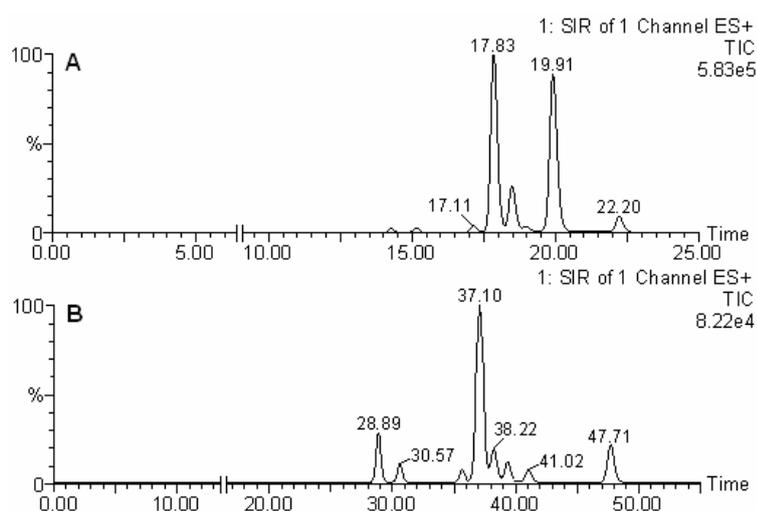
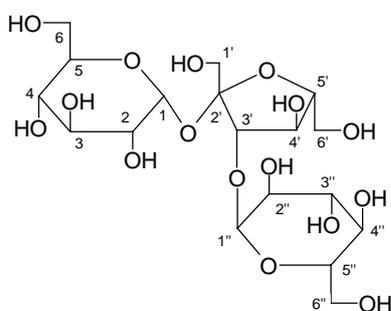


Figura 4: Cromatograma del monodecanoato de sacarosa de Fluka (A) y del monopalmitato de sacarosa purificado a partir de D-1615 de Mitsubishi Kagaku Foods Corp. (B). Para el cromatograma A se utilizó como fase móvil acetonitrilo/agua (43:57, v/v) a 0.3 ml/min, seleccionando en el detector el ión m/z 519 (con un voltaje de cono de 50V). Para el cromatograma B se utilizó como fase móvil acetonitrilo/agua (62:38, v/v) con la misma velocidad de flujo, seleccionando en el detector el ión m/z 603 aplicando también un voltaje de cono de 50V.

Comparativa del método LC/ESI/MS con la espectroscopía RMN de ^{13}C de rutina como metodología para la determinación de la regioselectividad en reacciones de acilación de oligosacáridos catalizadas por enzimas

Los datos sobre regioselectividad en reacciones de acilación de carbohidratos catalizadas por enzimas, basados exclusivamente en RMN de ^{13}C de rutina que aparecen usualmente en bibliografía son aproximados (Riva et al., 1998) y menos exactos que los que se pueden obtener con el método LC/ESI/MS aquí desarrollado. Como se ha presentado anteriormente, la alta sensibilidad cromatográfica que se consigue con el registro de la señal en modo SIR permite la detección de regioisómeros presentes en la muestra en una proporción muy baja; por el contrario, las intensidades observadas en un espectro de RMN de ^{13}C de rutina son muy dependientes del número de “scans” utilizados en la adquisición (Claridge, 1999) lo que puede provocar que algunos regioisómeros minoritarios ni siquiera aparezcan en el espectro. Además, un carbono determinado del carbohidrato puede presentar diferentes tiempos de relajación según el regioisómero de que se trate y tampoco se puede descartar la posibilidad de isocronía en determinados carbonos del carbohidrato al pasar de un regioisómero a otro.

Para ilustrar la superioridad del método LC/ESI/MS sobre la espectroscopía RMN- ^{13}C de rutina para la determinación de la regioselectividad de reacciones de acilación de oligosacáridos catalizadas por enzimas, se muestra a continuación una comparativa de ambas metodologías para el caso de la acilación del trisacárido melecitosa con laurato de vinilo, empleando como biocatalizador la lipasa B de *C. antarctica*, Novozym 435 (ver Anexo II).



Esquema 3. Estructura de la melecitosa. Existen once posiciones de acilación diferentes, no obstante, los cuatro hidroxilos primarios son los más reactivos en la reacción de acilación con la lipasa.

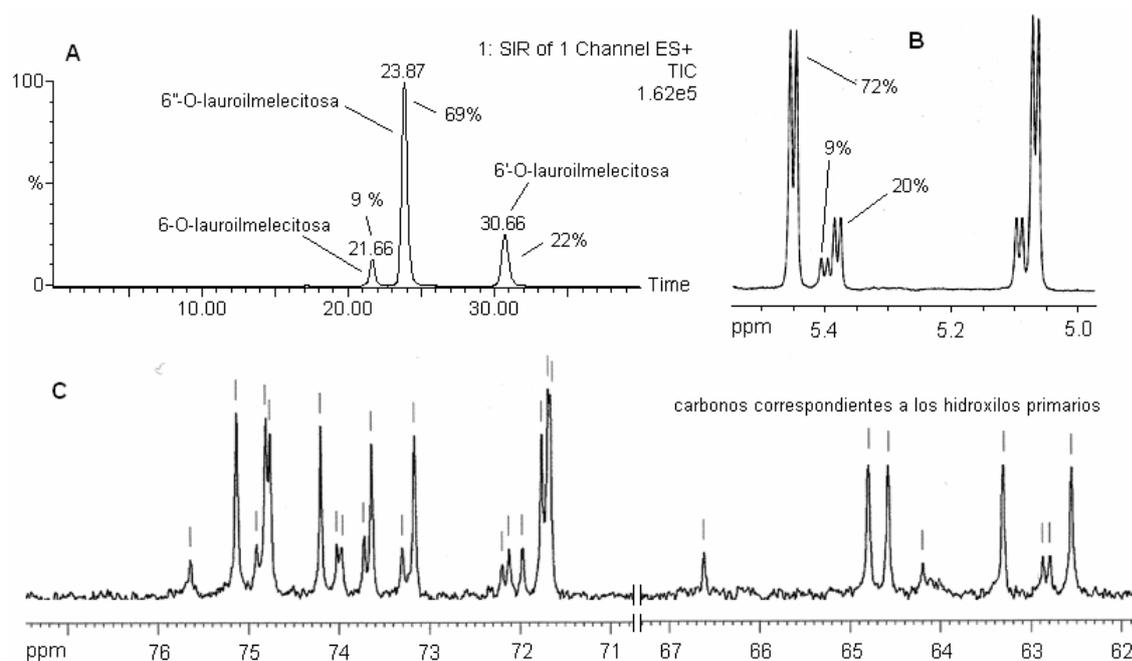


Figura 4. (A). Cromatograma con la distribución de regioisómeros presentes en el monolaurato de melecitosa preparado con catálisis de Novozym 435. Se utilizó como fase móvil acetonitrilo/agua (35:65, v/v) a una velocidad de flujo de 1.1ml/min (con “split” postcolumna antes del detector) seleccionando en el detector el ión m/z 709 a un voltaje de cono de 40V. (B) Ampliación de la región anómerica en el espectro RMN-¹H del mismo producto. (C) Ampliación de parte del espectro RMN-¹³C incluyendo la región de las posiciones aciladas.

Para analizar el monolaurato de melecitosa aislado tras la reacción, se utilizó el método LC/ESI/MS con algunas modificaciones. El flujo de fase móvil se aumentó hasta 1.1 ml/min realizando una división del mismo con un divisor postcolumna de manera que al detector llegasen 0.20 ml/min, obteniéndose el mismo nivel de sensibilidad que con los monoésteres de sacarosa. Dado que se trata de un compuesto bastante más polar que los estudiados anteriormente, se aumentó la proporción de agua en la fase móvil, usándose una relación acetonitrilo/agua 35:65 (v,v). La detección se realizó en modo SIR seleccionando el ión m/z 709 a un voltaje de cono de 40V (a 50V se produce algo más de fragmentación que en los casos anteriores, siendo pues preferible trabajar a un voltaje más bajo). La figura 4A muestra el cromatograma con la distribución de regioisómeros presentes en la muestra (ver Anexo II para la asignación de los picos). Se observan claramente tres regioisómeros; sin embargo, en el espectro de RMN de ¹³C de rutina (Fig. 4C) sólo aparecen dos. Por ejemplo, si se observa la región de los carbonos correspondientes a los cuatro hidroxilos primarios (los hidroxilos más reactivos con la lipasa) se observan dos grupos de señales, las cuatro más intensas corresponden al regioisómero mayoritario y las cuatro de baja intensidad al siguiente regioisómero en

abundancia presente en la muestra. Sin embargo, no aparecen las señales del regioisómero minoritario, probablemente porque se confundan con el ruido del espectro y también porque alguna pueda ser isócrona con las de los otros regioisómeros. Este ejemplo pone claramente de manifiesto que la regioselectividad determinada por RMN de ^{13}C de rutina, es menos precisa que la que se obtiene con el método LC/ESI/MS. La figura 4B muestra la ampliación de la región anomérica en el espectro RMN- ^1H , los tres dobletes en torno a 5.4 ppm corresponden al protón anomérico de la glucosa unida 1→2 a la fructosa para cada uno de los tres regioisómeros presentes en la muestra. Se puede determinar la abundancia relativa de cada regioisómero a partir de la integración de cada señal, realizada con la altura de la señal y no con la típica integración empleada en RMN debido al solapamiento de dos de los tres dobletes, de manera análoga a como se hace en el método cromatográfico. Los valores obtenidos que se indican en la figura se correlacionan bastante bien con los obtenidos a partir del cromatograma y por tanto de algún modo validan el método. Para poder establecer la distribución de regioisómeros a partir del espectro de RMN de ^1H , hay que seleccionar la señal de algún protón bien diferenciado en su desplazamiento químico del resto. En este tipo de compuestos los protones anoméricos son una buena elección. En segundo lugar, se requiere que dicho protón resuene a frecuencias diferentes según el regioisómero de que se trate. Este requisito no siempre se cumple, como ejemplo sirvan los dos dobletes que aparecen en la figura 4B a la derecha, justo por encima de 5.0 ppm. Estas señales corresponden al protón anomérico de la otra unidad de glucosa del trisacárido. Dado que existen tres regioisómeros en la muestra se esperarían tres dobletes para este protón, sin embargo sólo aparecen dos debido a que este protón presenta isocronía en el caso de los regioisómeros mayoritario y minoritario. Por tanto, el establecimiento de la distribución de regioisómeros a partir del espectro de RMN de ^1H exclusivamente, también presenta sus limitaciones dado que no siempre será posible encontrar un protón (o protones) cuya señal sea adecuada para realizar la integración. Obviamente, la posibilidad de isocronía entre protones determinados del carbohidrato en distintos regioisómeros, es mucho mayor que la que pueda darse en los carbonos debido a que el intervalo de frecuencias del espectro es mucho menor en el caso de la RMN de ^1H .

Conclusiones

Aunque es necesario recurrir a la espectroscopía de RMN de ^{13}C para poder elucidar la posición de sustitución en el regioisómero mayoritario en reacciones de síntesis de monoésteres de carbohidratos con catálisis enzimática, a la hora de establecer el porcentaje de todos los regioisómeros producidos en la reacción, incluidos los minoritarios, resulta mucho más conveniente utilizar el método LC/ESI/MS que se ha discutido en este trabajo, ya que presenta una mayor sensibilidad y precisión. Además, al requerirse cantidades muy pequeñas de muestra (al contrario que para la espectroscopía RMN de ^{13}C), resulta un método muy adecuado cuando interese realizar un “screening” de distintas hidrolasas para buscar la que produzca mayor regioselectividad, o aquellas que produzcan regioselectividades diferentes, en la reacción de acilación de un carbohidrato determinado. Para esta aplicación no sería necesario aislar el producto de la reacción, pudiéndose realizar el análisis cromatográfico a partir de alícuotas de la reacción con un simple tratamiento de muestra para eliminar el disolvente y el exceso de agente acilante. En los anexos siguientes se ha determinado la regioselectividad de las distintas reacciones de acilación enzimática de oligosacáridos con el método LC/ESI/MS objeto de este trabajo.

Referencias bibliográficas

- Ashcroft AE.** (1997) Ionization methods in organic mass spectrometry. *The Royal Society of Chemistry*. Cambridge, UK.
- Cech ND, Enke CG.** (2001) Practical implications of some recent studies in electro spray ionization fundamentals. *Mass Spectrom. Rev.* 20: 362-387.
- Claridge TDW.** (1999) High-Resolution NMR techniques in organic chemistry. *Pergamon*. Oxford, UK.
- Cruces MA, Plou FJ, Ferrer M, Bernabé M, Ballesteros A.** (2001) Improved synthesis of sucrose fatty acid monoesters. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 78: 541-546.
- de Hoffman E, Stroobant V.** (2001) *Mass spectrometry: principles and applications*. Second edition. John Wiley & Sons.
- de Koster CG, Pajarron AM, Heerma W, Haverkamp J.** (1993) Fast atom bombardment mass spectrometry of sucrose monocaprato and sucrose monolaurate. *Biol. Mass Spec.* 22: 277-284.

- Domon B, Costello CE.** (1988) A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. *Glycoconjugate J.* 5: 397–409.
- Ferrer M, Cruces MA, Bernabé M, Ballesteros A, Plou FJ.** (1999) Lipase-catalyzed regioselective acylation of sucrose in two-solvent mixtures. *Biotechnol. Bioeng.* 65: 10-16.
- Ferrer M, Soliveri J, Plou FJ, López-Cortés N, Reyes-Duarte D, Christensen M, Copa-Patiño JL, Ballesteros A.** (2005) Synthesis of sugar esters in solvent mixtures by lipases from *Thermomices lanuginosus* and *Candida antarctica* B, and their antimicrobial properties. *Enzyme Microb. Tehcnol.* 36: 391-398.
- Garofalakis G, Murray BS, Sarney DB.** (2000) Surface activity and critical aggregation concentration of pure sugar esters with different sugar headgroups. *J. Colloid Interf. Sci.* 229: 391-398.
- Kadereit D, Waldmann H.** (2001) Enzymatic protecting group techniques. *Chem. Rev.* 101: 3367-3396.
- Karrer R, Herberg H.** (1992) Analysis of sucrose fatty acid esters by high temperature gas chromatography. *J. High Resol. Chromatogr.* 15: 585-589.
- Lerk PC, Sucker HH, Eicke HF.** (1996) Micellization and solubilization behaviour of sucrose laurate, a new pharmaceutical excipient. *Pharm. Dev. Technol.* 1: 27-36.
- Liu Y, Urganar S, Verkade JG, Armstrong DW.** (2005) Separation and characterization of underivatized oligosaccharides using liquid chromatography and liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1079: 146-152.
- Molinier V, Wisniewski K, Bouchu A, Fitremann J, Queneau Y.** (2003) Transesterification of sucrose in organic medium: study of acyl group migrations. *J. Carbohydr. Chem.* 22: 657-669.
- Polat T, Lindhardt RJ.** (2001) Synthesis and applications of sucrose-based esters. *J. Surf. Det.* 4: 415-421.
- Potier P, Bouchu A, Gagnaire J, Queneau Y.** Proteinase N-catalyzed regioselective esterification of sucrose and other mono- and disaccharides. *Tetrahedron: Asymmetry.* 12: 2409-2419.
- Riva S, Nonini M, Ottolina G, Danieli B.** (1998) Subtilisin-catalyzed esterification of di- and oligosaccharides containing a D-fructose moiety. *Carbohydr. Res.* 314: 259-266.

Woudenberg-van Oosterom M, van Rantwijk F, Sheldon RA. (1996) Regioselective acylation of disaccharides in *tert*-butyl alcohol catalyzed by *Candida antarctica* lipase. *Biotechnol. Bioeng.* 49: 328-333.

Zhu J, Shi Z. (2003) ESI-MS studies of polyether surfactant behaviours in reversed-phase HPLC system. *Int. J. Mass Spectrom.* 226: 369-378. Koster CG

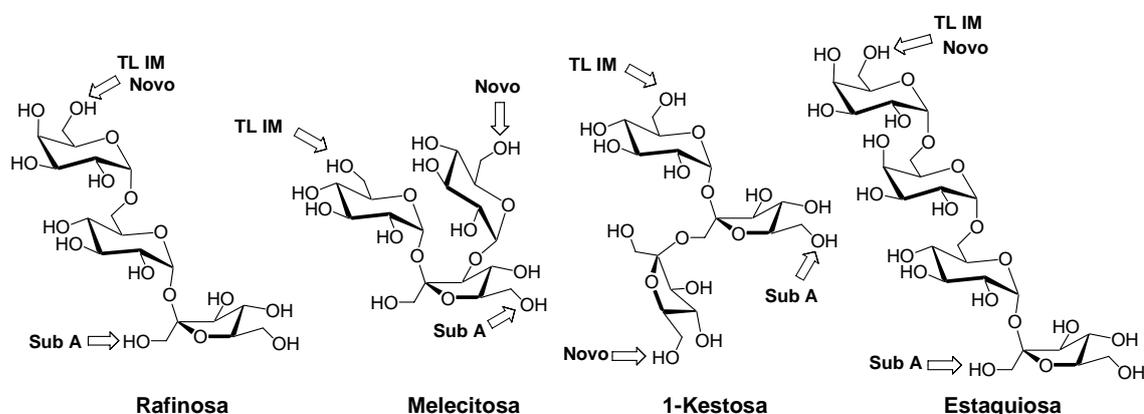
ANEXO II

Esterificaciones regioselectivas complementarias de oligosacáridos no reductores catalizadas por distintas hidrolasas.

Tetrahedron, 62 (2006): 878-886

Resumen

En este trabajo se describe la transesterificación enzimática de los trisacáridos rafinosa, melecitosa y 1-kestosa, y el tetrasacárido estaquiosa, con laurato de vinilo. Se han empleado las lipasas de *Candida antarctica* B (Novozym 435) y *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme TL IM), y la proteasa alcalina de *Bacillus licheniformis* (subtilisina Carlsberg) con cada carbohidrato para obtener diferentes regioisómeros. Mediante el empleo de los azúcares en forma amorfa, se consigue su completa solubilidad en el medio de reacción (mezclas t-butanol/piridina para las lipasas y piridina para la proteasa) y se obtiene un rendimiento alto de los correspondientes monoésteres. La regioselectividad observada para todas las enzimas es satisfactoria, incluso excelente en algunos casos, mostrando un dibujo final de complementariedad respecto a los hidroxilos primarios de los oligosacáridos estudiados. En las siguientes páginas se reproduce el artículo publicado.



Novo = Novozym 435 ; TL IM = Lipozyme TL IM ; Sub A = M β CD-Subtilisina Carlsberg

Complementary regioselective esterification of non-reducing oligosaccharides catalyzed by different hydrolases

Ignacio Pérez-Victoria^{a,b} and Juan Carlos Morales^{a,*}

^aDepartamento de Química, Puleva Biotech, S. A., 18004 Granada, Spain

^bDepartamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, 18071 Granada, Spain

Received 14 September 2005; revised 17 October 2005; accepted 18 October 2005

Available online 7 November 2005

Abstract—The enzymatic transesterification of several tri- and tetrasaccharides with vinyl laurate is described. The lipases from *Candida antarctica* B (Novozym 435) and *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme TL IM) and the alkaline protease from *Bacillus licheniformis* (subtilisin Carlsberg) have been used with each carbohydrate to obtain different regioisomers. By using the sugars in their amorphous form, complete solubility is achieved in the reaction media (*tert*-butanol/pyridine mixtures for the lipases and pyridine for the protease) and high isolated yields of the corresponding monoesters are obtained. Good to excellent regioselectivity is observed for all the enzymes, showing a final complementary picture respect to the primary hydroxyls of the oligosaccharides studied.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Carbohydrate fatty acid esters are non-ionic surfactants with broad applications in food, cosmetic and pharmaceutical industries.¹ They are biodegradable, non-toxic and can be produced from inexpensive and renewable raw materials.² Their emulsifying and surfactant properties³ may be modulated by the type of fatty acid, the sugar moiety, the degree of substitution and the position of attachment to the fatty acid (for instance regioisomeric sucrose monoesters present different CMC values).⁴

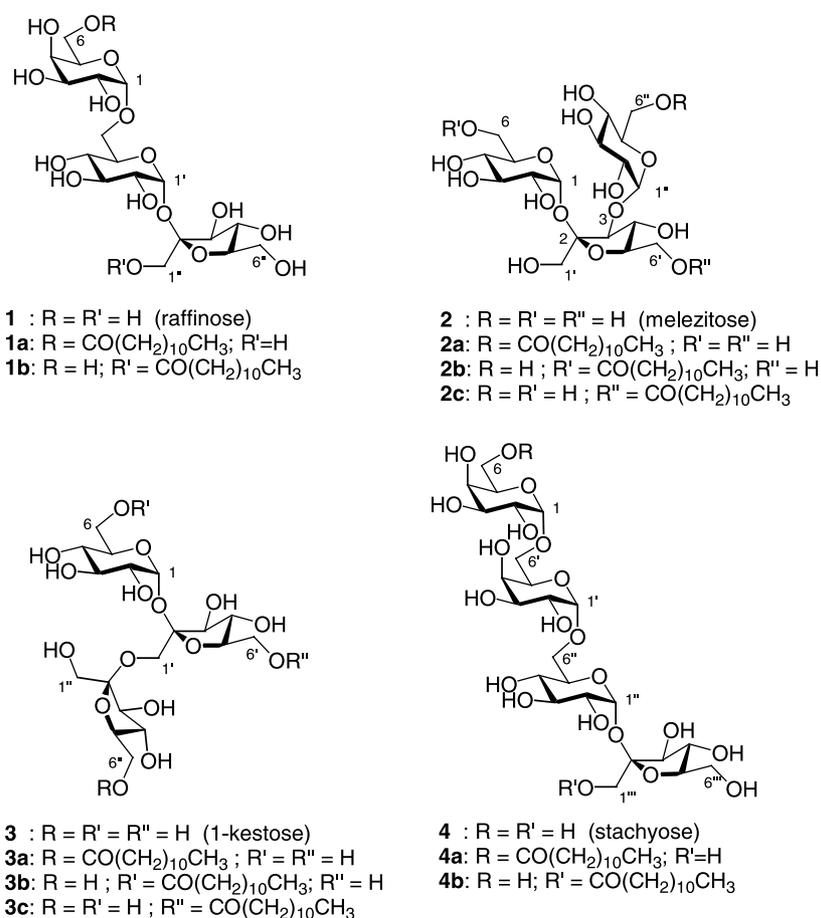
Regioselective chemical acylation of carbohydrates is a particular challenging task due to their multifunctionality.⁵ For this reason, tedious multi-step synthesis based on protection/deprotection reactions is usually required.⁶ The use of enzymes in organic solvents has helped to solve this problem and both, lipases⁷ and proteases⁸ have been employed for the regioselective acylation of carbohydrates.⁹ Different factors affect the activity, stability and selectivity of hydrolases in non-aqueous media.¹⁰ The nature of the solvent is particularly important since a compromise between enzyme activity and saccharide solubility is required. This is even more important in the case of lipases that are active in hydrophobic solvents limiting acylation

mainly to mono- and disaccharides.¹¹ To our knowledge, only three previous examples of enzymatic acylation of tri- and tetrasaccharides have been described in the literature. Riva et al.^{12,13} synthesized a series of esterified tri- and tetrasaccharides by using subtilisin in dimethylformamide and trihaloethyl butyrates as the acylating agents to get ca. 29–50% isolated yields. Subtilisin showed a strong preference towards the regioselective esterification of the primary hydroxyls of the fructose unit in fructose-containing oligosaccharides and to the 6''-OH in the non-reducing glucose of maltotriose. Ferrer et al.¹⁴ prepared long-chain fatty acid esters of maltotriose using the lipase from *Thermomyces lanuginosus* (previously *Humicola Lanuginosa*) in a medium constituted by two miscible solvents (2-methyl-2-butanol/dimethylsulfoxide). The hydroxyl 6''-OH in the non-reducing end of the trisaccharide was acylated in low yields with 20% DMSO mixtures. Higher yields could be obtained by using 5% DMSO mixtures, but 10% of diesters were formed under these reaction conditions. Recently, Gustavsson et al.¹⁵ reported similar reaction conditions using the lipase from *Candida antarctica* B for the transesterification of xyloglucan oligosaccharides mixtures with vinyl stearate obtaining 14% yield and some disubstitution (less than 10% of the total acylated products).

We were interested in preparing fatty acid esters of tri- and tetrasaccharides in order to study the relevance of the specific carbohydrate, its size and acylation position in the physicochemical properties of this type of non-ionic

Keywords: Oligosaccharide acylation; subtilisin Carlsberg; Lipases; *Candida antarctica*; *Thermomyces lanuginosus*; Transesterification; Regioselectivity.

* Corresponding author. Tel.: +34 958 240320; fax: +34 958 240160; e-mail: jcmorales@pulevabiotech.es



Scheme 1.

surfactants. Moreover, recently reported antibacterial activity of 6''-O-laurylmaltotriose¹⁶ and antitumoral activity of 6''-O-palmitoylmaltotriose¹⁷ confirm the interest in developing selective methods for the preparation of large-oligosaccharide fatty acid esters. In this work, we present the enzymatic transesterification of the non-reducing oligosaccharides raffinose, melezitose, 1-kestose and stachyose with vinyl laurate. The reactions were performed in *tert*-butanol/pyridine mixtures with lipases from *Thermomices lanuginosus* (Lipozyme TL IM) and from *Candida antarctica* B (Novozym 435), and in pyridine with the alkaline protease from *Bacillus licheniformis* (subtilisin Carlsberg). The three enzymes studied gave high isolated yields of the sugar monoesters and only small amounts of diesters were produced. Regioselectivity for each oligosaccharide and enzyme is also discussed showing a complementary behaviour that allows the access to a particular regioisomer by selecting the appropriate hydrolase.

2. Results and discussion

All the commercially available non-reducing oligosaccharides considered in this investigation contain a sucrose moiety in their chemical structure (Scheme 1). The tri- and tetrasaccharides raffinose (**1**) and stachyose (**4**) can be considered as sucrose molecules substituted at the C-6 hydroxyl group while the trisaccharides melezitose (**2**) and

1-kestose (**3**) can be considered as a C-3' hydroxyl-glucosylated sucrose and a C-1' hydroxyl-fructosylated sucrose, respectively. This common structural feature led us to select the three different hydrolases indicated in the introduction because they have previously shown different regioselectivity in the acylation of sucrose.^{12,18}

In all these enzyme-catalyzed transesterifications, vinyl laurate was chosen as acyl donor. We decided to use the amorphous form of each oligosaccharide obtained by lyophilization to increase the solubility of the sugars in organic solvents with the additional advantage of removing almost all the water of crystallization.¹⁹ The regioisomeric distribution in the isolated products was determined by HPLC/MS (see Supplementary data) and the structure of main regioisomers was established by NMR. The position of esterification was determined by correlation bidimensional analysis ¹H–¹H (COSY) and ¹H–¹³C NMR (HSQC, HMBC) and in some cases using 1D selective TOCSY and HSQC-TOCSY experiments.

Transesterifications catalyzed by Candida antarctica lipase B

First, we investigated the esterification of raffinose (**1**) with lipase Novozym 435, an immobilized preparation of *C. antarctica* lipase B on a macroporous acrylic resin. Due to the low solubility of trisaccharides in the relatively

apolar solvents needed to use lipases, we tried a *tert*-butanol/pyridine (55:45) mixture at 60 °C to carry out the enzymatic reaction. The specific ratio of solvents and temperature were selected since Novozym 435 shows the highest enzyme activity in the acylation of glucose with myristic acid in the above reaction conditions.²⁰

Using 0.04 M of **1** and 0.2 M acyl donor as starting concentrations, complete solubilization of the sugar was observed in the reaction media, and 48% isolated yield of raffinose monoester was obtained after 72 h of reaction (Table 1). A small proportion of starting material and diester was also observed by TLC. Analysis of raffinose mono-laurate showed that only the regioisomer possessing the ester substitution at the 6-OH of the galactose unit was formed. The reaction processing is very simple since it only requires filtration, rotary-evaporation of the solvents and column chromatography of the residue. Interestingly, only one regioisomer was obtained, whereas for sucrose this lipase produces a 1:1 mixture of the 6 and 6' esters.¹¹

We extended the same reaction conditions to the other two trisaccharides: melezitose (**2**) and 1-kestose (**3**). Similarly to raffinose, a small proportion of diester and remaining starting sugar was detected by TLC. The isolated yield of monoester was 38% for melezitose and 54% for 1-kestose. The acylation of melezitose went preferentially to the 6''-OH of the glucose linked 1→3 to the fructose (69% selectivity), to some extent to the 6'-OH of the fructose unit (22% selectivity) and a small proportion to the 6-OH of the other glucose residue (9% selectivity). In the case of 1-kestose, the esterification goes to the 6''-OH of the terminal fructose with high selectivity (90%), with only 7% to the 6'-OH of the middle fructose and 3% of other regioisomers. It is remarkable the strong preference for the fructofuranosyl ring compared with the results obtained with raffinose and melezitose.

The tetrasaccharide stachyose (**4**) was the last carbohydrate tested. We used slight modifications in the reaction conditions (see Table 1) in order to achieve complete solubility of this larger oligosaccharide. After 8 days the majority of the sugar remained unreacted (as seen by TLC) giving the lowest yield (26%) of isolated monoester amongst all the oligosaccharide tested. The regioselectivity partially correlates with that observed for raffinose; 79% of the esterification went to the 6-OH of the terminal galactose and 14% to the 6'''-OH of the fructose unit.

Transesterifications catalyzed by *Thermomices lanuginosus* lipase

Next, we studied the esterification of the selected oligosaccharides with the immobilized form of *T. lanuginosus* lipase on granulated silica (currently commercialized under the trade name Lipozyme TL IM). We selected this type of immobilization since it has higher selectivity to monoesters than other supported preparations when used in the synthesis of sucrose esters in two-solvent mixtures.²¹ In addition, it has been reported¹⁸ that lipases from *T. lanuginosus* and *C. antarctica* acylate sucrose in the same 2-methyl-2-butanol/DMSO mixtures. This observation lead us to use Lipozyme TL IM in the same *tert*-butanol/pyridine reaction mixtures described above for Novozym 435.

When we carried out the esterification reaction with Lipozyme TL IM for raffinose (**1**), the same regioisomer as for lipase Novozym 435 was obtained, but the isolated yield was much higher (79%) and the reaction time much shorter (24 h). Actually, the conversion of the reaction was 89% as determined by HPLC and no diester formation was detected (by TLC or HPLC) even at prolonged reaction times (Fig. 1).

In the case of trisaccharides melezitose (**2**) and 1-kestose (**3**), similar reactivity was found for both sugars, although this was lower than for raffinose, requiring longer reaction time to reach the plateau of conversion (Fig. 1). The isolated yield of monoester after 72 h was 54% for melezitose and 57% for 1-kestose. Some starting material remained unreacted and only traces of diester were observed. The preferred position of acylation in the case of melezitose was the 6-OH of the glucose linked 1→2 to the fructose (61% selectivity) while partial acylation occurred at the primary hydroxyl of the other glucose unit (33% selectivity) and at the fructosyl 6'-OH (4% selectivity). On the other hand, 1-kestose was acylated at the 6-OH of the terminal glucose with 87% selectivity along with 13% of other unidentified regioisomers. This can be considered a high regioselectivity taking into account that 1-kestose has four primary hydroxyls (one more than raffinose) in its structure.

The esterification of the tetrasaccharide stachyose (**4**) with Lipozyme TL IM was also carried out using the same reaction conditions as with Novozym 435. Surprisingly, the initial reaction rate was very similar to the rate observed for **2** and **3** but after 3 days higher isolated yield of monoester was obtained (68%) with an excellent selectivity (96%)

Table 1. Acylation of tri- and tetrasaccharides using Novozym 435 and vinyl laurate as acylating agent

| Carbohydrate | Solvent | Temperature (°C) | Reaction time (h) | Yield (%) | Position of acylation | Selectivity (%) |
|--------------|---------------------------------|------------------|-------------------|-----------|-----------------------------|-----------------|
| Raffinose | <i>t</i> -BuOH–pyridine (55/45) | 60 | 72 | 48 | Galactosyl 6-OH | >99 |
| Melezitose | <i>t</i> -BuOH–pyridine (55/45) | 60 | 72 | 38 | Glucosyl linked 1→3, 6''-OH | 69 |
| | | | | | Fructosyl 6'-OH | 22 |
| | | | | | Glucosyl linked 1→2, 6-OH | 9 |
| Kestose | <i>t</i> -BuOH–pyridine (55/45) | 60 | 72 | 54 | Terminal Fructosyl 6''-OH | 90 |
| | | | | | Middle Fructosyl 6'-OH | 7 |
| Stachyose | <i>t</i> -BuOH–pyridine (50/50) | 65 | 192 | 26 | Galactosyl 6-OH | 79 |
| | | | | | Fructosyl 6'''-OH | 14 |

Yields are referred to isolated monoester and selectivity corresponds to percentage of each regioisomer of saccharide monoester as found by HPLC/MS.

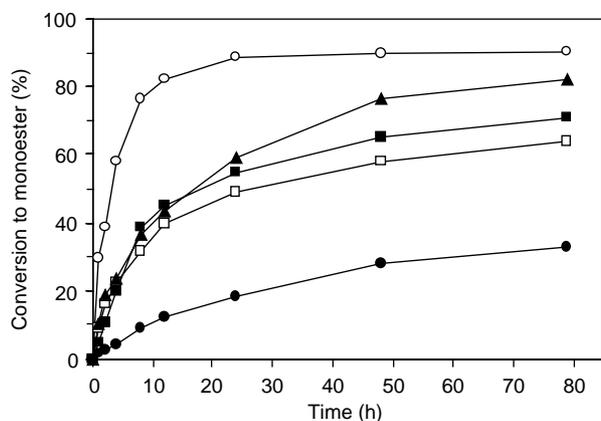


Figure 1. Kinetics of transesterification of the non-reducing oligosaccharides with vinyl laurate catalyzed by Lipozyme TL IM. Conditions: (A) 0.04 M trisaccharide, 0.2 M vinyl laurate, 10 mg/ml biocatalyst, 10 mg/ml 3 Å molecular sieves, *t*-BuOH/pyridine (55:45), 60 °C. [raffinose (○), melezitose (□), 1-kestose (■)]. (B) 0.026 M tetrasaccharide, 0.131 M vinyl laurate, 8 mg/ml biocatalyst, 8 mg/ml 3 Å molecular sieves, *t*-BuOH–pyridine (50/50), 65 °C [stachyose (▲)]. (C) 0.1 M trisaccharide, 0.5 M vinyl laurate 25 mg/ml biocatalyst, 25 mg/ml 3 Å molecular sieves, pyridine, 60 °C [raffinose (●)].

towards the 6-OH of the terminal galactose. A negligible amount of diacylated product was formed in this case.

T. lanuginosus lipase (immobilized on Celite) has previously shown better conversion than Novozym 435 in the acylation of sucrose with vinyl laurate,¹⁸ what clearly agrees with the results we have obtained for the tri- and tetrasaccharides studied. It is also important to note that our isolated yields (54–79%) are higher than the previously reported in the literature¹⁴ for the transesterification of maltotriose with vinyl laurate employing *T. lanuginosus* lipase (immobilized on Celite) in 2-methyl-2-butanol containing 20% DMSO, although we use longer reaction times and lower substrate concentration, what may be important for scale-up reactions. In any case, the *tert*-butanol/pyridine mixtures seem to be a good reaction media. In fact, we have observed that Lipozyme TL IM has significant activity in the transesterification of raffinose in pyridine (Fig. 1).

The regioselectivity we have found (Tables 1 and 2) is different for both lipases (with the only exception of raffinose). Although the overall fold and catalytic machinery of the two enzymes are very similar, there are important structural differences that may explain the different behaviour. *C. antarctica* lipase has a large binding pocket and likely no amphiphilic lid over it while in *T. lanuginosus*

lipase the binding pocket is less spacious and occluded by an helical lid.^{22,23} Furthermore, computational studies of sucrose transesterification with vinyl laurate catalyzed by these lipases²⁴ have shown that not only the different binding pocket shape but also the different motion of the pocket during catalysis may explain the different regioselectivity observed with each lipase.

Transesterifications catalyzed by subtilisin Carlsberg

It has been reported that co-lyophilization of subtilisin Carlsberg with methyl- β -cyclodextrin (M β CD) improves the enzyme activity and enantioselectivity in organic solvents.²⁵ This form of the biocatalyst is superior to both the simple lyophilized powder and the cross-linked enzyme crystals (CLEC) preparations.²⁶ We decided to employ the M β CD-subtilisin Carlsberg preparation in our oligosaccharide acylations expecting to obtain good yields with high levels of regioselectivity.

Subtilisin catalyzes carbohydrate acylation in DMF and pyridine,¹² although the former is a better solvent for oligosaccharides, the use of the amorphous form of the sugars allowed us to employ pyridine at 40 °C facilitating the processing of the reaction. Using 0.2 M of raffinose (1) and 0.6 M of vinyl laurate in the presence of 22 mg/ml biocatalyst under vigorous stirring, high conversion was observed by TLC after 24 h and only traces of diester were noticed. Raffinose monoester was isolated in 74% yield with excellent regioselectivity (98%) towards the 1''-OH of the fructose moiety (Table 3).

Similar reaction conditions were employed for the remaining oligosaccharides. After 48 h, reactions were stopped when traces of diester were observed, although a small amount of starting material remained unreacted. Reaction over the tetrasaccharide stachyose (4) showed a great correlation with that of raffinose producing acylation in the same hydroxyl of the fructose unit (98% selectivity) and similar isolated yield (76%). On the other hand, acylation of melezitose and kestose went preferentially towards the 6'-OH of the central fructose in both cases.

The regioselectivity observed for stachyose is similar to the reported by Riva et al.¹³ for acylation with trifluoroethyl butyrate in DMF, but for raffinose and melezitose our esterification conditions with vinyl laurate produce higher regioselectivity. Furthermore, we have obtained higher isolated yields by using M β CD-subtilisin Carlsberg preparation than those described for carbohydrate acylation using a CLEC preparation of subtilisin²⁷ or a lyophilized

Table 2. Acylation of tri- and tetrasaccharides using Lipozyme TL IM and vinyl laurate as acylating agent

| Carbohydrate | Solvent | Temperature (°C) | Reaction time (h) | Yield (%) | Position of acylation | Selectivity (%) |
|--------------|---------------------------------|------------------|-------------------|-----------|-------------------------------|-----------------|
| Raffinose | <i>t</i> -BuOH–pyridine (55/45) | 60 | 24 | 79 | Galactosyl 6-OH | > 99 |
| Melezitose | <i>t</i> -BuOH–pyridine (55/45) | 60 | 72 | 54 | Glucosyl linked 1 → 2, 6-OH | 61 |
| | | | | | Glucosyl linked 1 → 3, 6''-OH | 33 |
| | | | | | Fructosyl 6'-OH | 4 |
| Kestose | <i>t</i> -BuOH–pyridine (55/45) | 60 | 72 | 57 | Glucosyl 6-OH | 87 |
| Stachyose | <i>t</i> -BuOH–pyridine (50/50) | 65 | 72 | 68 | Galactosyl 6-OH | 96 |
| | | | | | Fructosyl 1'''-OH | 4 |

Yields are referred to isolated monoester and selectivity corresponds to percentage of each regioisomer of saccharide monoester as found by HPLC/MS.

Table 3. Acylation of tri- and tetrasaccharides using M β CD-Subtilisin Carlsberg preparation and vinyl laurate as acylating agent

| Carbohydrate | Solvent | Temperature (°C) | Reaction time (h) | Yield (%) | Position of acylation | Selectivity (%) |
|--------------|----------|------------------|-------------------|-----------|---|-----------------|
| Raffinose | Pyridine | 40 | 24 | 74 | Fructosyl 1''-OH | 98 |
| Melezitose | Pyridine | 40 | 48 | 69 | Fructosyl 6'-OH | 73 |
| | | | | | Glucosyl linked 1 \rightarrow 2, 6-OH | 16 |
| | | | | | Glucosyl linked 1 \rightarrow 3, 6''-OH | 6 |
| Kestose | Pyridine | 40 | 48 | 55 | Middle Fructosyl 6'-OH | 69 |
| | | | | | Glucosyl 6-OH | 11 |
| | | | | | Terminal Fructosyl 6''-OH | 10 |
| Stachyose | Pyridine | 40 | 48 | 76 | Fructosyl 1'''-OH | 98 |

Yields are referred to isolated monoester and selectivity corresponds to percentage of each regioisomer of saccharide monoester as found by HPLC/MS.

subtilisin powder.¹³ Computational studies of Subtilisin-catalyzed transesterification of sucrose²⁸ have shown that entropic factors are crucial in the enzyme regioselectivity. Modelling of the possible tetrahedral transition-state adducts find that in the 1'-OH-adduct the sucrose moiety is the most solvent exposed. This exposure confers a higher mobility upon the sucrose, which translates into a larger entropic stabilization. This approach also explains the results obtained with raffinose and stachyose as these compounds can be considered as sucrose derivatives modified at their glucosyl C-6 hydroxyl. It is probable than the 6'-OH adduct in both melezitose and 1-kestose is also the most solvent exposed.

In summary, we have carried out one-step acylation of tri- and tetrasaccharides catalyzed by hydrolases in good isolated yields. Key aspects in the reaction conditions are the use of the amorphous form of the saccharides and the specific solvent (*tert*-butanol/pyridine mixtures for lipases and pyridine for the protease). Moreover, it is the first time that these non-reducing oligosaccharides are acylated using lipases and are transesterified with a long chain acyl donor using subtilisin. High selectivity has been obtained for acylation with all the enzymes employed. This allows the access to a particular regioisomer by selecting the appropriate hydrolase, showing a picture of complementary regioselective acylation of the primary hydroxyl groups. At the same time, a correlation in the enzymatic behaviour towards the pair raffinose–stachyose is observed for all used hydrolases, and to a less extent for the pair 1-kestose–melezitose. Studies of the biological and physical properties of these new non-ionic surfactants are in progress.

3. Experimental

3.1. General methods

Anhydrous pyridine and vinyl laurate were supplied by Fluka; anhydrous *tert*-butanol, molecular sieves (3 Å, 8–12 mesh) and methyl- β -cyclodextrin from Aldrich; raffinose and melezitose from Sigma and stachyose and 1-kestose from TCI Chemicals. All the carbohydrates were used in their amorphous form prepared by lyophilization of the corresponding aqueous solutions. Granulated lipase from *T. lanuginosus* (Lipozyme TL IM), immobilized lipase from *C. antarctica* B (Novozym 435) and subtilisin Carlsberg (purified powder) were kindly donated by Novozymes A/S. Molecular sieves were preactivated at ca. 350 °C for 12 h. All reactions were monitored by TLC on precoated Silica-Gel 60

plates (Alugram Sil G/UV₂₅₄ supplied by Macherey-Nagel), and detected by heating with Mostain (500 ml of 10% H₂SO₄, 25 g of (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, 1 g Ce(SO₄)₂·4H₂O). The elution system was CHCl₃–MeOH (2.5/1) for the reactions involving trisaccharides and EtOAc–MeOH–H₂O (7/5/1) for the reactions with stachyose. Products were purified by flash chromatography with Aldrich Silica gel 60 (200–400 mesh) using a gradient of chloroform/methanol 5:1 to 2:1 (v/v) for the trisaccharides monolaurates and 5:1 to 1:1 v/v for the stachyose monolaurates.

NMR spectra were recorded on either a Bruker AVANCE 300 or ARX 400 [300 or 400 MHz (¹H) and 75 or 100 (¹³C)] at room temperature for solutions in CD₃OD. Chemical shifts are referred to the methanol multiplet, centered at 3.31 ppm for ¹H NMR and 49.0 ppm for ¹³C NMR. Optical rotations (Sodium D line) were measured at 20 °C with a Perkin-Elmer 241 for pure regioisomers (those oligosaccharide monolaurates obtained with >95% regioselectivity). High resolution FAB (+) mass spectral analyses were obtained on a Micromass AutoSpec-Q spectrometer. Infrared spectra were recorded using a Nicolet 20SXB FTIR spectrophotometer.

Analysis of the regioisomeric distribution of the isolated monoesters and the kinetic study of reactions catalyzed by Lipozyme TL IM were carried out by HPLC/MS. A Waters Alliance 2695 separation module was employed with a Waters Spherisorb 3 μ m ODS2 column (4.6 \times 250 mm) and a Waters Micromass ZQ mass spectrometer detector. The temperature of the column was set to 40 °C. Flow rate was 1.1 ml/min with splitting before the detection module. Mobile phases were acetonitrile/water mixtures in isocratic conditions. The ratio changed depending on the application as follows: for the analysis of the regioisomeric distribution of trisaccharide monolaurates, acetonitrile/water 35:65 (v:v) and for the more polar stachyose monolaurates, 30:70 (v:v); for the analysis of the kinetics of trisaccharide reactions, acetonitrile/water 45:55 (v:v) and for the stachyose reaction, 40:60 (v:v). Detection was done with positive ESI ionization in both Scan and SIR modes. For the kinetics studies, aliquots were concentrated to dryness, diluted with water and extracted with hexane to remove excess of vinyl laurate, prior to analysis.

3.2. General method for the transesterifications catalyzed by Novozym 435

Raffinose, melezitose or 1-kestose (202 mg, 0.4 mmol) were dissolved in anhydrous pyridine (4.5 ml) at 60 °C before

careful addition of preheated (60 °C) anhydrous *tert*-butanol (5.5 ml). Novozym 435 (100 mg) and 3 Å molecular sieves (100 mg) were then added and the suspension maintained 30 min at 60 °C with orbital shaking (250 rpm). Finally, vinyl laurate (457 mg, 2 mmol) was added. When conversion stopped by TLC, the mixture was cooled and filtered. The solvent was evaporated under vacuum at 45 °C eliminating last traces of pyridine by co-evaporation with toluene. The remaining residue was subjected to flash chromatography. Concentration of pure fractions in vacuo afforded the monolaurates as amorphous white solids.

The tetrasaccharide stachyose (210 mg, 0.315 mmol) was dissolved in anhydrous pyridine (6 ml) at 65 °C before careful addition of preheated (65 °C) anhydrous *tert*-butanol (6 ml). Novozym 435 (100 mg) and 3 Å molecular sieves (100 mg) were then added and the suspension maintained 30 min at 65 °C with orbital shaking (250 rpm). Finally, vinyl laurate (360 mg) was added. The reaction was monitored and processed as described for trisaccharides.

3.2.1. 6-O-Lauroylraffinose (1a). The general procedure outlined above was followed. After 3 days the reaction was stopped and the monoester isolated (132 mg, 48%). Only regioisomer **1a** was obtained (HPLC/MS). $R_f=0.34$; $[\alpha]_D^{25} +80.7$ (*c* 7 in methanol); ν_{\max} (cm⁻¹) (KBr disks): 3410 br (O–H), 1730 (C=O); HRMS (FAB): calcd for C₃₀H₅₄O₁₇Na (M+Na⁺) 709.325871, found 709.324561; ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz): δ 5.40 (d, 1H, $J_{1'-2'}$ = 3.7 Hz, H-1'), 4.87 (d partially overlapped with residual water, 1H, H-1), 4.24 (m, 1H, H-6a), 4.22 (dd, 1H, J_{6a-b} = 11.3 Hz, J_{6b-5} = 2.6 Hz, H-6b), ca. 4.10 (m, 2H, H-3'', H-4''); ca. 4.04 (m, 2H, H-5, H-5'), 3.88 (br.d, 1H, J = 3.0 Hz, H-4), 3.83 (dd, 1H, $J_{6'a-b}$ = 11.1 Hz, $J_{6'a-5'}$ = 6.1 Hz, H-6'a), ca. 3.81 (m, 1H, H-3), ca. 3.76 (m, 3H, H-5'', H-6''a, H-6''b), ca. 3.73 (m, 1H, H-2), 3.71 (t, 1H, $J_{2'-3'}$ = $J_{3'-4'}$ = 9.4 Hz, H-3'), ca. 3.70 (m, 1H, H-6'b), 3.64 (d, 1H, $J_{1''a-b}$ = 12.3 Hz, H-1''a), 3.60 (d, 1H, $J_{1''a-b}$ = 12.3 Hz, H-1''b), 3.43 (dd, 1H, $J_{2'-3'}$ = 9.7 Hz, $J_{1'-2'}$ = 3.7 Hz, H-2'), 3.26 (t, 1H, $J_{3'-4'}$ = $J_{4'-5'}$ = 9.5 Hz, H-4'), 2.34 (t, 2H, J = 7.4 Hz, –CH₂–CO–), 1.61 (m, 2H, CH₂–CH₂–CO–), 1.29 (m, 16H, –CH₂– chain), 0.90 (t, 3H, J = 6.8 Hz, CH₃–); ¹³C NMR (CD₃OD, 100 MHz): δ 175.4 (C=O), 105.3 (C-2''), 100.5 (C-1), 93.4 (C-1'), 83.5 (C-5''), 79.1 (C-3''), 75.4 (C-4''), 74.4 (C-3'), 73.2 (C-5'), 73.1 (C-2'), 72.1 (C-4'), 71.1 (C-3), 70.9 (C-4), 70.3 (C-2), 69.9 (C-5), 68.5 (C-6'), 64.9 (C-6), 64.2 (C-1''), 63.3 (C-6''), 35.0 (–CH₂–CO–), 33.1, 30.7, 30.6, 30.5, 30.4, 30.2, 26.0, 23.7 (–CH₂–lauroyl backbone), 14.5 (CH₃–lauroyl).

3.2.2. 6''-O-Lauroylmelezitose (2a). The general procedure outlined above was followed. After 3 days the reaction was stopped and the monoester isolated (104 mg, 38%). $R_f=0.63$; ν_{\max} (cm⁻¹) (KBr disks): 3400 br (O–H), 1725 (C=O); HRMS (FAB): calcd for C₃₀H₅₄O₁₇Na (M+Na⁺) 709.325871, found 709.326346. Regioisomeric proportion 6''/6'/6 = 69/22/9 (HPLC/MS). NMR assignments of main regioisomer **2a** ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz): δ 5.47 (d, 1H, J_{1-2} = 3.8 Hz, H-1), 5.08 (d, 1H, $J_{1''-2''}$ = 3.6 Hz, H-1''), 4.42 (dd, 1H, $J_{6''a-b}$ = 11.6 Hz, $J_{6''a-5''}$ = 1.5 Hz, H-6''a), 4.29 (t, 1H, $J_{3'-4'}$ = $J_{4'-5'}$ = 7.7 Hz, H-4'), 4.24 (dd, 1H, $J_{6''a-b}$ = 11.6 Hz, $J_{6''b-5''}$ = 6.4 Hz, H-6''b), 4.19 (d, 1H, $J_{3'-4'}$ = 7.7 Hz, H-3'), 4.11 (m, 1H, H-5''), 3.91 (m, 1H, H-5), 3.85 (dd, 1H, J_{6a-b} = 11.9 Hz, J_{6a-5} = 1.4 Hz, H-6a), ca. 3.78 (m,

2H, H6'a, H6'b), ca. 3.73 (m, 1H, H-5') ca. 3.72 (m, 1H, H1'a), 3.70 (dd, 1H, J_{6a-b} = 11.9 Hz, J_{6b-5} = 4.9 Hz, H-6b), 3.69 (t, 1H, $J_{2''-3''}$ = $J_{3''-4''}$ = 9.6 Hz, H-3''), 3.62 (t, 1H, J_{2-3} = J_{3-4} = 9.6 Hz, H-3), 3.58 (d, 1H, H-1'b), 3.43 (dd, 1H, J_{2-3} = 9.7 Hz, J_{1-2} = 3.8 Hz, H-2), 3.41 (dd, 1H, $J_{2''-3''}$ = 9.7 Hz, $J_{1''-2''}$ = 3.8 Hz, H-2''), 3.35 (t, 1H, $J_{3''-4''}$ = $J_{4''-5''}$ = 9.6 Hz, H-4''), 3.31 (t, 1H, J_{3-4} = J_{4-5} = 9.6 Hz, H-4), 2.37 (t, 2H, J = 7.5 Hz, –CH₂–CO–), 1.61 (m, 2H, CH₂–CH₂–CO–), 1.29 (m, 16H, –CH₂– chain), 0.90 (t, 3H, J = 6.8 Hz, CH₃–); ¹³C NMR (CD₃OD, 100 MHz): δ 175.5 (C=O), 105.3 (C-2'), 101.6 (C-1''), 93.2 (C-1), 85.7 (C-3'), 83.7 (C-5'), 75.1 (C-3), 74.8 (C-3''), 74.2 (C-5), 73.6 (C-2''), 73.2 (C-2), 71.8 (C-4''), 71.7 (C-5''), 71.7 (C-4), 64.8 (C-6''), 64.6 (C-1'), 63.3 (C-6'), 62.6 (C-6), 35.0 (–CH₂–CO–), 33.1, 30.7, 30.6, 30.4, 30.2, 26.0, 23.7 (–CH₂–lauroyl backbone), 14.4 (CH₃–lauroyl).

3.2.3. 6''-O-Lauroyl(1-kestose) (3a). The general procedure outlined above was followed. After 3 days the reaction was stopped and the monoester isolated (148 mg, 54%). $R_f=0.33$; ν_{\max} (cm⁻¹) (KBr disks): 3400 br (O–H), 1730 (C=O); HRMS (FAB): calcd for C₃₀H₅₄O₁₇Na (M+Na⁺) 709.325871, found 709.324767. Main regioisomer **3a** was produced with 90% regioselectivity (HPLC/MS). NMR assignments of **3a** ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz): δ 5.38 (d, 1H, J_{1-2} = 3.8 Hz, H-1), 4.41 (dd, 1H, $J_{6''a-b}$ = 11.8 Hz, $J_{6''a-5''}$ = 8.0 Hz, H-6''a), 4.23 (dd, 1H, $J_{6''a-b}$ = 11.8 Hz, $J_{6''b-5''}$ = 3.0 Hz, H-6''b), 4.19 (d, 1H, $J_{3'-4'}$ = 8.4 Hz, H-3'), 4.12 (d, 1H, $J_{3''-4''}$ = 8.1 Hz, H-3''), 4.02 (m, 1H, H4'), 4.00 (m, 1H, H4''), 3.91 (td, 1H, $J_{4''-5''}$ = $J_{5''-6''a}$ = 7.9 Hz, $J_{5''-6''b}$ = 3.0 Hz, H-5''), 3.81 (m, 2H, H-5, H1'a), ca. 3.77 (m, 1H, H-1'b), ca. 3.76 (m, 3H, H-5', H6'a, H-6'b), ca. 3.71 (m, 2H, H-6a, H-6b), 3.67 (t, 1H, J_{2-3} = J_{3-4} = 9.4 Hz, H-3), 3.65 (d, 1H, $J_{1''a-b}$ = 12.0 Hz, H-1''a), 3.58 (d, 1H, $J_{1''a-b}$ = 12.0 Hz, H-1''b), 3.38 (dd, 1H, J_{2-3} = 9.6 Hz, J_{1-2} = 3.8 Hz, H-2), 3.34 (t, 1H, J_{3-4} = J_{4-5} = 9.4 Hz, H-4), 2.36 (t, 2H, J = 7.5 Hz, –CH₂–CO–), 1.61 (m, 2H, CH₂–CH₂–CO–), 1.29 (m, 16H, –CH₂– chain), 0.90 (t, 3H, J = 6.8 Hz, CH₃–); ¹³C NMR (CD₃OD, 100 MHz): δ 175.5 (C=O), 105.6 (C-2''), 104.9 (C-2'), 94.1 (C-1), 83.6 (C-5'), 80.7 (C-5''), 79.5 (C-3'), 78.6 (C-3''), 77.3 (C-4''), 75.6 (C-4'), 74.8 (C-3), 74.4 (C-5), 73.3 (C-2), 71.5 (C-4), 66.8 (C-6''), 63.2 (C-6'), 62.9 (C-1'), 62.3 (C-6), 61.9 (C-1''), 35.0 (–CH₂–CO–), 33.1, 30.7, 30.6, 30.4, 30.2, 26.0, 23.7 (–CH₂–lauroyl backbone), 14.4 (CH₃–lauroyl).

3.2.4. 6-O-Lauroylstachyose (4a). The general procedure outlined above was followed. After 8 days the reaction was stopped and the monoester isolated (69 mg, 26%). Regioisomeric proportion 6/6''' = 79/14% + 7% other regioisomers (HPLC/MS). See characterization of main regioisomer **4a** in next section.

3.3. General method for the transesterifications catalyzed by Lipozyme TL IM

Exactly the same method as the Novozym 435 catalyzed reactions was used changing just the biocatalyst to Lipozyme TL IM.

3.3.1. 6-O-Lauroylraffinose (1a). The general procedure outlined above was followed. After 24 h the reaction was stopped and the monoester isolated (217 mg, 79%).

Only one regioisomer **1a** was obtained (HPLC/MS), which is the same obtained with Novozym 435 catalysis.

3.3.2. 6-O-Lauroylmelezitose (2b). The general procedure outlined above was followed. After 3 days the reaction was stopped and the monoester isolated (148 mg, 54%). $R_f = 0.33$; ν_{\max} (cm^{-1}) (KBr disks): 3400 br (O–H), 1725 (C=O); HRMS (FAB): calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{54}\text{O}_{17}\text{Na}$ ($\text{M} + \text{Na}^+$) 709.325871, found 709.326346. Regioisomeric proportion 6/6''/6' = 61/33/4% + 2% other regioisomers (HPLC/MS). NMR assignments of main regioisomer **2b** ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz): δ 5.42 (d, 1H, $J_{1-2} = 3.8$ Hz, H-1), 5.08 (d, 1H, $J_{1''-2''} = 3.8$ Hz, H-1''), 4.44 (dd, 1H, $J_{6a-b} = 12.0$ Hz, $J_{6a-5} = 1.4$ Hz, H-6a), 4.16 (dd, 1H, $J_{6a-b} = 12.0$ Hz, $J_{6b-5} = 5.6$ Hz, H-6b), ca. 4.23 (m, 1H, H-4'), ca. 4.20 (m, 1H, H-3'), 4.04 (m, 1H, H-5), 3.97 (m, 1H, H-5''), ca. 3.91 (m, 1H, H-6''a), ca. 3.87 (m, 1H, H-1'a), ca. 3.85 (m, 1H, H-5'), ca. 3.70 (m, 2H, H-6'a, H-6'b), 3.69 (t, 1H, $J_{2''-3''} = J_{3''-4''} = 9.3$ Hz, H-3''), 3.65 (dd, 1H, $J_{6''a-b} = 12.0$ Hz, $J_{6''b-5''} = 5.2$ Hz, H-6''b), 3.61 (t, 1H, $J_{2-3} = J_{3-4} = 9.3$ Hz, H-3), 3.57 (d, 1H, $J_{1'a-b} = 12.1$ Hz, H-1'b), 3.43 (dd, 1H, $J_{2''-3''} = 9.8$ Hz, $J_{2''-1''} = 3.7$ Hz, H-2''), 3.41 (dd, 1H, $J_{2-3} = 9.8$ Hz, $J_{2-1} = 3.9$ Hz, H-2), 3.27 (t, 1H, $J_{3''-4''} = J_{4''-5''} = 9.4$ Hz, H-4''), 3.26 (t, 1H, $J_{3-4} = J_{4-5} = 9.4$ Hz, H-4), 2.37 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz, $-\text{CH}_2-\text{CO}-$), 1.62 (m, 2H, $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-$), 1.29 (m, 16H, $-\text{CH}_2-$ chain), 0.90 (t, 3H, $J = 6.8$ Hz, CH_3-); ^{13}C NMR (CD_3OD , 100 MHz): δ 175.5 (C=O), 105.4 (C-2'), 102.2 (C-1''), 93.2 (C-1), 86.1 (C-3'), 83.4 (C-5') 75.0 (C-3), 74.7 (C-3''), 74.6 (C-4'), 73.9 (C-5''), 73.7 (C-2''), 73.1 (C-2), 72.1 (C-4''), 71.9 (C-5), 71.6 (C-4), 64.8 (C-6), 64.0 (C-1', C-6'), 62.9 (C-6''), 34.9 ($-\text{CH}_2-\text{CO}-$), 33.1, 30.8, 30.7, 30.5, 30.4, 30.3, 26.0, 23.7 ($-\text{CH}_2-$ lauroyl backbone), 14.5 (CH_3- lauroyl).

3.3.3. 6-O-Lauroyl(1-kestose) (3b). The general procedure outlined above was followed. After 3 days the reaction was stopped and the monoester isolated (157 mg, 57%). $R_f = 0.33$; ν_{\max} (cm^{-1}) (KBr disks): 3400 br (O–H), 1730 (C=O); HRMS (FAB): calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{54}\text{O}_{17}\text{Na}$ ($\text{M} + \text{Na}^+$) 709.325871, found 709.324767. Main regioisomer **3b** was produced with 87% regioselectivity (HPLC/MS). NMR assignments for main regioisomer **3b** ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz): δ 5.39 (d, 1H, $J_{1-2} = 3.8$ Hz, H-1), 4.39 (dd, 1H, $J_{6a-b} = 12.0$ Hz, $J_{6a-5} = 1.5$ Hz, H-6a), 4.20 (d, 1H, $J_{3'-4'} = 8.4$ Hz, H-3'), 4.18 (dd, 1H, $J_{6a-b} = 12.0$ Hz, $J_{6b-5} = 5.0$ Hz, H-6b), 4.13 (d, 1H, $J_{3''-4''} = 8.3$ Hz, H-3''), ca. 4.01 (m, 1H, H-4''), 4.00 (m, 1H, H-5), ca. 3.99 (m, 1H, H-4'), 3.82 (d, 1H, $J_{1'a-b} = 10.4$ Hz, H-1'a), ca. 3.77 (m, 1H, H-1'b), ca. 3.76 (m, 1H, H-5'), ca. 3.75 (m, 4H, H-6'a, H-6'b, H-6''a, H-6''b), ca. 3.74 (m, 1H, H-5''), 3.69 (t, 1H, $J_{2-3} = J_{3-4} = 9.4$ Hz, H-3), 3.64 (d, 1H, $J_{1''a-b} = 12.0$ Hz, H-1''a), 3.59 (d, 1H, $J_{1''a-b} = 12.0$ Hz, H-1''b), 3.39 (dd, 1H, $J_{2-3} = 9.7$ Hz, $J_{1-2} = 3.8$ Hz, H-2), 3.30 (t, 1H, $J_{3-4} = J_{4-5} = 9.4$ Hz, H-4), 2.37 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz, $-\text{CH}_2-\text{CO}-$), 1.61 (m, 2H, $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-$), 1.29 (m, 16H, $-\text{CH}_2-$ chain), 0.90 (t, 3H, $J = 6.7$ Hz, CH_3-); ^{13}C NMR (CD_3OD , 100 MHz): δ 175.5 (C=O), 105.3 (C-2'), 104.9 (C-2''), 93.8 (C-1), 83.7 (C-5'), 83.4 (C-5''), 79.2 (C-3'), 78.7 (C-3''), 76.3 (C-4'), 75.7 (C-4''), 74.5 (C-3), 73.2 (C-2), 72.0 (C-5), 71.6 (C-4), 64.6 (C-6), 63.9 (C-6''), 63.7 (C-6'), 63.0 (C-1'), 62.3 (C-1''), 34.9 ($-\text{CH}_2-\text{CO}-$), 33.1, 30.7, 30.6, 30.5, 30.2, 26.0, 23.7 ($-\text{CH}_2-$ lauroyl backbone), 14.4 (CH_3- lauroyl).

3.3.4. 6-O-Lauroylstachyose (4a). The general procedure outlined above was followed. After 3 days the reaction was stopped and the monoester isolated (183 mg, 68%). Regioisomer **4a** was obtained with >95% regioselectivity (HPLC/MS). $R_f = 0.63$; $[\alpha]_D + 106.9$ (c 7 in methanol); ν_{\max} (cm^{-1}) (KBr disks): 3410 br (O–H), 1730 (C=O); HRMS (FAB): calcd for $\text{C}_{36}\text{H}_{64}\text{O}_{22}\text{Na}$ ($\text{M} + \text{Na}^+$) 871.378694, found 871.378528; ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz): δ 5.41 (d, 1H, $J_{1''-2''} = 3.7$ Hz, H-1''), 4.86 (d, 1H, H-1), 4.85 (d, 1H, $J_{1'-2'} = 3.6$ Hz, H-1'), 4.27 (dd, 1H, $J_{6a-b} = 11.2$ Hz, $J_{6a-5} = 4.7$ Hz, H-6a), 4.21 (dd, 1H, $J_{6a-b} = 11.2$ Hz, $J_{6b-5} = 7.5$ Hz, H-6b), 4.12 (m, 1H, H-5), ca. 4.10 (m, 2H, H-3''', H-4'''), ca. 4.05 (m, 1H, H-5''), ca. 4.04 (m, 1H, H-5'), 3.90 (m, 1H, H-4), 3.88 (dd, 1H, 1H, $J_{6''a-b} = 11.0$ Hz, $J_{6''a-5''} = 5.9$ Hz, H-6''a), ca. 3.87 (m, 1H, H-4'), 3.85 (m, 1H, H-6'a), 3.83 (m, 1H, H-3), 3.81 (m, 1H, H-3'), ca. 3.77 (m, 3H, H-6''a, H-6''b, H-2), ca. 3.76 (m, 1H, H-5''), ca. 3.75 (m, 1H, H-2'), 3.71 (m, 2H, H-3'', H-6''b), 3.63 (d, 1H, $J_{1''a-b} = 12.4$ Hz, H-1''a), 3.62 (m, 1H, H-6'b), 3.60 (d, 1H, $J_{1''a-b} = 12.4$ Hz, H-1''b), 3.44 (dd, 1H, $J_{2''-3''} = 9.7$ Hz, $J_{1''-2''} = 3.7$ Hz, H-2''), 3.29 ((t, 1H, $J_{3''-4''} = J_{4''-5''} = 9.5$ Hz, H-4''), 2.37 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz, $-\text{CH}_2-\text{CO}-$), 1.62 (m, 2H, $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-$), 1.29 (m, 16H, $-\text{CH}_2-$ chain), 0.90 (t, 3H, $J = 6.8$ Hz, CH_3-); ^{13}C NMR (CD_3OD , 100 MHz): δ 175.4 (C=O), 105.3 (C-2'''), 100.4 (C-1'), 99.8 (C-1), 93.4 (C-1''), 83.5 (C-5'''), 79.1 (C-3'''), 75.3 (C-4'''), 74.5 (C-3''), 73.1 (C-5''), 73.0 (C-2''), 72.1 (C-4''), 71.3 (C-3')^a, 71.2 (C-3'a), 71.0 (C-4, C-4'), 70.6 (C-2)^b, 70.5 (C-5')^b, 70.1 (C-2')^b, 69.9 (C-5), 68.4 (C-6''), 68.0 (C-6'), 64.9 (C-6), 64.2 (C-1'''), 63.2 (C-6''), 35.0 ($-\text{CH}_2-\text{CO}-$), 33.1, 30.8, 30.7, 30.5, 30.3, 26.0, 23.7 ($-\text{CH}_2-$ lauroyl backbone), 14.5 (CH_3- lauroyl). Note: ^{13}C NMR assignments marked with the same letter may be interchangeable.

3.4. General method for the transesterifications catalyzed by subtilisin Carlsberg

M β CD-subtilisin Carlsberg preparation was obtained as previously described²⁶ using 0.1 M KOH instead of phosphate buffer for the pH adjustment in order to prevent side alkaline catalysis in the transesterification reactions, which would promote competitive non-regioselective acylations and even more substitution.²⁹

In a typical experiment a solution of raffinose, melezitose or 1-kestose (125 mg, 0.25 mmol) in anhydrous pyridine (2 ml) and vinyl laurate (170 mg, 0.74 mmol) were shaken with vigorous magnetic stirring at 40 °C in the presence of M β CD-subtilisin Carlsberg (45 mg). When conversion stopped by TLC, the mixture was cooled and filtered. The solution was concentrated under vacuum at 45 °C eliminating last traces of pyridine by co-evaporation with toluene. The remaining residue was subjected to flash chromatography. Concentration of pure fractions in vacuo afforded the monolaurates as amorphous white solids.

For the tetrasaccharide transesterification, the enzyme (70 mg), stachyose (150 mg, 0.225 mmol) and vinyl laurate (156 mg, 0.68 mmol) were mixed in anhydrous pyridine (2 ml). The same reaction conditions and work-up described for the trisaccharides was followed.

3.4.1. 1''-O-Lauroylraffinose (1b). The general procedure outlined above was followed. After 24 h the reaction was stopped and the monoester isolated (127 mg, 74%). Regioisomer **1b** was obtained with 98% regioselectivity (HPLC/MS). $R_f=0.30$; $[\alpha]_D +94$ (c 7 in methanol); ν_{\max} (cm^{-1}) (KBr disks): 3410 br (O–H), 1735 (C=O); HRMS (FAB): calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{54}\text{O}_{17}\text{Na}$ ($\text{M}+\text{Na}^+$) 709.325871, found 709.326289; ^1H NMR (CD_3OD , 300 MHz): δ 5.41 (d, 1H, $J_{1'-2'}=3.8$ Hz, H-1'), 4.89 (d, 1H, $J_{1-2}=3.2$ Hz, H-1), 4.35 (d, 1H, $J_{1''\text{a-b}}=12.2$ Hz, H-1''a), 4.12 (d, 1H, $J_{1''\text{a-b}}=12.2$ Hz, H-1''b), 4.10 (m, 1H, H-4''), 4.09 (m, 1H, H-3''), 4.05 (m, 1H, H-5'), 3.91 (m, 1H, H-3), 3.87 (dd, 1H, $J_{6'\text{a-b}}=11.5$ Hz, $J_{6'\text{a-5'}}=6.0$ Hz, H-6'a), 3.85 (m, 1H, H-5), 3.78 (m, 1H, H-4), ca. 3.77 (m, 1H, H-2), ca. 3.75 (m, 2H, H-6''a, H-6''b), ca. 3.75 (m, 1H, H-6'b), ca. 3.73 (m, 1H, H-5''), 3.70 (m, 2H, H-6a, H-6b), 3.69 (t, 1H, $J_{2'-3'}=J_{3'-4'}=9.4$ Hz, H-3'), 3.43 (dd, 1H, $J_{2'-3'}=9.6$ Hz, $J_{1'-2'}=3.8$ Hz, H-2'), 3.32 (t, 1H, $J_{3'-4'}=J_{4'-5'}=9.2$ Hz, H-4'), 2.37 (t, 2H, $J=7.4$ Hz, $-\text{CH}_2-\text{CO}-$), 1.62 (m, 2H, $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-$), 1.29 (m, 16H, $-\text{CH}_2-$ chain), 0.90 (t, 3H, $J=6.7$ Hz, CH_3-); ^{13}C NMR (CD_3OD , 75 MHz): δ 174.8 (C=O), 104.4 (C-2''), 100.5 (C-1), 93.9 (C-1'), 83.6 (C-5''), 78.6 (C-3''), 74.7 (C-4''), 74.4 (C-3'), 73.3 (C-5'), 72.8 (C-2'), 72.4 (C-5), 72.0 (C-4'), 71.4 (C-3), 71.0 (C-4), 70.5 (C-2), 68.3 (C-6'), 64.1 (C-1''), 63.0 (C-6''), 62.8 (C-6), 35.0 ($-\text{CH}_2-\text{CO}-$), 33.0, 30.7, 30.6, 30.4, 30.2, 26.0, 23.7 ($-\text{CH}_2-$ lauroyl backbone), 14.4 (CH_3 -lauroyl).

3.4.2. 6'-O-Lauroylmelezitose (2c). The general procedure outlined above was followed. After 48 h the reaction was stopped and the monoester isolated (119 mg, 69%). $R_f=0.32$; ν_{\max} (cm^{-1}) (KBr disks): 3400 br (O–H), 1725 (C=O); HRMS (FAB): calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{54}\text{O}_{17}\text{Na}$ ($\text{M}+\text{Na}^+$) 709.325871, found 709.325243. Regioisomeric proportion 6'/6''=73/16/6%+5% other regioisomers (HPLC/MS). NMR assignments for main regioisomer **2c**: ^1H NMR (CD_3OD , 300 MHz): δ 5.41 (d, 1H, $J_{1-2}=3.8$ Hz, H-1), 5.12 (d, 1H, $J_{1''\text{a-b}}=3.7$ Hz, H-1''), 4.43 (dd, 1H, $J_{6'\text{a-b}}=11.8$ Hz, $J_{6'\text{a-5'}}=7.7$ Hz, H-6'a), 4.35 (dd, 1H, $J_{6'\text{a-b}}=11.8$ Hz, $J_{6'\text{a-5'}}=3.7$ Hz, H-6'b), 4.34 (t, 1H, $J_{3'-4'}=J_{4'-5'}=8.1$ Hz, H-4'), 4.23 (d, 1H, $J_{3'-4'}=8.1$ Hz, H-3'), 3.95 (m, 1H, H-5'), ca. 3.90 (m, 2H, H-5, H-5''), ca. 3.88 (m, 2H, H-6a, H-6''a), 3.82 (d, 1H, $J_{1''\text{a-b}}=12.3$ Hz, H-1'a), ca. 3.69 (m, 1H, H-3''), ca. 3.68 (m, 2H, H-6b, H-6''b), ca. 3.63 (m, 1H, H-3), 3.60 (d, 1H, $J_{1''\text{a-b}}=12.3$ Hz, H-1'b), 3.42 (dd, 1H, H-2''), 3.40 (dd, 1H, H-2), ca. 3.28 (m, 2H, H-4, H-4''), 2.35 (t, 2H, $J=7.5$ Hz, $-\text{CH}_2-\text{CO}-$), 1.62 (m, 2H, $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-$), 1.29 (m, 16H, $-\text{CH}_2-$ chain), 0.90 (t, 3H, $J=6.8$ Hz, CH_3-); ^{13}C NMR (CD_3OD , 75 MHz): δ 175.5 (C=O), 105.6 (C-2'), 101.7 (C-1''), 93.1 (C-1), 85.2 (C-3'), 80.4 (C-5'), 75.7 (C-4'), 75.1 (C-3), 74.9 (C-3''), 74.0 (C-5, C-5'), 73.7 (C-2''), 73.3 (C-2), 72.1 (C-4''), 72.0 (C-4), 66.6 (C-6'), 64.2 (C-1'), 62.9 (C-6''), 62.8 (C-6), 35.0 ($-\text{CH}_2-\text{CO}-$), 33.1, 30.7, 30.6, 30.4, 30.2, 26.0, 23.7 ($-\text{CH}_2-$ lauroyl backbone), 14.4 (CH_3 -lauroyl).

3.4.3. 6'-O-Lauroyl(1-kestose) (3c). The general procedure outlined above was followed. After 48 h the reaction was stopped and the monoester isolated (94 mg, 55%). $R_f=0.33$; ν_{\max} (cm^{-1}) (KBr disks): 3400 br (O–H), 1730 (C=O); HRMS (FAB): calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{54}\text{O}_{17}\text{Na}$ ($\text{M}+\text{Na}^+$) 709.325871, found 709.324767. Main regioisomer **3c** was produced with 69% regioselectivity (HPLC/MS). NMR assignments for main regioisomer **3c**: ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz): δ 5.37 (d, 1H, $J_{1-2}=3.8$ Hz, H-1), 4.31 (m, 2H,

H6'a, H6'b), 4.20 (d, 1H, $J_{3'-4'}=8.3$ Hz, H-3'), 4.13 (d, 1H, $J_{3''\text{a-b}}=8.1$ Hz, H-3''), 4.01 (m, 1H, H-4''), 3.99 (m, 1H, H-4'), 3.89 (m, 1H, H-5'), 3.86 (d, 1H, $J_{1''\text{a-b}}=11.8$ Hz, H-1'a), 3.80 (m, 1H, H-5), ca. 3.74 (m, 3H, H-5'', H6''a, H6''b), 3.70 (m, 3H, H-1'b, H-6a, H-6b), 3.67 (t, 1H, $J_{2-3}=J_{3-4}=9.6$ Hz, H-3), 3.65 (d, 1H, $J_{1''\text{a-b}}=11.9$ Hz, H-1''a), 3.58 (d, 1H, $J_{1''\text{a-b}}=11.9$ Hz, H-1''b), 3.38 (dd, 1H, $J_{2-3}=9.7$ Hz, $J_{1-2}=3.8$ Hz, H-2), 3.33 (t, 1H, $J_{3-4}=J_{4-5}=9.6$ Hz, H-4), 2.37 (t, 2H, $J=7.5$ Hz, $-\text{CH}_2-\text{CO}-$), 1.61 (m, 2H, $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-$), 1.29 (m, 16H, $-\text{CH}_2-$ chain), 0.90 (t, 3H, $J=6.7$ Hz, CH_3-); ^{13}C NMR (CD_3OD , 100 MHz): δ 175.5 (C=O), 105.3 (C-2''), 105.2 (C-2'), 94.0 (C-1), 83.5 (C-5''), 80.5 (C-5'), 78.8 (C-3'), 78.7 (C-3''), 76.5 (C-4'), 76.3 (C-4''), 74.8 (C-3), 74.2 (C-5), 73.4 (C-2), 71.5 (C-4), 66.5 (C-6'), 63.9 (C-6''), 62.6 (C-1'), 62.4 (C-1''), 62.3 (C-6), 34.9 ($-\text{CH}_2-\text{CO}-$), 33.1, 30.8, 30.6, 30.5, 30.2, 26.0, 23.7 ($-\text{CH}_2-$ lauroyl backbone), 14.4 (CH_3 -lauroyl).

3.4.4. 1'''-O-Lauroylstachyose (4b). The general procedure outlined above was followed. After 48 h the reaction was stopped and the monoester isolated (145 mg, 76%). Regioisomer **4b** was obtained with 98% regioselectivity (HPLC/MS). $R_f=0.63$; $[\alpha]_D +105.4$ (c 7 in methanol); ν_{\max} (cm^{-1}) (KBr disks): 3410 br (O–H), 1735 (C=O); HRMS (FAB): calcd for $\text{C}_{36}\text{H}_{64}\text{O}_{22}\text{Na}$ ($\text{M}+\text{Na}^+$) 871.378694, found 871.378598; ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz): δ 5.41 (d, 1H, $J_{1''\text{a-b}}=3.7$ Hz, H-1''), 4.88 (d, 1H, $J_{1-2}=3.2$ Hz, H-1), 4.86 (d, 1H, $J_{1'-2'}=3.7$ Hz, H-1'), 4.35 (d, 1H, $J_{1'''\text{a-b}}=12.1$ Hz, H-1'''a), 4.11 (d, 1H, $J_{1'''\text{a-b}}=12.1$ Hz, H-1'''b), ca. 4.08 (m, 2H, H-3''', H-4'''), 4.07 (m, 1H, H-5'), 4.05 (m, 1H, H-5''), 3.93 (m, 1H, H-4'), 3.91 (dd, 1H, $J_{6''\text{a-b}}=11.1$ Hz, $J_{6''\text{a-5''}}=5.6$ Hz, H-6''a), ca. 3.89 (m, 1H, H-5), ca. 3.85 (m, 1H, H-6'a), 3.83 (m, 1H, H-3), 3.80 (m, 1H, H-4), ca. 3.76 (m, 4H, H-2, H-2', H-6'''a, H-6'''b), ca. 3.73 (m, 1H, H-3'), ca. 3.72 (m, 1H, H-5'''), ca. 3.71 (m, 2H, H-6a, H-6b), 3.69 (m, 1H, H-6''b), 3.67 (t, 1H, $J_{2''\text{a-b}}=J_{3''\text{a-b}}=9.5$ Hz, H-3''), ca. 3.65 (m, 1H, H-6'b), 3.43 (dd, 1H, $J_{2''\text{a-b}}=9.7$ Hz, $J_{1''\text{a-b}}=3.7$ Hz, H-2''), 3.32 (t, 1H, $J_{3''\text{a-b}}=J_{4''\text{a-b}}=9.5$ Hz, H-4''), 2.37 (t, 2H, $J=7.5$ Hz, $-\text{CH}_2-\text{CO}-$), 1.63 (m, 2H, $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-$), 1.29 (m, 16H, $-\text{CH}_2-$ chain), 0.90 (t, 3H, $J=6.8$ Hz, CH_3-); ^{13}C NMR (CD_3OD , 60 MHz): δ 174.8 (C=O), 104.1 (C-2'''), 100.4 (C-1'), 100.1 (C-1), 93.9 (C-1''), 83.7 (C-5'''), 78.6 (C-3'''), 74.7 (C-4'''), 74.5 (C-3''), 73.1 (C-5''), 72.8 (C-2''), 72.4 (C-5), 72.0 (C-4''), 71.5 (C-3)'^a, 71.3 (C-3)'^a, 71.0 (C-4)'^b, 70.9 (C-4)'^b, 70.5 (C-5)'^c, 70.2 (C-2, C-2)'^c, 68.2 (C-6''), 67.8 (C-6'), 64.0 (C-1'''), 63.1 (C-6'''), 62.6 (C-6), 35.0 ($-\text{CH}_2-\text{CO}-$), 33.1, 30.8, 30.6, 30.5, 30.3, 26.0, 23.7 ($-\text{CH}_2-$ lauroyl backbone), 14.5 (CH_3 -lauroyl). Note: ^{13}C NMR assignments marked with the same letter may be interchangeable.

Supplementary data

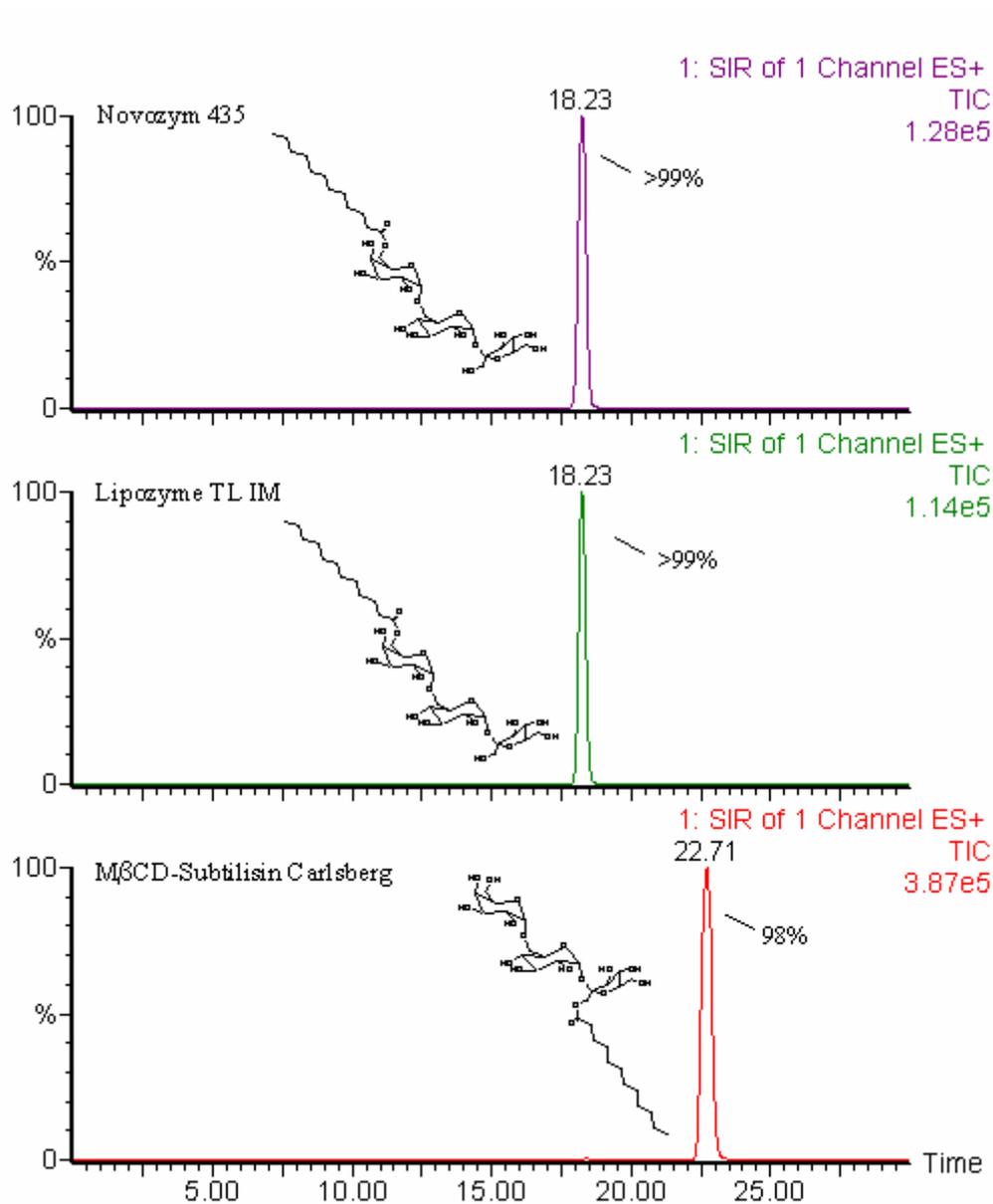
Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.tet.2005.10.046

References and notes

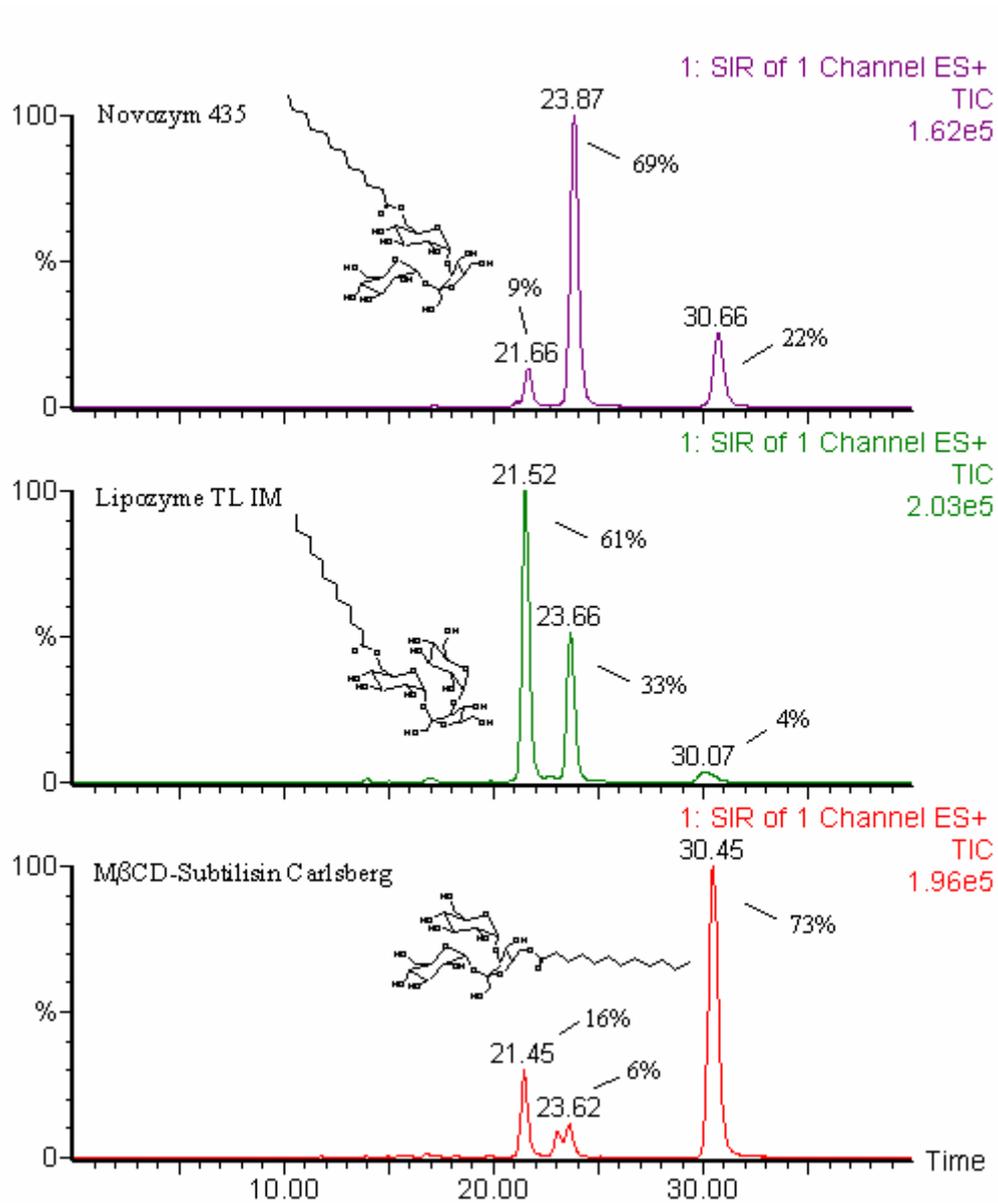
1. Watanabe, T. *Foods Food Ingr. J. Jpn.* **1999**, *180*, 18–25.
2. Björkling, F.; Godtfredsen, S. E.; Kirk, O. *Trends Biotechnol.* **1991**, *9*, 360–363.

3. Ferrer, M.; Comelles, F.; Plou, F. J.; Cruces, M. A.; Fuentes, G.; Parra, J. L.; Ballesteros, A. *Langmuir* **2002**, *18*, 667–673.
4. Garofalakis, G.; Murria, B. S.; Sarney, D. B. *J. Colloid Interface Sci.* **2000**, *229*, 391–398.
5. Haines, A. H. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1976**, *33*, 11–109.
6. Haines, A. H. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1981**, *39*, 13–70.
7. Schmid, R. D.; Verger, R. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1998**, *37*, 1608–1633.
8. Bordusa, F. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4817–4867.
9. Plou, F. J.; Cruces, M. A.; Ferrer, M.; Fuentes, G.; Pastor, E.; Bernabé, M.; Christensen, M.; Comelles, F.; Parra, J. L.; Ballesteros, A. *J. Biotechnol.* **2002**, *96*, 55–66.
10. Carrea, G.; Riva, S. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, *39*, 2226–2254.
11. Woudenberg-van Oosterom, M.; van Rantwijk, F.; Sheldon, R. A. *Biotechnol. Bioeng.* **1996**, *49*, 328–333.
12. Riva, S.; Chopineau, J.; Kieboom, A. P. G.; Klibanov, A. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 584–589.
13. Riva, S.; Nonini, M.; Ottolina, G.; Danieli, B. *Carbohydr. Res.* **1998**, *314*, 259–266.
14. Ferrer, M.; Cruces, M. A.; Plou, F. J.; Bernabé, M.; Ballesteros, A. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 4053–4061.
15. Gustavsson, M. T.; Persson, P. V.; Iversen, T.; Martinelle, M.; Hult, K.; Teeri, T. T.; Brumer, H. *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 196–203.
16. Devulapalle, K. S.; Gómez de Segura, A.; Ferrer, M.; Alcalde, M.; Mooser, G.; Plou, F. J. *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*, 1029–1034.
17. Ferrer, M.; Perez, G.; Plou, F. J.; Castell, J. V.; Ballesteros, A. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2005**, *42*, 35–39.
18. Ferrer, M.; Cruces, M. A.; Bernabé, M.; Ballesteros, A.; Plou, F. J. *Biotechnol. Bioeng.* **1999**, *65*, 10–16.
19. Saleki-Gerhardt, A.; Stowell, J. G.; Byrn, S. R.; Zografi, G. *J. Pharm. Sci.* **1995**, *84*, 318–323.
20. Degn, P.; Zimmermann, W. *Biotechnol. Bioeng.* **2001**, *74*, 485–491.
21. Ferrer, M.; Plou, F. J.; Fuentes, G.; Cruces, M. A.; Andersen, L.; Kirk, O.; Christensen, M.; Ballesteros, A. *Biocatal. Biotransform.* **2002**, *20*, 63–71.
22. Pleiss, J.; Fischer, M.; Schmid, R. D. *Chem. Phys. Lipids* **1998**, *93*, 67–80.
23. Muralidhar, R. V.; Chirumamilla, R. R.; Marchant, R.; Ramachandran, V. N.; Ward, O. P.; Nigam, P. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, *18*, 81–97.
24. Fuentes, G.; Ballesteros, A.; Verma, C. S. *Protein Sci.* **2004**, *13*, 3092–3103.
25. Griebenow, K.; Laureano, Y. D.; Santos, A. M. Montanez Clemente, I., Rodríguez, L., Vidal, M. W., Barletta, G., *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 8157–8163.
26. Montanez Clemente, I.; Alvira, E.; Macias, M.; Ferrer, A.; Fonseca, M.; Rodríguez, J.; Gonzalez, A.; Barletta, G. *Biotechnol. Bioeng.* **2002**, *78*, 53–59.
27. Polat, T.; Bazin, H. G.; Linhardt, R. J. *J. Carbohydr. Chem.* **1997**, *16*, 1319–1325.
28. Fuentes, G.; Cruces, M. A.; Plou, F. J.; Ballesteros, A.; Verma, C. S. *ChemBioChem* **2002**, *9*, 907–910.
29. Potier, P.; Bouchu, A.; Gagnaire, J.; Queneau, Y. *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 2409–2419.

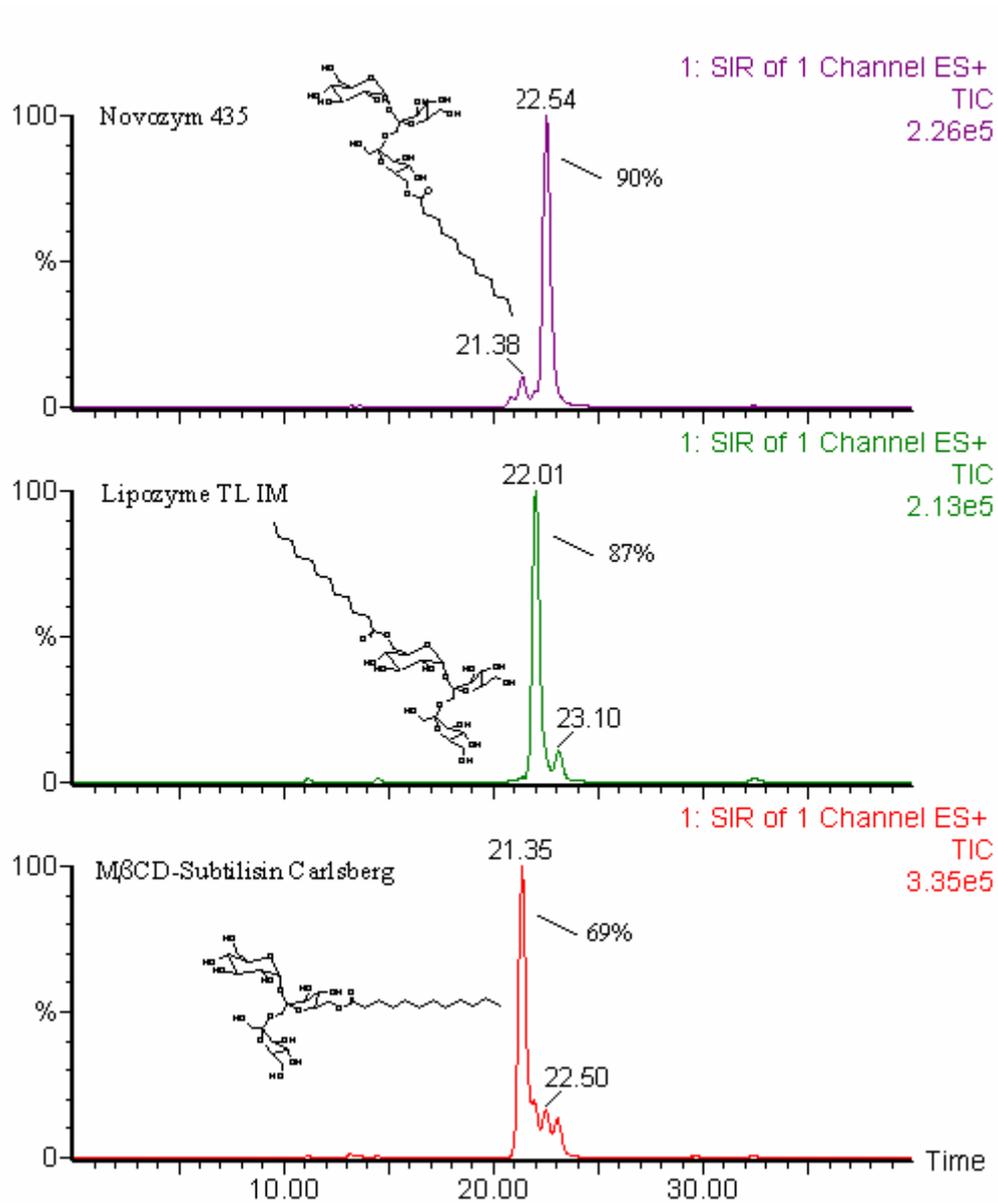
SUPPLEMENTARY DATA



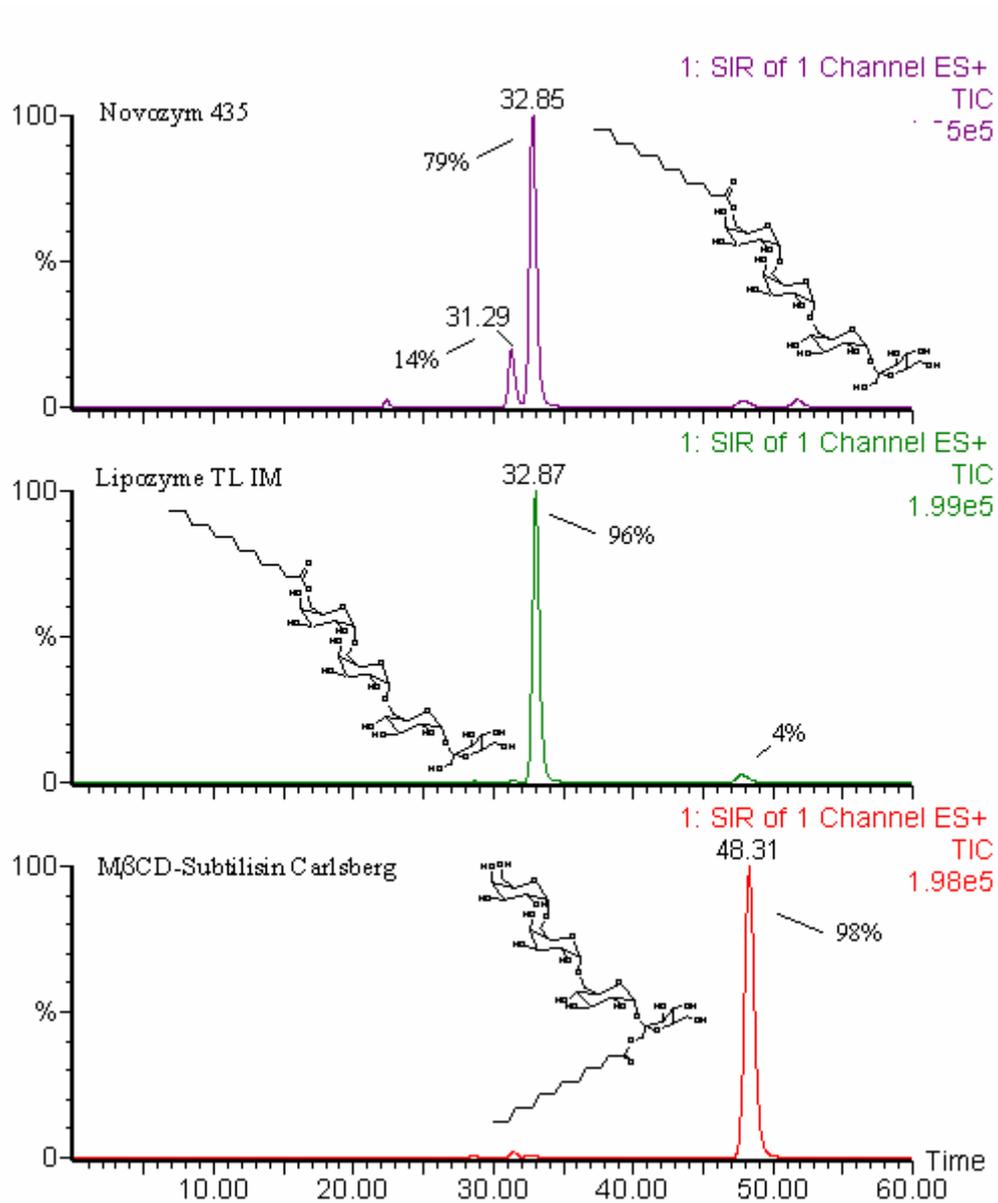
HPLC/MS chromatograms of isolated monoester for each enzyme used to acylate raffinose (**1**) showing the regioisomeric distribution. Structure of main regioisomer is represented.



HPLC/MS chromatograms of isolated monoester for each enzyme used to acylate melezitose (**2**) showing the regioisomeric distribution. Structure of main regioisomer is represented.



HPLC/MS chromatograms of isolated monoester for each enzyme used to acylate 1-kestose (**3**) showing the regioisomeric distribution. Structure of main regioisomer is represented.



HPLC/MS chromatograms of isolated monoester for each enzyme used to acylate stachyose (**4**) showing the regioisomeric distribution. Structure of main regioisomer is represented.

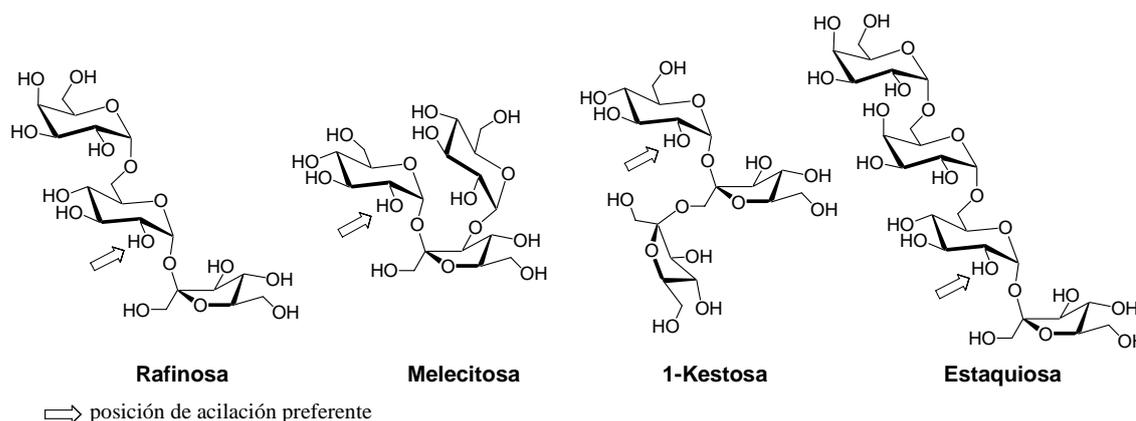
ANEXO III

Regioselectividad en la acilación de oligosacáridos catalizada por la metaloproteasa termolisina.

Tetrahedron, 62 (2006): 2361-2369

Resumen

En este trabajo se ha llevado a cabo una investigación sobre el alcance de la acilación de carbohidratos empleando la metaloproteasa termolisina inmovilizada sobre Celita como biocatalizador. Las reacciones se realizaron en DMSO, un buen disolvente para carbohidratos, donde la enzima ya había mostrado su actividad en la transesterificación de sacarosa, maltosa y maltooligosacáridos. Sorprendentemente, no se observó reacción sobre trehalosa ni lactosa, dos disacáridos que contienen glucosa en su estructura. En contraste, se sintetizaron los monolauratos de varios oligosacáridos que contienen una unidad de sacarosa en su estructura, mediante la transesterificación directa empleando laurato de vinilo como agente acilante. La regioselectividad de la reacción se determinó de manera precisa mediante HPLC/MS y la estructura de los principales regiosómeros se estableció mediante una combinación de experimentos RMN. La posición preferente de acilación en todos los casos es el OH-2 de la unidad de α -D-glucopiranososa unida 1 \rightarrow 2 a la unidad de β -D-fructofuranosa. Estos resultados correlacionan con la regioselectividad observada en el caso del disacárido sacarosa. Por último se propone un motivo de unión del carbohidrato a la termolisina para que produzca la catálisis. En las siguientes páginas se reproduce el artículo publicado.



Regioselectivity in acylation of oligosaccharides catalyzed by the metalloprotease thermolysin

Ignacio Pérez-Victoria^{a,b} and Juan Carlos Morales^{a,*}

^aDepartamento de Química, Puleva Biotech, S. A., 18004 Granada, Spain

^bDepartamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, 18071 Granada, Spain

Received 19 October 2005; revised 23 November 2005; accepted 28 November 2005

Available online 10 January 2006

Abstract—Investigation of the acylation scope of carbohydrates by metalloprotease thermolysin immobilized on Celite as biocatalyst has been carried out. The reactions were performed in DMSO, a good solvent for carbohydrates, where the enzyme has previously shown its activity in transesterifications of sucrose, maltose and maltose-containing oligosaccharides. Surprisingly, no reaction was observed for glucose or the glucose-containing disaccharides, trehalose and lactose. In contrast, laurate monoesters of several sucrose-containing tri- and tetrasaccharides were synthesized through a one step transesterification using vinyl laurate as the acylating agent. Enzyme regioselectivity was accurately determined by HPLC/MS and the structure of the main regioisomers was established by a combination of NMR experiments. The preferred position of acylation in all cases was the 2-OH of the α -D-glucopyranose moiety linked 1 \rightarrow 2 to the β -D-fructofuranose unit. These results correlate with the regioselectivity observed in the case of the disaccharide sucrose. A general carbohydrate binding motif for catalysis by thermolysin is proposed.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Carbohydrate fatty acid esters are an important class of biodegradable and non-toxic surfactants with broad applications in food, cosmetic and pharmaceutical industries.¹ Their emulsifying and surfactant properties² may be modulated by the type of fatty acid and the sugar moiety. Actually, the degree of substitution and the position of attachment to the fatty acid is also important as shown by the different CMC values found for regioisomeric sucrose monoesters.³ Moreover, this type of compounds also present interesting biological properties like the recently reported antibacterial⁴ and antitumoral⁵ activities of maltotriose fatty acid esters.

Regioselective chemical monoacylation of carbohydrates is not easy due to their multifunctionality⁶ and frequently, protection/deprotection sequences are needed.⁷ On the other hand, enzymatically catalyzed sugar fatty acid esterification reactions are, in general, reasonably specific and the regioselective acylation of several carbohydrates with both lipases⁸ and proteases⁹ has been reported.¹⁰ The hydrolases used in these processes share in common a similar mechanism, which involves the formation of an acyl

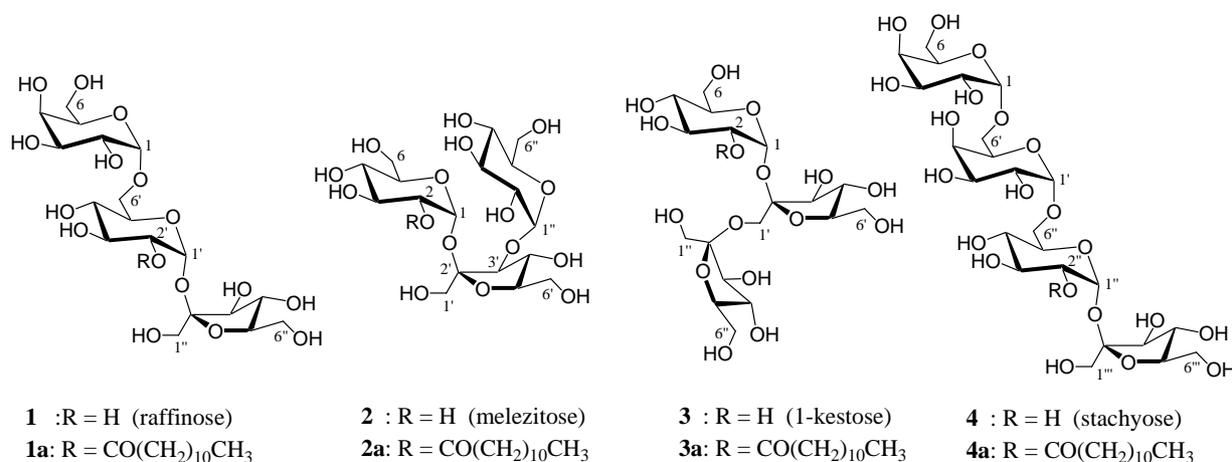
enzyme intermediate and the acylation takes place on the less hindered primary hydroxyls.

We have recently reported on the enzymatic preparation of oligosaccharide fatty acid esters showing how different regioisomers substituted on primary hydroxyls can be prepared by selecting the appropriate hydrolase preparation.¹¹ We were also interested in investigating enzymes that could provide regioselective esterification on secondary hydroxyl groups. Lipases are able to acylate secondary hydroxyl groups in sugars solely when the primary hydroxyls are blocked (with a protecting group)¹² and there are only two examples of serine proteases, which have shown regioselectivity towards secondary hydroxyls in unprotected carbohydrates.^{13–15} A very promising enzyme employed to date for secondary hydroxyl acylation in carbohydrates is thermolysin, the thermostable neutral metalloprotease from *Bacillus thermoproteolyticus*. This enzyme was first used by Pedersen et al.¹⁶ to catalyze the transesterification of sucrose with vinyl laurate in DMSO with selectivity towards the 2-OH of the glucose moiety. Recently, the same authors have extended the use of this enzyme to prepare cyclodextrin esters.¹⁷

In this work, we study the transesterification of carbohydrates catalyzed by thermolysin. Acylation of the sucrose-containing oligosaccharides raffinose, melezitose, 1-kestose and stachyose with vinyl laurate in DMSO is described (Scheme 1).

Keywords: Oligosaccharide acylation; Thermolysin; Carbohydrate fatty acid esters; Transesterification; Regioselectivity.

* Corresponding author. Tel.: +34 958 240320; fax +34 958 240160; e-mail: jcmorales@pulevabiotech.es



Scheme 1. Oligosaccharides used in this study and their corresponding main acylated regioisomers found after thermolysin catalysis.

The results obtained allow us to suggest a possible reaction-mechanism for carbohydrate acylation by thermolysin.

2. Results

Our investigation on the acylation capacity of thermolysin over a range of carbohydrates used the reaction conditions previously described for sucrose.¹⁶ We decided to employ the amorphous form of each oligosaccharide obtained by lyophilization in order to remove most of the crystallization water¹⁸ and thus avoid the formation of fatty acid (by thermolysin-catalyzed hydrolysis of the vinyl ester). The amorphous form also has the additional advantage of being dissolved much more rapidly in DMSO than the crystalline carbohydrate. The enzyme was immobilized onto Celite as previously described¹⁶ but the preparation was dried by lyophilization instead of overnight vacuum drying.

First, we tried transesterification of monosaccharide glucose since sucrose is acylated at the 2-OH of the glucose unit by thermolysin. Surprisingly, no reaction was observed by TLC after 24 h (Fig. 1). Furthermore, neither trehalose or lactose, two disaccharides that contain glucose in their structures, showed acylation by the metalloprotease. Although maltose and sucrose, both containing glucose in their structures, are acylated at secondary hydroxyl groups, it seems that other structural or electrostatic features are needed in the carbohydrate to interact with thermolysin and allow catalysis to take place.

Next, we investigated the acylation of raffinose (**1**) that can be considered a sucrose molecule substituted at the C-6

hydroxyl group with a galactose unit. After 24 h, a monoacylated product was observed by TLC (Fig. 1). The reaction was stopped after 72 h, when traces of diester were observed although some starting material remained unreacted. No reaction was observed with the Celite control prepared in the same manner as the immobilized enzyme. The reaction mixture of the enzyme-catalyzed transesterification was processed and finally subjected to flash chromatography. The monoester fraction was separated from remaining starting material and minor amounts of

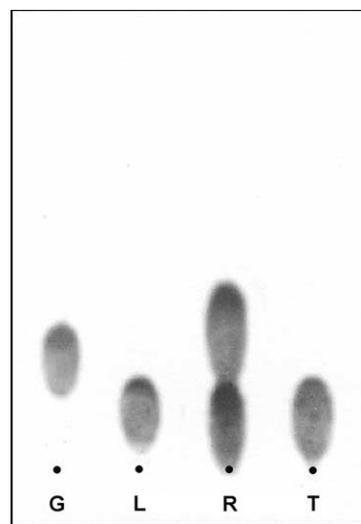


Figure 1. TLC of reaction after 24 h with the saccharides G = glucose; L = lactose; R = raffinose and T = trehalose. Only product formation is observed in the raffinose reaction. Alliquots were extracted with *n*-hexane to remove excess of vinyl laurate and diluted with methanol prior to analysis. Eluent: chloroform–methanol (2.5/1, v/v)

Table 1. HRMS [FAB (+)] of the oligosaccharide monoesters. *R_f* and yields are also indicated

| Carbohydrate | Monolaurate ^a Isolated yield (%) ^c | <i>R_f</i> ^b | Formula | <i>M_w</i> (M + Na) | |
|--------------|---|-----------------------------------|--|-------------------------------|----------|
| | | | | Calculated | Found |
| Raffinose | 27 | 0.31 | C ₃₀ H ₅₄ O ₁₇ Na | 709.3259 | 709.3246 |
| Melezitose | 22 | 0.32 | C ₃₀ H ₅₄ O ₁₇ Na | 709.3259 | 709.3263 |
| 1-Kestose | 32 | 0.32 | C ₃₀ H ₅₄ O ₁₇ Na | 709.3259 | 709.3248 |
| Stachyose | 12 | 0.63 | C ₃₆ H ₆₄ O ₂₂ Na | 871.3787 | 871.3785 |

^a As a mixture of regioisomers.

^b See TLC solvent in Section 4.

^c See Section 4 for yield calculation.

diacylated compounds. The FTIR analysis of the isolated monoester (as a mixture of regioisomers) showed the presence of the ester carbonyl group signal at 1730 cm^{-1} and HRMS analysis gave the expected molecular weight (Table 1). The isolated yield obtained is slightly lower than for sucrose.¹⁶

Then, we extended the reaction to other sucrose-containing oligosaccharides to check the possible influence of other sugar substituents in the structure of sucrose on acylation with themolysin. Two trisaccharides and a tetrasaccharide were examined: melezitose (**2**) and 1-kestose (**3**), that can be considered as a C-3' hydroxyl-glucosylated sucrose and a C-1' hydroxyl-fructosylated sucrose, respectively, and stachyose (**4**), that can be considered a raffinose extended on C-6 with galactose. All reactions showed some diester formation and remaining starting sugar by TLC after 72 h, similarly to the raffinose case. After processing and purification, monoacylated compounds were isolated (as a mixture of regioisomers) with the yields shown in Table 1.

In order to study the regioselectivity of the acylation by themolysin, the purified monoester fraction for each reaction was analyzed by HPLC/MS (see Section 4).¹¹ The regioisomeric distribution obtained by this method is much more accurate than the typically reported based on ^{13}C NMR. The high chromatographic sensitivity achieved by acquisition in SIR mode (selected-ion recording mode) allows the detection of regioisomers present in the sample in very small quantities; on the other hand, the intensities observed in the routine ^{13}C NMR spectrum are highly dependent on the number of acquisition scans (minor regioisomers may not even appear in the spectrum) and a particular carbon in different regioisomers may present different relaxation times. HPLC/MS chromatograms in Figure 2 show the substitution pattern obtained for each oligosaccharide. It is clear the presence of a major regioisomer in all cases, although the selectivity is not the same, decreasing in the order: raffinose \approx stachyose > melezitose > 1-kestose.

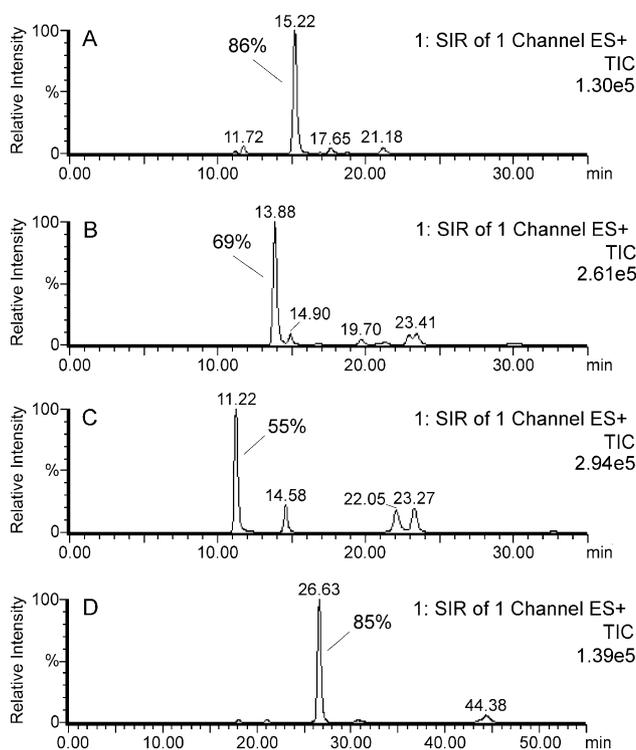


Figure 2. HPLC/MS chromatograms showing the regioisomeric distribution in the isolated monoesters. (A) Raffinose monolaurate regioisomers. (B) Melezitose monolaurate regioisomers. (C) 1-Kestose monolaurate regioisomers. (D) Stachyose monolaurate regioisomers. The percentage of the main regioisomer in each mixture is also indicated.

A combination of one and two-dimensional NMR experiments was then used to establish the position of acylation in the main regioisomer. Using raffinose monolaurate as example, the HMBC spectrum shows the correlation between the carbon peak of the carbonyl of the newly created ester linkage with the proton of the carbon bearing the oxygen atom of the ester function (Fig. 3A). The edited-HSQC spectrum corroborates that this carbon is a methine and thus acylation has taken

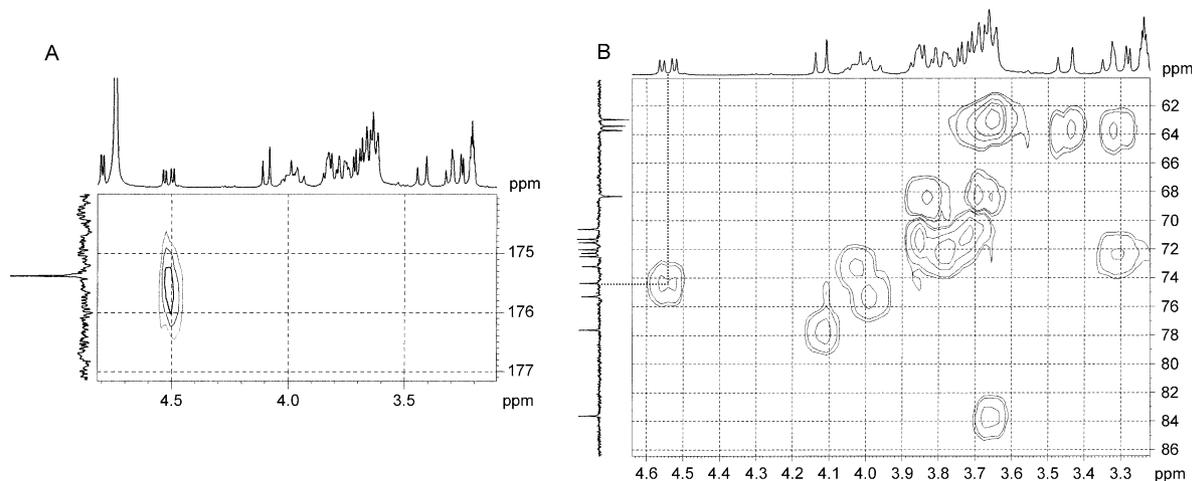


Figure 3. (A) Amplification of the HMBC spectrum of isolated 2'-O-lauroylraffinose (**1a**) (86% regioisomeric purity) showing the key cross peak involving the carbonyl ester signal. (B) Part of the edited-HSQC spectrum of the same product. The correlation between the acylated carbon of raffinose (a methine) and its corresponding proton is indicated.

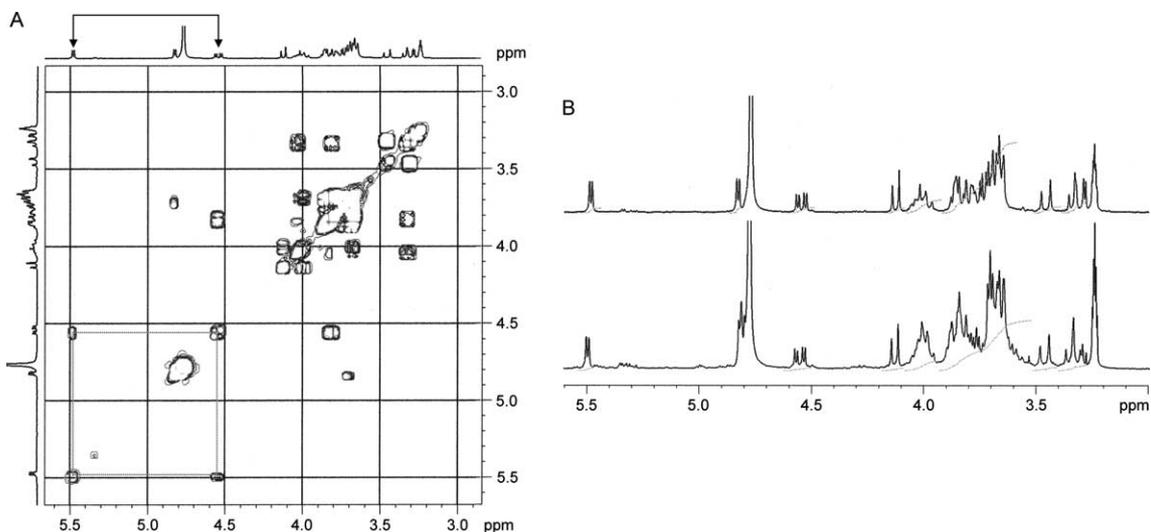


Figure 4. (A) Part of the COSY spectrum (carbohydrate region) of 2'-O-lauroylraffinose (**1a**) (86% regioisomeric purity) with indication of the vicinal coupling between the anomeric glucose proton and the proton of the acylated position. (B) Comparison between the proton spectra (carbohydrate region) of 2'-O-lauroylraffinose (**1a**) (86% regioisomeric purity) (upper spectrum) and 2''-O-lauroylstachyose (**4a**) (85% regioisomeric purity) (lower spectrum).

place in a secondary hydroxyl (Fig. 3B). Finally, a COSY experiment reveals vicinal scalar coupling between the proton of this methine and the anomeric proton of the glucose moiety (Fig. 4A) providing the final evidence that acylation has taken place in the 2-OH of the glucose moiety in raffinose. A similar approach was used for the other oligosaccharide monolaurates. In the case of the stachyose derivative a simple comparison between its 1D proton spectrum and that of the acylated raffinose (Fig. 4B) proves at a glance that acylation has also taken place in the 2-OH of the glucose moiety in stachyose. In the cases of melezitose and 1-kestose, where a more complex regioisomeric mixture was observed, selective 1D-TOCSY experiments were very helpful. Comparison between the spectrum obtained by selective excitation of the anomeric glucose proton in both 1-kestose and its derivative clearly shows that the 2-

OH of this (spin system) residue was acylated (Fig. 5A). In the case of melezitose the same approach shows that acylation has taken place in the 2-OH of the α -D-glucopyranose moiety linked 1 \rightarrow 2 to the β -D-fructofuranose unit (Fig. 5B). When compared with the parent carbohydrate, the ^{13}C NMR spectra of all new derivatives (Table 2) showed the expected downfield shift of the peak corresponding to the acylated glucosyl C-2 and a similar upfield shift of the peaks corresponding to the neighboring glucosyl C-1 and C-3, in agreement with the general trend observed by Yoshimoto et al.¹⁹ In all these sucrose-containing oligosaccharides acylation occurred preferentially at the 2-OH of the α -D-glucopyranose moiety linked 1 \rightarrow 2 to β -D-fructofuranose, which is in agreement with the regioselectivity reported in the case of sucrose acylation catalyzed by the same enzyme¹⁶ (see structures **1a–4a** in Scheme 1).

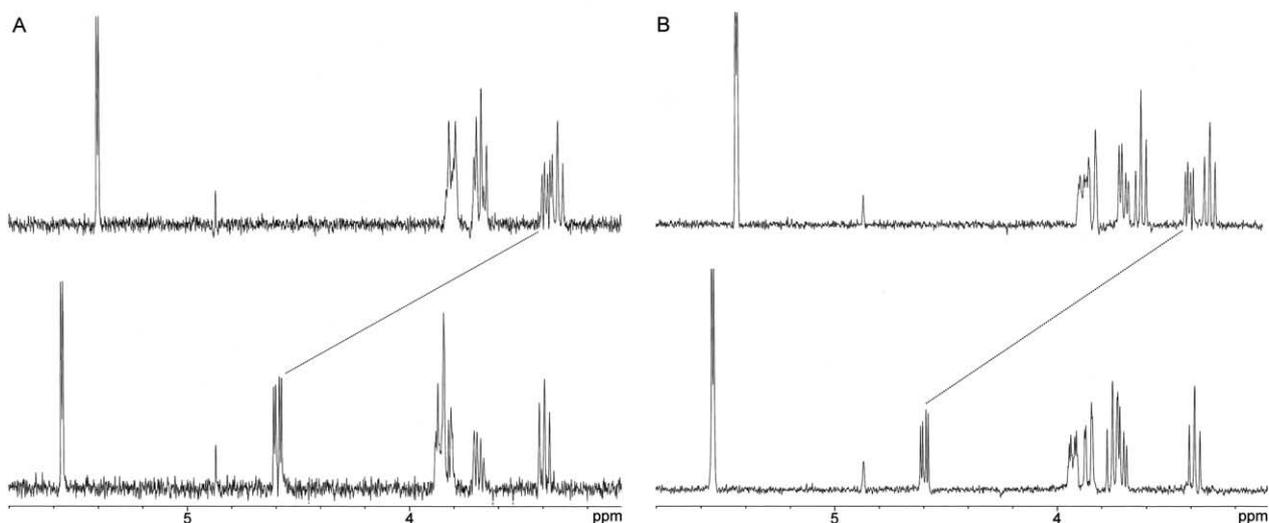


Figure 5. Comparison of 1D TOCSY spectra obtained after selective excitation of the anomeric proton of α -D-glucopyranose moiety linked 1 \rightarrow 2 to β -D-fructofuranose in: (A) 1-kestose (upper) and its monolauryl ester (lower); (B) melezitose (upper) and its monolauryl ester (lower). Deshielding of the 2-H of the glucose residue consequence of esterification is evident as shown in the figure.

Table 2. ^{13}C NMR chemical shifts (ppm) of compounds **1a**, **2a**, **3a**, **4a** and their parent carbohydrates **1**, **2**, **3** and **4**

| Compound | C-1 | C-2 | C-3 | C-4 | C-5 | C-6 |
|--|----------------|---------------------------------|---|-----------------------------|-------------------|------|
| α -Galactopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- 1 | 100.5 | 70.5 | 71.4 | 71.0 | 72.4 | 62.8 |
| α -Glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- 93.4 | | 73.0 | 74.4 | 72.0 | 73.3 | 68.3 |
| β -Fructofuranose | 64.2 | 105.3 | 79.2 | 75.3 | 83.4 | 63.2 |
| α -Galactopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- 1a | 100.6 | 70.5 | 71.4 | 71.2 | 72.3 | 62.8 |
| α -Glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- 90.7 | | 74.2 | 72.1 | 71.9 | 73.0 | 68.2 |
| β -Fructofuranose | 63.6 | 105.8 | 77.5 | 75.2 | 83.4 | 63.2 |
| Laurate | 175.4 (C=O) | 35.1 (-CH ₂ -CO-) | 33.0–23.7 (-CH ₂ - chain) | 14.4 (CH ₃ -) | | |
| α -Glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- 2 | 93.3 | 73.2 | 75.1 | 71.7 | 74.1 | 62.4 |
| β -Fructofuranosyl-(3 \rightarrow 1)- | 64.2 | 105.3 | 85.8 | 74.4 | 83.4 | 63.3 |
| α -Glucopyranose | 101.9 | 73.8 | 74.9 | 72.2 | 74.0 | 62.9 |
| α -Glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- 2a | 90.3 | 74.3 | 72.4 | 71.4 | 74.1 | 62.3 |
| β -Fructofuranosyl-(3 \rightarrow 1)- | 63.9 | 105.0 | 85.2 | 74.3 | 83.2 | 63.3 |
| α -Glucopyranose | 102.7 | 73.7 | 74.8 | 71.8 | 74.0 | 62.4 |
| Laurate | 175.2 (C=O) | 35.1 (-CH ₂ -CO-) | 33.0–23.7 (-CH ₂ - chain) | 14.4 (CH ₃ -) | | |
| α -Glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- 3 | 94.1 | 73.4 | 74.7 | 71.5 | 74.4 | 62.4 |
| β -Fructofuranosyl-(1 \rightarrow 2)- | 63.0 | 105.3 | 79.9 | 75.6 | 83.6 | 63.2 |
| β -Fructofuranose | 62.4 | 105.0 | 78.9 | 76.4 | 83.5 | 63.8 |
| α -Glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- 3a | 91.1 | 74.3 | 72.0 | 71.6 | 74.3 | 62.2 |
| β -Fructofuranosyl-(1 \rightarrow 2)- | 63.2 | 105.5 | 77.8 | 75.0 | 83.6 | 63.2 |
| β -Fructofuranose | 63.0 | 105.2 | 78.9 | 76.4 | 83.4 | 63.5 |
| Laurate | 175.5 (C=O) | 35.1 (-CH ₂ -CO-) | 33.1–23.7 (-CH ₂ - chain) | 14.5 (CH ₃ -) | | |
| α -Galactopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- 4^a | 99.8 | 70.2 ^b | 71.3 ^b | 70.8 | 72.3 | 62.5 |
| α -Galactopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- | 100.1 | 70.1 ^b | 71.1 ^b | 70.8 | 70.3 ^b | 67.7 |
| α -Glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- 93.4 | | 72.8 | 74.4 | 71.5 | 72.9 | 67.7 |
| β -Fructofuranose | 63.8 | 105.2 | 78.7 | 75.3 | 83.3 | 63.4 |
| α -Galactopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- 4a | 100.1 | 70.3 ^b | 71.5 ^b | 71.1 ^b | 72.4 | 62.7 |
| α -Galactopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- | 100.4 | 70.2 ^b | 71.3 ^b | 71.0 ^b | 70.3 ^b | 67.9 |
| α -Glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- 90.7 | | 74.2 | 72.1 | 71.9 | 72.9 | 68.1 |
| β -Fructofuranose | 63.6 | 105.9 | 77.5 | 75.2 | 83.5 | 63.3 |
| Laurate | 175.4 (C=O) | 35.1 (-CH ₂ -CO-) | 33.0–23.7 (-CH ₂ - chain) | 14.4 (CH ₃ -) | | |

All spectra were acquired in CD₃OD. The carbons where the induced shift effect due to acylation is observed are indicated in bold.

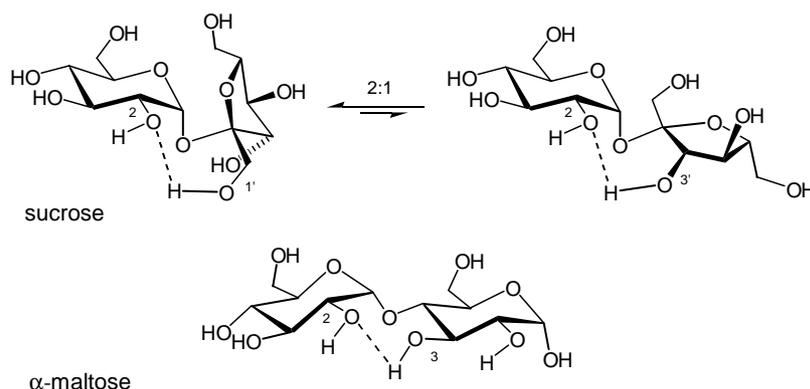
^a Solvent CD₃OD–D₂O (7.5/1).

^b Assignments marked with the same letter may be reversed.

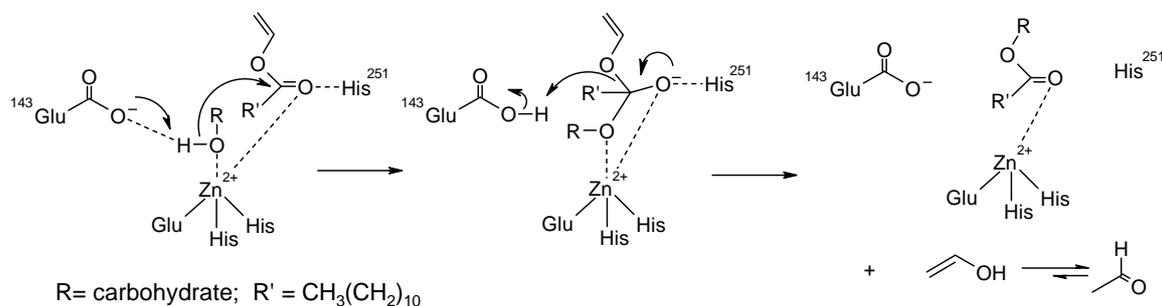
3. Discussion

Acylation of a number of carbohydrates using metalloprotease thermolysin has been investigated. In this work, sucrose-containing oligosaccharides have been esterified with vinyl laurate. At the same time, transesterification of sucrose, maltose, maltotetraose, maltoheptaose and cyclodextrins has been reported by Pedersen et al.^{16,17} The major regioisomer obtained for sucrose and cyclodextrins has shown acylation at the secondary hydroxyl group in position 2 of glucose whereas

no regioselectivity has been reported for maltose and maltose-containing oligosaccharides. It is important to note that monosaccharide glucose and disaccharides trehalose and lactose, both containing glucose in their structure, gave no acylation on the same reaction conditions. It seems that a common structural motif is necessary for a proper binding of the carbohydrate with the enzyme so that catalysis occurs. In fact, an inter-residue H-bond is present in sucrose,²⁰ (1'-OH \cdots O-2 or 3'-OH \cdots O-2) maltose and cyclodextrins²¹ (3-OH \cdots O-2'), where glucose OH-2 participates as hydrogen bond acceptor (Scheme 2).



Scheme 2. Inter-residual hydrogen bond found in DMSO-*d*₆ for sucrose (equilibrium of two conformations) and α -maltose.



Scheme 3. Proposed reaction mechanism for transesterification of carbohydrates with vinyl laurate by metalloprotease thermolysin.

It is important to note that this hydrogen bond organizes both involved hydroxyl groups in a very similar spatial position for both disaccharides. This motif is not possible in glucose, trehalose or lactose, and may arrange the sucrose- or maltose-containing saccharides in a specific way that allows appropriate interaction with the metalloprotease for catalysis to take place. In fact, sucrose is able to act as a bidentate ligand towards heavy atoms yielding isolable complexes like Δ -[Co(III)(phen)₂(sucrose)]³⁺ in which coordination takes place at the 2-OH of the glucose unit and the 1'-OH of the fructose unit, but no complex is formed with the monosaccharide glucose in such a case, probably because the specific spatial placement of the OHs achieved by sucrose is needed.²² On the other hand, the hydroxamate moiety of some inhibitors of thermolysin form a bidentate complex with the active site's zinc.²³ Thus, it would be reasonable to think that the carbohydrate binding to the zinc cation in the active site follows a similar bidentate approach, that would be possible for sucrose- or maltose-containing saccharides, but not for glucose, trehalose or lactose.

When we compared the regioselectivity found in the transesterification of the sucrose-containing oligosaccharides with the obtained for sucrose, a decrease is observed in the order sucrose \approx raffinose \approx stachyose $>$ melezitose $>$ 1-kestose. Actually, from the hydrolytic mechanism accepted for thermolysin,²⁴ a putative mechanism for the carbohydrate transesterification may be proposed to help understand the regioselectivity obtained. In this mechanism (Scheme 3) the nucleophilicity of the attacking hydroxyl is enhanced by amino acid Glu143, which functions as a general-basic catalyst (GBC) in the reaction. A possible explanation for the regioselectivity observed could be related with the relative acidity of this hydroxyl in the different carbohydrates, bearing in mind the GBC role of Glu143. ¹H NMR experiments have shown the presence of two intramolecular hydrogen-bond conformations for sucrose in DMSO-*d*₆, in which the glucosyl 2-OH acts as acceptor for 1'-OH or 3'-OH of the fructofuranosyl residue. The two hydrogen-bond conformations exist in a competitive equilibrium with the 1'-OH...O-2 hydrogen bond favoured over the 3'-OH...O-2 hydrogen bond in a ratio \sim 2:1, assuming that the magnitudes of the isotope effects reflect the relative 'strengths' of the hydrogen bonds (Scheme 2).²⁰ Semiempirical calculations based on these hydrogen bond conformations clearly establish that the glucosyl 2-OH is the most acidic position of the sucrose molecule.²⁵ This is also corroborated experimentally in the base-catalyzed acylation of sucrose with vinyl laurate in

DMSO, which produces 2-O-lauroylsucrose as the main regioisomer.²⁶ Similar NMR experiments have shown that the same competitive hydrogen-bond equilibrium found in sucrose also occurs in raffinose and stachyose²⁷ and thus a similar acidity of the corresponding glucosyl 2-OH should be expected. Both melezitose and 1-kestose have one of the possible interresidue H-bonds excluded in their sucrose moiety due to substitution with a sugar unit. The other possible inter-residual H-bond, the 1'-OH...O-2 hydrogen bond for melezitose and the 3'-OH...O-2 hydrogen bond for 1-kestose may take place, since O-3' sucrose derivatives and 1'-sucrose derivatives with similar structures have showed its presence in DMSO-*d*₆.^{28,29} It is important to note that missing one of the two-possible hydrogen-bonds may reduce the actual acidity of the OH-2, and also that the 3'-OH...O-2 hydrogen bond is weaker than the 1'-OH...O-2.²⁰ This takes us to the following order of relative acidity of the glucosyl 2-OH for each carbohydrate: sucrose \approx raffinose \approx stachyose $>$ melezitose $>$ 1-kestose, which correlates quite well with the substitution pattern observed.

In summary, we have extended the study of acylation with the metalloprotease thermolysin to several mono-, di-, tri- and tetrasaccharides. It seems that a common structural motif in the carbohydrate is needed for proper binding so that catalysis may take place. This motif may locate the two hydroxyl groups involved in an inter-residual H-bond in a position where they are able to bind the zinc ion via a bidentate mode. Accurate HPLC/MS analysis along with NMR spectroscopic studies show that the acylation occurs preferentially in the 2-OH of the glucose moiety involved in an inter-residue H-bond with the vicinal sugar moiety. Moreover, it is the first time that sucrose containing tri- and tetrasaccharides are acylated enzymatically in a secondary hydroxyl group. Studies of the biological and physical properties of these new non-ionic surfactants are in progress.

4. Experimental

4.1. Chemicals

Anhydrous dimethyl sulfoxide (DMSO) and vinyl laurate were supplied by Fluka; raffinose and melezitose from Sigma and stachyose and 1-kestose from TCI Chemicals. All the carbohydrates were used in their amorphous form prepared by lyophilization of the corresponding aqueous solutions. Thermolysin from *Bacillus thermoproteolyticus*

rokko (Type X, lyophilized powder, 50–100 units/mg protein) and acid-washed Celite were from Sigma.

4.2. Enzyme immobilization

Enzyme adsorption onto Celite was done essentially as previously described.¹⁶ Basically, thermolysin (100 mg) was dissolved in 3.33 ml of 50 mM 3-morpholinopropane-sulfonic acid (Na-MOPS) buffer at pH 7.5. The enzyme solution was mixed thoroughly with 3.33 g of acid-washed Celite and subsequently lyophilized to ensure complete drying of the preparation. Celite control was prepared as the immobilized enzyme.

4.3. General procedure for ester synthesis and product isolation

In a typical experiment a solution of raffinose, melezitose, 1-kestose (150 mg, 0.30 mmol) or stachyose (200 mg, 0.30 mmol) in anhydrous DMSO (8.5 ml) and vinyl laurate (228 mg, 1 mmol) were shaken with orbital stirring (325 rpm) at 45 °C in the presence of immobilized enzyme (1500 mg). When traces of diester were observed by TLC, the mixture was cooled and filtered. Then, *n*-hexane was added (5 ml) and the mixture vigorously stirred and then cooled to –20 °C. The *n*-hexane, which took up residual vinyl laurate, was decanted. The DMSO reaction solution was allowed to warm at room temperature and then mixed with 10 ml of water. The mixture was extracted with *n*-butanol–cyclohexane (3/1 v/v for trisaccharide reactions and 4:1 v/v for the stachyose reaction) (3×40 ml). The organic phases were pooled and washed with 15 ml of brine to remove residual DMSO, and solvents were evaporated off. The remaining residue was subjected to flash chromatography. Concentration of pure fractions in vacuo afforded the monolaurates (mixture of regioisomers) as amorphous white solids. Yields of oligosaccharide monolaurates (Table 1) are based on weight of the isolated fraction containing the monoesters.

All reactions were monitored by TLC on precoated Silica-Gel 60 plates (Alugram Sil G/UV₂₅₄ supplied by Macherey-Nagel), and detected by heating with Mostain (500 ml of 10% H₂SO₄, 25 g of (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, 1 g Ce(SO₄)₂·4H₂O). The elution system was CHCl₃–MeOH (2.5/1) for the reactions involving trisaccharides and EtOAc–MeOH–H₂O (7/5/1) for the reactions with stachyose. Flash chromatography was performed with Aldrich Silica gel 60 (200–400 mesh) using a gradient of chloroform/methanol 5:1–2:1 (v/v) for the trisaccharides monolaurates and 5:1 to 1:1 v/v for stachyose monolaurate.

4.4. HPLC/MS analysis

Analysis of the regioisomeric distribution of the isolated monoesters was carried out by HPLC/MS.¹¹ A Waters Alliance 2695 separation module was employed with a Waters Spherisorb 3 μm ODS2 column (4.6×250 mm) and a Waters Micromass ZQ mass spectrometer detector. The temperature of the column was set to 40 °C. Flow rate was 1.1 ml/min with splitting before the detection module (so that 0.20 ml/min enters the detector). Mobile phases were acetonitrile:water mixtures in isocratic conditions. The ratio

changed depending on the compounds as follows: for the analysis of the regioisomeric distribution of trisaccharide monolaurates, acetonitrile/water 35:65 (v:v) and for the more polar stachyose monolaurate, 30:70 (v:v). Detection was done with positive ESI ionization in both Scan and SIR (selecting the mass of the Na⁺ adduct, i.e., M+Na) modes. Cone voltage was set to 40 V to have the maximum possible intensity for the molecular ion and no fragmentation. Samples were prepared as water solutions (ca. 1 ppm) and immediately analyzed. Percentage of main regioisomer in each mixture was calculated by integration (using MassLynx version 3.5 software) of the corresponding SIR chromatogram (Fig. 2) as follows: [(Area peak mean regioisomer)/(ΣArea all peaks)]×100%. This calculation assumes that all regioisomers in the sample have the same response in the detector, that is, all of them ionize equally in the ESI source. The chromatographic conditions we have employed (constant flow rate, isocratic eluent, absence of additives in the mobile phase, sample diluted enough to avoid signal saturation, etc.) and the obvious structural similarity between all regioisomers (all of them have the same hydrophilic–lipophilic balance and are polar enough to form stable adducts with Na⁺ in the source) ensure that the equal response requirement is met.

4.5. Spectroscopic analysis

NMR spectra of the parent oligosaccharides and their corresponding isolated monolaurates were recorded on either a Bruker AVANCE 300 or ARX 400 [300 or 400 MHz (¹H) and 75 or 100 (¹³C)] at room temperature for solutions in CD₃OD. Chemical shifts are referred to the methanol multiplet, centered at 3.31 ppm for ¹H NMR and 49.0 ppm for ¹³C NMR. All spectra were acquired using standard pulse sequences, instrument settings and procedures (selective excitation in 1D selective TOCSY spectra was achieved by excitation sculpting with a PFGSE sequence). High resolution FAB (+) mass spectral analyses were obtained on a Micromass AutoSpec-Q spectrometer. Infrared spectra (KBr disks) were recorded using a Nicolet 20SXB FTIR spectrophotometer.

4.5.1. 2'-O-Lauroylraffinose (1a). The general procedure outlined above was followed. After 72 h the reaction was stopped and the monoester fraction isolated (56 mg, 27%). $R_f=0.31$, ν_{\max} (cm⁻¹) (KBr disks): 3410 br (O–H), 1730 (C=O); HRMS (FAB +): calcd for C₃₀H₅₄O₁₇Na (M+Na) 709.3259, found 709.3246. Compound **1a** was obtained with 86% regioisomeric purity (HPLC/MS). NMR assignments of main regioisomer **1a**: ¹H NMR (CD₃OD, 300 MHz): δ 5.55 (d, 1H, $J_{1'-2'}=3.7$ Hz, H-1'), 4.90 (d, 1H, $J_{1-2}=3.4$ Hz, H-1), 4.61 (dd, 1H, $J_{2'-3'}=9.7$ Hz, $J_{1'-2'}=3.7$ Hz, H-2'), 4.19 (d, 1H, $J_{3''-4''}=8.8$ Hz, H-3''), 4.10 (m, 1H, H-5'), 4.06 (t, 1H, $J_{3''-4''}=J_{4''-5''}=8.8$ Hz, H-4''), 3.93 (m, 1H, H-3), 3.93 (dd, 1H, $J_{6'a-b}=11.2$ Hz, $J_{6'a-5'}=5.7$ Hz, H-6'a), 3.88 (t, 1H, $J_{2'-3'}=J_{3'-4'}=9.7$ Hz, H-3'), 3.85 (m, 1H, H-5), 3.80 (m, 1H, H-4), ca. 3.77 (m, 1H, H-2), 3.75 (m, 1H, H-6'b), ca. 3.73 (m, 3H, H-5'', H-6''a, H-6''b), ca. 3.71 (m, 2H, H-6a, H-6b), 3.53 (d, 1H, $J_{1''a-b}=11.9$ Hz, H-1''a), 3.39 (t, 1H, $J_{3'-4'}=J_{4'-5'}=9.7$ Hz, H-4'), 3.38 (d, 1H, $J_{1''a-b}=11.9$ Hz, H-1''b), 2.38 (t, 2H, $J=7.4$ Hz, –CH₂–CO–), 1.63 (m, 2H, CH₂–CH₂–CO–),

1.29 (m, 16H, $-\text{CH}_2-$ chain), 0.90 (t, 3H, $J=6.7$ Hz, CH_3-); ^{13}C NMR (CD_3OD , 75 MHz): see assignment in Table 2.

4.5.2. 2-O-Lauroylmelezitose (2a). The general procedure outlined above was followed. After 72 h the reaction was stopped and the monoester fraction isolated (45 mg, 22%). $R_f=0.32$, ν_{max} (cm^{-1}) (KBr disks): 3400 br (O–H), 1725 (C=O); HRMS (FAB+): calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{54}\text{O}_{17}\text{Na}$ (M+Na) 709.3259, found 709.3263. Compound **2a** was obtained with 69% regioisomeric purity (HPLC/MS). NMR assignments of main regioisomer **2a**: ^1H NMR (CD_3OD , 300 MHz): δ 5.55 (d, 1H, $J_{1-2}=3.7$ Hz, H-1), 5.07 (d, 1H, $J_{1'-2'}=3.7$ Hz, H-1'), 4.61 (dd, 1H, $J_{2-3}=9.7$ Hz, $J_{1-2}=3.7$ Hz, H-2), ca. 4.26 (m, 2H, H-3', H-4'), 3.94 (m, 1H, H-5), 3.88 (m, 1H, H-5''), 3.87 (dd, 1H, $J_{6a-b}=12.1$ Hz, $J_{6a-5}=2.1$ Hz, H-6a), ca. 3.82 (m, 2H, H-6''a, H-6''b), ca. 3.78 (m, 3H, H-5', H-6'a, H-6'b), 3.76 (t, 1H, $J_{2-3}=J_{3-4}=9.7$ Hz, H-3), 3.72 (dd, 1H, $J_{6a-b}=12.1$ Hz, $J_{6b-5}=6.1$ Hz, H-6b), 3.70 (t, 1H, $J_{2'-3'}=J_{3'-4'}=9.6$ Hz, H-3''), 3.67 (d, 1H, $J_{1'-a-b}=11.9$ Hz, H-1'a), 3.44 (dd, 1H, $J_{2'-3'}=9.6$ Hz, $J_{1'-2'}=3.7$ Hz, H-2''), 3.43 (t, 1H, $J_{3'-4'}=J_{4'-5'}=9.6$ Hz, H-4''), 3.39 (t, 1H, $J_{3-4}=J_{4-5}=9.7$ Hz, H-4), 3.28 (d, 1H, $J_{1'-a-b}=11.9$ Hz, H-1'b), 2.38 (t, 2H, $J=7.5$ Hz, $-\text{CH}_2-\text{CO}-$), 1.63 (m, 2H, $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-$), 1.29 (m, 16H, $-\text{CH}_2-$ chain), 0.89 (t, 3H, $J=6.8$ Hz, CH_3-); ^{13}C NMR (CD_3OD , 75 MHz): see assignment in Table 2.

4.5.3. 2-O-Lauroyl(1-kestose) (3a). The general procedure outlined above was followed. After 72 h the reaction was stopped and the monoester fraction isolated (66 mg, 32%). $R_f=0.32$, ν_{max} (cm^{-1}) (KBr disks): 3400 br (O–H), 1730 (C=O); HRMS (FAB+): calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{54}\text{O}_{17}\text{Na}$ (M+Na) 709.3259, found 709.3248. Compound **3a** was obtained with 55% regioisomeric purity (HPLC/MS). NMR assignments of main regioisomer **3a**: ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz): δ 5.57 (d, 1H, $J_{1-2}=3.7$ Hz, H-1), 4.61 (dd, 1H, $J_{2-3}=9.7$ Hz, $J_{1-2}=3.7$ Hz, H-2), 4.27 (d, 1H, $J_{3'-4'}=8.4$ Hz, H-3'), 4.15 (d, 1H, $J_{3''-4''}=8.3$ Hz, H-3''), ca. 4.04 (m, 2H, H-4', H-4''), 3.87 (m, 1H, H-5), 3.86 (m, 1H, H-3), ca. 3.84 (m, 1H, H-6a), ca. 3.84–3.77 (m, 2H, H-1'a, H-1'b), ca. 3.77–3.72 (6H, H-5', H-5'', H-6'a, H-6'b, H-6''a, H-6''b), 3.70 (dd, 1H, $J_{6a-b}=12.0$ Hz, $J_{6b-5}=5.2$ Hz, H-6b), ca. 3.64–3.60 (2H, H-1''a, H-1''b), 3.41 (t, 1H, $J_{3-4}=J_{4-5}=9.7$ Hz, H-4), 2.38 (t, 2H, $J=7.5$ Hz, $-\text{CH}_2-\text{CO}-$), 1.63 (m, 2H, $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-$), 1.29 (m, 16H, $-\text{CH}_2-$ chain), 0.90 (t, 3H, $J=6.8$ Hz, CH_3-); ^{13}C NMR (CD_3OD , 100 MHz): see assignment in Table 2.

4.5.4. 2''-O-Lauroylstachyose (4a). The general procedure outlined above was followed. After 72 h the reaction was stopped and the monoester fraction isolated (31 mg, 12%). $R_f=0.63$, ν_{max} (cm^{-1}) (KBr disks): 3410 br (O–H), 1730 (C=O); HRMS (FAB+): calcd for $\text{C}_{36}\text{H}_{64}\text{O}_{22}\text{Na}$ (M+Na) 871.3787, found 871.3785. Compound **4a** was obtained with 85% regioisomeric purity (HPLC/MS). NMR assignments of main regioisomer **4a**: ^1H NMR (CD_3OD , 300 MHz): δ 5.55 (d, 1H, $J_{1'-2'}=3.7$ Hz, H-1'), 4.89 (d, 1H, H-1), 4.88 (d, 1H, $J_{1'-2'}=3.6$ Hz, H-1'), 4.61 (dd, 1H, $J_{2'-3'}=9.7$ Hz, $J_{1'-2'}=3.7$ Hz, H-2''), 4.20 (d, 1H, $J_{3''-4''}=8.6$ Hz, H-3'''), 4.08 (m, 1H, H-5''), 4.07 (m, 1H, H-5'), 4.05 (t, 1H, $J_{3''-4''}=J_{4''-5''}=8.6$ Hz, H-4'''), 3.93 (m, 1H, H-3'), 3.93 (dd, 1H, $J_{6''a-b}=11.1$ Hz, $J_{6''a-5''}=5.6$ Hz, H-6''a), ca. 3.89 (m, 1H, H-3), 3.87 (t, 1H, $J_{2''-3''}=J_{3''-4''}=9.7$ Hz,

H-3''), ca. 3.85 (m, 1H, H-6'a), ca. 3.83 (m, 1H, H-5), ca. 3.80 (m, 1H, H-4), ca. 3.76 (m, 2H, H-2, H-2'), ca. 3.73 (m, 4H, H-4', H-5''', H-6''a, H-6''b), ca. 3.71 (m, 2H, H-6a, H-6b), 3.70 (m, 1H, H-6''b), ca. 3.65 (m, 1H, H-6'b), 3.53 (d, 1H, $J_{1''a-b}=11.9$ Hz, H-1''a), 3.39 (t, 1H, $J_{3''-4''}=J_{4''-5''}=9.7$ Hz, H-4''), 3.38 (d, 1H, $J_{1''a-b}=11.9$ Hz, H-1''b), 2.38 (t, 2H, $J=7.4$ Hz, $-\text{CH}_2-\text{CO}-$), 1.63 (m, 2H, $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-$), 1.29 (m, 16H, $-\text{CH}_2-$ chain), 0.90 (t, 3H, $J=6.7$ Hz, CH_3-); ^{13}C NMR (CD_3OD , 75 MHz): see assignment in Table 2.

References and notes

1. Watanabe, T. *Foods Food Ingr. J. Jpn.* **1999**, *180*, 18–25.
2. Ferrer, M.; Comelles, F.; Plou, F. J.; Cruces, M. A.; Fuentes, G.; Parra, J. L.; Ballesteros, A. *Langmuir* **2002**, *18*, 667–673.
3. Garofalakis, G.; Murria, B. S.; Sarney, D. B. *J. Colloid Interface Sci.* **2000**, *229*, 391–398.
4. Devulapalle, K. S.; Gómez de Segura, A.; Ferrer, M.; Alcalde, M.; Mooser, G.; Plou, F. J. *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*, 1029–1034.
5. Ferrer, M.; Perez, G.; Plou, F. J.; Castell, J. V.; Ballesteros, A. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2005**, *42*, 35–39.
6. Haines, A. H. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1976**, *33*, 11–109.
7. Haines, A. H. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1981**, *39*, 13–70.
8. Schmid, R. D.; Verger, R. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1998**, *37*, 1608–1633.
9. Bordusa, F. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4817–4867.
10. Plou, F. J.; Cruces, M. A.; Ferrer, M.; Fuentes, G.; Pastor, E.; Bernabé, M.; Christensen, M.; Comelles, F.; Parra, J. L.; Ballesteros, A. *J. Biotechnol.* **2002**, *96*, 55–66.
11. Pérez-Victoria, I.; Morales, J. C., *Tetrahedron* **2005**, *62*, in press. doi: 10.1016/j.tet.2005.10.046.
12. Therisod, M.; Klivanov, A. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 3977–3981.
13. Pedersen, N. R.; Wimmer, R.; Matthiesen, R.; Pedersen, L. H.; Gessesse, A. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 667–673.
14. Ferreira, L.; Ramos, M. A.; Gil, M. H.; Dordick, J. S. *Biotechnol. Progr.* **2002**, *18*, 986–993.
15. Xiao, Y.; Wu, Q.; Wang, N.; Lin, X. *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*, 1279–1283.
16. Pedersen, N. R.; Halling, P. J.; Pedersen, L. H.; Wimmer, R.; Matthiesen, R.; Veltman, O. R. *FEBS Lett.* **2002**, *519*, 181–184.
17. Pedersen, N. R.; Kristensen, J. B.; Bauw, G.; Ravoo, B. J.; Darcy, R.; Larsen, K. L.; Pedersen, L. H. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 615–622.
18. Saleki-Gerhardt, A.; Stowell, J. G.; Byrn, S. R.; Zografi, G. *J. Pharm. Sci.* **1995**, *84*, 318–323.
19. Yoshimoto, K.; Itatani, Y.; Tsuda, T. *Chem. Pharm. Bull.* **1980**, *28*, 2065–2076.
20. Christofides, J. C.; Davies, D. B. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1985**, 1533–1534.
21. St-Jacques, M.; Sundarajan, P. R.; Taylor, K. J.; Marchessault, R. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 4386–4391.
22. Parada, J.; Bunel, S.; Ibarra, C.; Larrazabal, G.; Moraga, E.; Gillitt, N. D.; Bunton, C. A. *Carbohydr. Res.* **2000**, *329*, 195–197.
23. Holmes, M. A.; Matthews, B. W. *Biochemistry* **1981**, *20*, 6912–6920.

24. Hernick, M.; Fierke, C. A. *Arch. Biochem. Biophys.* **2005**, *433*, 71–84.
25. Houdier, S.; Pérez, S. *J. Carbohydr. Chem.* **1995**, *14*, 1117–1132.
26. Cruces, M. A.; Plou, F. J.; Ferrer, M.; Bernabé, M.; Ballesteros, A. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2001**, *78*, 541–546.
27. Davies, D. B.; Christofides, J. C. *Carbohydr. Res.* **1987**, *163*, 269–274.
28. Christofides, J. C.; Davies, D. B. *Magn. Reson. Chem.* **1985**, *23*, 582–584.
29. Christofides, J. C.; Davies, D. B.; Martin, J. A.; Rathbone, E. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 5738–5743.

ANEXO IV

Síntesis y estudio preliminar de propiedades físicoquímicas de varias familias de monoésteres de rafinosa y melecitosa con ácidos grasos de distinto tamaño de cadena. Posibles aplicaciones en bioquímica de dichos compuestos.

Resumen

En el presente trabajo se describe la síntesis enzimática de tres series homólogas de monoésteres de rafinosa y melecitosa con ácidos grasos de cadena larga siguiendo la metodología descrita en el anexo II para acilar regioselectivamente hidroxilos primarios en estos trisacáridos. Las propiedades físicoquímicas relacionadas con la naturaleza surfactante de los compuestos preparados se evaluaron con diversas técnicas como la espectrofotometría de absorción UV/visible, la tensiometría, o la dispersión de luz dinámica. El efecto de la posición de acilación se pone de manifiesto al comparar los resultados obtenidos para los monoésteres de rafinosa regioisoméricos. Por último, se describe una aplicación en bioquímica de estos surfactantes: la solubilización de proteínas integrales de membrana en condiciones no desnaturalizantes.

Introducción

Los compuestos anfifílicos sintéticos en los que la cabeza polar es un carbohidrato son una clase de surfactantes no iónicos relativamente nueva y muy atractiva debido a que se pueden preparar a partir de materias primas renovables, son biodegradables, no tóxicos y tienen aplicaciones en las industrias de alimentación, cosmética y farmacéutica (Watanabe, 1999), y en investigación básica, como por ejemplo en la extracción de proteínas de membrana (Garavito et al., 2001). Constituyen una alternativa muy válida respecto a los surfactantes de origen petroquímico. Los ésteres de carbohidratos con ácidos grasos son uno de los tipos típicos de surfactantes derivados de azúcares (Allen et al., 1999). Los monoésteres son los más interesantes por su mayor solubilidad en agua. Se pueden preparar con un rango amplio de balance hidrofílico-

lipofílico (HLB) dependiendo del tamaño de la cadena de acilo y de la naturaleza de la cabeza de carbohidrato.

Se han llevado a cabo numerosos estudios sobre las propiedades fisicoquímicas de ésteres de mono- y disacáridos (ver por ejemplo Garofalakis et al., 2000). Sin embargo, los monoésteres de trisacáridos no han sido estudiados en profundidad fundamentalmente debido a la ausencia de métodos sintéticos apropiados para prepararlos de manera regioselectiva sin que se produzca polisustitución. En el anexo II se ha descrito una metodología para la síntesis enzimática regioselectiva de monolauratos de oligosacáridos no reductores. En este trabajo se ha extendido dicha metodología para acilar rafinosa y melecitosa con ácidos grasos de cadena larga de diferente longitud con objeto de producir series homólogas de monoésteres a partir de cada trisacárido.

Las propiedades fisicoquímicas de los surfactantes preparados se pueden estudiar empleando diversas técnicas. Se ha utilizado la espectrofotometría UV/visible para determinar la CMC de cada compuesto a partir de un método colorimétrico. La tensiometría ha permitido evaluar la capacidad de estos compuestos para bajar la tensión superficial del agua. Mediante dispersión dinámica de luz de soluciones micelares de los distintos surfactantes, se ha estimado el tamaño de los agregados supramoleculares que forman. Finalmente, se discute la influencia del tamaño de cadena y la posición de acilación en el comportamiento de los monoésteres sintetizados.

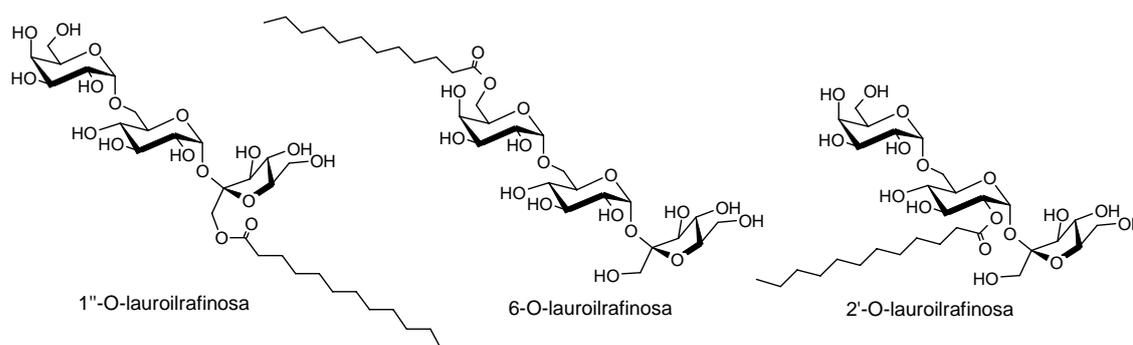
Los estudios sobre relación estructura-actividad de proteínas integrales de membrana requieren el empleo de detergentes no desnaturizantes, es decir, compuestos anfifílicos capaces de solubilizar las proteínas problema manteniendo su plegamiento nativo biológicamente activo. Los surfactantes derivados de carbohidratos generalmente cumplen estos requisitos, por lo que es deseable añadir nuevos compuestos de esta clase al arsenal de detergentes disponibles actualmente (Le Maire et al., 2000). En este trabajo, se describe la aplicación de los monoésteres de rafinosa y melecitosa sintetizados, como detergentes para la solubilización de una proteína integral de membrana, la glicoproteína P de *Leishmania tropica*.

Resultados y Discusión

Estudio cualitativo de la estabilidad de distintos monolauratos de rafinosa en solución acuosa: influencia de la posición de acilación.

A diferencia de los surfactantes tipo alquil glicósido (como el dodecil maltósido, octil glucósido, etc.) en los que la unión entre la cabeza polar de carbohidrato y la cadena alquílica se produce a través de un enlace glicosídico, en los monoésteres de carbohidratos con ácidos grasos de cadena larga la unión entre el azúcar y la cola hidrófoba tiene lugar mediante enlace éster. Estas diferencias en la naturaleza del enlace son la causa de que los alquil glicósidos sean estables en medio alcalino hidrolizándose con catálisis ácida mientras que los monoésteres de carbohidratos son menos estables en medio básico en el que se produce su hidrólisis (Baker et al., 2000a) y también transacilaciones intramoleculares que provocan la migración del grupo acilo (Molinier et al., 2003). En general, se considera que los ésteres de carbohidratos con ácidos grasos son bastante estables en solución acuosa (Söderman et al., 2000). Aparte de los estudios sobre la biodegradabilidad de este tipo de compuestos que demuestran que la hidrólisis del enlace éster es la primera etapa que ocurre (Baker et al., 2000b), no se han descrito estudios sobre la estabilidad en medio acuoso de monoésteres de carbohidratos con ácidos grasos de cadena larga a excepción del monolaurato de sacarosa (mezcla de regioisómeros) (Anderson et al., 1968).

Antes de decidir los monoésteres de trisacáridos que se iban a preparar en este trabajo, se realizó un estudio cualitativo sobre la estabilidad en solución acuosa de tres monolauratos de rafinosa regioisoméricos (esquema 1), tomados de las muestras sintetizadas en los anexos II y III, con objeto de establecer la influencia de la posición de acilación en la hidrólisis y migración intramolecular del grupo acilo.



Esquema 1. Estructura de los tres monolauratos de rafinosa empleados para realizar el estudio de estabilidad.

Para ello se prepararon soluciones acuosas diluidas (ca. 1ppm) de cada uno de los regioisómeros y se realizó un seguimiento de las mismas (mantenidas a 25 °C) por LC/ESI/MS (ver condiciones cromatográficas en la parte experimental) a distintos tiempos para monitorizar cualitativamente la posible hidrólisis y/o transacilaciones intramoleculares. Los resultados obtenidos se recogen en los cromatogramas de la figura 1. El pico que aparece a 1.97 min corresponde a la rafinosa que se libera al hidrolizarse el monoéster, el resto de picos corresponden a diferentes regioisómeros.

A partir de la figura 1 se observa claramente que los regioisómeros en 1'' y 6 no comienzan a hidrolizarse hasta los dos días mientras que en el regioisómero en 2' la hidrólisis del enlace éster es detectable incluso a las 4 h; sin embargo, para este regioisómero, tras una semana, la hidrólisis neta es menor que para los otros dos regioisómeros estudiados. Respecto a la migración del grupo acilo, ésta es casi despreciable en el caso de los regioisómeros en 1'' y 6, mientras que para el regioisómero en 2' la isomerización es espectacular, ocurriendo desde los primeros instantes (en el cromatograma correspondiente a las 2h ya es bastante significativa). De manera que, lo que en origen era una solución de un regioisómero mayoritario, tras una semana, se ha convertido en una mezcla con tres regioisómeros principales.

Como era de esperar, la migración intramolecular del grupo acilo es más favorable cuando el éster involucra a un hidroxilo secundario del carbohidrato en lugar de a un hidroxilo primario, ya que en este último caso el éster es más estable termodinámicamente. El grupo de Queneau, en un estudio sobre las migraciones del grupo acilo en monoésteres de sacarosa, ha demostrado que el medio básico acuoso favorece la isomerización cuando se trata de regioisómeros con el enlace éster sobre hidroxilos secundarios, mientras que en los regioisómeros con el grupo acilo sobre un hidroxilo primario no se produce la migración (Molinier et al., 2003); estos resultados concuerdan perfectamente con los obtenidos en el presente trabajo. Obviamente, en el caso de 2'-O-lauroilrafinosa se produce una pérdida de pureza regioisomérica con el tiempo que no se da para los 1''-O-acil y 6-O-acil derivados (Fig. 1); por este motivo se descartó la preparación regioselectiva de monoésteres sobre cualquier hidroxilo secundario para el estudio ulterior de propiedades fisicoquímicas.

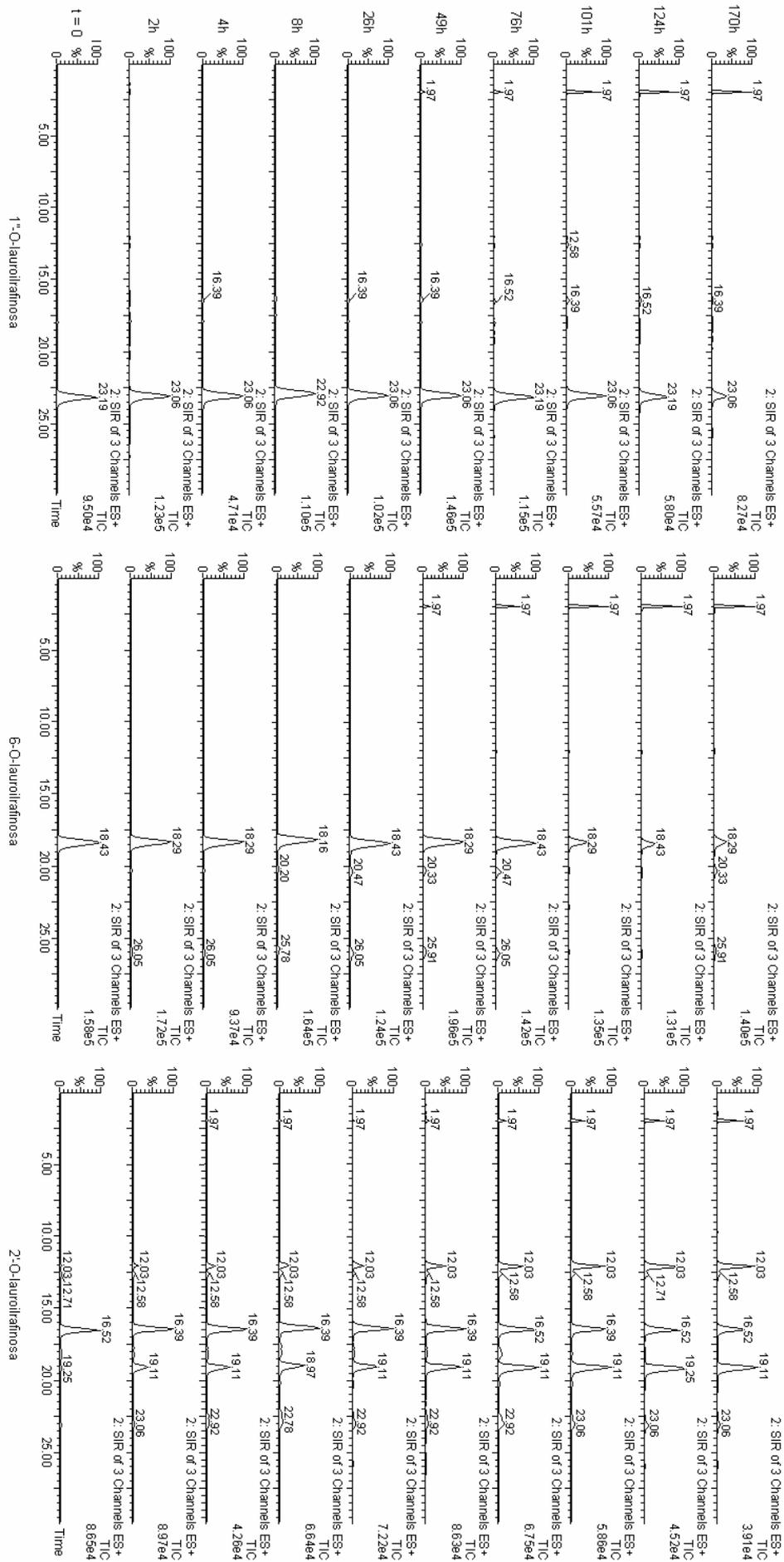


Figura 1. Cromatogramas correspondientes al análisis de la evolución temporal de las soluciones acuosas de los distintos monoisómeros de rafínosa regiosoméricos

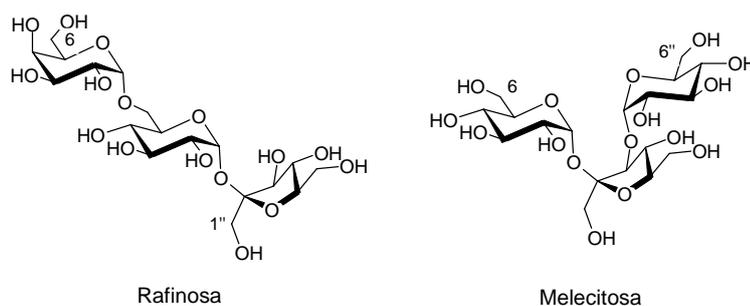
Respecto a la hidrólisis, puede afirmarse que estos compuestos son bastante estables, aunque hay que tener en cuenta este fenómeno en cualquier experimento que se lleve a cabo con soluciones acuosas de los mismos por un espacio prolongado de tiempo.

Habría que subrayar que la concentración de cada compuesto utilizada en este estudio de estabilidad (ca. 1ppm) está por debajo de su concentración micelar crítica, CMC, (como se podrá ver más adelante) y por tanto la velocidad de hidrólisis es mayor que la que se daría si la solución de los distintos monolauratos de rafinosa se hubiera preparado por encima de su CMC. Al igual que se ha descrito para el monolaurato de sacarosa, se debe esperar que la velocidad de hidrólisis sea menor en soluciones micelares (Anderson et al., 1968). Es importante tener este factor en cuenta, pues para muchas de las aplicaciones potenciales de este tipo de compuestos como pueda ser su empleo como excipientes farmacéuticos, la concentración a la que se utilicen estará muy por encima de su CMC (Hahn et al., 1989).

En general, estos resultados sobre hidrólisis y migración del grupo acilo son extrapolables para monoésteres de otros trisacáridos con ácidos grasos de cadena larga, por lo que para el estudio de propiedades fisicoquímicas se sintetizaron únicamente regioisómeros con el grupo acilo sobre algún hidroxilo primario del carbohidrato.

Síntesis enzimática de familias de monoésteres de rafinosa y melecitosa con ácidos grasos de distinto tamaño de cadena

Para el estudio de las propiedades fisicoquímicas de los monoésteres de trisacáridos con ácidos grasos de cadena larga se seleccionaron la rafinosa y la melecitosa (esquema 2) por ser los trisacáridos comerciales más económicos.



Esquema 2. Estructura de los trisacáridos no reductores rafinosa y melecitosa. Se han indicado las posiciones de acilación en los regioisómeros sintetizados.

Para obtener compuestos con un rango más o menos amplio de balance hidrofílico-lipofílico (HLB) se prepararon monoésteres de decanoilo, lauroilo, miristoilo, palmitoilo y estearoilo. A diferencia de los monoestearatos de sacarosa que son insolubles en agua (Polat et al., 2001), la mayor polaridad de los trisacáridos permite la solubilización en medio acuoso de sus monoésteres con el ácido esteárico. Para preparar derivados en los que el grupo acilo se encuentre solamente sobre hidroxilos primarios se emplearon dos enzimas, la lipasa de *Thermomices lanuginosus* inmovilizada sobre sílica granulada, Lipozyme TL IM, y la proteasa alcalina de *Bacillus licheniformis*, subtilisina Carlsberg coliofilizada con metil- β -ciclodextrina. En concreto, basándose en los resultados descritos en el anexo II, se prepararon dos familias de regioisómeros en el caso de la rafinosa: una de ellas con catálisis de Lipozyme TL IM para acilar el carbohidrato en posición 6 y la otra con catálisis de subtilisina Carlsberg-M β CD para producir la acilación regioselectivamente en posición 1''. Con la melecitosa se preparó únicamente una familia de derivados utilizando Lipozyme TL IM para obtener una mezcla aproximadamente 2:1 de los regioisómeros en 6/6''. Las condiciones de reacción, el procesado y la purificación cromatográfica de los monoésteres producidos en la reacción fueron esencialmente idénticos a los procedimientos descritos en el anexo II, únicamente se introdujo agitación orbitalica en lugar de agitación magnética en las reacciones con subtilisina Carlsberg-M β CD; obviamente para cada tamaño de cadena se utilizó un agente acilante diferente, aunque siempre en el mismo exceso molar respecto al trisacárido. La tabla 1 muestra los rendimientos de monoéster aislado para cada reacción.

Comparando el rendimiento de monolaurato de trisacárido descrito en el anexo II con los valores obtenidos aquí para el mismo compuesto se observa una concordancia perfecta en el caso de la catálisis con Lipozyme TL IM; sin embargo, mientras en el anexo II se describió un rendimiento del 74% para el monolaurato de rafinosa preparado con catálisis de subtilisina Carlsberg-M β CD, aquí se ha obtenido un rendimiento sensiblemente menor (57%) de producto aislado. Una posible causa de esta diferencia puede estar en la forma de agitación empleada en cada caso. Mientras en el anexo II se utilizó agitación magnética vigorosa para esta reacción, aquí se ha utilizado agitación orbitalica y es probable que la primera forma de agitación sea más eficaz a la hora de reducir las limitaciones por difusión que presenta la reacción de transesterificación del trisacárido utilizando la preparación de proteasa suspendida en el medio orgánico de la

reacción (piridina), dando lugar por tanto a un mayor rendimiento de monolaurato de rafinosa que cuando se emplea agitación orbitalica.

Tabla 1. Rendimientos de monoéster aislado para las distintas reacciones de transesterificación de los trisacáridos con los correspondientes agentes acilantes empleando como catalizadores las enzimas indicadas.

| | subtilisina Carlsberg-M β CD | | Lipozyme TL IM | |
|---------------------|------------------------------------|--|----------------|------------|
| | Rafinosa | | Rafinosa | Melecitosa |
| Decanoato de vinilo | 74% | | 80% | 56% |
| Laurato de vinilo | 57% | | 79% | 52% |
| Miristato de vinilo | 44% | | 73% | 50% |
| Palmitato de vinilo | 25% | | 81% | 55% |
| Estearato de vinilo | 13% | | 84% | 53% |

Por otra parte, se observa que el rendimiento de producto aislado es independiente del tamaño de la cadena del agente acilante en el caso de las reacciones catalizadas por la lipasa, lo que concuerda con los resultados descritos por el grupo de Ballesteros para la síntesis de monoésteres de maltotriosa utilizando la misma enzima pero inmovilizada sobre celita (Ferrer et al., 2000). Sin embargo, para las reacciones catalizadas por la proteasa se produce un descenso lineal del rendimiento al aumentar el tamaño de cadena (Fig. 2). Esta menor actividad al aumentar la longitud de la cadena de acilo ya fue descrita en la síntesis de monoésteres de sacarosa con catálisis de una enzima muy relacionada, la proteasa de *Bacillus subtilis* (Carrea et al., 1989). Curiosamente, el grupo de Linhardt ha obtenido un rendimiento constante de producto aislado al pasar del lauroato de vinilo al estearato de vinilo como agentes acilantes en la síntesis de monoésteres de sacarosa utilizando como biocatalizador la subtilisina Carlsberg en forma CLEC (Polat et al., 1997), lo que implicaría, en comparación con los resultados obtenidos aquí, una influencia importante de la forma de preparación de esta proteasa (coliofilizada con M β CD vs. CLEC) en la especificidad respecto al tamaño de la cadena de ácido graso.

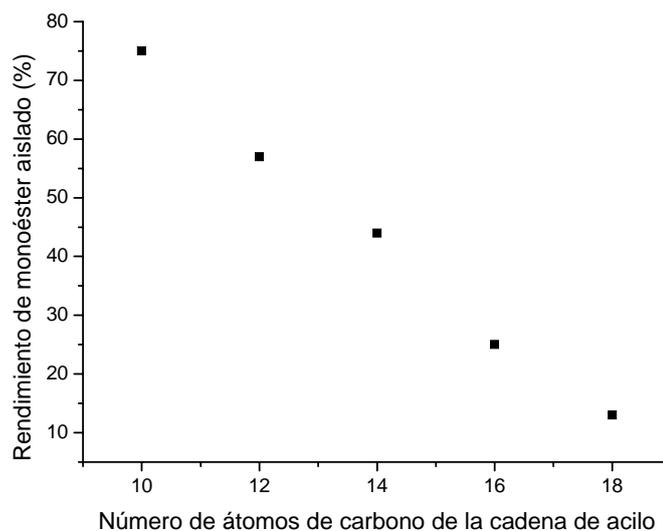


Figura 2. Influencia del tamaño de la cadena del agente acilante en el rendimiento de monoéster aislado en la reacción de transesterificación de la rafinosa catalizada por subtilisina Carlsberg-M β CD.

Respecto a la regioselectividad de las reacciones (ver parte experimental) hay que indicar que es independiente del tamaño de cadena en las reacciones catalizadas por Lipozyme TL IM, produciéndose únicamente los derivados en 6 cuando se aciló la rafinosa, mientras que las reacciones con melecitosa produjeron una mezcla aproximada 2:1 de los 6-O-acil/6''-O-acil derivados como se había teorizado a partir de los resultados descritos en el anexo 2. Sin embargo, para las reacciones catalizadas por subtilisina Carlsberg-M β CD, la regioselectividad se ve afectada por el tamaño de cadena y así, mientras con decanoato de vinilo se obtiene casi exclusivamente 1''-O-decanoilrafinosa (97%), con el estearato de vinilo se pierde pureza regioisomérica, produciéndose una mezcla de 1''-estearoilrafinosa / 6-O-estearoilrafinosa en una relación 82 : 18. Aunque este descenso en la regioselectividad de la reacción al aumentar el tamaño de la cadena de agente acilante no es tan acusado como el que se ha descrito para la monoacilación de la sacarosa catalizada por la proteasa de *B. subtilis* (Carrea et al., 1989), es bastante apreciable y contrasta con los resultados descritos para la síntesis de monoésteres de sacarosa utilizando como biocatalizador la subtilisina Carlsberg en forma CLEC, en los que independientemente del tamaño de la cadena de acilo se obtiene la misma regioselectividad (Polat et al., 1997). Estudios computacionales sobre la acilación de la sacarosa catalizada por subtilisina Carlsberg sugieren que al aumentar la longitud de la cadena del ácido graso, la acilación en 1' aumenta su impedimento estérico mientras que la acilación en 6 pasa a ser menos impedida (Rich et al., 1995). Es probable que para la rafinosa, que puede ser

considerada como una 6-O- α -galactosilsacarosa, se pueda aplicar el mismo razonamiento.

Cálculo del balance HLB de los compuestos

El balance HLB pondera el tamaño y fuerza de las partes hidrofílica y lipofílica de una molécula de surfactante, su valor teórico para surfactantes no iónicos se establece según la siguiente fórmula (Griffin, 1954):

$$\text{HLB} = 20 (\text{Peso molecular grupo hidrofílico})/(\text{Peso molecular total del surfactante})$$

Para las familias de compuestos sintetizadas, el peso molecular del grupo hidrofílico es constante, pues en todos los casos se trata de un trisacárido no reductor (rafinosa o melecitosa). Es evidente también, que los distintos monoésteres con un tamaño de cadena dado tendrán formalmente el mismo HLB independientemente del carbohidrato que constituya la cabeza polar y de la posición de acilación. Aplicando la fórmula anterior se han obtenido los valores que aparecen en la tabla 2.

Tabla 2. Valores de HLB para los surfactantes preparados a partir de los trisacáridos.

| Tamaño de la cadena de acilo | Compuesto | HLB |
|------------------------------|-----------------------|------|
| C10 | Decanoil-trisacárido | 15.3 |
| C12 | Lauroil-trisacárido | 14.7 |
| C14 | Miristoil-trisacárido | 14.1 |
| C16 | Palmitoil-trisacárido | 13.6 |
| C18 | Estearoil-trisacárido | 13.1 |

Los compuestos se encuentran en el rango HLB \sim 13-15, por lo que, según la clasificación de Griffin (Griffin, 1949), son surfactantes adecuados para preparar emulsiones O/W y se pueden emplear como detergentes.

Determinación colorimétrica de la CMC de los distintos monoésteres preparados

Para evaluar la capacidad de formación de micelas de los surfactantes preparados a partir de los dos trisacáridos no reductores, y estimar su concentración micelar crítica (CMC) en medio acuoso, se recurrió a experimentos de inclusión de colorante. El coeficiente de extinción molar del “Coomassie brilliant blue G-250” a 620 nm es

dependiente de la hidrofobicidad de su entorno. Esta propiedad se ha explotado para desarrollar un método de medida de la CMC de surfactantes no iónicos (Rosenthal et al., 1983). Recientemente, se ha aplicado dicho método para caracterizar la CMC de surfactantes preparados a partir de oligosacáridos de xiloglucano como cabeza polar (Greffé et al., 2005).

En el presente trabajo el método colorimétrico se ha adaptado para poder realizar las medidas de absorbancia en placas “microtiter” (ver materiales y métodos), de modo análogo a como se ha descrito para otros experimentos de determinación de la CMC de detergentes, basados en la solubilización de colorantes insolubles en agua (Vulliez-Le Normand et al., 1993). La adaptación a microescala permite, por un lado, utilizar cantidades más pequeñas de cada uno de los compuestos sintetizados, y por otro, llevar a cabo la determinación de la CMC de una manera sensiblemente más rápida que con la metodología original.

El cambio de color asociado al desplazamiento del máximo de absorción del colorante que se produce como consecuencia de su inclusión en las micelas de detergente (pasando a un entorno hidrófobo) se observa claramente (Fig. 3).

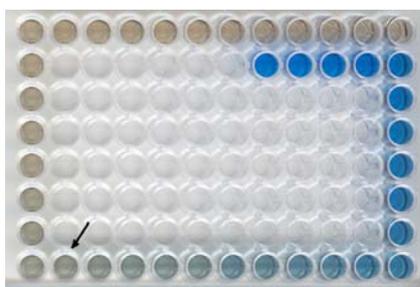


Figura 3. Fotografía de una placa “microtiter” en la que se evaluó la CMC del monomiristato de melecitosa. La concentración de colorante es constante en cada pocillo. La concentración del surfactante es creciente en el sentido en el que la intensidad del color azul aumenta. Se ha indicado con una flecha el pocillo en el que visualmente se pueda notar el comienzo de la transición de color que indica la existencia de micelas en la solución.

A partir de las lecturas de absorbancia a 620 nm se obtuvieron las siguientes curvas para cada una de las familias de monoésteres preparados (Fig. 4). El punto en el que se produce el despegue en la absorbancia se tomó como la CMC para cada compuesto.

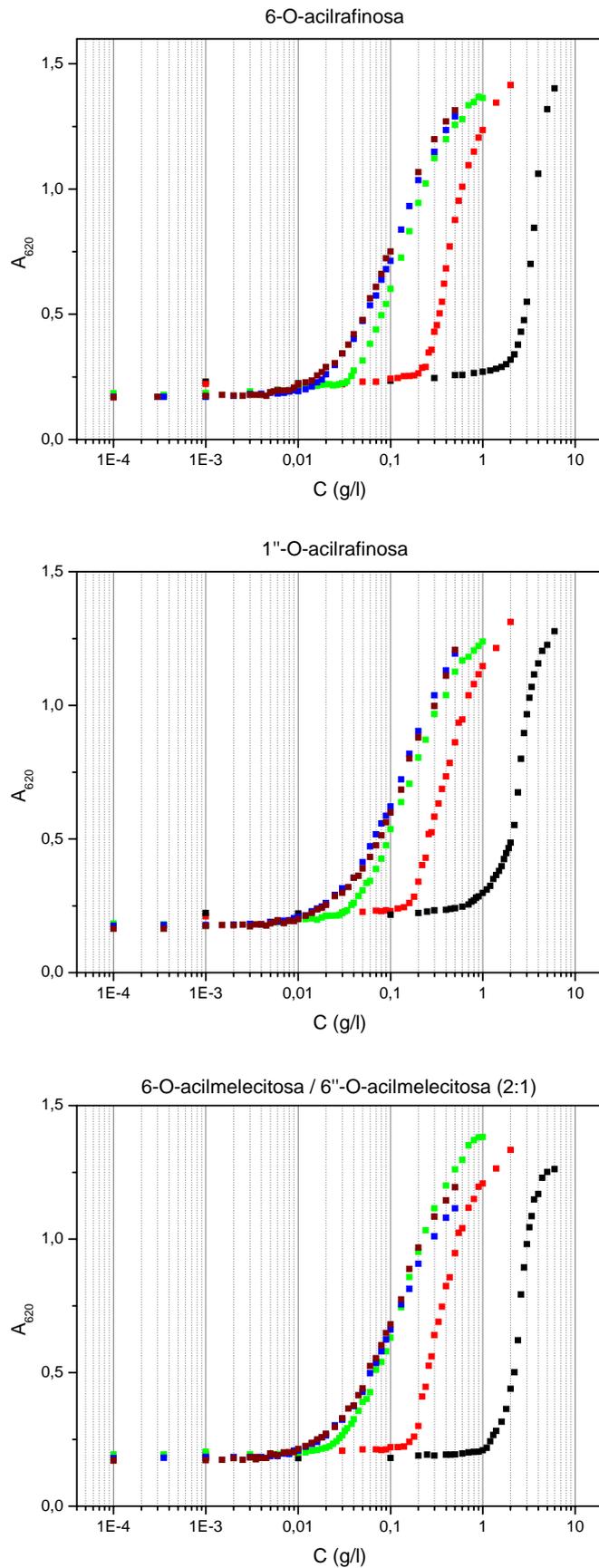


Figura 4. Curvas para la estimación de la CMC de cada una de las familias de surfactantes. Negro: decanoatos, rojo: lauratos, verde: miristatos, azul: palmitatos, marrón: estearatos.

La tabla 3 resume los valores de CMC obtenidos a partir de las curvas de absorbancia frente a la concentración de surfactante así como las correspondientes energías libres de micelización para cada compuesto calculadas según la siguiente expresión (Augé et al., 2000):

$$\Delta G_{\text{mic}} = RT \ln(\text{CMC}/55.5), \text{ con la CMC en moles/l.}$$

Tabla 3. Estimación de la CMC y energía libre de micelización (ΔG_{mic}) de los distintos surfactantes preparados.

| Compuesto ^a | CMC (g/l) | CMC (μM) | ΔG_{mic} (kJ/mol) |
|-------------------------|-----------|-----------------------|----------------------------------|
| 6-O-decanoilrafínosa | 1.8 | 2733 | -24.6 |
| 1''-O-decanoilrafínosa | 0.8 | 1214 | -26.6 |
| decanoilmelecitosa | 1.1 | 1670 | -25.8 |
| 6-O-lauroilrafínosa | 0.22 | 320 | -29.9 |
| 1''-O-lauroilrafínosa | 0.16 | 233 | -30.7 |
| lauroilmelecitosa | 0.17 | 247 | -30.5 |
| 6-O-miristoilrafínosa | 0.036 | 50 | -34.5 |
| 1''-O-miristoilrafínosa | 0.032 | 45 | -34.8 |
| miristoilmelecitosa | 0.026 | 36 | -35.3 |
| 6-O-palmitoilrafínosa | 0.014 | 19 | -36.9 |
| 1''-O-palmitoilrafínosa | 0.010 | 13 | -37.7 |
| palmitoilmelecitosa | 0.008 | 11 | -38.3 |
| 6-O-estearoilrafínosa | 0.007 | 9 | -38.7 |
| 1''-O-estearoilrafínosa | 0.007 | 9 | -38.7 |
| estearoilmelecitosa | 0.006 | 8 | -39.1 |

^a Cada acilmelecitosa es una mezcla $\sim 2:1$ de los 6-O-acil / 6''-O-acil derivados

El análisis de regresión lineal de ΔG_{mic} frente al número de átomos de carbono en la cadena de acilo (Fig. 5) indica una contribución de -2.5, -2.1 y -2.4 kJ/mol por unidad de metileno para las familias de 6-O-acilrafínosa, 1''-O-acilrafínosa y acilmelecitosa respectivamente, cuando se consideran solamente los derivados de decanoilo, lauroilo y miristoilo ($r^2 > 0.999$ en los tres ajustes realizados). Estos valores concuerdan bastante bien con los ~ -2 kJ/mol por unidad de metileno que se han descrito para otros surfactantes de base glicosídica (Augé et al., 2000).

Sin embargo, parece claro que el método colorimétrico empleado sobreestima la CMC de los derivados del ácido palmítico (C16) y esteárico (C18) como puede inferirse a

partir de la figura 5. Al ser la inflexión de las curvas de la figura 4 menos acusada al aumentar el tamaño de la cadena de acilo, la estimación de la CMC de los derivados de palmitoilo y estearoilo es menos precisa que para el resto de tamaños de cadena. El método colorimétrico que se ha empleado para estimar la CMC, al igual que otros métodos similares basados en la solubilización de un colorante hidrófobo, depende fundamentalmente del número total de micelas en el sistema (Domínguez et al., 1997). Como el número de agregación micelar “n” (número medio de moléculas de surfactante por micela) aumenta al hacerlo el tamaño de cadena y a mayor “n” menor CMC (ver apartado C 3.2 de la introducción), es lógico que por encima de la CMC el número total de micelas disponibles para atrapar el colorante “Coomassie” sea menor con los derivados de ácidos grasos de cadena más larga, y por eso para éstos la inflexión en las curvas de absorbancia vs. concentración es más suave, complicando la estimación precisa de su CMC. Se ha descrito el mismo comportamiento en la caracterización de la CMC de surfactantes preparados a partir de oligosacáridos de xiloglucano, utilizando el mismo método colorimétrico (Greffé et al., 2005).

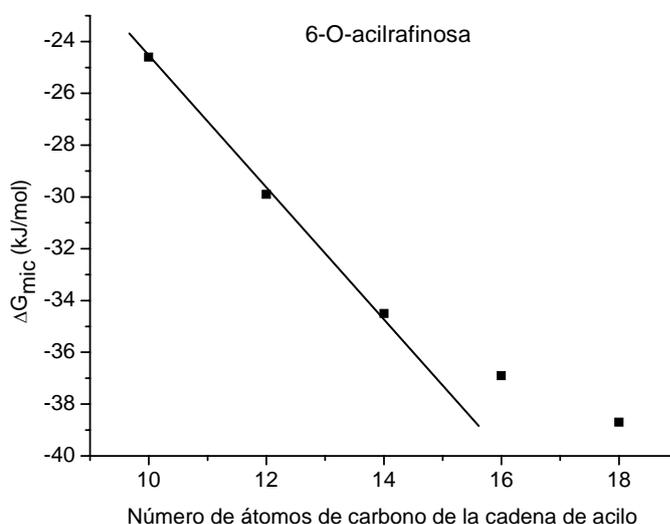


Figura 5. ΔG_{mic} vs. tamaño de la cadena de acilo para la familia de 6-O-acilrafinosas. Sólo se han incluido para el ajuste los tres primeros puntos. Para las otras dos familias de compuestos se observa el mismo comportamiento.

Para los monoésteres de sacarosa con ácidos grasos de cadena larga, la CMC (determinada por un método colorimétrico basado en la solubilización de un colorante hidrófobo) es diferente según el regioisómero del que se trate (Polat et al., 1997). En los compuestos estudiados en el presente trabajo, la influencia de la posición de acilación

sobre la CMC se pone de manifiesto si comparamos el valor obtenido para los derivados de decanoilo y lauroilo (para los que la estimación es más precisa como se ha comentado previamente) de rafinosa regioisoméricos: 6-O-acilrafinosa frente a 1''-O-acilrafinosa. Por otra parte, la CMC obtenida para los derivados de melecitosa se asemeja bastante a la de los derivados de rafinosa acilada en posición 1''. La diferente CMC observada en este trabajo para los monoésteres de rafinosa regioisoméricos es totalmente análoga a la descrita para el par 6-O-acilsacarosa / 1'-O-acilsacarosa (Polat et al., 1997) y es posible que la causa de este comportamiento en ambos casos tenga un mismo origen, dado que la rafinosa se puede considerar como una 6-O- α -galactosilsacarosa. En efecto, en la superficie de la micela, podría producirse un empaquetamiento diferente de los azúcares según el regioisómero de que se trate, lo que se podría traducir en diferencias en la energía libre de micelización dando lugar por tanto a distintas CMCs. Es lógico pensar que el empaquetamiento dependerá de la conformación del carbohidrato en el monoéster. La acilación en OH-1 de fructosa provoca la ruptura del enlace de hidrógeno intramolecular $\text{HO-2}_{\text{glucosa}} \cdots \text{HO-1}_{\text{fructosa}}$ existente en ambos carbohidratos (Davies et al., 1987), provocando consecuentemente diferencias en la conformación del azúcar para cada regioisómero (Molinier et al., 2005).

Medidas de la tensión superficial de soluciones acuosas de los distintos monolauratos preparados

Para estudiar las propiedades surfactantes de estos compuestos con mayor detalle se seleccionaron los tres monolaurilo ésteres preparados y se llevaron a cabo medidas de la tensión superficial de sus soluciones acuosas (interfase agua-aire) empleando la técnica de la gota pendiente (Hansen, 1993). Los valores de CMC (tabla 4) se obtuvieron a partir de los puntos de cruce en las isotermas de tensión superficial (fig. 6) (el punto de cruce de cada curva se estima a partir de la intersección de las líneas correspondientes al ajuste de las partes descendentes y planas de las curvas en torno a la CMC). Estos valores están dentro del mismo orden de magnitud que los obtenidos por el método colorimétrico, aunque son sensiblemente mayores. Una posible razón por la que las CMC colorimétricas son menores que las obtenidas a partir de las isotermas de tensión superficial, que podrían considerarse como las “reales”, es la distorsión que la molécula de “Coomassie”, bastante voluminosa, provoca en las micelas de surfactante al incluirse

en ellas. En cierta manera, al estar la sonda colorimétrica integrada en el entorno hidrófobo de la micela, son necesarias menos moléculas de surfactante para completar la estructura supramolecular, lo que lleva a una CMC más baja. Para los tres monolauratos estudiados, los valores mínimos de tensión superficial al alcanzar la CMC, γ_{cmc} , se encuentran en torno a 38 mJ/m^2 , siendo similares a los obtenidos para monolauratos de otros carbohidratos (ver tablas II. C3 y II. C4 de la introducción).

Para poder evaluar la cantidad de surfactante adsorbida por unidad de área en la interfase aire/agua, los datos de tensión superficial se trataron en términos de la ecuación de adsorción de Gibbs. La densidad máxima de adsorción, también denominada concentración superficial de exceso, Γ_{max} (mol / m^2), y el área mínima por molécula de surfactante en la interfase aire/agua, A_0 (Å^2), se determinaron a partir de las siguientes ecuaciones (Levine, 1996):

$$\Gamma_{max} = - [1/(2.303RT)](d\gamma/d\log c) \quad ; \quad A_0 = 10^{20} / N \Gamma_{max}$$

donde R es la constante de los gases ($8.314 \text{ J} / (\text{mol}\cdot\text{K})$), T es la temperatura absoluta, y $d\gamma/d\log c$ se estimó a partir de la pendiente de las rectas descendentes de las curvas de tensión superficial frente a concentración. Los valores de A_0 calculados a partir de los datos experimentales y las ecuaciones anteriores se indican en la tabla 4.

Tabla 4. Valores de CMC, γ_{cmc} , A_0 , C_{pp} , y estimación de la forma micelar, obtenidos a partir de las isotermas de tensión superficial obtenidas a temperatura ambiente. A título comparativo, se incluyen los correspondientes valores para otros monolauratos de carbohidratos descritos en bibliografía.

| Compuesto | CMC (g/l) | CMC (mM) | γ_{cmc} (mJ/m^2) | A_0 (Å^2) | C_{pp} | Forma micelar | Referencia bibliográfica * |
|--------------------------------|-----------|----------|------------------------------------|------------------------|----------|---------------|----------------------------|
| 6-O-lauroilrafínosa | 0.75 | 1.09 | 38.0 | 55 | 0.38 | cilíndrica | A |
| 1''-O-lauroilrafínosa | 0.52 | 0.757 | 37.6 | 49 | 0.42 | cilíndrica | A |
| lauroilmelecitosa ^a | 0.42 | 0.612 | 39.5 | 51 | 0.41 | cilíndrica | A |
| lauroilrafínosa ^b | 0.65 | 0.948 | 44.1 | 67 | 0.31 | esférica | B |
| 6-O-lauroilsacarosa | 0.24 | 0.455 | 37.4 | 56 | 0.37 | cilíndrica | B |
| 6-O-lauroilsacarosa | 0.14 | 0.25 | 31.5 | 44 | 0.48 | cilíndrica | C |
| 6'-O-lauroilmaltosa | 0.17 | 0.33 | 39.0 | 50 | 0.42 | cilíndrica | D |

^a mezcla 6-O-lauroilmelecitosa / 6''-O-lauroilmelecitosa ~ 2:1. ^b mezcla de regioisómeros.

*Referencias bibliográficas y métodos de medida de γ aire/agua utilizados en cada caso: A (este trabajo) método de la gota pendiente a 25 °C, B (Södeberg et al., 1995) método de du Nouÿ a 20 °C, C (Ferrer et al., 2002) método de Wilhelmy a 25 °C, D (Kjellin et al., 2001) método de Wilhelmy a 22 °C.

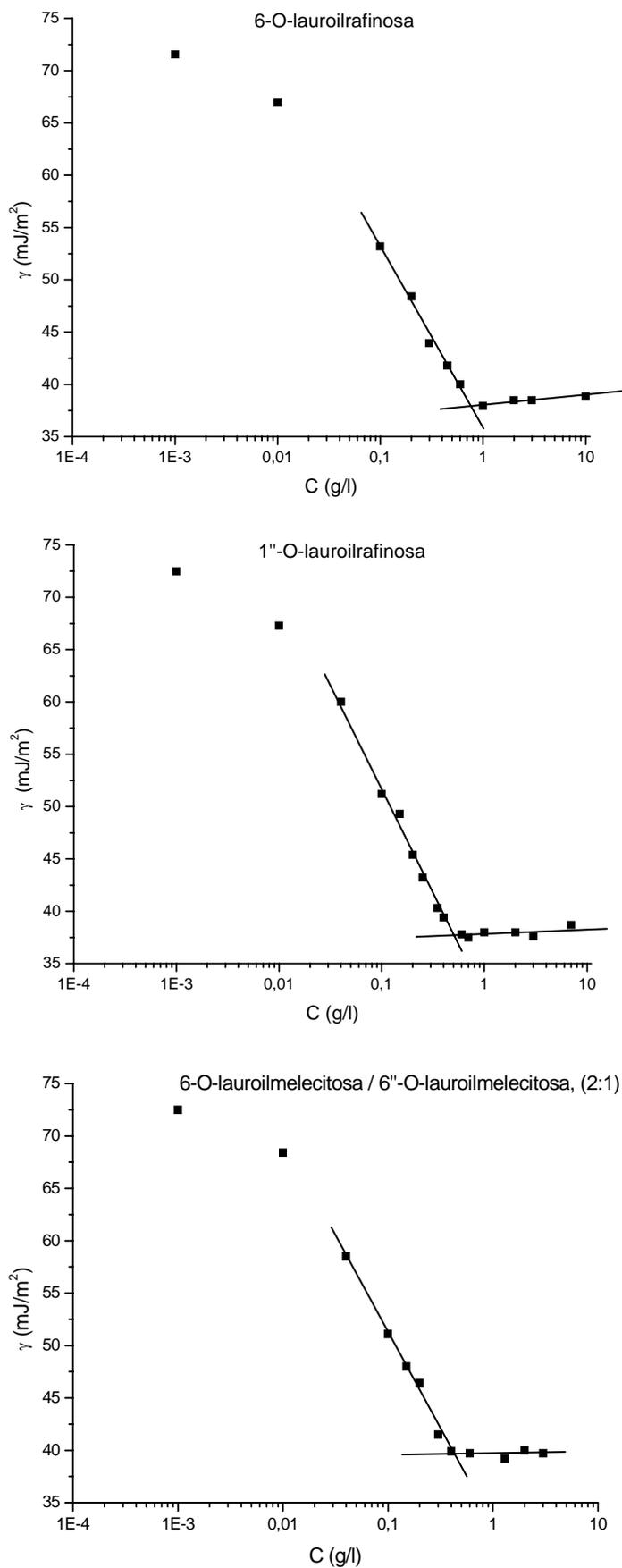


Figura 6. Medidas de tensión superficial (interfase aire/agua) frente a la concentración para los tres surfactantes estudiados, realizadas a 25 °C.

Una vez calculado el valor de A_0 , se puede hacer una predicción aproximada de la geometría de los agregados micelares aplicando el criterio del parámetro de empaquetamiento crítico, C_{pp} (Israelachvili et al., 1976):

$$C_{pp} = \nu / (a_0 \cdot l_c)$$

Donde ν es el volumen de la cadena hidrocarbonada, a_0 es el área óptima de la cabeza polar del surfactante y l_c es la longitud media de la cola hidrófoba. Para cadenas de hidrocarburo saturadas se pueden emplear las siguientes fórmulas (Tanford, 1980):

$$\begin{aligned} \nu &= 27.4 + 26.9n \quad (\text{en } \text{Å}^3) \\ l_c \leq l_{\text{max}} &= 1.5 + 1.265n \quad (\text{en } \text{Å}) \end{aligned}$$

donde n es el número de átomos de carbono de la cadena hidrocarbonada. Dado que estas fórmulas se aplican para cadenas de hidrocarburo saturadas, la longitud efectiva de una cadena de ácido graso será cercana a $n_c - 1$, donde n_c es el número de átomos de carbono en el ácido graso. Por tanto, para todos los monolauril ésteres de la tabla 4, $n_c = 12$ y $n = 11$. El parámetro C_{pp} predice formas micelares esféricas, cilíndricas, bicapas y estructuras inversas cuando $C_{pp} < 1/3$, $1/3 < C_{pp} < 1/2$, $1/2 < C_{pp} < 1$, y $C_{pp} > 1$, respectivamente. Igualando a_0 con el valor de A_0 calculado a partir de las isotermas de tensión superficial se obtienen los valores de C_{pp} y la predicción de la forma micelar que aparecen en la tabla 4. Habría que subrayar que la forma micelar derivada a partir de éste método es una mera estimación basada en simples consideraciones geométricas, y que además no proporciona ninguna información sobre la polidispersidad de las micelas presentes en el sistema.

En la tabla 4 se han incluido a título comparativo, los datos correspondientes para los monolauratos de otros carbohidratos. Los valores descritos para el monolaurato de rafinosa (mezcla de regioisómeros) (Södeberg et al, 1995) muestran discrepancia con los que se han obtenido para la 6-O-lauroilrafinosa y la 1''-O-lauroilrafinosa estudiadas en este trabajo, especialmente en γ_{cmc} y A_0 , lo que provoca una predicción de forma micelar diferente, no obstante, respecto a la CMC si se da bastante similitud, encontrándose el valor descrito en bibliografía en el mismo orden de magnitud y entre los valores obtenidos aquí para los dos regioisómeros. El origen de las discrepancias observadas puede estar, entre otros factores en la naturaleza del surfactante (mezcla de

regioisómeros frente a regioisómeros puros), en el método experimental de medida de la tensión superficial (“du Noüy” frente a “gota pendiente”), en la pureza de las muestras (la presencia de impurezas superficialmente activas puede tener mucha influencia en las isothermas de tensión superficial aunque se hallen en pequeñas cantidades) y en el ajuste lineal para calcular la pendiente ($d\gamma/d\log c$). Al comparar los datos de tensión superficial obtenidos para un surfactante determinado por distintos laboratorios son frecuentes las discrepancias debido a las múltiples variables que entran en juego. Como ejemplo, en la tabla 4 se han incluido los datos correspondientes a 6-O-lauroilsacarosa según dos grupos de investigación diferentes.

Los resultados obtenidos, muestran nuevamente la influencia de la posición de acilación, ya que tanto la CMC como A_0 , difieren entre 6-O-lauroilrafinosa y 1''-O-lauroilrafinosa. De manera análoga a como se había observado en la estimación de la CMC con el método colorimétrico, el comportamiento del monolaurato de melecitosa se asemeja bastante al de 1''-O-lauroilrafinosa.

Medidas del tamaño micelar mediante “Dynamic Light Scattering”

La técnica de dispersión dinámica de luz, “Dynamic Light Scattering” (DSL) permite evaluar el tamaño y la polidispersidad de partículas coloidales como, por ejemplo, las micelas que forma un surfactante por encima de su CMC (Berne et al., 1990). Para caracterizar las micelas que la clase de compuestos sintetizados en este trabajo forma en solución acuosa, se seleccionó la familia de 6-O-acilrafinosas. Los compuestos de esta familia constituyen una serie homóloga y es de esperar un tamaño micelar mayor en los derivados de ácidos grasos más largos.

Los datos de los experimentos DLS se trataron mediante el método de los cumulantes a partir de la decorrelación temporal de la intensidad de la onda electromagnética dispersada. La función de autocorrelación de la intensidad del campo eléctrico dispersado, $\langle E_d(0) E_d^*(t) \rangle$, presenta para un sistema monodisperso, y sin interacción entre partículas, la forma $\langle E_d(0) E_d^*(t) \rangle = g_E(t) = \exp[-Dq^2t]$, siendo D el coeficiente de difusión de las partículas, q el vector de dispersión: $q = (4\pi n/\lambda)\text{sen}(\theta/2)$, n el índice de refracción del medio (agua), λ la longitud de onda del láser empleado y θ el ángulo de dispersión. Obviamente, ante la no monodispersidad, la función de autocorrelación se

transforma en una distribución de coeficientes de difusión, que se transformó a su vez, mediante la aplicación de la ecuación de Stokes-Einstein, en una distribución de radios hidrodinámicos:

$$R_h = kT / (6\pi\eta D)$$

donde k es la constante de Boltzmann y η es la viscosidad del agua a la temperatura absoluta T . Las medidas se llevaron a cabo a 25 °C y con tres concentraciones diferentes de cada compuesto (80, 100 y 120 veces su CMC según el método colorimétrico). El derivado de decanoilo no se incluyó debido a la gran cantidad de material necesario como consecuencia de ser el compuesto con mayor CMC de los estudiados. Las medidas dieron un coeficiente de difusión independiente de la concentración de surfactante y por tanto, el valor final de D se tomó como la media de las tres medidas. La misma independencia de D con la concentración se ha observado en estudios por DLS de micelas de monolaurato de sacarosa (Lerk et al., 1996). Los valores obtenidos para el radio hidrodinámico se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Coeficientes de difusión y radio hidrodinámico de las micelas formadas por los compuestos estudiados. Se indica también la longitud teórica de cada molécula en conformación totalmente extendida.

| Compuesto | Tamaño de cadena | $D \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ | R_h (Å) | Longitud molecular (Å) |
|-----------------------|------------------|--|-----------|------------------------|
| 6-O-lauroilrafínosa | C12 | 7.08 | 27.8 | 28.1 |
| 6-O-miristoilrafínosa | C14 | 6.67 | 29.5 | 30.6 |
| 6-O-palmitoilrafínosa | C16 | 6.15 | 32.0 | 33.2 |
| 6-O-estearoilrafínosa | C18 | 5.19 | 34.5 | 35.7 |

Las micelas parecen ser poco polidispersas, como se puede observar en la figura 7, en la que se ha representado la distribución de tamaños de acuerdo a una densidad de probabilidad de Schulz, típica para sistemas coloidales (Berne et al., 1990), para el caso de las micelas formadas por 6-O-estearoilrafínosa.

Los valores del radio hidrodinámico que aparecen en la tabla 5 concuerdan bastante bien con un modelo de micelas esférico con un radio igual a la longitud de cada molécula en conformación totalmente extendida. Para el cálculo teórico orientativo de la longitud molecular se construyó un modelo de la estructura de cada monoéster a partir de la estructura cristalina de rayos X de la rafínosa (Jeffrey, 1990) a la que se le añadió la cadena de acilo en posición 6 y en conformación totalmente extendida; la

torsión del metileno correspondiente al grupo hidroxilo acilado, se fijó para producir la máxima longitud molecular posible.

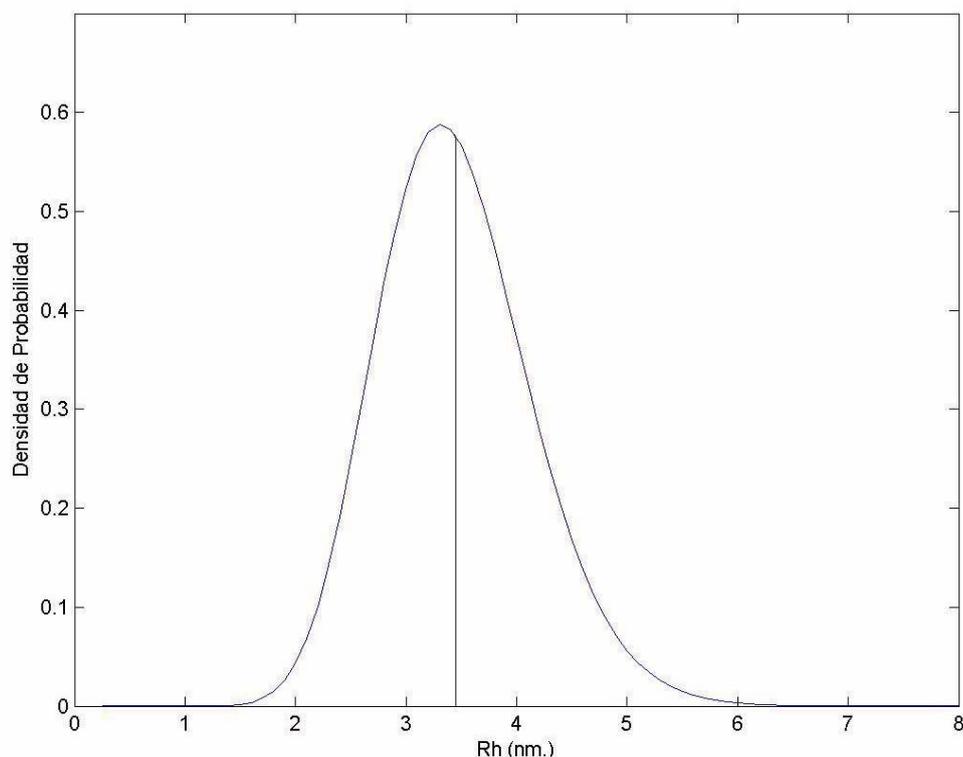


Figura 7. Distribución de tamaños de acuerdo a una densidad de probabilidad de Schulz, en las micelas que forma 6-O-estearoilrafínosa. Para la construcción de la curva de distribución (que está normalizada) se han utilizado los valores obtenidos para el radio hidrodinámico $\langle R_h \rangle = 34.5 \text{ \AA} = 3.45 \text{ nm}$, señalado en la gráfica, y la varianza estándar relativa $S = 0.16$, en la medida realizada a una concentración de compuesto 80 veces su CMC.

Resulta chocante que los valores experimentales de R_h queden por debajo de valor estimado para la longitud molecular (Fig. 8), ya que, en principio, el agua fuertemente asociada al exterior de la micela (hidratando las cabezas polares de rafínosa), debería producir un radio hidrodinámico micelar mayor que la longitud de la molécula de surfactante, como se ha comprobado recientemente empleando la técnica PFGSE-NMR en los estudios de difusión en agua de micelas de unos compuestos análogos, los monoésteres de sacarosa con ácidos grasos de cadena larga (Molinier et al., 2005). En cualquier caso, parece que el modelo micelar ideal esférico se ajusta bastante bien, demostrando que la predicción de micelas cilíndricas derivada de las medidas de tensión superficial (tabla 4) es una mera estimación en ningún caso definitiva, de hecho, en el estudio mencionado anteriormente sobre monoésteres de sacarosa se deduce una forma

micelar esférica, mientras que los resultados derivados de las medidas de tensión superficial también predicen micelas cilíndricas (tabla 4).

No se realizó el estudio con ningún regioisómero, ni con los derivados de melecitosa, ya que es de esperar un comportamiento similar, y las posibles diferencias en R_h para un tamaño de cadena dado al pasar de un compuesto a otro serían nulas o tan pequeñas que se hallarían dentro de la propia incertidumbre del método experimental.

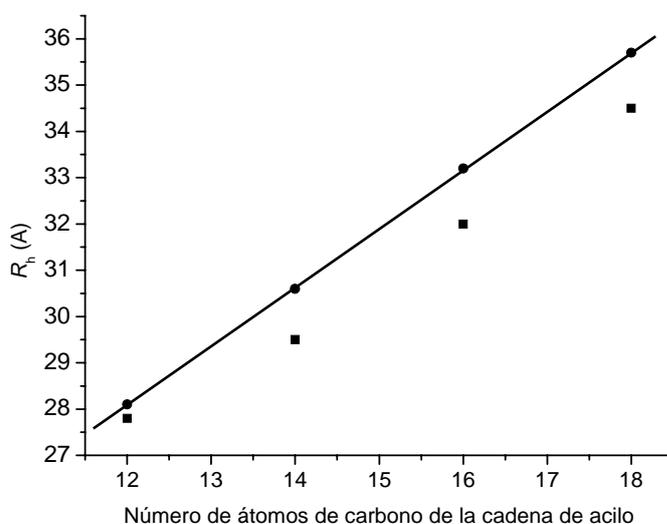


Figura 8. Correlación entre el radio hidrodinámico de las micelas (modelo esférico ideal) y el número de átomos de carbono de la cadena de acilo. La recta representa el valor teórico estimado suponiendo un radio hidrodinámico igual a la longitud de cada molécula en conformación totalmente extendida.

Aplicación de los compuestos sintetizados en bioquímica: solubilización de proteínas integrales de membrana.

Los monoésteres sintetizados a partir de rafinosa y melecitosa, presentan un rango de HLB entre 13 y 15.5 como se ha indicado anteriormente (tabla 2). En general, los surfactantes con un valor HLB entre 12 y 20 son detergentes apropiados para la solubilización de proteínas de membrana, aunque los que tienen un valor de HLB en la zona superior de dicho rango son más adecuados para la solubilización de proteínas extrínsecas (Garavito, 2001). Por tanto, los surfactantes derivados de trisacáridos que nos ocupan son potenciales candidatos para la solubilización y estabilización de proteínas integrales de membrana. Se ha demostrado que compuestos análogos, como los monoésteres de sacarosa con ácidos grasos de cadena larga, estabilizan esta clase de

proteínas (Abran et al., 1989). De hecho, el propio monolaurato de sacarosa es un producto comercial (Fluka, Calbiochem, etc.) que se vende para esta aplicación.

Para evaluar la capacidad de los compuestos preparados en este trabajo para solubilizar proteínas integrales de membrana, se seleccionó como modelo la glicoproteína P (Pgp) de *Leishmania tropica*. Esta proteína es un transportador de membrana perteneciente a la superfamilia ABC, y tiene importancia clínica al conferir multirresistencia a fármacos (MDR) al exportar un gran número de estos compuestos, de naturaleza química muy diferente, fuera del parásito, evitando así su efecto citotóxico (Pérez-Victoria et al., 2002). La Pgp de *Leishmania* presenta 12 segmentos transmembrana, por lo que está bien integrada en la misma, siendo un buen modelo para estudiar la solubilización. Para ello, se utilizó un concentrado de membranas totales preparado a partir de una línea multirresistente del parásito que presenta un elevado nivel de sobreexpresión del transportador (Pérez-Victoria et al., 2002 y ver parte experimental)

El comportamiento de los derivados de rafinosa y melecitosa se comparó con otros dos detergentes comerciales que han sido empleados en la purificación de la Pgp humana: el CHAPS (3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato) y el SDS (dodecil sulfato sódico). Para estos dos compuestos se ha descrito una eficacia en la solubilización de la proteína (definida como la relación entre la cantidad de Pgp solubilizada y la Pgp total contenida en las membranas) del 24 % empleando CHAPS al 1% y del 93 % con el SDS al 2% en ausencia de NaCl en ambos casos (Dong et al., 1996). Aunque el SDS sea un detergente aniónico fuerte de eficacia solubilizadora elevada, también es un agente desnaturalizante que inactiva las proteínas. Por lo tanto, se usó como control positivo de la solubilización, y negativo de la actividad. Por otra parte, el CHAPS es un detergente zwitteriónico suave, menos eficaz solubilizando proteínas de membrana, pero que normalmente preserva la actividad de la proteína solubilizada (Hamada et al., 1988). También se incluyó a efectos comparativos el monolaurato de sacarosa, por ser el detergente comercial más similar en términos estructurales a los monoésteres de trisacáridos sintetizados en este trabajo.

La solubilización se llevó a cabo de la manera indicada en la sección experimental, usando una concentración de detergente del 1% en todos los casos salvo en el del SDS que se empleó al 2%. Tras ultracentrifugar las muestras para eliminar la fracción no

solubilizada, la eficacia del proceso se evaluó cualitativamente mediante SDS-PAGE y Western Blot de los distintos solubilizados (sobrenadantes), comparándose los detergentes sintetizados con los comerciales y teniendo en cuenta que la intensidad de la banda de Pgp es máxima en el caso del detergente más fuerte, el SDS. La figura 9 muestra los resultados obtenidos con la familia de 6-O-acilrafinosa.

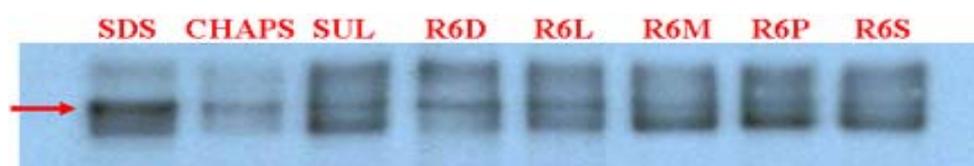


Figura 9. Western blot con los resultados de la solubilización de la Pgp contenida en las membranas empleando los detergentes indicados. La banda de la glicoproteína esta señalada con la flecha. Abreviaturas: SUL = monolaurato de sacarosa, R6D = 6-O-decanoilrafinosa, R6L = 6-O-lauroilrafinosa, R6M = 6-O-miristoilrafinosa, R6P = 6-O-palmitoilrafinosa, R6S = 6-O-estearoilrafinosa.

Cualitativamente, se puede concluir que la eficacia en la solubilización de la glicoproteína sigue el orden $SDS > SUL, R6P > R6M, R6S > R6L, R6D > CHAPS$. Las bandas que aparecen justo por debajo de la banda señalada para la Pgp pueden ser resultado de la degradación parcial de la glicoproteína, de la deglicosilación parcial de la misma, o de la formación/destrucción de distintos puentes disulfuro intracatenarios de la proteína, que afectarían a su conformación, y por lo tanto a su migración. Este último hecho puede darse a pesar de que el tampón de Laemmli (utilizado para la carga en el gel) es reductor (5% β -mercaptoetanol), y está descrito para muchas proteínas de membrana (JM Pérez-Victoria, comunicación personal). Los otros derivados de rafinosa y melecitosa mostraron un comportamiento análogo al de la figura 9.

Adicionalmente, y para evaluar no sólo la capacidad de solubilización de proteínas integrales de membrana, sino también la estabilidad de las mismas en presencia de los detergentes, se midió la actividad fosfatasa ácida (ver experimental) de los solubilizados obtenidos con cada detergente. Aunque sería más correcto realizar la medida de la actividad ATPasa característica de la Pgp, al haber utilizado membranas totales del parásito nos encontraríamos con una gran actividad de fondo debido a la gran cantidad de distintas proteínas con actividad ATPasa presentes. Además, se sabe que la actividad total de los transportadores ABC solo se consigue cuando se reconstituyen en proteoliposomas, lo que supondría una inversión importante de tiempo. A nivel cualitativo, resulta mucho más cómodo, por su rapidez, medir la actividad fosfatasa

ácida. Esta proteína también está localizada en la membrana, aunque sólo contiene un segmento transmembrana (Wiese et al.,1996), y por lo tanto, pese a no encontrarse sobreexpresada, sí que es más fácilmente extraíble por los detergentes, por lo que estará presente en el solubilizado. La actividad resultante se normalizó respecto a la actividad obtenida en las membranas antes de la solubilización, a la cual se le asignó un valor del 100% y los resultados se muestran en la Fig 10. La ausencia casi completa de actividad en el caso del SDS, un detergente desnaturizante que solubiliza las membranas con gran eficacia, y la actividad cercana al 90% observada para los solubilizados de alguno de los detergentes prueba la validez cualitativa de esta aproximación (Fig. 10).

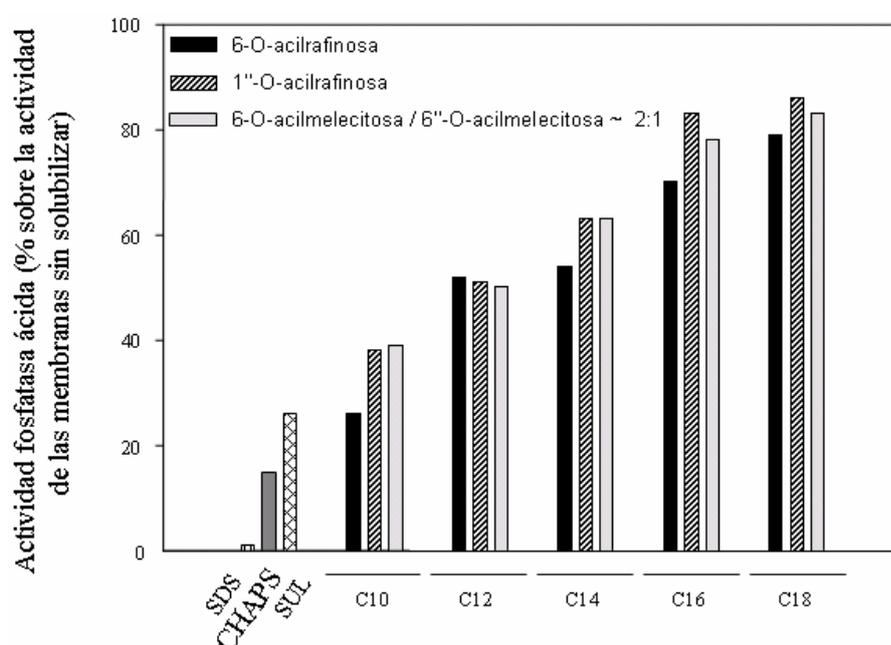


Figura 10. Actividad fosfatasa ácida relativa en el solubilizado obtenido con los diferentes detergentes empleados –agrupados según el tamaño de la cadena de acilo-. A la actividad obtenida para las membranas de partida sin solubilizar se le asignó el 100 %.

Estos resultados muestran que en cada serie homóloga se obtiene mayor actividad con los derivados de ácidos grasos de cadena más larga, los que tienen una CMC menor (tabla 3). Para estos, una concentración del 1% ~ 10 g/l (la concentración utilizada para todos los detergentes), está muy por encima de su CMC (tabla 7), y por tanto, la concentración efectiva de micelas es mayor, facilitando quizás la solubilización. Además, es posible que la mayor estabilización observada para los derivados de cadena más larga esté relacionada con el hecho de que las micelas que éstos forman tienen un tamaño mayor en el cual se acomodan mejor las proteínas, suponiendo un modelo de unión proteína-detergente micelar (le Maire et al., 2000). En cualquier caso, es muy

llamativa la mayor estabilización que todos los compuestos sintetizados producen en comparación con el monolaurato de sacarosa, el detergente comercial más parecido a ellos en términos estructurales. Por otra parte, los resultados muestran nuevamente diferencia entre los regioisómeros de rafinosa para un tamaño de cadena determinado. El comportamiento de los derivados de melecitosa se asemeja al de las 1''-O-acilrafinosas. En general, se puede concluir que todos los detergentes sintetizados son muy prometedores y parecen ser mejores que el CHAPS y el monolaurato de sacarosa para la solubilización de proteínas integrales de membrana en condiciones no desnaturalizantes.

Tabla 7. Concentración relativa de cada detergente respecto a su CMC^a. Cada valor corresponde a la relación [10 (g/l)/CMC] salvo el SDS que se calculó según [20 (g/l)/CMC].

| | | | | | | | | | | | |
|-------|-----|-----|----|-----|----|-----|-----|-----|------|-----|------|
| SDS | 10 | R6D | 6 | R6L | 45 | R6M | 278 | R6P | 714 | R6S | 1428 |
| CHAPS | 7 | R1D | 12 | R1L | 62 | R1M | 312 | R1P | 1000 | R1S | 1428 |
| SUL | 118 | MD | 9 | ML | 59 | MM | 385 | MP | 1250 | MS | 1666 |

^aPara el cálculo se utilizaron los valores de CMC de los derivados de rafinosa y melecitosa indicados en la tabla 3. Para el CHAPS y SUL con el método colorimétrico del "Coomassie" se obtuvo una CMC de 1.4 g/l y 0.085 g/l respectivamente. Para el SDS se utilizó el valor de CMC descrito de 7 g/l (le Maire et al., 2000).

Abreviaturas: SUL, R6D, R6L, R6M, R6P y R6S como se ha indicado en el pie de la fig. 9; R1D = 1''-O-decanoilrafinosa, R1L = 1''-O-lauroilrafinosa, R1M = 1''-O-miristoilrafinosa, R1P = 1''-O-palmitoilrafinosa, R1S = 1''-O-estearoilrafinosa; MD = decanoil melecitosa, ML = lauroil melecitosa, MM = miristoil melecitosa, MP = palmitoil melecitosa, MS = estearoil melecitosa. Cada acilmelecitosa es una mezcla ~ 2:1 de los 6-O-acil / 6''-O-acil derivados.

Conclusiones

Los monoésteres de rafinosa y melecitosa con ácidos grasos de cadena larga que se han sintetizado mediante transesterificación enzimática, presentan propiedades fisicoquímicas similares a las de otros surfactantes derivados de carbohidratos. Los resultados preliminares obtenidos sugieren que podrían aplicarse en alimentación, cosmética o farmacia, como estabilizadores de emulsiones O/W, inductores de formación de espumas o excipientes solubilizantes de fármacos hidrófobos. La principal ventaja de estos compuestos en comparación con los monoésteres de sacarosa es su mayor solubilidad en agua. Así, mientras el monopalmitato y el monoestearato de sacarosa son insolubles en agua (Polat et al., 1997; Molinier et al., 2005), los derivados

análogos de rafinosa y melecitosa sí lo son. Por tanto, el empleo de una cabeza polar de trisacárido en lugar de disacárido, permite el acceso a monoésteres hidrosolubles con una CMC menor que la de los derivados de sacarosa comerciales.

Igualmente, a partir del comportamiento observado en el ensayo de solubilización de la Pgp, se puede afirmar que estos compuestos suponen una aportación muy prometedora al arsenal de detergentes utilizables en procesos de purificación de proteínas integrales de membrana. Por todo ello, este trabajo invita a profundizar en el estudio de esta clase de compuestos y en sus potenciales aplicaciones.

Materiales y métodos

Estudio cromatográfico de LC/ESI/MS sobre la estabilidad en solución acuosa de monolauratos de rafinosa regioisoméricos.

El análisis LC-MS de los tres monolauratos de rafinosa regioisoméricos (6-O-lauroilrafinosa, 1''-O-lauroilrafinosa y 2'-O-lauroilrafinosa), tomados de las muestras preparadas en los anexos II y III, se llevó a cabo con un módulo de separación Waters Alliance 2695 acoplado a un espectrómetro de masas de cuadrupolo simple Waters Micromass ZQ. La sonda de interfase ESI operó en modo de ionización positivo. Los cromatogramas se adquirieron en modo Scan (rango m/z 500-720) y en modo SIR seleccionando las masas de los aductos con sodio del monoéster y su producto de hidrólisis, el trisacárido, es decir, 709 y 527 respectivamente; no se incluyó la masa del ácido láurico que se libera en la hidrólisis del éster, ya que, debido a su pK_a en torno a 5 (Anderson, 1968), a pH neutro se encontrará ionizado, originando el correspondiente carboxilato cargado negativamente no detectable en modo de ionización positivo. Se usaron los mismos parámetros instrumentales descritos en el Anexo I, trabajando a un voltaje de cono de 40V. La separación HPLC se realizó utilizando una columna de fase reversa Waters Spherisorb 3 μ m ODS2 (4.6 \times 250 mm). La temperatura de la columna se fijó a 40 °C. Como eluyente se utilizó una mezcla acetonitrilo:H₂O 35:65 (v:v) en condiciones isocráticas. El flujo de eluyente se a 1.1 ml/min (con división del flujo postcolumna, de modo que al detector llegan 0.2ml/min). Las muestras se prepararon como soluciones acuosas diluidas (ca. 1ppm) empleando agua ultrapura Milli-Q[®], y se mantuvieron en una cámara termostatazada a 25 °C; a los tiempos indicados en la figura

1 se tomaron alícuotas que, tras filtrarse a través de filtros de nylon Millipore de 3 μm , se analizaron inyectando un volumen de 10 μl en el equipo. Para la fase móvil cromatográfica se utilizó acetonitrilo calidad HPLC-gradiente de Scharlau y agua ultrapura Milli-Q[®]. Se utilizó el software MassLynx versión 3.5 para la adquisición y procesamiento de datos.

Métodos generales utilizados para la síntesis de las familias de monoésteres de rafinosa y melecitosa

Se utilizó exactamente la misma metodología, materiales de partida y disolventes descritos en el Anexo II, con la única diferencia de emplear agitación orbitálica (250 rpm) en lugar de agitación magnética vigorosa en las reacciones catalizadas por subtilisina Carlsberg-M β CD. Como agentes acilantes se emplearon los siguientes ésteres vinílicos: decanoato y laurato (Fluka), miristato y palmitato (TCI), y estearato (Aldrich). Todos ellos se añadieron en el mismo exceso molar que se describe en el Anexo II para las correspondientes reacciones con laurato de vinilo. Las reacciones se escalaron para acilar 504 mg (1mmol) de trisacárido. La monitorización por TLC y la cromatografía flash para aislar los monoésteres se realizó de la misma forma descrita en el anexo mencionado.

Los espectros de RMN se adquirieron en un espectrómetro Bruker AVANCE 300 ó ARX 400 [300 ó 400 MHz (¹H) y 75 ó 100 MHz (¹³C)] a temperatura ambiente disolviendo las muestras en CD₃OD. Los desplazamientos químicos están referidos al multiplete de metanol, centrado a 3.31 ppm en el espectro de protón y a 49.0 ppm en el de carbono. Los espectros de ¹H de los derivados de decanoilo, miristoilo, palmitoilo y estearoilo mostraron desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento dentro de ± 0.01 ppm y ± 0.05 Hz, respectivamente, de los encontrados para los monolauratos cuya asignación está descrita en el anexo II.

De la misma manera, las señales de los carbonos del trisacárido en el espectro de ¹³C de los distintos monoésteres se hallan dentro de un intervalo de ± 0.1 ppm respecto a los desplazamientos químicos observados para los monolauratos. Por este motivo no se han listado los espectros de RMN de los compuestos sintetizados (se puede ver la asignación de los correspondientes monolauratos en el anexo II). La distribución de regioisómeros

en los monoésteres aislados se estableció a partir del espectro de protón de modo análogo a como se ha descrito en el anexo I. Los espectros de masas de alta resolución FAB (+) se obtuvieron con un espectrómetro Micromass AuroSpec-Q.

6-O-decanoilrafinosa (R6D): Siguiendo el procedimiento indicado arriba se preparó el monoéster con un rendimiento del 80 %. Sólo se obtuvo el regioisómero **R6D** ($^1\text{H-RMN}$). HRMS (FAB): calculado para $\text{C}_{28}\text{H}_{50}\text{O}_{17}\text{Na}$ (M+Na) 681.2945, encontrado 681.2943

6-O-lauroilrafinosa (R6L): Siguiendo el procedimiento indicado arriba se preparó el monoéster con un rendimiento del 79 %. Sólo se obtuvo el regioisómero **R6L** ($^1\text{H-RMN}$). HRMS (FAB): calculado para $\text{C}_{30}\text{H}_{54}\text{O}_{17}\text{Na}$ (M+Na) 709.3259, encontrado 709.3246

6-O-miristoilrafinosa (R6M): Siguiendo el procedimiento indicado arriba se preparó el monoéster con un rendimiento del 73 %. Sólo se obtuvo el regioisómero **R6M** ($^1\text{H-RMN}$). HRMS (FAB): calculado para $\text{C}_{32}\text{H}_{58}\text{O}_{17}\text{Na}$ (M+Na) 737.3571, encontrado 737.3569

6-O-palmitoilrafinosa (R6P): Siguiendo el procedimiento indicado arriba se preparó el monoéster con un rendimiento del 81 %. Sólo se obtuvo el regioisómero **R6P** ($^1\text{H-RMN}$). HRMS (FAB): calculado para $\text{C}_{34}\text{H}_{62}\text{O}_{17}\text{Na}$ (M+Na) 765.3885, encontrado 765.3885

6-O-estearoilrafinosa (R6S): Siguiendo el procedimiento indicado arriba se preparó el monoéster con un rendimiento del 79 %. Sólo se obtuvo el regioisómero **R6L** ($^1\text{H-RMN}$). HRMS (FAB): calculado para $\text{C}_{36}\text{H}_{66}\text{O}_{17}\text{Na}$ (M+Na) 793.4198, encontrado 793.4209

Monodecanoato de melecitosa (MD): Siguiendo el procedimiento indicado arriba se preparó el monoéster con un rendimiento del 56 %. Se obtuvo una mezcla ~ 2:1 de los regioisómeros en 6/6'' ($^1\text{H-RMN}$). HRMS (FAB): calculado para $\text{C}_{28}\text{H}_{50}\text{O}_{17}\text{Na}$ (M+Na) 681.2945, encontrado 681.2957

Monolaurato de melecitosa (ML): Siguiendo el procedimiento sintético indicado arriba se preparó el monoéster con un rendimiento del 52 %. Se obtuvo una mezcla ~ 2:1 de los regioisómeros en 6/6'' ($^1\text{H-RMN}$). HRMS (FAB): calculado para $\text{C}_{30}\text{H}_{54}\text{O}_{17}\text{Na}$ (M+Na) 709.3259, encontrado 709.3263

Monomiristato de melecitosa (MM): Siguiendo el procedimiento indicado arriba se preparó el monoéster con un rendimiento del 50 %. Se obtuvo una mezcla ~ 2:1 de los regioisómeros en 6/6'' ($^1\text{H-RMN}$). HRMS (FAB): calculado para $\text{C}_{32}\text{H}_{58}\text{O}_{17}\text{Na}$ (M+Na) 737.3571, encontrado 737.3579

Monopalmitato de melecitosa (MP): Siguiendo el procedimiento indicado arriba se preparó el monoéster con un rendimiento del 55 %. Se obtuvo una mezcla ~ 2:1 de los regioisómeros en 6/6'' ($^1\text{H-RMN}$). HRMS (FAB): calculado para $\text{C}_{34}\text{H}_{62}\text{O}_{17}\text{Na}$ (M+Na) 765.3886, encontrado 765.3885

Monoestearato de melecitosa (MS): Siguiendo el procedimiento indicado arriba se preparó el monoéster con un rendimiento del 53 %. Se obtuvo una mezcla ~ 2:1 de los regioisómeros en 6/6'' (¹H-RMN). HRMS (FAB): calculado para C₃₆H₆₆O₁₇Na (M+Na) 793.4198, encontrado 793.4178

1''-O-decanoilrafinosa (R1D): Siguiendo el procedimiento indicado arriba se preparó el monoéster con un rendimiento del 74 %. La reacción es altamente regioselectiva, **R1D/R6D** 97:3 (¹H-RMN). HRMS (FAB): calculado para C₂₈H₅₀O₁₇Na (M+Na) 681.2945, encontrado 681.2951

1''-O-lauroilrafinosa (R1L): Siguiendo el procedimiento indicado arriba se preparó el monoéster con un rendimiento del 57 %. La reacción es altamente regioselectiva, **R1L/R6L** 95:5 (¹H-RMN). HRMS (FAB): calculado para C₃₀H₅₄O₁₇Na (M+Na) 709.3259, encontrado 709.3263

1''-O-miristoilrafinosa (R1M): Siguiendo el procedimiento indicado arriba se preparó el monoéster con un rendimiento del 44 %. La reacción es muy regioselectiva, **R1M/R6M** 90:10 (¹H-RMN). HRMS (FAB): calculado para C₃₂H₅₈O₁₇Na (M+Na) 737.3571, encontrado 737.3549

1''-O-palmitoilrafinosa (R1P): Siguiendo el procedimiento indicado arriba se preparó el monoéster con un rendimiento del 74 %. La reacción es muy regioselectiva, **R1P/R6P** 86:14 (¹H-RMN). HRMS (FAB): calculado para C₃₄H₆₂O₁₇Na (M+Na) 765.3886, encontrado 765.3892

1''-O-estearoilrafinosa (R1S): Siguiendo el procedimiento indicado arriba se preparó el monoéster con un rendimiento del 74 %. La reacción es bastante regioselectiva, **R1S/R6S** 82:18 (¹H-RMN). HRMS (FAB): calculado para C₃₆H₆₆O₁₇Na (M+Na) 793.4198, encontrado 793.4202

Determinación colorimétrica de la CMC de los monoésteres sintetizados.

La determinación de la CMC mediante la inclusión en las micelas del colorante "Coomassie brilliant blue G-250" se basó en el método previamente descrito para surfactantes no-iónicos (Rosenthal et al., 1983). En lugar de preparar la solución del colorante que se describe en el artículo original, se utilizó directamente la disolución comercial "Bradford Reagent" de Sigma, que esencialmente tiene la misma composición. El método se adaptó a microescala para realizar las medidas de absorbancia en placas microtiter de la siguiente manera: en un tubo "ependorf" se mezclan 75 µl de solución de surfactante preparada en agua ultrapura Milli-Q[®], y 225 µl de solución "Bradford", se agita en vortex unos instantes y se transvasan 175 µl de la mezcla a un pocillo de la placa. Por tanto, hay que tener en cuenta que la concentración final de surfactante en la mezcla es 1/4 de la concentración de partida. La principal ventaja del empleo de la microescala está en que en una sola placa puede incluirse un

rango suficientemente amplio de concentraciones de surfactante, en incrementos pequeños, para determinar la CMC en una sola lectura de absorbancia. Las medidas se realizaron en un lector de placas Bio-Rad model 550, seleccionando el filtro de 620 nm. Para estimar de manera más precisa la CMC, en las curvas de absorbancia vs. concentración se empleó escala logarítmica en la abscisa como se ha descrito recientemente (Greffé et al., 2005). Para la preparación de las disoluciones de surfactante, las mezclas con la solución de colorante y las medidas de absorbancia se trabajó a 25 °C. Cada punto de las curvas representa el valor medio de tres medidas con una dispersión < 2% en todos los casos.

Determinación de la tensión superficial de las soluciones acuosas de los surfactantes preparados.

Todas las disoluciones se prepararon con agua ultrapura Milli-Q[®]. La tensión superficial de cada solución de surfactante se midió a 25 °C con el método de la gota pendiente (Hansen, 1993) empleando un dispositivo diseñado en el grupo de Cabrerizo - Departamento de Física Aplicada, Universidad de Granada- (Wege et al., 1999). El valor de tensión superficial tomado para cada concentración de surfactante se midió tras 8h y corresponde al valor de equilibrio asintótico que se observa en cada curva de tensión superficial frente al tiempo (a diferencia de otros métodos, la técnica de la gota pendiente proporciona una medida dinámica de la tensión superficial). Cada medida se repitió tres veces, tomándose al final el valor medio obtenido para la tensión superficial de equilibrio (en todos los casos la dispersión en las tres medidas fue menor del 1%) Debido a los requisitos extremos de limpieza necesarios para este tipo de medidas, los viales utilizados para la preparación de las soluciones se mantuvieron 24 h sumergidos en ácido sulfúrico concentrado para posteriormente enjuagarlos 30 veces con agua Helix y 20 veces con agua ultrapura Milli-Q[®], dejándolos secar a temperatura ambiente en cámara cerrada para evitar su contaminación con polvo del ambiente.

Determinación del tamaño micelar mediante dispersión dinámica de luz, “dynamic Light scattering” (DLS).

Se utilizó un dispositivo MALVERN 4700C (Malvern instruments) equipado con un láser de Ar (75mW de potencia máxima) utilizado como fuente de luz que emite un haz

polarizado verticalmente con una longitud de onda de 488 nm, y un correlador digital de 256 canales que realiza el cálculo de la función de autocorrelación de la intensidad y almacena toda la información en un PC para el procesamiento posterior de los datos. La cubeta de medida con la muestra se colocó en un baño termostatzado a 25 °C y las medidas se realizaron a un ángulo de dispersión de 90° y una potencia del láser de 35 mW. Las soluciones micelares preparadas con agua ultrapura Milli-Q[®] se añadieron a la cubeta de medida (previamente limpiada escrupulosamente) filtrándolas a través de un filtro Millipore de Nylon de 0.22 µm.

Para la construcción de los modelos de 6-O-acilrafínosa con la cadena de acilo en conformación totalmente extendida se utilizó el software ArgusLab 4.0 (gratuito a través de www.planaria-software.com/arguslab40). La estructura de rayos X de la rafínosa se obtuvo a través de la página www.cermav.cnrs.fr/cgi-bin/oligos/oligos.cgi

Solubilización de proteínas integrales de membrana.

Para evaluar la capacidad de los compuestos sintetizados para extraer proteínas integrales de membrana en forma activa se usó como modelo la glicoproteína P (Pgp) presente en un aislado de membranas de una línea multiresistente de *Leishmania tropica*, con una concentración de proteína total de ~ 18 µg/ µl (JM Pérez-Victoria, comunicación personal). Se utilizaron también varios detergentes comerciales: SDS (Sigma), CHAPS (Sigma) y monolaurato de sacarosa (Fluka). El tampón de solubilización para todos los detergentes preparados y los comerciales (a excepción de SDS) tiene la siguiente composición: 1 % (w/v) de detergente, TRIS-HCl 50 mM pH 7.4, cloruro magnésico 5 mM, DTT 1mM, cloruro sódico 300 mM y 20 % glicerol. El SDS se preparó al 2% en Tris-HCl 10 mM al mismo pH. La extracción se realizó con cada detergente a 4 °C mezclando 16.7 µl del preparado de membrana con 283 µl de tampón de solubilización con agitación magnética continua durante 30 minutos a 4 °C. Las mezclas se ultracentrifugaron entonces a 100000 × g durante 45 minutos, y el sobrenadante resultante se utilizó como fuente de las proteínas de membrana (entre ellas la Pgp y la fosfatasa ácida) solubilizadas. Los distintos solubilizados obtenidos con cada detergente se analizaron cualitativamente mediante electroforesis en gel desnaturante de poliacrilamida y SDS (SDS-PAGE) y posterior Western blot (siguiendo en ambos casos el procedimiento experimental descrito en “Pérez-Victoria,

2000”) de los geles empleando un anticuerpo policlonal antiPgp (Chiquero et al, 1988). La determinación de la actividad fosfatasa ácida se realizó sobre el aislado original de membranas y los distintos solubilizados utilizando el fosfato de paranitrofenilo como sustrato, como se describe en Parodi-Talice et al., 2003.

Referencias bibliográficas

Abran D, Boucher F, Hamakana T, Hiraki K, Kito Y, Koyama K, Leblanc LM, Machida H, Munger G, Seidou M, Tessier M. (1989) On some physicochemical properties of sucrose fatty acid esters and the stability they confer to membrane proteins. *J. Colloid Interf. Sci.* 128: 230-236.

Allen DK, Tao BY. (1999) Carbohydrate-alkyl ester derivatives as biosurfactants. *J. Surf. Det.* 2: 383-390.

Anderson RA, Polack AE. (1968) The stability of sucrose monolaurate: rate of formation of lauric acid. *J. Pharm. Pharmacol.* 20: 249-254.

Augé J, Lubin-Germain N. (2000) Glycosylhydrazides, a new class of sugar surfactants. Preparation and amphiphilic properties of 1-glycosyl-2-acylhidrazines. *J. Carbohydr. Chem.* 19: 379-392.

Baker IJA, Furlong DN, Grieser F, Drummond CJ. (2000a) Sugar fatty acid ester surfactants: base-catalyzed hydrolysis. *J. Surf. Det.* 3: 1-12.

Baker IJA, Willing I, Furlong DN, Grieser F, Drummond CJ. (2000b) Sugar fatty acid ester surfactants: biodegradation pathways. *J. Surf. Det.* 3: 1-12.

Berne BJ, Pecora R. (1990) *Dynamic light scattering: with applications to chemistry, biology and physics.* Robert E. Krieger Publishing Company. Malabar, Florida.

Carrea G, Riva S, Secundo F. (1989) Enzymatic synthesis of various 1'-O-sucrose and 1'-O-fructose esters. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1.* 1057-1061.

Chiquero MJ, Perez-Victoria JM, O'Valle F, Gonzalez-Ros JM, del Moral RG, Ferragut JA, Castanys S, Gamarro F. (1998) Altered drug membrane permeability in a multidrug-resistant *Leishmania tropica* line. *Biochem. Pharmacol.* 55: 131-139.

Davies DB, Christofides JC. (1987) Comparison of intramolecular hydrogen-bonding conformations of sucrose-containing oligosaccharides in solution and the solid state. *Carbohydr. Res.* 163: 269-274.

Domínguez A, Fernández A, González N, Iglesias E, Montenegro L. (1997) Determination of critical micelle concentration of some surfactants by three techniques.

J. Chem. Educ. 74: 1227-1231.

Dong M, Penin F, Baggetto LG. (1996) Efficient purification and reconstitution of P-glycoprotein for functional and structural studies. *J. Biol. Chem.* 271: 28875-28883.

Ferrer M, Comelles F, Plou FJ, Cruces MA, Fuentes G, Parra JL, Ballesteros A. (2002) Comparative surface activities of di- and trisaccharide fatty acid esters. *Langmuir* 18: 667-673.

Ferrer M, Cruces MA, Plou FJ, Bernabé M, Ballesteros A. (2000) A simple procedure for the regioselective synthesis of fatty acid esters of maltose, leucrose, maltotriose and *n*-dodecyl maltosides. *Tetrahedron* 56: 4053-4061.

Garavito RM, Ferguson-Miller S. (2001) Detergents as tools in membrane biochemistry. *J. Biol. Chem.* 276: 32403-32406.

Garofalakis G, Murray BS, Sarney DB. (2000) Surface activity and critical aggregation concentration of pure sugar esters with different sugar headgroups. *J. Colloid Interf. Sci.* 229: 391-398.

Grefte L, Bessueille L, Bulone V, Brumer H. (2005) Synthesis, preliminary characterization, and application of novel surfactants from highly branched xyloglucan oligosaccharides. *Glycobiology.* 15: 437-445.

Griffin WC. (1949) Classification of surface-active agents by "HLB". *J. Soc. Cosmet. Chem.* 1: 311-326.

Griffin WC. (1954) Calculation of HLB values of non-ionic surfactants. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 5: 259-267.

Hahn L, Sucker H. (1989) Solid surfactant solutions of active ingredients in sugar esters. *Pharm. Res.* 6: 958-960.

Hamada H, Tsuruo T. (1988) Purification of the 170- to 180-kilodalton membrane glycoprotein associated with multidrug resistance. *J. Biol. Chem.* 263: 1454-1458.

Hansen FK. (1993) Surface tension by image analysis: Fast and automatic measurements of pendant and sessile drops and bubbles. *J. Coll. Int. Sci.* 160: 209-217.

Israelachvili JN, Mitchell DJ, Nihman BW. (1976) Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2* 72: 1525-1568.

Jeffrey GA, Huang D-B (1990) The hydrogen bonding in the crystal structure of raffinose pentahydrate. *Carbohydr. Res.* 206: 173

Kjellin URM, Claesson PM, Vulfson EN. (2001) Studies of *N*-

dodecylactobionamide, maltose 6'-dodecanoate, and octyl- β -glucoside with surface tension, surface force and wetting techniques. *Langmuir* 17: 1941-1949.

Le Maire M, Champeil P, Möller JV. (2000) Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. *Biochim. Biophys. Acta* 1508: 86-111.

Lerk PC, Sucker HH, Eicke HF. (1996) Micellization and solubilization behaviour of sucrose laurate, a new pharmaceutical excipient. *Pharm. Develop. Technol.* 1: 27-36.

Levine IN. (1996) *Fisicoquímica*. McGraw-Hill.

Molinier V, Fenet B, Fitremann J, Bouchu A, Queneau Y. (2005) PFGSE-NMR study of self-diffusion of sucrose fatty acid monoesters in water. *J. Colloid Interf. Sci.* 286: 360-368.

Molinier V, Wisniewski K, Bouchu A, Fitremann J, Queneau Y. (2003) Transesterification of sucrose in organic medium: study of acyl group migrations. *J. Carbohydr. Chem.* 22: 657-669.

Parodi-Talice A, Araujo JM, Torres C, Perez-Victoria JM, Gamarro F, Castanys S. (2003) The overexpression of a new ABC transporter in *Leishmania* is related to phospholipid trafficking and reduced infectivity. *Biochim. Biophys. Acta.* 1612: 195-207.

Pérez-Victoria JM, Di Pietro A, Barron D, Ravelo AG, Castanys S, Gamarro F. (2002) Multidrug resistance phenotype mediated by the P-glycoprotein-like transporter in *Leishmania*: a search for reversal agents. *Curr. Drug Targets.* 3: 311-333.

Pérez-Victoria JM. (2000) Estrategias de inhibición de la glicoproteína-P de *Leishmania* para revertir la multirresistencia a fármacos. Tesis Doctoral, Universidad de Granada, Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra" CSIC.

Polat T, Bazin HG, Lindhardt RJ. (1997) Enzyme catalyzed regioselective synthesis of sucrose fatty acid ester surfactants. *J. Carbohydr. Chem.* 16: 1319-1335.

Polat T, Lindhardt RJ. (2001) Synthesis and applications of sucrose-based esters. *J. Surf. Det.* 4: 415-421.

Rich JO, Bedell BA, Dordick JS. (1995) Controlling enzyme-catalyzed regioselectivity in sugar ester synthesis. *Biotechnol. Bioeng.* 45: 426-434.

Rosenthal KS, Koussale F. (1983) Critical micelle concentration determination of non-ionic detergents with coomassie brilliant blue G-250. *Anal. Chem.* 55: 1115-1117.

Södeberg I, Drummond CJ, Furlong DN, Godkin S, Matthews B. (1995) Non-ionic sugar-based surfactants: self assembly and air/water interfacial activity. *Coll. Surf. A.* 102: 91-97.

Söderman O, Johansson I. (2000) Polyhydroxyl-based surfactants and their physicochemical properties and applications. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 4: 391-401.

Tanford C. (1980) *The hydrophobic effect.* Wiley Interscience, New York.

Vulliez-Le Normand B, Eiselé J-L. (1993) Determination of detergent critical micellar concentration by solubilization of a colored dye. *Anal. Biochem.* 208: 241-243.

Watanabe T. (1999) Sucrose fatty acid esters: past, present and future. *Foods Food Ingredients J. Jpn.* 180: 18-25.

Wege HA, Holgado-Terriza JA, Gálvez-Ruiz MJ and Cabrerizo-Vílchez MA. (1999) Development of a new Langmuir-type pendant-drop film balance. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 12: 339-349.

Wiese M, Berger O, Stierhof YD, Wolfram M, Fuchs M, Overath P. Gene cloning and cellular localization of a membrane-bound acid phosphatase of *Leishmania mexicana*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 82: 153-165.

ANEXO V

Ensayos de evaluación de la actividad biológica de todos los compuestos sintetizados en la memoria de tesis doctoral.

Resumen

En este último trabajo se han realizado distintos ensayos para estudiar la posible actividad biológica de los ésteres de oligosacáridos que se han descrito en los anexos anteriores incluyendo también en cada test, con fines comparativos, al monolaurato de sacarosa comercial. En concreto, se ha evaluado la toxicidad de los compuestos frente a una batería de células tumorales, protozoos parásitos, levaduras y bacterias; también se ha estudiado si los compuestos son capaces de revertir el fenotipo de multirresistencia a fármacos (MDR) conferido por la sobreexpresión de transportadores ABC. Los resultados obtenidos muestran que, en general, el comportamiento de todos los compuestos sintetizados es muy similar al monolaurato de sacarosa, observándose toxicidad a las mayores cocentraciones ensayadas, por encima de la cmc, lo que apunta a un mecanismo de acción inespecífico basado en la capacidad que como detergentes tienen estos compuestos para desintegrar la membrana plasmática. Al igual que los sucroésteres comerciales utilizados en alimentación, los derivados de trisacáridos también podrían utilizarse como emulgentes con la capacidad adicional de impedir la contaminación microbiana.

Introducción

Aparte de sus propiedades surfactantes, otra de las razones por las que los ésteres de carbohidratos son unos productos atractivos es su actividad biológica (ver apartado D. 4 de la introducción).

Las propiedades antimicrobianas de los ésteres de sacarosa como el monolaurato de sacarosa se han estudiado con cierto detalle, demostrándose que causan la inhibición del crecimiento de distintas bacterias como *Escherichia coli* (Kato et al., 1971), *Staphylococcus auerus* (Kato et al., 1987) o *S. mutants* (Hayes et al., 1984, Iwami et al.,

1995). Los monoésteres 6'-*O*-lauroilmaltosa y 6'-*O*-lauroilmaltotriosa provocan también una inhibición completa del crecimiento de *S. sobrinus* (Devulapalle et al., 2004).

Más interesante aún resulta la actividad antitumoral descrita para algunos compuestos de esta clase, como pueden ser los prometedoros resultados de citotoxicidad que 6''-*O*-palmitoilmaltotriosa ha mostrado frente a las líneas celulares cancerígenas humanas Hep-G2 y HeLa (Ferrer et al., 2005).

Todos estos antecedentes invitaban a realizar diferentes ensayos de bioactividad con los monoésteres de trisacáridos sintetizados en la presente memoria. En concreto, se ha evaluado la actividad antimicrobiana frente a bacterias y levaduras; la actividad antiparasitaria y la reversión del fenotipo MDR (multidrug resistance) en parásitos debido a la sobreexpresión de transportadores ABC; y la toxicidad frente a distintas líneas celulares tumorales humanas.

Materiales y métodos

Compuestos utilizados en los ensayos

- 1: 6-*O*-decanoirafinosa (tomada del anexo V)
- 2: 6-*O*-lauroilrafinosa (tomada del anexo II)
- 3: 6-*O*-miristoilrafinosa (tomada del anexo V)
- 4: 6-*O*-palmitoilrafinosa (tomada del anexo V)
- 5: 6-*O*-estearoilrafinosa (tomada del anexo V)
- 6: 1''-*O*-decanoirafinosa (tomada del anexo V)
- 7: 1''-*O*-lauroilrafinosa (tomada del anexo II)
- 8: 1''-*O*-miristoilrafinosa (pureza regioisomérica del 90 %, tomada del anexo V)
- 9: 1''-*O*-palmitoilrafinosa (pureza regioisomérica del 86 %, tomada del anexo V)
- 10: 1''-*O*-estearoilrafinosa (pureza regioisomérica del 82 %, tomada del anexo V)
- 11: 2'-*O*-lauroilrafinosa (pureza regioisomérica del 86 %, tomada del anexo III)
- 12: 6-*O*-decanoilmelecitosa / 6''-*O*-decanoilmelecitosa ~ 2:1 (tomada del anexo V)
- 13: 6-*O*-lauroilmelecitosa / 6''-*O*-lauroilmelecitosa ~ 2:1 (tomada del anexo V)
- 14: 6-*O*-miristoilmelecitosa / 6''-*O*-miristoilmelecitosa ~ 2:1 (tomada del anexo V)

- 15: 6-O-palmitoilmelecitosa / 6''-O-palmitoilmelecitosa ~ 2:1 (tomada del anexo V)
- 16: 6-O-estearoilmelecitosa / 6''-O-estearoilmelecitosa ~ 2:1 (tomada del anexo V)
- 17: 6'-O-lauroilmelecitosa (pureza regioisomérica del 73 %, tomada del anexo II)
- 18: 6''-O-lauroilmelecitosa (pureza regioisomérica del 69 %, tomada del anexo II)
- 19: 2-O-lauroilmelecitosa (pureza regioisomérica del 69 %, tomada del anexo III)
- 20: 6-O-lauroil(1-kestosa) (pureza regioisomérica del 87 %, tomada del anexo II)
- 21: 6'-O-lauroil(1-kestosa) (pureza regioisomérica del 69 %, tomada del anexo II)
- 22: 6''-O-lauroil(1-kestosa) (pureza regioisomérica del 90 %, tomada del anexo II)
- 23: 2-O-lauroil(1-kestosa) (pureza regioisomérica del 55 %, tomada del anexo II)
- 24: 6-O-lauroilestaquiosa (tomada del anexo II)
- 25: 1'''-O-lauroilestaquiosa (tomada del anexo II)
- 26: 6-O-lauroilestaquiosa (pureza regioisomérica del 79 %, tomada del anexo II)
- 27: 2''-O-lauroilestaquiosa (pureza regioisomérica del 85 %, tomada del anexo II)
- 28: monolaurato de sacarosa (Fluka) (mezcla de regioisómeros, ver anexo I)

Las distintas disoluciones acuosas de cada compuesto utilizadas en los ensayos se obtuvieron mediante dilución de las correspondientes soluciones stock preparadas de forma extemporánea con agua ultrapura Milli-Q® estéril. No se observó ninguna contaminación durante el curso de los experimentos a pesar de no haberse esterilizado las muestras.

Medios de cultivo utilizados

Los medios de cultivo utilizados para cada tipo celular fueron

- RPMI suplementado con 20% de suero bovino fetal (SBF): para *Leishmania tropica*. En el caso de la línea MDR de *L. tropica*, se supleneta con 150 µM de daunomicina (DNM).
- M199 suplementado con 10% de SBF: para *L. donovani*.
- SDM-79 suplementado con 10% de SBF: para las formas procíclicas de *Trypanosoma brucei*.
- HMI-9 suplementado con 10% de SBF: para las formas sanguíneas de *T. brucei*.
- DMEM suplementado con un 10 % SBF, 2mM L-glutamina, 50 unidades/mL de gentamicina: para las líneas celulares tumorales humanas.
- LB (Luria-Bertani): para *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*.

- SD (Synthetic Dextrose): para *Saccharomyces cerevisiae*.

Breve descripción del método del MTT y del azul de alamar usados para los ensayos de citotoxicidad.

La cuantificación de la reducción de sales de tetrazolio es una forma ampliamente aceptada de examinar la proliferación celular. El MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetil-2-tiazolil]-2,5-difenil-2H-tetrazolio), amarillo, es reducido por las células metabólicamente activas, en parte por la acción de deshidrogenasas mitocondriales, para generar cristales insolubles de formazán de color púrpura, que pueden ser solubilizados con la adición de detergentes. El color resultante puede ser cuantificado espectrofotométricamente (570 nm) en un lector de placas de ELISA. La cantidad de color producida es directamente proporcional al número de células viables (Scudiero et al., 1988).

También es posible utilizar el método del azul de alamar (resazurina), cuyo fundamento es análogo al método del MTT, pero que es más sensible que éste, ya que utiliza la fluorescencia del producto reducido (resorufina) en vez de la absorbancia (O'Brien et al., 2000), por lo que se aconseja para monitorizar la viabilidad de las formas sanguíneas de *T. brucei*, que crecen a mucha menor concentración.

Análisis de la actividad antiparasitaria

Se sembraron 3×10^5 parásitos/pozo (1×10^4 en el caso de las formas sanguíneas de *T. brucei*), en un volumen de 150 μL , en placas de cultivo de 96 pozos. Se añadieron las concentraciones indicadas de compuestos y se incubaron durante 72 horas a 28 °C. Posteriormente se añadió el colorante MTT (10 μL /pozo de una solución 5mg/mL) disuelto en PBS y se incubó 4 horas a 28 °C. La sal de formazán precipitada, producto de la reducción del MTT en las células viables, fue solubilizada mediante la adición de 50 μL de SDS 20% e incubando durante la noche a 37 °C. El color desarrollado se determinó midiendo la absorbancia a 570 nm en un lector de placas de ELISA (VERSAmax, Molecular Devices). En el caso de las formas sanguíneas de *T. brucei*, en vez de MTT se añadieron 20 μL de azul de alamar y la solución de SDS fue del 3%. La fluorescencia de la resorufina producida se leyó inmediatamente a 590 nm, tras excitarla a 560 nm, en un lector de placas de ELISA.

Análisis de la actividad revertidora del fenotipo MDR en parásitos

La reducción del MTT se midió como se indica anteriormente, salvo que todo el ensayo se realizó en presencia de 150 μ M daunomicina (DNM). Se utilizó una línea MDR de *L. tropica*.

Análisis de la actividad antitumoral

Se sembraron $3,5 \times 10^3$ células/pozo, en un volumen de 250 μ L, en placas de cultivo de 96 pozos y se incubaron toda la noche. Al día siguiente, se eliminó el medio con las células no pegadas y se añadió medio fresco conteniendo las concentraciones indicadas de compuestos, incubándose durante 72 horas a 37 °C en una atmósfera húmeda con un 5 % de CO₂ en un medio de cultivo. Posteriormente se añadió el colorante MTT (10 μ l/pozo de una solución 5mg/mL) y se incubó 4 horas a 37 °C. El color desarrollado se determinó como se indicó anteriormente.

Análisis de la actividad antimicrobiana frente a levaduras y bacterias

Se sembraron las bacterias (*Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*) y la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) a una DO_{600nm} de 1×10^{-4} , en un volumen de 100 μ L, en placas de cultivo de 96 pozos. Se añadieron las concentraciones indicadas de compuestos y se incubó durante 12 horas a 37 °C (*E. coli*) y a 28 °C (*B. subtilis* y *S. cerevisiae*). El crecimiento se determinó midiendo la turbidez a 600 nm en un lector de placas de ELISA, incluyendo en las placas blanco de medio de cultivo y control de crecimiento sin compuestos.

Resultados y Discusión

Actividad antiparasitaria

Aunque no existen precedentes descritos en bibliografía sobre la posible actividad antiparasitaria de ésteres de carbohidratos con ácidos grasos de cadena larga, sí se ha descrito que análogos de fosfolípidos como el fármaco mitelfosina

(hexadecilfosfolina), que tiene una estructura molecular anfipática zwitteriónica, presentan una actividad antiparasitaria aprobada para uso clínico (Croft et al., 2002). El mecanismo de acción de este fármaco parece involucrar no sólo a posibles dianas intracelulares, sino también a las distintas membranas celulares en las que es probable que ejerza acciones citotóxicas inespecíficas (Pérez-Victoria JM y Parodi-Tallice A, resultados no publicados).

Por sugerencia de los Doctores José María Pérez-Victoria y Javier Pérez-Victoria, se incluyeron ensayos de actividad antiparasitaria en los estudios de actividad biológica planteados para el presente anexo. En concreto, con los monoésteres descritos en los anexos anteriores se realizaron ensayos de inhibición del crecimiento de los siguientes protozoos parásitos:

a) *Trypanosoma brucei* tanto en su forma procíclica (residente en la mosca tse-tse) como sanguínea (la que vive en el hombre), responsables de la enfermedad del sueño o tripanosomiasis africana (<http://www.who.int/tdr/diseases/tryp/default.htm>).

b) *Leishmania donovani* y *L. tropica*, responsables de distintas formas de leishmaniasis (<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/default.htm>).

Los ensayos se realizaron en placas microtiter empleando el método de la reducción del compuesto amarillo MTT para dar cristales de formazán púrpuras, como indicador cualitativo y cuantitativo del estado celular (ver experimental), salvo en la forma sanguínea de *T. brucei*, que se usó el método de la reducción del azul de alamar (ver experimental).

Se ha descrito que algunos surfactantes no iónicos como los de tipo polioxietileno, producen una reversión del fenotipo de multiresistencia a fármacos (multidrug-resistance, MDR) (Dudeja et al., 1995); por este motivo, en los ensayos de actividad antiparasitaria se incluyó también una línea MDR de *L. tropica* (Pérez-Victoria et al., 2002) y se estudió si los compuestos producían algún tipo de reversión en la resistencia del parásito a la daunomicina (DNM) (Pérez-Victoria et al., 1999)

Los resultados se pueden observar cualitativamente en las figuras 1 y 2. Sobre la línea salvaje (Wt) de *L. donovani* se observa que ninguno de los monolauratos de estaquiosa (**24 a 27**) y ninguno de los monoésteres con el ácido decanoico (**1, 6, 12**) presentan actividad. El resto de compuestos matan al parásito a la máxima concentración ensayada (1 mM). A 0.2 mM, solamente el monopalmitato y monoestearato de melecitosa (**15, 16**) presentan actividad significativa. A una concentración de compuesto de 40 μM , el parásito crece en todos los casos.

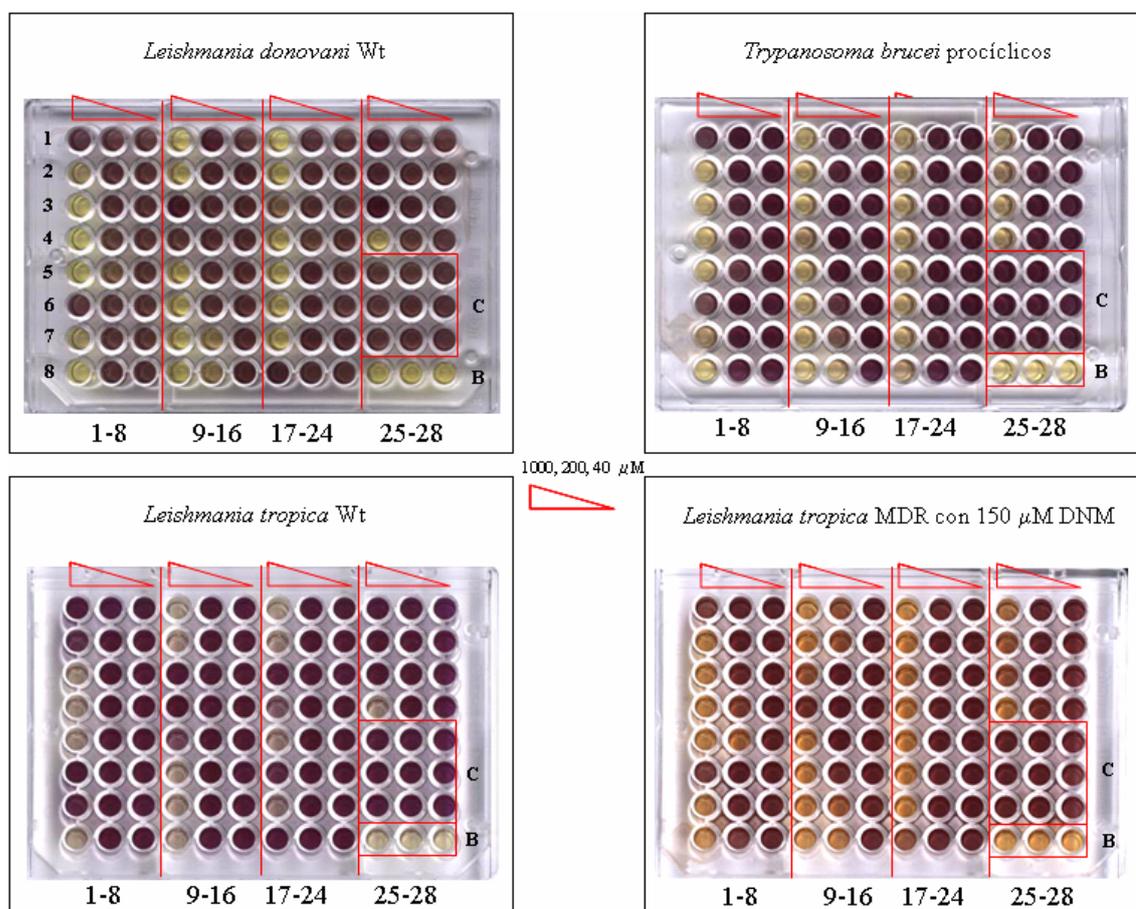


Figura 1. Toxicidad de los distintos compuestos frente a los parásitos indicados. Para cada compuesto (**1 a 28**) se utilizaron tres concentraciones diferentes, tal como está señalado en la figura. El control de crecimiento (C) y el blanco de MTT (B) también están incluidos en cada placa. Los pocillos donde el color es similar al blanco indican ausencia de crecimiento.

Sobre la línea de *L. tropica* salvaje los resultados son muy similares, con la diferencia de que ahora no sólo los derivados de decanoilo, sino también los de lauroilo son los que no ejercen ningún efecto sobre el parásito en todo el rango de concentraciones. Además, ningún compuesto mata al parásito a 0.2 mM.

En el caso de la línea de *T. brucei* procíclicos los resultados son muy similares a los obtenidos con *L. donovani*, con la salvedad de que aquí los monolauratos de estaquiosa y el monodecanoato de melecitosa (**12**) sí matan al parásito a 1 mM.

Comparando los resultados de la línea MDR de *L. tropica* con la línea salvaje, se observa cierta sensibilización de los parásitos frente a la daunomicina (DNM) por efecto de los compuestos. Por ejemplo, los derivados de estaquiosa (**24 a 27**) provocan en combinación con el fármaco la muerte del parásito cuando se utilizan a 1mM. En el caso de los derivados de palmitoilo y estearoilo, especialmente los de melecitosa (**15** y **16**) se produce reversión del fenotipo MDR cuando se emplean a 0.2 mM. Ningún compuesto produce reversión a 40 μ M.

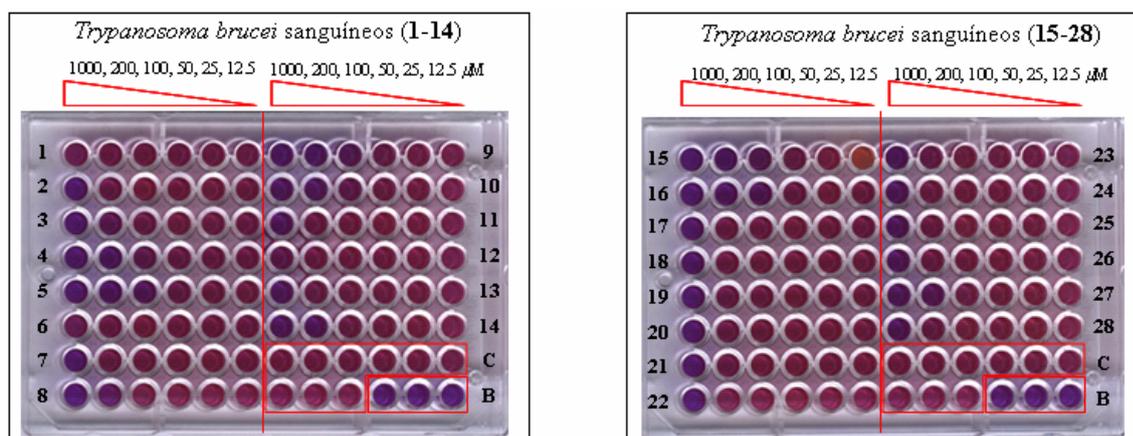


Figura 2. Toxicidad de los distintos compuestos frente a *Trypanosoma brucei* (sanguíneos). Para cada compuesto (**1 a 28**) se utilizaron las concentraciones señaladas en la figura. El control de crecimiento (C) y el blanco de azul de alamar (B) también están incluidos en cada placa. Los pocillos donde se observa color/fluorescencia análogo al del blanco indican ausencia de crecimiento.

Respecto al ensayo con *T. brucei* sanguíneos (Fig.2), el comportamiento es muy similar al de los procíclicos, sólo los derivados de palmitoilo y estearoilo (**4, 5, 9, 10, 15, 16**) y el monomiristato de melecitosa (**14**) presentan actividad a concentraciones inferiores a la máxima (0.2 mM).

A la vista de estos resultados, se seleccionaron los derivados de palmitoilo y estearoilo (**4, 5, 9, 10, 15, 16**) por ser los que presentan actividad a concentraciones más bajas en todos los casos, y se repitieron los ensayos con un número mayor de concentraciones, incluyéndose también, con fines comparativos, el monolaurato de sacarosa comercial (**28**).

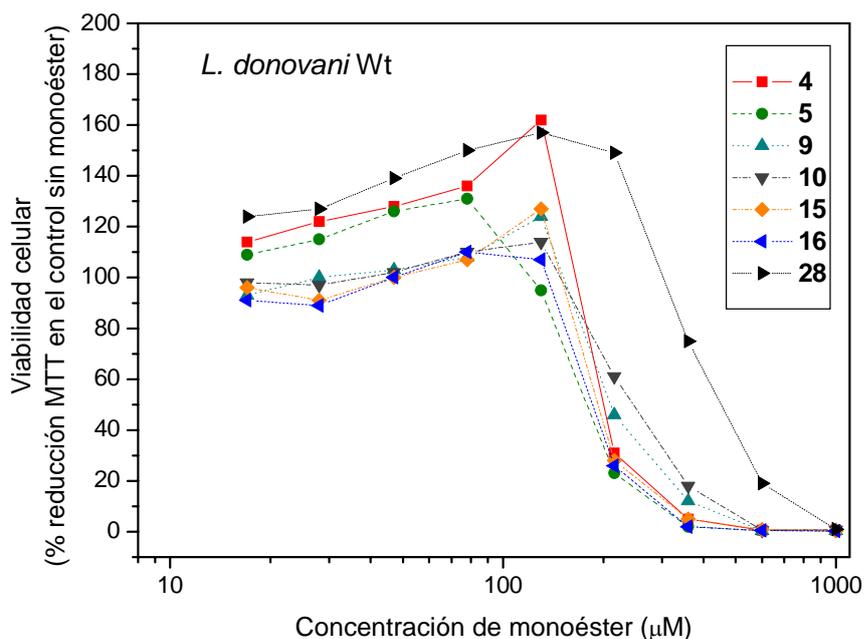


Figura 3. Toxicidad de los monoésteres seleccionados frente a *Leishmania donovani* (línea Wild type). El experimento se desarrolló con se indica en la parte experimental, y la DO se cuantificó a 570 nm. El color desarrollado por los parásitos en ausencia de tratamiento se consideró como el 100%. Para cada compuesto se utilizó un número de diferentes concentraciones, mayor que en el ensayo general.

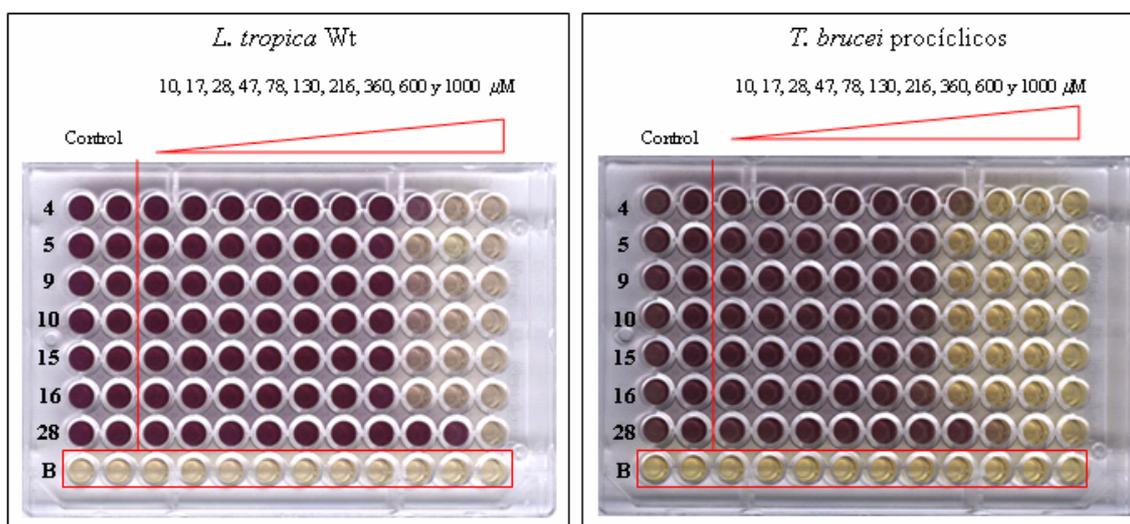


Figura 4. Toxicidad de los monoésteres seleccionados frente a *Leishmania tropica* (línea Wild type) y *Trypanosoma brucei* procíclicos. Para cada compuesto se utilizó un número de concentraciones diferentes mayor que en el ensayo general, tal y como se indica en la figura. El control de crecimiento y el blanco de MTT (B) están señalados en cada placa.

El comportamiento de todos los monoésteres sintéticos es muy similar; las concentraciones mínimas de monoéster necesarias para observar algún efecto son dependientes del tipo de parásito, así en el caso de *L. donovani* están en torno a 0.2 mM, para *L. tropica* el umbral está en torno a 0.6 mM, mientras que en *T. brucei* procíclicos se encuentra sobre 0.35 mM (en los sanguíneos se observó el mismo

comportamiento que en los procíclicos). Para el monolaurato de sacarosa, la concentración mínima a la cuál se observa actividad, es mayor que para los compuestos sintéticos en todos los parásitos estudiados.

En términos generales la actividad de los distintos monoésteres estudiados sigue el orden: estearatos \approx palmitatos $>$ miristatos \approx lauratos (incluido el de sacarosa) $>$ decanoatos. El orden coincide con el de una CMC creciente, según se ha visto en el anexo IV, y apunta a un efecto detergente totalmente inespecífico como causa de la toxicidad frente a los distintos parásitos. Si por ejemplo se comparan los resultados de *L. donovani* con los de *L. tropica* se observa que para esta última se requiere mayor concentración de compuesto para provocar la muerte celular, lo que podría traducirse simplemente en una mayor resistencia de la membrana plasmática de esta especie de *Leishmania* para ser disuelta por los surfactantes. Este efecto de citotoxicidad debido a la lisis celular podría ser similar al descrito con otros surfactantes sobre la bacteria *Bacillus subtilis* (Cho et al., 1990).

Actividad antitumoral

Para la evaluación de la actividad antitumoral se realizaron ensayos de citototoxicidad sobre las siguientes líneas celulares tumorales humanas (Hay et al., 1994):

- MDA: línea celular derivada de un carcinoma de mama.
- HeLa: línea celular proveniente de un adenocarcinoma de cérvix
- KB: línea celular derivada de un carcinoma epidérmico.
- Raw: línea celular proveniente de macrófagos de ratón.

Nuevamente los ensayos se llevaron en placas “microtiter” empleando el método del MTT. Los resultados pueden observarse cualitativamente en la figura 5.

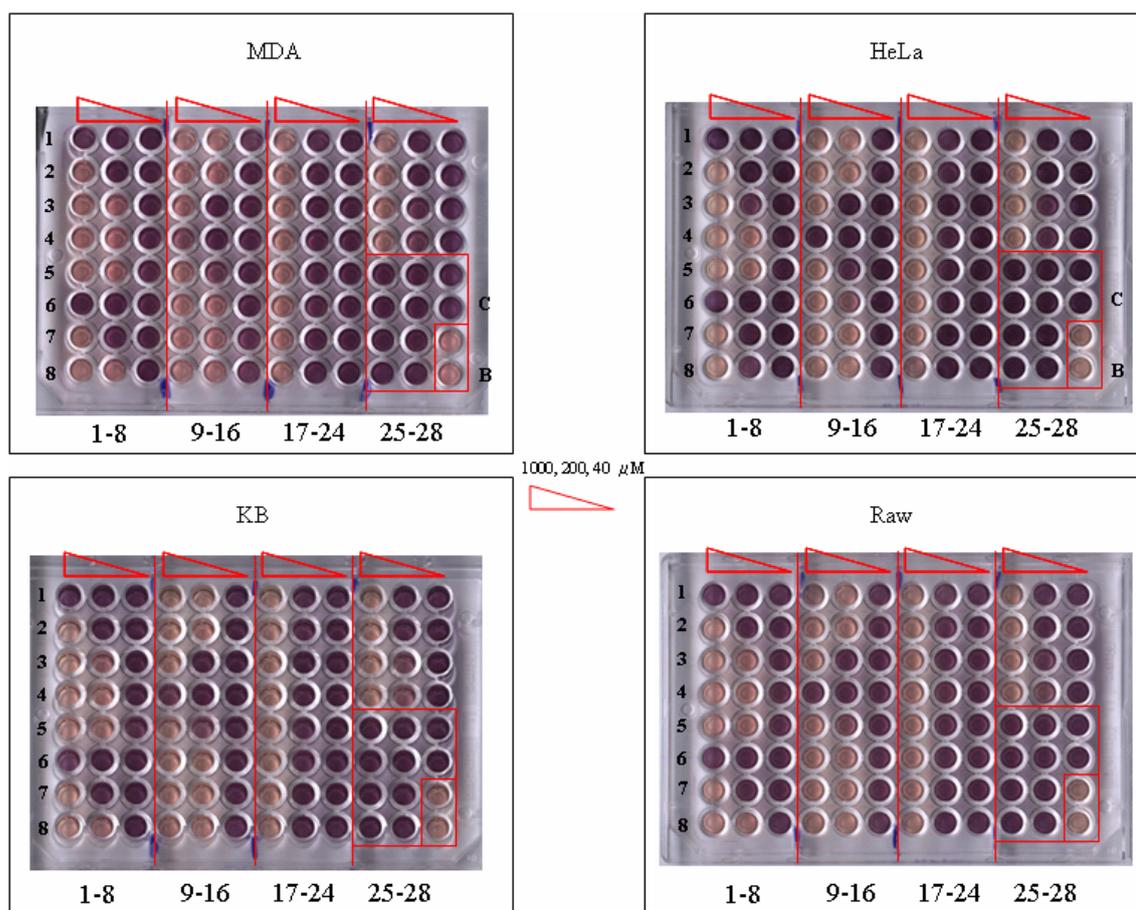


Figura 5. Ensayos de actividad antitumoral frente a las líneas celulares indicadas. El comportamiento de los compuestos es prácticamente idéntico en todos los casos

El comportamiento es prácticamente idéntico en las cuatro líneas celulares y muy similar a lo observado con los parásitos, sólo los derivados de miristoilo, palmitoilo y estearoilo muestran citotoxicidad a 0.2 mM. El compuesto **5** (6-O-estearoil rafinosa) es el único que presenta cierto efecto a 40 μ M, aunque prácticamente despreciable. Nuevamente, la citotoxicidad observada a 0.2 mM y 1 mM, parece ser debida a un efecto detergente totalmente inespecífico de modo análogo a como se ha comentado anteriormente para el estudio con parásitos.

Para 6''-O-palmitoilmaltotriosa se ha descrito una citotoxicidad muy interesante frente a las líneas celulares tumorales humanas Hep-G2 y HeLa, con valores de IC_{50} de 2.3 μ M y 3.6 μ M respectivamente (Ferrer et al., 2005). Obviamente, la analogía estructural de este compuesto con los ensayados en este trabajo es muy grande, y su CMC (Ferrer et al., 2002) es comparable a la de los derivados de palmitoilo y estearoilo sintetizados en el anexo IV. Parece claro entonces, que el mecanismo de acción antitumoral de este monoéster de maltotriosa es independiente, o al menos no está basado exclusivamente

en su naturaleza surfactante. Este ejemplo, pone de manifiesto como mononésteres de oligosacáridos de estructura similar, no sólo pueden presentar propiedades físicas diferentes en función del carbohidrato concreto utilizado y de la posición de acilación (anexo IV), si no que también pueden mostrar una bioactividad totalmente diferente.

Actividad antimicrobiana

Los ésteres de carbohidratos se usan como agentes antibacterianos en bebidas de lata en Japón. Casi todos los estudios previos sobre las propiedades antimicrobianas de los ésteres de carbohidratos se han llevado a cabo con productos comerciales (Marshall et al., 1994). Éstos suelen estar constituidos por mezclas complejas de mono-, di-, triésteres, etc. y contienen diferentes regioisómeros. En contraste con los numerosos trabajos sobre la actividad biológica de los ésteres derivados de sacarosa, existen muy pocos estudios realizados con ésteres derivados de otros disacáridos o trisacáridos, probablemente debido a la ausencia de métodos adecuados para su síntesis. Quizás la única excepción sean los trabajos realizados en el grupo de Ballesteros con ésteres de maltosa (Ferrer et al., 2005) y maltotriosa (Devulapalle et al., 2004).

Para la evaluación de la actividad antimicrobiana se analizó el efecto de los compuestos seleccionados sobre el crecimiento en medio líquido de los siguientes microorganismos: las bacterias *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*, y la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

A efectos comparativos se utilizó el monolaurato de sacarosa (**28**) y se seleccionaron los compuestos sintetizados de CMC más próxima al compuesto comercial, es decir, los derivados de palmitoilo y miristoilo: 6-O-miristoilrafínosa (**3**), 6-O-palmitoilrafínosa (**4**), 1''-O-miristoilrafínosa (**8**), 1''-O-palmitoilrafínosa (**9**), monomiristato de melecitosa (**14**), monopalmitato de melecitosa (**15**). La tabla 1 resume los resultados obtenidos tras 12 horas.

Ninguno de los compuestos inhibe el crecimiento de *E. coli*, incluido el monolaurato de sacarosa comercial, aunque curiosamente se había descrito con anterioridad que este compuesto sí inhibía el crecimiento de esta bacteria (Kato et al., 1971, Ferrer et al., 2005). En el ensayo sobre *B. subtilis* sí se observó inhibición con el monolaurato de sacarosa comercial (**28**), los derivados de melecitosa **14** y **15**, y 6-O-palmitoilrafínosa

(4). Estos resultados son lógicos teniendo en cuenta que las bacterias Gram-positivas (como *B. subtilis*) son más susceptibles que las Gram-negativas (como *E. coli*) a la acción de los ésteres de sacarosa (Conley et al., 1973). Por otra parte, es probable que estos compuestos sí sean capaces de inhibir el crecimiento de *E. coli* como resultado de un efecto sinérgico si se usan en combinación con el EDTA de modo análogo a como se ha descrito para ésteres de sacarosa (Kato et al., 1975). También se ha descrito la inhibición de bacterias Gram-positivas con combinaciones de ésteres de sacarosa y antibióticos.

Tabla 1. Screening de la actividad antimicrobiana del monolaurato de sacarosa y de los monoésteres derivados de trisacáridos seleccionados.

| Compuesto | <i>E. coli</i> | | <i>B. subtilis</i> | | <i>S. cerevisiae</i> | |
|-----------------------|----------------|-----|--------------------|------|----------------------|------|
| 28 | ++ | ++ | -- | -- | ++ | ++ |
| 3 | ++ | ++ | +/-- | ++/- | ++ | ++ |
| 8 | ++ | ++ | ++/- | ++ | ++ | ++ |
| 4 | ++ | ++ | +/-- | +/-- | ++ | ++ |
| 9 | ++ | ++ | ++/- | ++ | ++ | ++ |
| 14 | ++ | ++ | +/-- | +/-- | ++/- | ++/- |
| 15 | ++ | ++ | -- | -- | +/-- | ++/- |
| Concentración (mg/ml) | 1 | 0.2 | 1 | 0.2 | 1 | 0.2 |

(++) crecimiento similar al control; (++)/- inhibición del crecimiento menor del 50%; (+/-) inhibición del crecimiento mayor del 50%; (--) ningún crecimiento.

Respecto a la inhibición del crecimiento de la levadura ningún compuesto produjo ningún efecto importante a excepción del monopalmitato de melecitosa (**15**) a la mayor concentración. Nuevamente, el comportamiento observado es similar al de los ésteres de sacarosa, para los que se ha descrito que producen una inhibición del crecimiento mucho menor en las levaduras que en otros hongos (Marshall et al., 1994).

Aunque las concentraciones de compuesto que muestran actividad antimicrobiana en estos experimentos pueden considerarse altas, es importante tener en cuenta que los ésteres de sacarosa comerciales se emplean como emulgentes en alimentación a concentraciones tan altas como 10 mg/ml (Ryoto® Sugar Esters Technical Information, Mitsubishi-Kagaku Foods Co., 1998). Como prueba de su baja toxicidad, indicar que la cantidad máxima de ingesta diaria de sucrosésteres es significativamente alta (20 mg/kg de peso del cuerpo).

El mecanismo que justifica la acción antimicrobiana de los ésteres de carbohidratos no se ha elucidado todavía. No obstante, se ha observado que los sucroésteres causan cambios en la morfología celular de células en crecimiento de *B. subtilis*, que inducen procesos de autólisis que resultan en la muerte celular (Tsuchido et al., 1990; Cho et al., 1990). Es probable que la acción de los ésteres de trisacáridos estudiados aquí sea muy similar.

Conclusiones

A pesar de las expectativas altas que se tenían sobre la posible actividad antitumoral de alguno de estos compuestos, a la vista de los precedentes descritos en bibliografía, ninguno de ellos ha mostrado un efecto reseñable.

Por otra parte, la inclusión del monolaurato de sacarosa comercial como control comparativo ha mostrado que la actividad antimicrobiana de los compuestos sintetizados es muy similar, siendo probablemente el resultado de una acción detergente totalmente inespecífica que provoca la lisis celular. Los distintos ésteres de oligosacáridos podrían utilizarse en alimentación como agentes surfactantes antimicrobianos y biodegradables de manera análoga a como se emplean actualmente los monoésteres de sacarosa comerciales.

Referencias bibliográficas

- Cho H-Y, Tsuchido T, Ono H, Takano M.** (1990) Cell death of *Bacillus subtilis* caused by surfactants at low concentrations results from induced cell autolysis. *J. Ferment. Bioeng.* 70: 11-14.
- Conley AJ, Kabara JJ.** (1973) Antimicrobial action of esters of polyhydric alcohols. *Antimicrob. Agents Chemother.* 4: 501-506.
- Croft SL, Seifert K, Duchene M.** (2002) Antiprotozoal activities of phospholipids analogues. *Mol. Biochem. Parasitol.* 126: 165-172.
- Devulapalle KS, Gomez de Segura A, Ferre M, Alcalde M, Mooser G, Plou FJ.** (2004) Effect of carbohydrate fatty acid esters on *Streptococcus sobrinus* and glucosyltransferase activity. *Carbohydr. Res.* 339: 1029-1034.

- Dudeja PK, Anderson KM, Harris JS, Buckingham L, Coon JS.** (1995) Reversal of multidrug-resistance phenotype by surfactants: relationship to membrane lipid fluidity. *Arch. Biochem. Biophys.* 319: 309-315.
- Ferrer M, Comelles F, Plou FJ, Cruces MA, Fuentes G, Parra JL, Ballesteros A.** (2002) Comparative surface activities of di- and trisaccharide fatty acid esters. *Langmuir* 18: 667-673.
- Ferrer M, Pérez G, Plou FJ, Castell JV, Ballesteros A.** (2005) Antitumor activity of fatty acid maltotriose esters obtained by enzymatic synthesis. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 42: 35-39.
- Ferrer M, Soliveri J, Plou FJ, López-Cortés N, Reyes-Duarte D, Christensen M, Copa-Patiño JL, Ballesteros A.** (2005) Synthesis of sugar esters in solvent mixtures by lipases from *Thermomyces lanuginosus* and *Candida Antarctica* B, and their antimicrobial properties. *Enzyme Microb. Technol.* 36: 391-398.
- Hay R, Park J-G, Gadzar A.** (1994) Atlas of human tumor cell lines. Academic Press. Elsevier. Amsterdam.
- Hayes ML.** (1984) The effects of fatty acid and their monoesters on the metabolic activity of dental plaque. *J. Dent. Res.* 63: 2-5.
- Iwami Y, Schatele CF, Yamada T.** (1995) Effect of sucrose monolaurate on acid production, levels of glycolytic intermediates, and enzyme activities of *Streptococcus mutants* NCTC 10449. *J. Dent. Res.* 74: 1613-1617.
- Kato A, Arima K.** (1971) Inhibitory effect of sucrose ester of lauric acid on the growth of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 42: 596-601.
- Kato N, Shibasaki I.** (1975) Combined effect of different drugs on the antibacterial effects of fatty acid esters and their esters. *J. Antibacterial Antifungal Agents.* 3: 355-361.
- Kato S, Kobayashi H, Watanabe T.** (1987) Antimicrobial action of sucrose monolaurate on *Staphylococcus aureus*. *J. Food Hyg. Soc. Japan* 28: 261-266.
- Marshall DL, Bullerman LB.** (1994) Antimicrobial properties of sucrose fatty acid esters. En: Akoh CC, Swanson, editors. *Carbohydrate polyesters as fat substitutes*. Marcel Dekker, New York. Pp. 149-167.
- O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F.** (2000) Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* 267: 5421-5426.
- Pérez-Victoria JM, Chiquero MJ, Conseil G, Dayan G, Di Pietro A, Barron D,**

Castanys S, Gamarro F. (1999). Correlation between the affinity of flavonoids binding to the cytosolic site of *Leishmania tropica* multidrug transporter and their efficiency to revert parasite resistance to daunomycin. *Biochemistry* 38: 1736-1743.

Pérez-Victoria JM, Di Pietro A, Barron D, Ravelo AG, Castanys S, Gamarro F. (2002) Multidrug resistance phenotype mediated by the P-glycoprotein-like transporter in *Leishmania*: a search for reversal agents. *Curr. Drug Targets.* 3: 311-333.

Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currens MJ, Seniff D, Boyd MR (1988) Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Research* 48: 4827-4833.

Tsuchido T, Svarachorn A, Soga H, Takano M. (1990) Lysis and aberrant morphology of *Bacillus subtilis* cells caused by surfactants and their relation to autolysin activity. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 34: 781-785.

Discusión

V. DISCUSIÓN

A. Acilaciones enzimáticas regioselectivas de carbohidratos.

La utilización de enzimas en química de carbohidratos está ampliamente extendida (Thiem, 1995). Se emplean tanto para sintetizar oligosacáridos complejos (por ejemplo las glicosiltransferasas y glicosidasas), como para transformar glicósidos. De estas transformaciones, la acilación constituye una derivatización muy sencilla que, gracias a la biocatálisis, se puede realizar de manera selectiva sobre determinados hidroxilos de entre los múltiples que presentan los carbohidratos. A lo largo de los siguientes apartados se discuten distintos aspectos de este tipo de reacción teniendo presentes los precedentes bibliográficos y los resultados obtenidos en esta memoria.

A. 1. Oligosacáridos empleados como sustratos de partida.

Los carbohidratos son la clase de compuestos más importante a nivel mundial en términos de volumen de producción, ya que representan aproximadamente el 95 % de una biomasa renovable anualmente de unos 200 billones de toneladas; de éstos, sólo el 3 % es utilizado por el hombre, mientras que el resto se recicla a través de rutas naturales (Lichtenthaler et al., 1997).

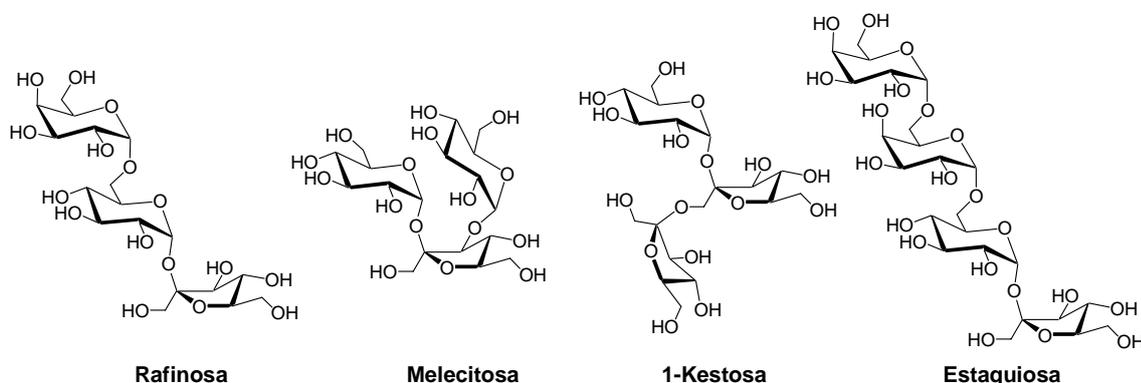
El empleo de materias primas renovables es una clave fundamental para un desarrollo sostenible. Los polisacáridos constituyen el grueso principal de la biomasa de carbohidratos, pero son los monosacáridos y disacáridos los azúcares más interesantes en la industria química. Muchos de ellos son muy baratos (sacarosa, glucosa, lactosa, fructosa, etc.) y son materiales de partida extraordinarios para la obtención de productos con valor añadido. De hecho, uno de los objetivos futuros de la industria es ir sustituyendo los productos de origen petroquímico por productos derivados de carbohidratos.

En química orgánica los carbohidratos tienen mucho valor como material de partida quiral en la síntesis de productos naturales y fármacos bioactivos (Nicolaou et al., 2001). No obstante el uso de los carbohidratos en química fina suele implicar

procesos multietapa. Los surfactantes derivados de carbohidratos, sin embargo, pueden obtenerse de manera más directa y, como ya se ha señalado a lo largo de la memoria, se trata de productos de gran interés.

El grupo de los SFAE (“sugar fatty acid esters”) está prácticamente copado a escala comercial por los ésteres de sacarosa. Añadir nuevos productos derivados de otros carbohidratos puede enriquecer el repertorio de aplicaciones dado que las propiedades fisicoquímicas de esta clase de compuestos, son dependientes, entre otros factores, de la naturaleza del carbohidrato (Garofalakis et al., 2000). También la actividad biológica descrita para algunos compuestos de esta clase invita a explorar nuevos derivados. Por estas razones, la síntesis de SFAE con carbohidratos diferentes a la sacarosa ha sido abordada por diversos grupos de investigación (Plou et al., 2002).

En la presente memoria se han utilizado oligosacáridos derivados biosintéticamente de la sacarosa (esquema V. A1), en concreto los trisacáridos rafinosa, melecitosa y 1-kestosa, y el tetrasacárido estaquiosa. El interés de preparar derivados acilados de estos oligosacáridos no es solamente la similitud estructural con el disacárido de sacarosa, sino su importancia como compuestos prebióticos, que estimulan el crecimiento de la flora intestinal. Esta interesante propiedad ha sido probada claramente para la 1-kestosa y otros fructo-oligosacáridos oligoméricos (FOS) en numerosos estudios (Chow, 2002), pero aún existe controversia para el resto de oligosacáridos estudiados (Smiricky-Tjardes et al., 2003).



Esquema V. A1. Oligosacáridos comerciales derivados de sacarosa empleados en la presente memoria.

La rafinosa se puede encontrar en diversos vegetales comestibles como la col, brocol, espárragos, judías y semillas análogas de las que se aísla el producto comercial (Ivanova et al., 1985; Ivanova et al, 1987). Se considera como un oligosacárido

funcional por promover el crecimiento de bifidobacterias en estudios *in vitro* (Scalabrini et al., 1998), aunque su actividad *in vivo* no parece apuntar en el mismo sentido (Smiricky-Tjardes et al., 2003;).

La estaquirosa es un tetrasacárido de la familia de la rafinosa y que se puede encontrar en las mismas fuentes. También se considera como un oligosacárido funcional en alimentación (Nakakuki, 2002), aunque estudios recientes en cerdos parecen no confirmar esta afirmación (Liyang et al., 2003).

El trisacárido melecitosa se encuentra en diversas resinas y en la miel (Hudson et al., 1920). Se ha observado que promueve el crecimiento de ciertas bifidobacterias (Scalabrini et al., 1998).

Por último, el trisacárido 1-kestosa es un fructooligosacárido que se encuentra en vegetales que disponen de fructosiltransferasas. Es un oligosacárido funcional muy interesante como prebiótico en alimentación (Chow, 2002) y se produce mediante técnicas biotecnológicas a partir de la sacarosa (Yun, 1996), obteniéndose como uno de los componentes de una mezcla de fructooligosacáridos.

Los ésteres de sacarosa tienen numerosas aplicaciones industriales como emulgentes como ya se comentó previamente en la introducción. Estas aplicaciones se podrían extender a algunos de los oligosacáridos estudiados en esta memoria, lo que podría aumentar el valor añadido de dichos azúcares. Sobre todo si se les considera no sólo como nuevos emulgentes, sino como emulgentes funcionales debido a su probable efecto prebiótico añadido.

A nivel de investigación básica, emplear nuevos oligosacáridos como sustratos en acilaciones enzimáticas aporta, por una parte, una valiosa información sobre el comportamiento de las distintas hidrolasas en reacciones de transesterificación de carbohidratos con ésteres vinílicos, y por otra, supone un estudio interesante sobre protección selectiva de estos sustratos, con potenciales aplicaciones en síntesis orgánica. Ambas vertientes se discutirán más adelante.

A. 2. El problema de la solubilidad de los oligosacáridos en disolventes orgánicos.

El éxito en la transesterificación enzimática de oligosacáridos depende, entre otros factores, de la solubilidad en el medio orgánico en el que se lleva a cabo la reacción, teniendo siempre presente que la hidrolasa utilizada debe mantener una actividad razonable en dicho medio.

Cuando se trata de proteasas como la subtilisina o la termolisina, capaces de actuar en DMF y DMSO respectivamente, la solubilidad de los carbohidratos no supone ningún problema ya que se trata de disolventes de azúcares excelentes debido a su alta polaridad. El problema surge con las lipasas, pues se trata de enzimas que muestran su mayor actividad en disolventes de alto valor de $\log P$ (hidrófobos), y en este tipo de medio, los carbohidratos de tamaño mayor que los monosacáridos son poco, o nada solubles.

La aproximación del grupo de Ballesteros, empleando mezclas de alcohol *t*-amílico y DMSO (en proporción insuficiente para causar la desactivación de las lipasas) es una solución muy satisfactoria al problema (Ferrer et al., 1999). En la presente memoria se ha planteado una mezcla diferente, compuesta por *t*-butanol y piridina, que se puede eliminar de manera más sencilla mediante evaporación a vacío (Anexo II). Esta mezcla ya se había utilizado con éxito para la esterificación directa de glucosa con ácido mirístico con catálisis de Novozym 435 (Degn et al., 2001). También se habían empleado estas condiciones con la misma lipasa en la transesterificación de sacarosa y maltosa con ésteres vinílicos; sin embargo no se observó reacción sobre lactosa o celobiosa debido a su baja solubilidad en el medio (Pedersen et al., 2002).

Para mejorar de manera drástica la solubilidad de los distintos oligosacáridos en este medio, se emplearon en estado amorfo. La figura V. A1 muestra como el liofilizado obtenido a partir de una solución preparada con rafinosa cristalina, produce una forma amorfa del trisacárido (Saleki-Gerhardt et al., 1995).

El grupo de Sheldon ya había demostrado como la solubilidad de la sacarosa en *t*-butanol a reflujo era mayor empleando el disacárido en estado amorfo, lo que se

traducía en una mayor reactividad del sustrato en su acilación catalizada por Novozym 435 (Woudenberg-van Oosterom et al., 1996).

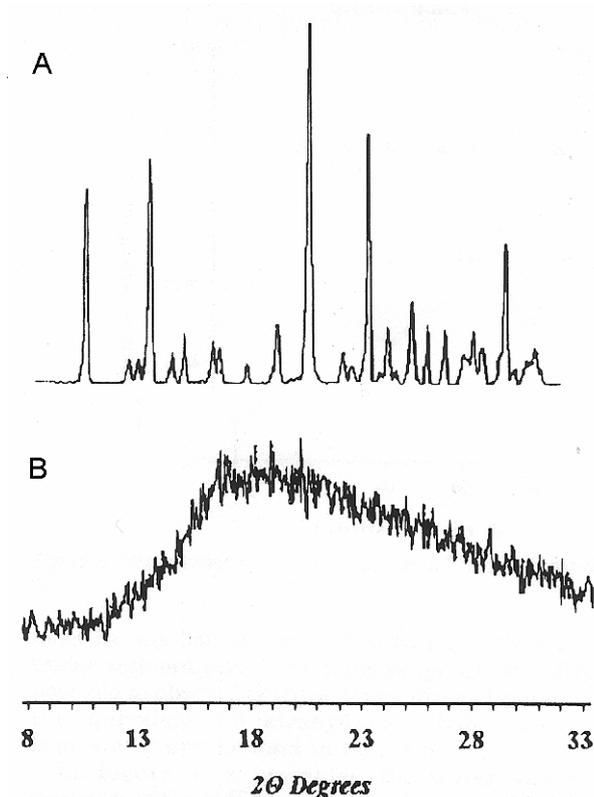


Figura V. A1. Comparación del patrón de difracción de rayos X de polvo de dos formas de rafinosa: (A) pentahidrato cristalino; (B) liofilizado amorfo (tomado de Saleki-Gerhardt et al., 1995).

En la presente memoria, el empleo de los oligosacáridos en forma amorfa ha permitido también utilizar piridina en lugar de DMF para las acilaciones catalizadas por subtilisina Carlsberg, lo que ha supuesto una gran ventaja a nivel práctico, pues la piridina es mucho más sencilla de eliminar mediante evaporación a vacío.

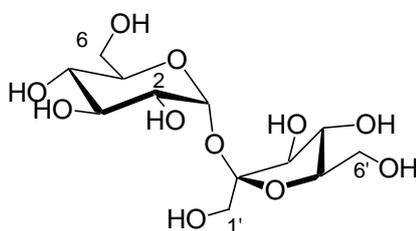
Por último habría que señalar otra ventaja adicional del empleo de los oligosacáridos en estado amorfo. Dado que el proceso de liofilización implica una deshidratación drástica (Roy et al., 2004), se consigue eliminar casi toda el agua de cristalización de los distintos carbohidratos (Saleki-Gerhardt et al., 1995), evitándose que ésta participe en la hidrólisis biocatalizada de los ésteres vinílicos utilizados como agentes acilantes, y que el porcentaje de la misma en el medio sea demasiado alto y provoque la inactivación de la enzima (ver apartado A de la introducción).

A. 3. Empleo de diferentes hidrolasas como estrategia para conseguir regioselectividades complementarias.

Uno de los principales atractivos de la acilación enzimática de carbohidratos es la modulación de la regioselectividad de la reacción seleccionando la hidrolasa (lipasa o proteasa) apropiada. Obviamente, en el caso de monosacáridos que presentan un único hidroxilo primario se observará siempre la acilación del mismo independientemente de la hidrolasa utilizada (apartados C. 5. 2. 1 y C. 5. 2. 2. de la introducción). Es a partir de disacáridos, en los que ya existe más de un hidroxilo primario como posible posición de acilación, donde surge el verdadero problema de la regioselectividad. Afortunadamente las lipasas y proteasas son muy selectivas en su comportamiento, siendo capaces de discriminar entre distintos hidroxilos primarios de un carbohidrato.

Para la acilación regioselectiva de hidroxilos secundarios de carbohidratos sin tener protegidos químicamente los primarios, hay que recurrir a hidrolasas muy particulares que presenten un mecanismo de acción totalmente diferente al de lipasas y serina proteasas; es decir, sin participación de un intermedio acil-enzima. Tal es el caso de la termolisina (apartado C. 4. 2.1 de la introducción; Pedersen et al., 2002).

Una revisión de los resultados descritos en bibliografía para la acilación enzimática de la sacarosa (esquema V. A2), pone de manifiesto la complementariedad que se puede conseguir en la regioselección en función de la enzima utilizada (apartado C. 5. 2. 3 de la introducción).



Sacarosa

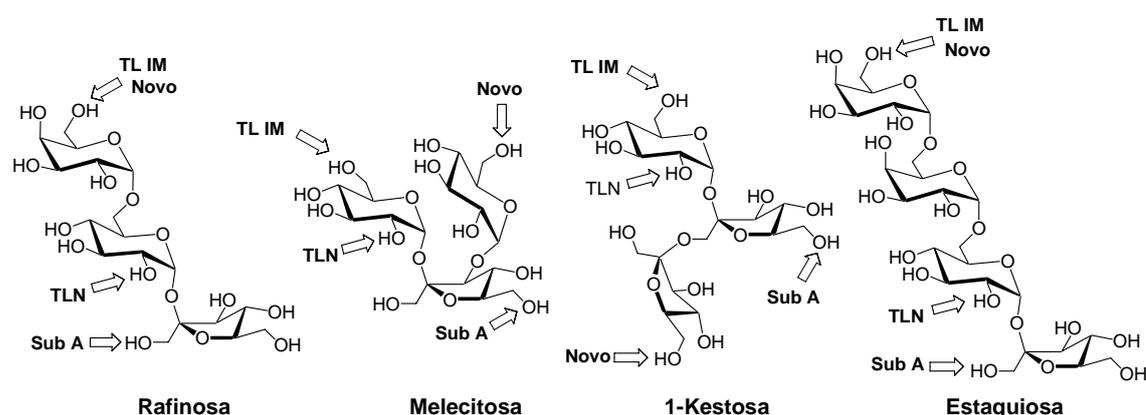
Esquema V. A2. Estructura de la sacarosa, con indicación de las posiciones cuya acilación enzimática ha sido descrita.

Para la sacarosa, se ha descrito que la subtilisina Carlsberg acila regioselectivamente la posición 1' (Riva et al., 1988), la lipasa de *Thermomyces*

lanuginosus acila regioselectivamente la posición 6 (Ferrer et al., 1999), la lipasa B de *Candida antarctica* produce una mezcla equimolar de los regioisómeros en 6 y 6' (Woudenberg-van Oosterom et al., 1996), y la metaloproteasa termolisina acila preferentemente la posición 2 (Pedersen et al., 2002a).

Como se ha indicado anteriormente, los oligosacáridos no reductores utilizados, contienen una unidad de sacarosa en su estructura (esquema V. A1). El trisacárido rafinosa y el tetrasacárido estaquiosa se pueden considerar moléculas de sacarosa sustituidas en el hidroxilo en 6 dando lugar a 6-O- α -galactopiranosilsacarosa y 6-O- α -[α -galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)-galactopiranosil]sacarosa, respectivamente. Los trisacáridos melecitosa y 1-kestosa se pueden considerar como 3'-O- α -glucopiranosilsacarosa y 1'-O- β -fructofuranosilsacarosa, respectivamente. Esta unidad estructural común a todos los oligosacáridos empleados y su similitud conformacional (Davies et al., 1987; Mulloy et al., 1988) permite teorizar *a priori* que, si se emplearan las mismas enzimas señaladas arriba para el caso de la sacarosa, podrían conseguirse regioselectividades complementarias en la acilación biocatalizada de los mismos.

Los resultados descritos en los anexos II y III muestran como, efectivamente, se pueden acilar diferentes hidroxilos en estos sustratos según la enzima empleada (esquema V. A3).



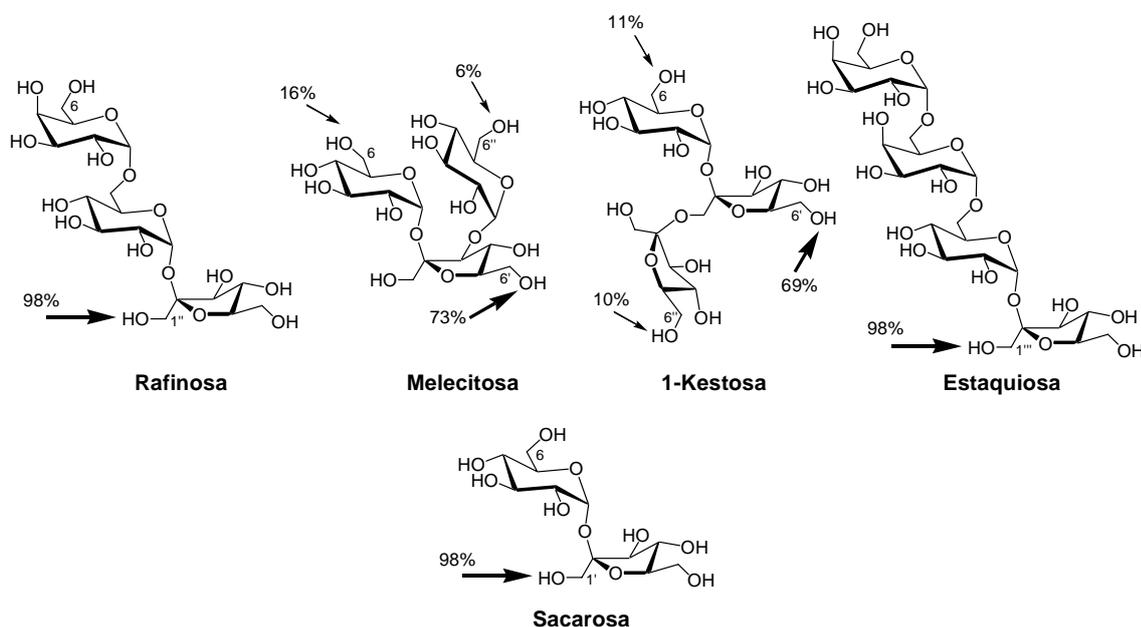
Esquema V. A3. Posiciones de acilación preferentes en la transesterificación de los oligosacáridos con ésteres vinílicos, empleando como catalizadores las enzimas indicadas. TL IM = Lipozyme TL IM (lipasa de *T. Lanuginosus* inmovilizada sobre sílica granulada); Novo = Novozym 435 (lipasa B de *C. antarctica* inmovilizada sobre resina acrílica macroporosa); Sub A = M β CD-subtilisina Carlsberg; TLN = termolisina (inmovilizada sobre celita).

A. 4. Posibles orígenes de las regioselectividades observadas.

El origen de la regioselectividad en la acilación de un carbohidrato catalizada por una enzima, hay que buscarlo fundamentalmente en el mecanismo de la reacción, en la estructura de la enzima –particularmente en la forma del centro activo-, en la estructura de los sustratos (carbohidrato y agente acilante), y en la interacción enzima-sustrato.

Transesterificaciones catalizadas por subtilisina Carlsberg

El esquema V. A4. resume la selectividad descrita en el Anexo II para la transesterificación de los oligosacáridos no reductores con laurato de vinilo empleando catálisis de subtilisina Carlsberg (coliofilizada con metil-β-ciclodextrina), y también recoge la regioselectividad observada para la misma enzima (en forma CLEC) en la reacción análoga sobre sacarosa (Polat et al., 1997).



Esquema V. A4. Selectividad observada en la transesterificación de los oligosacáridos catalizada por subtilisina Carlsberg en piridina, y en la correspondiente reacción sobre sacarosa. En ambos casos se usó laurato de vinilo como agente acilante.

El grupo de Riva ha empleado la subtilisina Carlsberg (liofilizado simple) en DMF para transesterificar rafinosa, melecitosa y estaquiosa con trifluoroetil butanoato (Riva et al., 1998). La regioselectividad que describen para rafinosa y melecitosa es

menor que la mostrada en el esquema V. A4, y análoga en el caso de estaquiosa. Para rafinosa describen una selectividad sobre la posición 1'' del 86 %, yendo el 14 % restante a la posición 6. En el caso de melecitosa el regioisómero mayoritario, acilado en posición 6', lo obtienen con una selectividad del 45 %, mucho menor que la descrita en esta memoria para la misma enzima. Estas diferencias pueden reflejar una influencia importante de la forma de preparación de la proteasa (coliofilizada con M β CD vs. liofilizado simple), en la selectividad de la transesterificación; en cualquier caso la posición preferente de acilación sí que coincide en todos los sustratos.

Comparando la selectividad observada para la sacarosa con la descrita para los oligosacáridos no reductores en el anexo II (esquema V. A4) hay una correlación perfecta en el caso de rafinosa y estaquiosa, pero difícil de racionalizar en el caso de melecitosa y 1-kestosa. Sin duda, los estudios computacionales sobre la transesterificación de la sacarosa catalizada por esta proteasa pueden aportar una orientación muy valiosa sobre el origen de la regioselectividad observada experimentalmente en la acilación de estos oligosacáridos.

El grupo de Verma (Fuentes et al., 2002) ha demostrado que los factores entrópicos son cruciales para la regioselectividad de la proteasa. La modelización de los posibles aductos del estado de transición prueba que, en el aducto correspondiente a la acilación sobre OH-1' (Fig. V. A1), la sacarosa está más expuesta al disolvente. Esta exposición le confiere al disacárido mayor movilidad, lo que se traduce en una estabilización entrópica mayor.

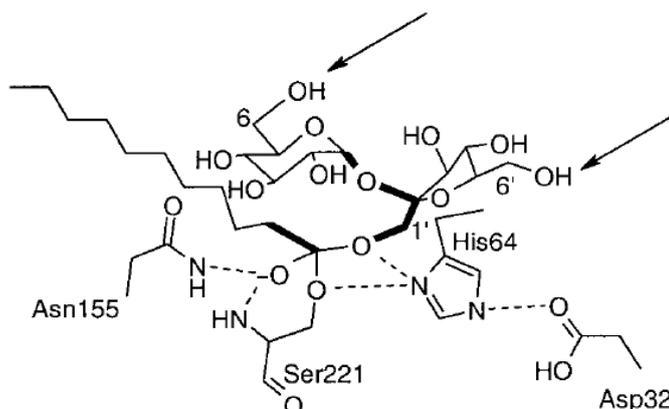


Figura V. A1. Representación esquemática del centro activo de la subtilisina (triada catalítica y agujero oxianión) y de las posiciones de acilación (OH-6, OH-6', y OH- 1') en la sacarosa. Las torsiones a través de las cuales se realizó el muestreo conformacional están resaltadas en la figura (tomado de Fuentes et al., 2002).

El mismo razonamiento explicaría los resultados obtenidos con rafinosa y estaquiosa ya que estos oligosacáridos pueden considerarse derivados de la sacarosa por glicosidación de su hidroxilo en 6. En el caso de melecitosa y 1-kestosa no se observa correlación con la sacarosa (obviamente el hidroxilo OH-1' en 1-kestosa está glicosidado y no se puede acilar). Formalmente pueden considerarse derivados de la sacarosa por glicosidación de la unidad de fructosa, lo que supone una diferencia estructural muy importante respecto a rafinosa y estaquiosa. Es probable que en ambos casos el aducto correspondiente a la acilación sobre OH-6' sea el que provoque más exposición del trisacárido al disolvente, aunque quizás las diferencias en la estabilización entrópica respecto a los otros posibles aductos, correspondientes a la acilación sobre alguno de los restantes hidroxilos primarios, no sean tan grandes como para la sacarosa, de ahí que la selectividad sea menor. En cualquier caso, se trata de una mera hipótesis que debería probarse a través de un estudio computacional análogo al señalado para sacarosa.

Los resultados que aparecen en el esquema V. A4 corroboran las observaciones del grupo de Riva (Riva et al., 1998) que apuntaban una preferencia clara de esta proteasa por los hidroxilos primarios en la unidades de fructosa de distintos oligosacáridos que contienen este monosacárido en su estructura.

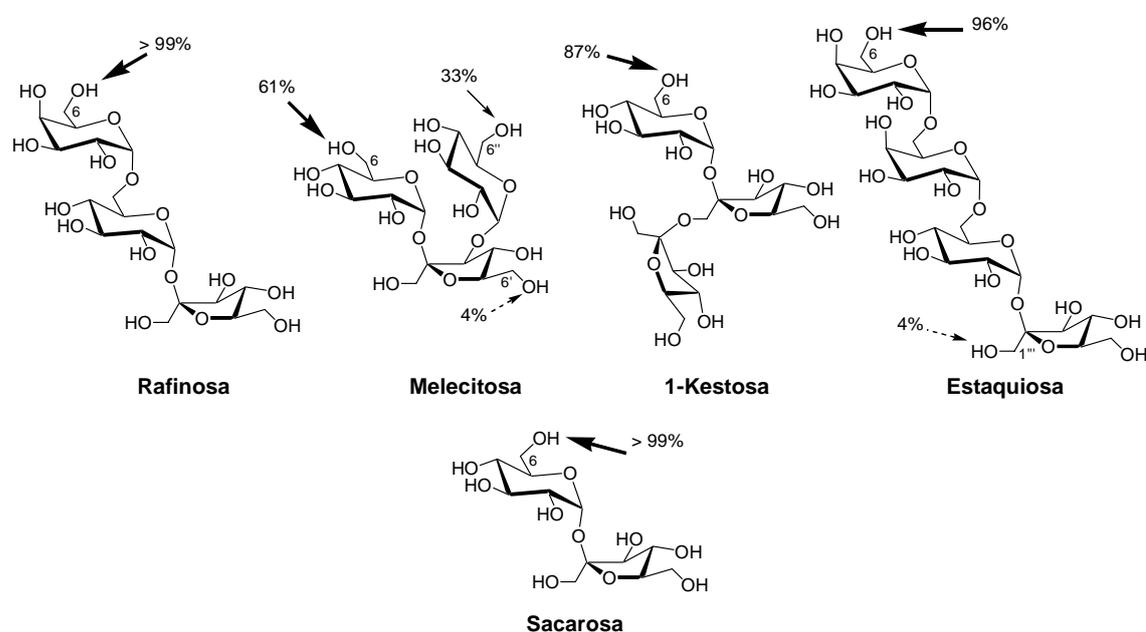
Transesterificaciones catalizadas por las lipasas de *Thermomyces lanuginosus* y de *Candida antarctica*

El esquema V. A5. resume la selectividad descrita en el Anexo II para la transesterificación de los oligosacáridos no reductores con laurato de vinilo empleando catálisis de la lipasa de *T. lanuginosus* (Lipozyme TL IM), y también recoge la regioselectividad observada para la misma enzima en la reacción análoga sobre sacarosa (Ferrer et al., 2005).

Comparando la selectividad observada para la sacarosa con la descrita para los oligosacáridos no reductores en el anexo II (esquema V. A5) hay una correlación excelente en el caso de rafinosa y estaquiosa, muy buena para 1-kestosa pero peor en el caso de melecitosa. No obstante, se puede observar un patrón de acilación bastante claro que implica una preferencia de la lipasa por el hidroxilo primario de las unidades de

glucosa terminales en los distintos oligosacáridos. La menor regioselectividad observada con melecitosa probablemente es consecuencia de la mayor simetría de este trisacárido, no obstante, la lipasa es capaz de discriminar en cierta medida entre las dos unidades de glucosa.

El esquema V. A6. resume la selectividad descrita en el Anexo II para la transesterificación de los oligosacáridos no reductores con laurato de vinilo empleando catálisis de la lipasa B de *C. antarctica* (Novozym 435), y también recoge la regioselectividad observada para la misma enzima en la reacción análoga sobre sacarosa (Ferrer et al., 1999).

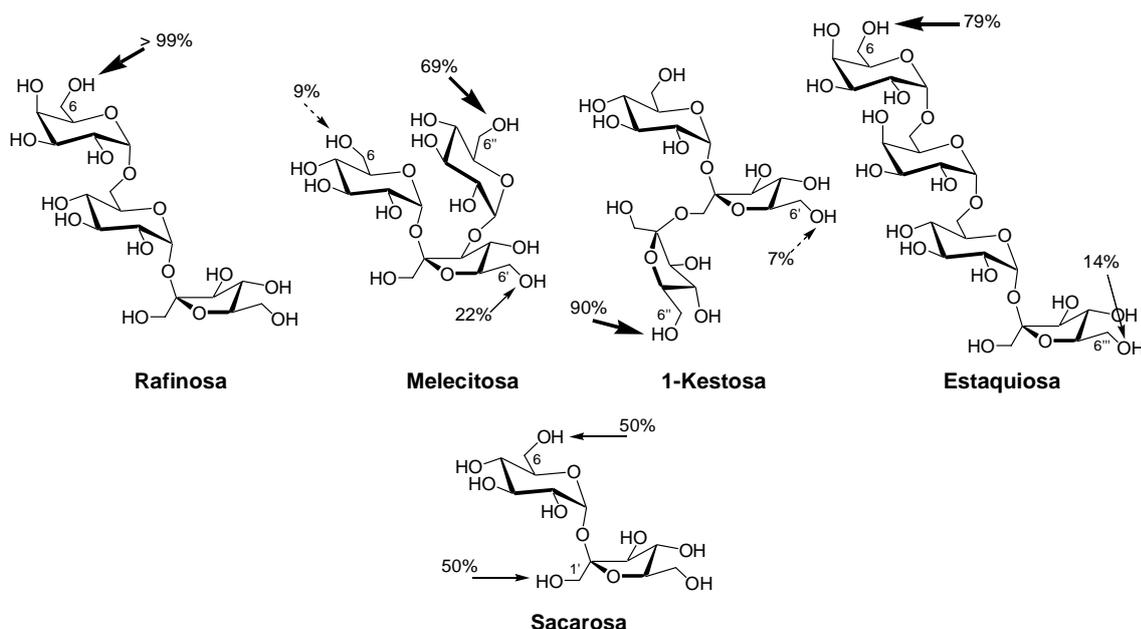


Esquema V. A5. Selectividad observada en la transesterificación de los oligosacáridos catalizada por Lipozyme TL IM (mezclas t-butanol/piridina), y en la correspondiente reacción sobre sacarosa (mezcla t-amílico/DMSO). El laurato de vinilo es el agente acilante en ambos casos.

Con esta lipasa, la comparación entre la selectividad observada para la sacarosa con la descrita para los oligosacáridos no reductores en el anexo II (esquema V. A6) no permite establecer ningún tipo de correlación. Se observa mayor selectividad sobre los oligosacáridos, en particular en el caso de rafinosa, que sobre sacarosa.

Lo más interesante de las selectividades observadas con Novozym 435 es que difieren de las encontradas para Lipozyme TL IM (a excepción del caso de rafinosa). En general, esta diferencia de selectividad no debería resultar chocante, ya que aunque

ambas enzimas son lipasas, existen diferencias estructurales importantes entre ambas que pueden explicarlo. Así, mientras la lipasa B de *C. antarctica* tiene un centro activo grande y no tiene “tapadera” anfifílica (ver apartado B 3. 3. de la introducción), en la lipasa de *T. Lanuginosus* el centro activo es menos espacioso y está ocluído por una “tapadera” de α -hélice (ver apartado B 3. 4. de la introducción).



Esquema V. A6. Selectividad observada en la transesterificación de los oligosacáridos catalizada por Novozym 435 (mezclas t-butanol/piridina), y en la correspondiente reacción sobre sacarosa (mezcla t-amílico/DMSO). El laurato de vinilo es el agente acilante en ambos casos.

De modo análogo a como se ha señalado para la catálisis con subtilisina Carlsberg los estudios computacionales sobre la transesterificación de la sacarosa con laurato de vinilo, catalizada por estas lipasas pueden ayudar a racionalizar los resultados observados con los oligosacáridos.

Nuevamente, el grupo de Verma (Fuentes et al., 2004) ha llevado a cabo a cabo estudios sobre la compleja dinámica molecular del proceso catalítico en la acilación de sacarosa con laurato de vinilo (Fig. V. A2). Los modelos de estos autores sugieren que la unión óptima del estado de transición tetraédrico requiere pequeños ajustes locales de las cadenas laterales de aminoácido en un sitio de unión preformado en la lipasa B de *C. antarctica*; por contra en la lipasa de *T. lanuginosus*, los aminoácidos que participan en la unión y en la catálisis parecen llevar a cabo una reorientación sustancial junto a

reajustes en la estructura secundaria. La disponibilidad de un centro activo grande unido a una adaptación meramente local en la lipasa B de *C. antarctica* sugiere parcialmente porqué la enzima cataliza la formación de dos regioisómeros (6-*O*-lauroilsacarosa y 6'-*O*-lauroilsacarosa) en contraste con la lipasa de *T. lanuginosus*, que tiene un centro activo más pequeño y además requiere la movilización de dominios de su estructura y por tanto conduce a la formación de sólo un regioisómero (6-*O*-lauroilsacarosa) (Fuentes et al., 2004).

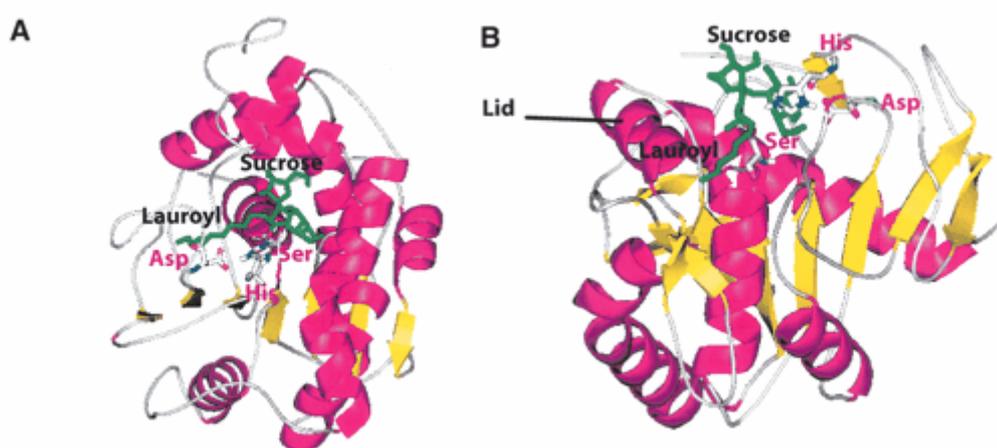


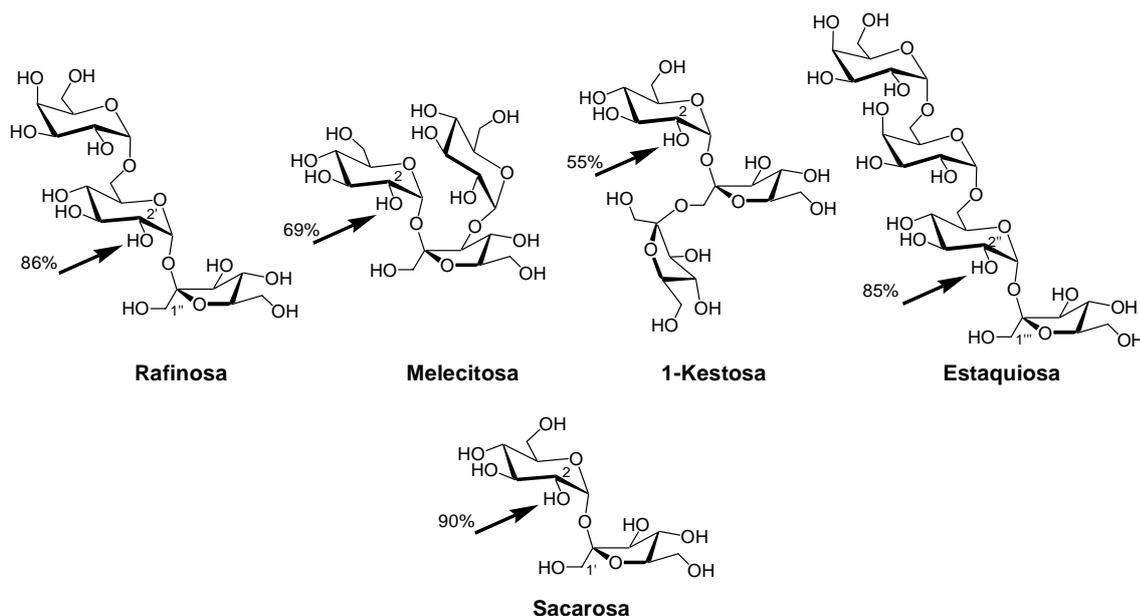
Figura V. A2. Estructura de las lipasas de *C. antarctica* (A) y *T. lanuginosus* (B). En la figura están señalados la tríada catalítica y el aducto tetraédrico empleado para el cálculo computacional (tomado de Fuentes et al., 2004)

La coincidencia en la regioselectividad observada cuando estas dos lipasas acilan la rafinosa podría tener su origen en la configuración axial del hidroxilo en 4 de la galactosa terminal, a diferencia de la configuración ecuatorial que presenta el hidroxilo en 4 de la unidad de glucosa en la sacarosa. La configuración axial podría dar lugar a algún tipo de interacción favorable (tipo puente de hidrógeno) enzima-sustrato en el aducto del estado de transición correspondiente a la acilación en el hidroxilo primario de la unidad de galactosa del trisacárido. En cualquier caso, la respuesta definitiva podría darla un estudio computacional análogo al del grupo de Verma empleando como sustratos de la acilación los distintos oligosacáridos manejados en esta memoria.

Transesterificaciones catalizadas por termolisina

El esquema V. A7. resume la selectividad descrita en el Anexo III para la transesterificación de los oligosacáridos no reductores con laurato de vinilo empleando catálisis de termolisina (inmovilizada sobre Celita), y también recoge la regioselectividad observada para la misma enzima en la reacción análoga sobre sacarosa (Pedersen et al., 2002a).

La posición de acilación preferente observada en los oligosacáridos coincide con la descrita para sacarosa (esquema V. A7). La selectividad sobre rafinosa y estaquiosa es análoga a la que se da sobre el disacárido, sin embargo es bastante menor sobre melecitosa y 1-kestosa. Nuevamente *a priori* la glicosidación de la unidad de fructosa en estos dos trisacáridos puede ser la principal diferencia estructural responsable de la menor selectividad de su acilación catalizada por termolisina.



Esquema V. A7. Selectividad observada en la transesterificación de los oligosacáridos catalizada por termolisina (inmovilizada sobre Celita) en DMSO, y en la correspondiente reacción sobre sacarosa. El laurato de vinilo es el agente acilante en ambos casos.

Como se comentó en el anexo III, la ausencia de catálisis observada sobre glucosa, trehalosa y lactosa apunta a la necesidad de ciertos requerimientos estructurales en el carbohidrato para que la termolisina puede catalizar su acilación. Dado que el Zn^{2+} del centro activo es esencial para la catálisis (Pedersen et al., 2002a), es lógico pensar que aquellos carbohidratos capaces de unirse a él de manera más fuerte, tendrán más probabilidad de ser acilados por la metaloproteasa. Una unión al catión tipo bidentada,

de manera análoga a como actúan algunos inhibidores de la termolisina (Holmes et al., 1981), podría ser la manera de interacción entre el carbohidrato y el centro metálico. De hecho, la propia sacarosa puede actuar como ligando bidentado a través de sus hidroxilos OH-2 de la unidad de glucosa y OH-1' de la unidad de fructosa, como se ha descrito para el complejo Δ -[Co(III)(phen)₂(sacarosa)]³⁺ (Fig. V. A3) (Parada et al., 2000). Por tanto la unión de la sacarosa y los oligosacáridos derivados de ella al Zn²⁺ de la termolisina podría producirse de una manera análoga.

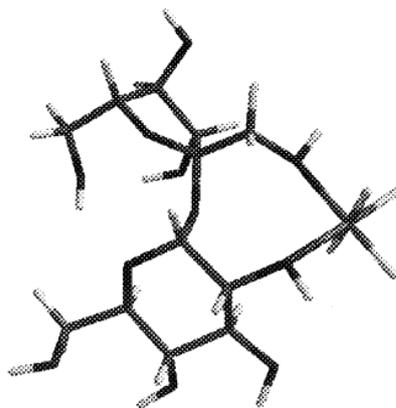


Figura V. A3. Estructura simulada del complejo Δ -[Co(III)(phen)₂(sacarosa)]³⁺, los ligandos de fenantrolina no se han representado por claridad (tomado de Parada et al., 2000).

El mecanismo que se ha propuesto para la catálisis en el anexo III, podría justificar que la posición preferente de acilación en cada oligosacárido coincida con el hidroxilo *a priori* más ácido. Cuanto mayor sea la diferencia de acidez entre éste y el resto de hidroxilos del oligosacárido, mayor será la selectividad. A partir de argumentos basados en la existencia de puentes de hidrógeno intramoleculares en estos oligosacáridos se ha concluido (anexo III) que la diferencia relativa de acidez entre el hidroxilo acilado y el resto de los presentes en cada sustrato sigue el orden sacarosa \approx rafinosa \approx estaquiosa > melecitosa > 1-kestosa, que coincide con la tendencia observada en la regioselectividad de la acilación enzimática. Un experimento sencillo consistente en la transesterificación de cada oligosacárido con laurato de vinilo en DMSO, empleando catálisis básica (Na₂HPO₄) de manera análoga a como lo ha realizado el grupo de Ballesteros para acilar sacarosa (Cruces et al., 2001), podría demostrar si, efectivamente, el hidroxilo acilado preferentemente por la termolisina es el más ácido de cada sustrato.

El principal atractivo de la acilación catalizada por la termolisina se encuentra en la regioselectividad hacia un hidroxilo secundario del sustrato a pesar de no tener los primarios protegidos. A diferencia de las lipasas y serina proteasas, el mecanismo de acción de esta metaloproteasa no involucra la formación de un intermedio acil-enzima. Es lógico pensar que cuanto mayor sea la diferencia en el modo de acción de distintas hidrolasas, mayor será la probabilidad de conseguir regioselectividades diferentes.

A. 5. Dependencia del rendimiento de la reacción con el azúcar. Influencia del tamaño de cadena.

Los rendimientos de monoéster aislado en las distintas reacciones descritas en el anexo II son, para una hidrolasa determinada, dependientes del azúcar utilizado. Generalmente, se suele achacar este comportamiento a las diferentes solubilidades de los carbohidratos en el medio de reacción. En este caso se han empleado los oligosacáridos en forma amorfa y a concentraciones en las que se hallan totalmente disueltos en el medio, por lo que se elimina el problema de la solubilidad como posible factor determinante del rendimiento.

Las diferencias estructurales entre los distintos oligosacáridos pueden ser suficientes para producir interacciones enzima-sustrato más favorables en unos casos que en otros, lo que conduciría a velocidades de conversión diferentes y por tanto a distintos rendimientos de producto aislado.

Un aspecto importante que ha contribuido a que los rendimientos de monoéster en las distintas reacciones sean altos en comparación con las acilaciones enzimáticas de carbohidratos descritas en bibliografía es la baja proporción de diéster formado en las reacciones. Este resultado es especialmente llamativo en los casos en los que la enzima cataliza la formación de más de un regioisómero.

Por ejemplo, cuando se utilizó la proteasa M β CD-Subtilisina Carlsberg en piridina, la reacción sobre melecitosa y 1-kestosa se procesó tras 48 h, después de observar trazas de diéster en la monitorización por TLC, aunque quedaba una pequeña proporción de material de partida sin reaccionar. En la fracción de monoéster aislada, el

regioisómero principal representa el 73 % en el caso de melecitosa y el 69 % en el caso de 1-kestosa. Los otros regioisómeros se producen a una velocidad mucho menor y por eso se encuentran en menor proporción. Aunque *a priori* el monoéster que se vaya formando es susceptible de ser acilado por la proteasa, parece que el trisacárido de partida sin reaccionar debe ser mejor sustrato para la enzima, pues de otra manera tras 48 h se produciría mayor cantidad de diéster. Además, se ha descrito para la transesterificación de sacarosa catalizada por la subtilisina en DMF a 45 °C, que la enzima muestra una actividad residual de sólo el 26 % tras 48 h (Carrea et al., 1989). Es probable que algo similar ocurra en piridina. Por tanto, si disminuye la actividad de la proteasa con el tiempo es lógico que disminuya la conversión tanto del material de partida como del monoéster formado, lo cual también contribuye a que se forme muy poca cantidad de diéster.

En el caso de la acilación de melecitosa con catálisis de Lipozyme TL IM en la mezcla t-butanol/piridina señalada en el anexo II, la reacción se procesó tras 72 h, después de observar trazas de diéster en el espectrómetro de masas ESI obtenido tras la inyección directa de una alícuota de la reacción, aunque quedaba material de partida sin reaccionar (fácilmente detectable por TLC). La baja proporción de diéster formado se puede justificar con argumentos análogos a los señalados anteriormente para la subtilisina. Además, se ha demostrado en la síntesis de ésteres de sacarosa, que esta forma de inmovilización de la lipasa de *T. lanuginosus* (sobre sílice granulada) es más selectiva hacia la producción de monoésteres que otras preparaciones inmovilizadas de la misma (Ferrer et al., 2002).

En el caso de la acilación de los oligosacáridos con Novozym 435, la proporción de diésteres observada por TLC fue mayor tras 72 h, curiosamente a pesar de quedar también material de partida sin reaccionar. Al ser el centro activo de la lipasa de *C. antarctica* mayor que el de la lipasa de *T. lanuginosus*, es posible que acepte mejor al monoéster como sustrato, de ahí que se forme mayor cantidad de diéster.

El efecto del tamaño de cadena sobre el rendimiento de producto aislado ha quedado patente en los resultados descritos en el anexo V. El principal factor por el que se seleccionó Lipozyme TL IM en lugar de Novozym 435 para preparar las familias de rafinosa y melecitosa esterificadas con ácidos grasos de distinta longitud está en la

anatomía del centro activo de estas dos lipasas (Fig. V. A4). Así, mientras la lipasa B de *C. antarctica* tiene una especificidad grande por ácidos grasos de cadena corta y media, y baja con ácidos grasos de cadena larga, la lipasa de *T. lanuginosus* tiene una especificidad relativamente baja por ácidos grasos de cadena corta, pero muy alta por ácidos de cadena larga (Pleiss et al., 1998).

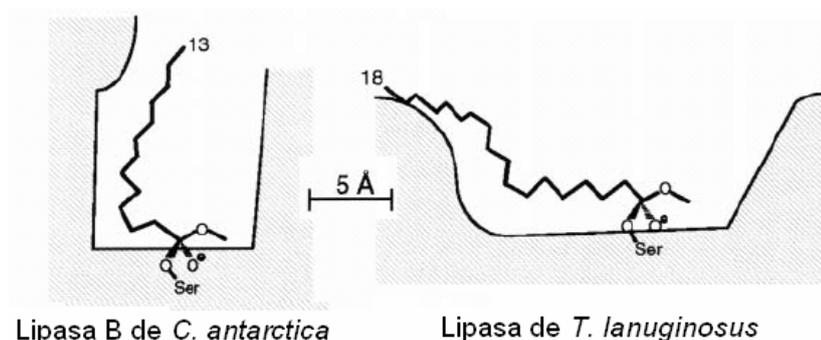


Figura V. A4. Vista lateral del centro activo las lipasas empleadas como biocatalizadores. La unidad de alcohol del sustrato (éster) no se muestra por claridad. El número indica la longitud del ácido graso más largo que puede unirse completamente en el centro activo (adaptado de Pleiss et al., 1998).

Por otra parte, es muy drástico el efecto del aumento del tamaño de la cadena del agente acilante en las transesterificaciones catalizadas por M β CD-Subtilisina Carlsberg. Como ya se señaló en el anexo V, se ha descrito un comportamiento similar para la proteasa de *Bacillus subtilis*, en la transesterificación de sacarosa con trifluoroetil ésteres de ácidos grasos (Carrea et al., 1989). Dado que la función natural de estas proteasas no es la hidrólisis de triglicéridos, no resulta chocante que su especificidad por los ácidos grasos de cadena más larga sea mucho menor que la de una lipasa.

B. Aplicaciones potenciales de los compuestos sintetizados, y de la metodología de acilación enzimática desarrollada.

B. 1. Protección selectiva de carbohidratos. Reactividades de los hidroxilos de cada oligosacárido.

La acilación enzimática de carbohidratos como estrategia de protección selectiva está ampliamente extendida (Kadereit et al., 2001). En este sentido, los resultados de la presente memoria suponen una nueva aportación a este campo.

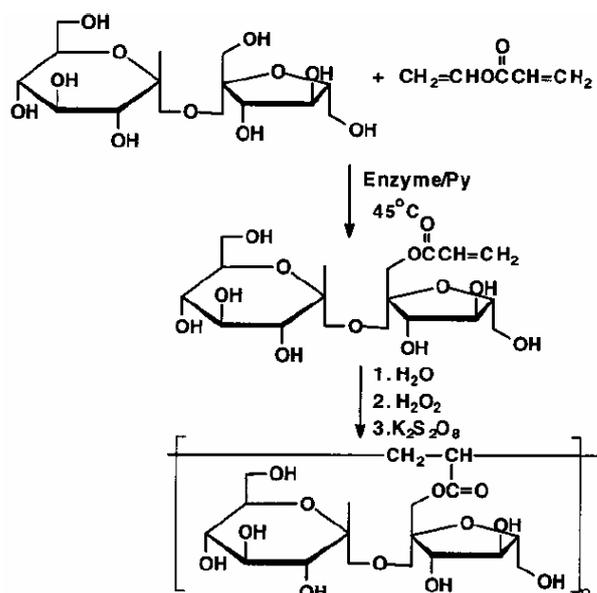
La reactividad química de los grupos hidroxilo de la sacarosa en la mayoría de las condiciones experimentales (esterificación o eterificación con electrófilos), sigue el siguiente orden: $\text{OH-6} \geq \text{OH-6}' > \text{OH-1}' > \text{OH-secundarios}$ (Descotes et al., 1999). La menor reactividad del grupo $\text{OH-1}'$ respecto a los otros dos hidroxilos primarios se suele achacar a su carácter neopentílico (Jarosz et al., 2002). En virtud de la similitud estructural de rafinosa y estaquiosa con el disacárido, se podría esperar para ellas el orden de reactividad $\text{OH-6}_{\text{galactosa}} \approx \text{OH-6}_{\text{fructosa}} > \text{OH-1}_{\text{fructosa}} > \text{OH-secundarios}$. Para la melecitosa se ha descrito el siguiente orden de reactividad en la reacción de tritilación (Tsao et al., 2003): $\text{OH-6}' > \text{OH-6} \approx \text{OH-6}'' > \text{OH-1}'$. Para la 1-kestosa habría que esperar que el OH-1 de la unidad de fructosa terminal también sea el hidroxilo primario menos reactivo de la molécula. Teniendo en cuenta estos órdenes de reactividad, se puede conseguir la protección más o menos selectiva de los hidroxilos más reactivos en estos carbohidratos si se utilizan condiciones de reacción extremas y/o reactivos especiales. Por el contrario, la acilación enzimática de los hidroxilos primarios de estos sustratos se puede llevar a cabo en condiciones suaves y además no siempre correlaciona con el orden de reactividad de los mismos, por ejemplo, la subtilisina Carlsberg acila regioselectivamente el $\text{OH-1}_{\text{fructosa}}$ en sacarosa, rafinosa y estaquiosa a pesar de ser el menos reactivo químicamente. El sutil modo de acción de las hidrolasas permite discriminar entre hidroxilos primarios de reactividad similar, algo que por vía química directa se antoja muy complicado.

Por tanto, la protección directa mediante la acilación enzimática de los oligosacáridos podría ser una metodología de interés en la síntesis de nuevos glicoconjugados a partir de estos carbohidratos.

B. 2. Preparación de monómeros polimerizables por vía radicalaria.

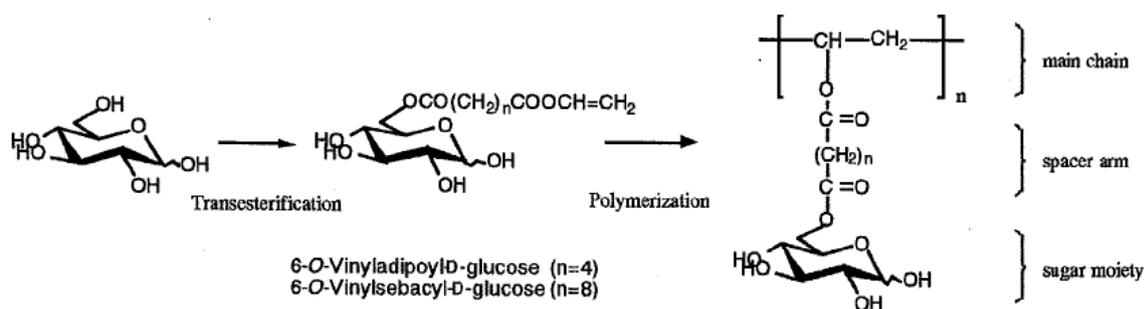
La síntesis de polímeros que contienen carbohidratos es un área de intensa investigación en el campo de la ciencia de materiales (Wang et al., 2002). Una de las aproximaciones quimioenzimáticas para la síntesis de polímeros de esta clase, consiste en la transesterificación biocatalizada de carbohidratos con vinil ésteres del ácido metacrílico, o divinil ésteres de diácidos carboxílicos como el adípico, para obtener glicomonómeros que contengan grupos funcionales etilénicos polimerizables por vía

radicalaria. El esquema V. A9 muestra esta aproximación para obtener un poliacrilato de sacarosa (Patil et al., 2001).



Esquema V. A9. Síntesis quimioenzimática de poliacrilato de sacarosa (tomado de Patil et al, 2001).

El esquema V. A10 muestra la misma metodología sobre glucosa, pero utilizando un divinil éster de sendos diácidos carboxílicos para realizar la transesterificación enzimática (Kitagawa et al., 1998).



Esquema V. A10. Síntesis quimioenzimática de polímeros derivados de glucosa (tomado de Kitagawa et al, 1998).

La metodología de acilación enzimática de oligosacáridos desarrollada en el anexo II podría extrapolarse empleando agentes acilantes tipo metacrilato, vinil adipato, etc. para preparar monómeros derivados de estos carbohidratos, polimerizables por vía radicalaria. Los polímeros obtenidos enriquecerían el repertorio de productos de esta clase, ya que hasta la fecha casi todos los polímeros descritos son derivados de monosacáridos o disacáridos (Wang et al, 2002).

B. 3. Los monoésteres de oligosacáridos como surfactantes. Posibles aplicaciones tecnológicas. Limitaciones al escalado de su síntesis.

Los resultados descritos en el anexo IV, muestran que los monoésteres de oligosacáridos con ácidos grasos de cadena larga (10 a 18 carbonos) son surfactantes hidrosolubles con alta capacidad tensioactiva. Además, sus valores de CMC se pueden modular según el tamaño de la cadena de ácido graso e incluso de una manera más fina según el regioisómero empleado. El comportamiento fisicoquímico de los nuevos compuestos es análogo al de otros surfactantes derivados de carbohidratos, compartiendo con estos otra propiedad adicional y muy importante, la biodegradabilidad.

A priori su utilización como emulgentes en alimentación por ejemplo, podría ser posible. No obstante, para esta aplicación concreta sería necesario realizar un estudio riguroso sobre la capacidad real de los distintos compuestos para estabilizar emulsiones O/W. De igual manera, habría que evaluar su capacidad para inducir la formación de espumas y estabilizarlas. Los resultados de estos estudios proporcionarían una importante información sobre la idoneidad de los mismos para su aplicación tecnológica en alimentación. Otro aspecto importante de estos compuestos está relacionado con su posible función nutricional. Dado que los oligosacáridos de partida utilizados están considerados en alimentación como azúcares funcionales (no digeribles), actuando como prebióticos, sus monoésteres con ácidos grasos serían también potenciales aditivos funcionales. La hidrólisis de estos monoésteres en el tracto intestinal por acción de lipasas liberaría al oligosacárido no digerible que sería procesado por la flora bacteriana estimulándose el crecimiento de las bifidobacterias. De este modo se podría hablar de una nueva generación de surfactantes con propiedades prebióticas.

Se ha estudiado la capacidad de los ésteres de carbohidratos para actuar como excipientes en formulaciones sólidas de fármacos poco solubles en agua. En concreto se ha comprobado que la capacidad para disolver la ciclosporina a temperatura ambiente en soluciones al 10 % de monolaurato de sacarosa y monolaurato de rafinosa (ambos como mezclas de regioisómeros) es de 16 y 13 mg/ml respectivamente (Hahn et al., 1989). Las formulaciones de estos fármacos hidrófobos son soluciones sólidas del mismo en el surfactante; tras la adición de agua se forma una auténtica solución micelar.

Probablemente se podría mejorar la solubilidad de este tipo de fármacos incluso con proporciones menores de surfactante usando derivados de ácidos grasos de cadena más larga (con una CMC menor) como los sintetizados en el anexo IV. La utilización de ésteres de sacarosa como vehículo de transporte de fármacos también se ha descrito (Vermerie et al., 1996) y podría ser otra aplicación potencial de los monoésteres de oligosacáridos preparados. La compatibilidad de los monoésteres de sacarosa con la piel, ha llevado a su aplicación en cosmética (Tanaka, 2001), siendo ésta otra posible vía de aplicación de los compuestos sintetizados en esta memoria.

Obviamente, para estas aplicaciones en alimentación, farmacia, cosmética, etc. sería necesario escalar el proceso de síntesis enzimática. Actualmente, los ésteres de sacarosa se sintetizan con catálisis básica a altas temperaturas. La baja selectividad, la costosa purificación y la formación de productos coloreados colaterales (Polat et al., 2001) ha llevado a que la atención se centre en los procesos enzimáticos, mucho más selectivos (Plou et al., 2002). La aplicación industrial de las lipasas en la síntesis de ésteres de sacarosa está limitada por su baja productividad, consecuencia fundamental de la baja solubilidad del carbohidrato en el medio orgánico de la reacción.

El grupo de Ballesteros ha estudiado en detalle los distintos parámetros que afectan la productividad en la síntesis del monopalmitato de sacarosa catalizada por Novozym 435 (Reyes-Duarte et al., 2005). Hay que destacar que, a nivel industrial, es preferible el empleo de ésteres etílicos o metílicos en lugar de los vinílicos como agentes acilantes por razones económicas. En este caso, dicho grupo obtuvo una productividad máxima de palmitato de sacarosa de 7.3 g/l en 120h en las condiciones óptimas de reacción (20% DMSO con 0.2 mol/l de sacarosa y 0.6 mol/l de palmitato de etilo o de metilo). La sacarosa inicialmente se encuentra sobresaturada dando lugar a una fina suspensión homogénea (también se describe la importancia del modo de preparación de la mezcla de reacción –Fig. II. C8 de la introducción-). Factores como el agua presente en la reacción, que provoca la hidrólisis del agente acilante, o el exceso de agente acilante, que influye en la solubilidad del disacárido en el medio, son fundamentales para obtener el mejor rendimiento de la reacción.

De las reacciones descritas en esta memoria para preparar monoésteres de oligosacáridos con ácidos grasos de cadena larga, las que producen mejor rendimiento

son las catalizadas por Lipozyme TL IM. La optimización de la productividad de estas reacciones pasaría por una parte por el empleo de los carbohidratos de partida a concentración sobresaturada en el medio a modo de fina suspensión de manera similar a como se ha descrito en el párrafo anterior para la sacarosa. Por otra parte, para abaratar costes en un proceso de escalado, habría que emplear ésteres de etilo o metilo como agentes acilantes en lugar de los ésteres vinílicos mucho más caros. Desafortunadamente, la lipasa de *T. lanuginosus* a diferencia de la lipasa B de *C. antarctica* no es capaz de aceptar ésteres de alquilo, al menos en medio orgánico de polaridad moderada (Reyes-Duarte et al., 2005). Por tanto, si en el escalado de la transesterificación sólo se pueden emplear los ésteres vinílicos, el coste final del producto será mucho mayor. Además, estos oligosacáridos son mucho más caros que la sacarosa, lo que comprometería la rentabilidad de una producción a mayor escala. A efectos de la aplicación en alimentación, farmacia, etc., surge el problema adicional de la compatibilidad de los disolventes usados (t-butanol/piridina) con la legislación. Para garantizar la aprobación del uso de estos productos en las aplicaciones mencionadas sería probablemente necesario emplear disolventes alternativos menos tóxicos que la piridina. No obstante, en la síntesis industrial de ésteres de sacarosa por vía química se emplea el DMSO, ya que usando costosos medios de purificación consiguen reducir drásticamente el residuo de DMSO en el producto final.

Otras aplicaciones prometedoras provienen de los interesantes resultados del anexo IV en procesos de purificación de proteínas de membrana. Para estas aplicaciones científicas se requieren productos de alta pureza. Además, el ejemplo de los monoésteres comerciales derivados de sacarosa de la casa Fluka es muy alentador. Estos productos se venden en pequeño formato: el monolaurato de sacarosa a un precio de 44 € - 250 mg, y el monodecanoato de sacarosa a 133 € - 250 mg, ambos como mezcla de regioisómeros. Los monoésteres de trisacáridos, al comportarse mejor que los compuestos comerciales de Fluka y ser además, en algunos casos, regiosoméricamente puros tendrían un potencial alto valor añadido. Obviamente, el primer paso es confirmar la capacidad de estos compuestos para solubilizar en condiciones no naturalizantes proteínas integrales de membrana.

C. Perspectivas.

Los resultados obtenidos a partir del trabajo desarrollado en esta memoria suponen una nueva aportación al campo de la acilación enzimática de carbohidratos. De igual modo, los monoésteres de oligosacáridos preparados expanden el repertorio de productos de esta clase, hasta ahora limitado a ésteres de monosacáridos, disacáridos y maltotriosa.

Las posibles líneas de trabajo que se abren se resumen brevemente a continuación:

a) Realizar estudios computacionales análogos a los descritos en bibliografía para la acilación de sacarosa con estas enzimas, pero empleando como sustratos los oligosacáridos empleados en la memoria. Estos estudios permitirían racionalizar la regioselectividad obtenida y poder establecer reglas predictivas sobre la regioselectividad de la acilación enzimática de carbohidratos en general y derivados (productos naturales glicosidados, glicoconjugados, etc.).

b) Buscar disolventes alternativos, menos tóxicos pero a la vez eficaces como medio para la transesterificación enzimática de estos oligosacáridos, además de optimizar la productividad de las distintas reacciones.

c) Evaluar la capacidad de los surfactantes preparados para estabilizar emulsiones O/W y espumas, comparando los resultados con los descritos para los monoésteres comerciales.

d) Confirmar la capacidad de estos compuestos para solubilizar en condiciones no naturalizantes proteínas integrales de membrana.

e) Preparar glicopolímeros mediante síntesis quimioenzimática a partir de estos oligosacáridos. De hecho se ha llevado a cabo con éxito la preparación de polímeros derivados de rafinosa mediante la transesterificación enzimática del trisacárido con el éster divinílico del ácido adípico, y posterior polimerización radicalaria del monoéster obtenido. Los resultados no se han incluido en la memoria, al estar aún pendientes de la caracterización completa de los polímeros obtenidos (peso molecular medio, polidispersidad, etc.).

Conclusiones

VI. CONCLUSIONES

1.- Se ha desarrollado nueva metodología de síntesis enzimática para preparar monoésteres de oligosacáridos con ácidos grasos de cadena larga en un solo paso y con buenos rendimientos. Las claves residen en el empleo de los carbohidratos en su forma amorfa en lugar de en su forma cristalina, del laurato de vinilo como agente acilante activado y de disolventes compatibles con las enzimas y capaces de solubilizar a los carbohidratos. En el caso de las lipasas se han utilizado mezclas t-butanol/piridina a temperaturas en torno a los 60 °C. La proteasa subtilisina Carlsberg se ha utilizado en su forma coliofilizada con M β CD, en piridina a 40 °C.

2.- Se ha obtenido complementariedad en la acilación regioselectiva de los hidroxilos primarios de los oligosacáridos utilizados como sustratos mediante la utilización de tres hidrolasas diferentes como son las lipasas de *Thermomyces lanuginosus* y *Candida antarctica* B, y la serina proteasa subtilisina Carlsberg.

3.- Se ha extendido el estudio de la acilación catalizada por la metaloproteasa termolisina a nuevos carbohidratos. Los resultados obtenidos sugieren la necesidad de un motivo estructural particular en el azúcar para que la catálisis tenga lugar. En los distintos oligosacáridos derivados de sacarosa acilados, se observa que esta enzima esterifica preferentemente el hidroxilo 2-OH de la unidad de glucosa enlazada 1→2 a la unidad de fructosa, lo que supone la primera descripción de una acilación enzimática selectiva sobre un hidroxilo secundario en estos oligosacáridos.

4.- Se ha desarrollado un método nuevo para el análisis de la distribución de regioisómeros en monoésteres de carbohidratos con ácidos grasos de cadena larga basado en LC/ESI/MS. Este método es más sensible y preciso que la metodología tradicional basada en el uso de espectroscopía de RMN de ¹³C.

5.- Se han sintetizado familias homólogas de monoésteres de rafinosa y melecitosa con ácidos grasos de distinto tamaño de cadena. Se ha puesto de manifiesto el mejor comportamiento de la lipasa de *T. lanuginosus* sobre subtilisina Carlsberg al aumentar el tamaño de cadena del agente acilante.

6.- Se han estudiado distintas propiedades fisicoquímicas relacionadas con la naturaleza surfactante de los compuestos de estas familias homólogas empleando diversas técnicas experimentales. En comparación con los ésteres de sacarosa comerciales, los derivados de ácidos grasos de cadena más larga sintetizados presentan las ventajas de su mayor solubilidad en agua y una concentración micelar crítica menor.

7.- Se han realizado ensayos de solubilización de la glicoproteína P de *Leishmania tropica* con los ésteres de oligosacáridos preparados, donde se observa que pueden ser detergentes muy útiles en la solubilización de proteínas integrales de membrana en condiciones no desnaturalizantes, con resultados superiores a los de otros detergentes comerciales.

8.- Se han llevado a cabo ensayos de toxicidad de los compuestos preparados en esta memoria frente a una batería de células tumorales, protozoos parásitos, levaduras y bacterias. Además, se ha estudiado la capacidad de los compuestos para revertir el fenotipo de multirresistencia a fármacos (MDR) conferido por la sobreexpresión de transportadores ABC. Los resultados obtenidos muestran que, en general, el comportamiento de todos los compuestos sintetizados es muy similar al monolaurato de sacarosa comercial, observándose toxicidad a las mayores concentraciones ensayadas, por encima de la cmc, lo que apunta a un mecanismo de acción inespecífico basado en la capacidad que como detergentes tienen estos compuestos para desintegrar la membrana plasmática y provocar la lisis celular.

Bibliografía

VII. BIBLIOGRAFÍA

Abran D, Boucher F, Hamakana T, Hiraki K, Kito Y, Koyama K, Leblanc LM, Machida H, Munger G, Seidou M, Tessier M. (1989) On some physicochemical properties of sucrose fatty acid esters and the stability they confer to membrane proteins. *J. Colloid Interf. Sci.* 128: 230-236.

Ahern TJ, Klibanov AM. (1987) Analysis of processes causing thermal inactivation of enzymes in non aqueous media. *Methods Biochem. Anal.* 33: 91-127.

Ahsan F, Arnold JJ, Meezan E, Pillion DJ. (2003) Sucrose cocoate, a component of cosmetic preparations enhances nasal and ocular peptide absorption. *Int. J. Pharm.* 251: 195-203.

Allen DK, Tao BY. (1999) Carbohydrate-alkyl ester derivatives as biosurfactants. *J. Surf. Det.* 2: 383-390.

Altreuter DH, Dordick JS, Clarck DS. (2002) Nonaqueous biocatalytic synthesis of new cytotoxic doxorubicin derivatives: exploiting unexpected differences in the regioselectivity of salt-activated and solubilized subtilisin. *J. Am. Chem. Soc.* 124: 1871-1876.

Anderson EM, Larsson KM, Kirk O. (1998) One biocatalyst-many applications: the use of *Candida antarctica* B-lipase in organic synthesis. *Biocatal. Biotransform.* 16: 181-204.

Anderson RA, Polack AE. (1968) The stability of sucrose monolaurate: rate of formation of lauric acid. *J. Pharm. Pharmacol.* 20: 249-254.

Arcos JA, Bernabé M, Otero C. (1998) Quantitative enzymatic production of 6-O-acylglucose esters. *Biotechnol. Bioeng.* 57: 505-509.

Arcos JA, Hill CH, Otero C. (2001) Kinetics of the lipase-catalyzed synthesis of glucose esters in acetone. *Biotechnol. Bioeng.* 73: 104-110.

Arima K, W-H Liu, Beppu T. (1972) Studies on the lipase of thermophilic fungus *Humicola lanuginosa*. *Agric. Biol. Chem.* 36: 893-895.

Ashcroft AE. (1997) *Ionization methods in organic mass spectrometry*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.

Assileniau C, Assileniau J. (1978) Trehalose containing glycolipids. *Prog. Chem. Fats Other Lipids.* 16: 59-99.

Augé J, Lubin-Germain N. (2000) Glycosylhydrazides, a new class of sugar

surfactants. Preparation and amphiphilic properties of 1-glycosyl-2-acylhydrazines. *J. Carbohydr. Chem.* 19: 379-392.

Ayala-Bravo HA, Quintanar-Guerrero D, Naik A, Kalia YN, Cornejo-Bravo JM, Ganem-Quintanar A. (2003) Effects of sucrose oleate and sucrose laureate on *in vivo* human stratum corneum permeability. *Pharm. Res.* 20: 1267-1273.

Baker IJA, Furlong DN, Grieser F, Drummond CJ. (2000a) Sugar fatty acid ester surfactants: base-catalyzed hydrolysis. *J. Surf. Det.* 3: 1-12.

Baker IJA, Matthews B, Soares H, Krodkiewska I, Furlong DN, Grieser F, Drummond CJ. (2000b) Sugar fatty acid ester surfactants: structure and ultimate aerobic biodegradability. *J. Surf. Det.* 3: 1-12.

Baker IJA, Willing I, Furlong DN, Grieser F, Drummond CJ. (2000c) Sugar fatty acid ester surfactants: biodegradation pathways. *J. Surf. Det.* 3: 1-12.

Barett AJ. (1994) Proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases. *Methods Enzymol.* 244: 1-15.

Barett AJ. (1995) Proteolytic enzymes: aspartic and metallopeptidases. *Methods Enzymol.* 248: 183.

Bedell BA, Mozhaev VV, Clark DS, Dordick JS. (1998) Testing for diffusion limitations in salt-activated enzyme catalysts operating in organic solvents. *Biotechnol. Bioeng.* 58: 654-657.

Beisson F, Tiss A, Rivière C, Verger R. (2000) Methods for lipase detection and assay: a critical review. *Eur J. Lipid Sci. Technol.* 102: 133-153

Bell G, Halling, PJ, Moore, BD, Partridge J, Ress DG. (1995) Biocatalyst behaviour in low-water systems. *Trends Biotechnol.* 13: 468-473.

Berne BJ, Pecora R. (1990) *Dynamic light scattering: with applications to chemistry, biology and physics.* Robert E. Krieger Publishing Company. Malabar, Florida.

Bianchi D, Cesti P, Battistel E. (1988) Anhydrides as acylating agents in lipase-catalyzed stereoselective esterification of racemic alcohols. *J. Org. Chem.* 53: 5531-5534.

Björkling F, Godtfredsen SE, Kirk O. (1991) The future impact of industrial lipases. *Trends Biotechnol.* 9: 360-363.

Bóday V, Peredi R, Bálint J, Egri G, Novák L, Szakacs G, Poope L. (2003) Novel hydrolases from thermophilic filamentous fungi for enantiomerically and enantiotopically selective biotransformations. *Adv. Synth. Catal.* 345: 811-818.

Boel E, Christensen T, Woldike H (Novo Nordisk AS). (1996) US-A 5536661

- Bolzinger-Thevenin MA, Grossiord JL, Poelman MC.** (1999) Characterization of a sucrose ester microemulsion by freeze fracture electron micrograph and small angle neutron scattering experiments. *Langmuir* 15: 2307-2315.
- Bonrath W, Karge R, Netscher T.** (2002) Lipase-catalyzed transformations as key-steps in the large-scale preparation of vitamins. *J. Mol. Catal., B: Enzym.* 19-20: 67-72.
- Bordusa F.** (2002) Proteases in organic synthesis. *Chem. Rev.* 102: 4817-4867.
- Bornscheuer UT, Kazlauskas RJ.** (2005) *Hydrolases in organic synthesis: regio- and stereoselective biotransformations.* Wiley.
- Bornscheuer UT, Pohl M.** (2001) Improved biocatalysts by directed evolution and rational design. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5: 137-143.
- Boros C, Katz B, Mitchell S, Pearce C, Swinbank K, Taylor D.** (2002) Emmyguyacins A y B: unusual glycolipids from a sterile fungus species that inhibit the low-pH conformational change of hemmagglutinin A during replication of influenza virus. *J. Nat. Prod.* 65: 108-114.
- Bottle S, Jenkins ID.** (1984) Improved synthesis of cord factor analogues. *Chem. Commun.* 385.
- Bourhim A, Czernecki S, Krausz P.** (1993) Selective monoesterification of unprotected mono and disaccharides. *J. Carbohydr. Chem.* 12: 853-863.
- Bovara R, Carrea G, Gioacchini AM, Riva S, Secundo F.** (1997) Activity, stability, and conformation of methoxypoly(ethylene glycol)-subtilisin at different concentrations of water in dioxane. *Biotechnol. Bioeng.* 54: 50-57.
- Bovara R, Ottolina G, Riva S.** (1993) Water activity does not influence the enantioselectivity of lipase PS and lipoprotein lipase in organic solvents. *Biotechnol. Lett.* 15: 169-174.
- Bowie JU.** (2001) Stabilizing membrane proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11: 397-402.
- Brzozowski AM, Savage H, Verma CS, Turkenburg JP, Lawson DM, Svendsen A, Patkar S.** (2000) Structural origins of the interfacial activation in *Thermomyces (Humicola) lanuginosa* lipase. *Biochemistry.* 39: 15071-15082.
- Cao L.** (2005) Immobilised enzymes; science or art?. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 9: 217-226.
- Carrea G, Ottolina G, Riva S.** (1995) Role of solvents in the control of enzyme selectivity in organic media. *Trends Biotechnol.* 13: 63-70.
- Carrea G, Riva S, Secundo F.** (1989) Enzymatic synthesis of various 1'-O-sucrose

and 1'-*O*-fructose esters. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I.* 1057-1061.

Carrea G, Riva S. (2000) Properties and synthetic applications of enzymes in organic solvents. *Angew. Chem. Int. Ed.* 39: 2226-2254.

Cech ND, Enke CG. (2001) Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. *Mass Spectrom. Rev.* 20: 362-387.

Chauvin C, Baczko K, Plusquellec D. (1993) New highly regioselective reaction of unprotected sucrose. Synthesis of 2-*O*-acylsucroses and 2-*O*-(*N*-alkylcarbamoyl)sucroses. *J. Org. Chem.* 58: 2291-2295.

Chiquero MJ, Perez-Victoria JM, O'Valle F, Gonzalez-Ros JM, del Moral RG, Ferragut JA, Castanys S, Gamarro F. (1998) Altered drug membrane permeability in a multidrug-resistant *Leishmania tropica* line. *Biochem. Pharmacol.* 55: 131-139.

Cho H-Y, Tsuchido T, Ono H, Takano M. (1990) Cell death of *Bacillus subtilis* caused by surfactants at low concentrations results from induced cell autolysis. *J. Ferm. Bioeng.* 70: 11-14.

Chow J. (2002) Probiotics and prebiotics: A brief overview. *J Ren Nutr.* 12: 78-86.

Christofides JC, Davies DB. (1985a) Cooperative and competitive hydrogen bonding in sucrose determined by SIMPLE ¹H NMR spectroscopy. *Chem. Commun.* 1533-1534.

Christofides JC, Davies DB. (1985b) SIMPLE ¹H NMR observation of cooperative hydrogen bonding in *O*-3'-sucrose derivatives. *Magn. Reson. Chem.* 23: 582-584

Christofides JC, Davies DB. (1986) Intramolecular hydrogen bonding in 1'-sucrose derivatives determined by SIMPLE ¹H NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 108: 5738-5743.

Clapés P, Torres JL, Adlercreutz P. (1995) Enzymatic peptide synthesis in low water content systems: Preparative enzymatic synthesis of [Leu]- and [Met]-enkephalin derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* 3: 245-255.

Claridge TDW. (1999) *High-Resolution NMR techniques in organic chemistry.* Pergamon. Oxford, UK.

Clayton W. (1943) *Theory of emulsions.* McGraw-Hill, New York.

Conley AJ, Kabara JJ. (1973) Antimicrobial action of esters of polyhydric alcohols. *Antimicrob. Agents Chemother.* 4: 501-506.

Coppola L, Gordano A, Procopio A, Sindona G. (2001) Phase equilibria and physical-chemical properties of sugar-based surfactants in aqueous solutions. *Colloid Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 196: 175-187.

- Croft SL, Seifert K, Duchene M.** (2002) Antiprotozoal activities of phospholipids analogues. *Mol. Biochem. Parasitol.* 126: 165-172.
- Cruces MA, Plou FJ, Ferrer M, Bernabé M, Ballesteros A.** (2001) Improved synthesis of sucrose fatty acid monoesters. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 78: 541-546.
- Dabulis K, Klibanov AM.** (1993) Dramatic enhancement of enzymatic activity in organic solvents by lyoprotectants. *Biotechnol. Bioeng.* 41: 566-571.
- Danieli B, Lusisetti M, Steurer S, Michelitsch A, Likussar W, Riva S, Reiner J, Schubert-Zsilavec M.** (1999) Application of lipase-catalyzed regioselective esterification in the preparation of digitonin derivatives. *J. Nat. Prod.* 62: 670-673.
- Davies DB, Christofides JC.** (1987) Comparison of intramolecular hydrogen-bonding conformations of sucrose-containing oligosaccharides in solution and the solid state. *Carbohydr. Res.* 163: 269-274.
- de Hoffman E, Stroobant V.** (2001) *Mass spectrometry: principles and applications.* Second edition. John Wiley & Sons.
- de Koster CG, Pajarron AM, Heerma W, Haverkamp J.** (1993) Fast atom bombardment mass spectrometry of sucrose monocaprate and sucrose monolaurate. *Biol. Mass Spec.* 22: 277-284.
- De Martin L, Ebert C, Gardossi L, Linda P.** (2001) High isolated yields in thermolysin-catalysed synthesis of *Z*-**L**-aspartyl-**L**-phenylalanine methyl ester in toluene at controlled water activity. *Tetrahedron Assymetry* 42: 3395-3397.
- Degn P, Pedersen LH, Duus JO, Zimmermann W.** (1999) Lipase-catalyzed synthesis of glucose fatty acid esters in *tert*-butanol. *Biotechnol Lett.* 21: 275-280.
- Degn P, Zimmermann W.** (2001) Optimization of carbohydrate fatty acid ester synthesis in organic media by a lipase from *Candida antarctica*. *Biotechnol. Bioeng.* 74: 483-491.
- Dembitsky VM.** (2004) Astonishing diversity of natural surfactants: 1. Glycosides of fatty acids and alcohols.
- Derewenda U, Swenson L, Green R, Wei Y, Dodson GG, Yamaguchi S, Haas MJ, Derewenda ZS.** (1994). An unusual buried polar cluster in a family of fungal lipases. *Nat. Struct. Biol.* 1: 36-47.
- Desai JD, Banat IM.** (1997) Microbial production of surfactants and their commercial applications. *Microbiol. Mol. Rev.* 61: 47-64.
- Desai UR, Klibanov AM.** (1995) Assessing the structural integrity of a lyophilized protein in organic solvents. *J. Am. Chem. Soc.* 117: 3940-3945

- Descotes G, Gagnaire J, Bouchu A, Thevenet S, Gyry-Panaud N, Salanski P, Belniak S, Wernicke A, Porwanski S, Queneau Y.** (1999) Preparations of esters, ethers and acetals from unprotected sucrose. *Polish J. Chem.* 73: 1069-1077.
- Devulapalle KS, Gomez de Segura A, Ferre M, Alcalde M, Mooser G, Plou FJ.** (2004) Effect of carbohydrate fatty acid esters on *Streptococcus sobrinus* and glucosyltransferase activity. *Carbohydr. Res.* 339: 1029-1034.
- Domínguez A, Fernández A, González N, Iglesias E, Montenegro L.** (1997) Determination of critical micelle concentration of some surfactants by three techniques. *J. Chem. Educ.* 74: 1227-1231.
- Domon B, Costello CE.** (1988) A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. *Glycoconjugate J.* 5: 397-409.
- Dong M, Penin F, Baggetto LG.** (1996) Efficient purification and reconstitution of P-glycoprotein for functional and structural studies. *J. Biol. Chem.* 271: 28875-28883.
- Drummond CJ, Wells D.** (1998) Nonionic lactose and lactitol based surfactants: comparison of some physico-chemical properties. *Colloid Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 141: 131-142.
- Dudeja PK, Anderson KM, Harris JS, Buckingham L, Coon JS.** (1995) Reversal of multidrug-resistance phenotype by surfactants: relationship to membrane lipid fluidity. *Arch. Biochem. Biophys.* 319: 309-315.
- Ebert C, Gardosi L, Linda P, Vesnaver R, Bosco M.** (1996) Influence of organic solvents on enzyme chemoselectivity and their role in enzyme-substrate interaction. *Tetrahedron* 52: 4867-4876.
- Endo S.** (1962) Studies on protease produced by thermophilic bacteria. *J. Ferment. Technol.* 40: 346-353.
- Everton-Warburton KM, Ghisalberti EL.** (2001) Isolation and structural identification of a germination inhibitor in fire-recruiters from the California chaparral. *J. Chem. Ecol.* 27: 371-382.
- Faber K.** (2004) *Biotransformations in Organic Chemistry.* Springer.
- Fang C-M, Wong C-H.** (1994) Enzymes in organic synthesis: alteration of reversible reactions to irreversible processes. *Synlett* 6: 393-40210.
- Fastrez J, Fersth AR.** (1973) Demonstration of the acyl-enzyme mechanism for the hydrolysis of peptides and anilides by chymotrypsin. *Biochemistry.* 12: 2025-2034.
- Feder J, Garrett LR, Wildi BS.** (1971) Studies on the role of calcium in thermolysin.

Biochemistry 10: 4552-4555.

Ferreira L, Ramos MA, Gil NH, Dordick JS. (2002) Exquisite regioselectivity and increased tranesterification activity of an immobilized *Bacillus subtilis* protease. *Biotechnol. Prog.* 18: 986-993.

Ferrer M, Cruces MA, Bernabé M, Ballesteros A, Plou FJ. (1999) Lipase-catalyzed regioselective acylation of sucrose in two-solvent mixtures. *Biotechnol. Bioeng.* 65: 10-16.

Ferrer M, Cruces MA, Plou FJ, Bernabé M, Ballesteros A. (2000) A simple procedure for the regioselective synthesis of fatty acid esters of maltose, leucrose, maltotriose and *n*-dodecyl maltosides. *Tetrahedron* 56: 4053-4061.

Ferrer M, Comelles F, Plou FJ, Cruces MA, Fuentes G, Parra JL, Ballesteros A. (2002a) Comparative surface activities of di- and trisaccharide fatty acid esters. *Langmuir* 18: 667-673.

Ferrer M, Plou FJ, Fuentes G, Cruces MA, Andersen L, Kira O, Christensen M, Ballesteros A. (2002b) Effect of the immobilization method of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on sucrose acylation. *Biocatal. Biotransform.* 20: 63-71.

Ferrer M, Pérez G, Plou FJ, Castell JV, Ballesteros A. (2005a) Antitumor activity of fatty acid maltotriose esters obtained by enzymatic synthesis. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 42: 35-39.

Ferrer M, Soliveri J, Plou FJ, López-Cortés N, Reyes-Duarte D, Christensen M, Copa-Patiño JL, Ballesteros A. (2005b) Synthesis of sugar esters in solvent mixtures by lipases from *Thermomyces lanuginosus* and *Candida antarctica* B, and their antimicrobial properties. *Enzyme Microb. Technol.* 36: 391-398.

Ferro V, Meldal M, Bock K. (1994) Synthesis of 2'- and 2''-*O*-acylated maltotriosides as potential fluorescence-quenched substrates for α -amylase. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* 2169-2176.

Fitzpatrick PA, Klivanov AM. (1991) How can the solvent affect enzyme enantioselectivity? *J. Am. Chem. Soc.* 113: 3166-3171.

Fitzpatrick PA, Steinmetz AU, Ringe D, Klivanov AM. (1993) Enzyme crystal structure in a neat organic solvent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 8653-8657.

Fuentes G, Cruces MA, Plou FJ, Ballesteros A, Verma CS. (2002) Computational studies of subtilisin-catalyzed tranesterification of sucrose: importance of entropic effects. *ChemBioChem* 9: 907-910.

Fuentes G, Ballesteros A, Verma CS. (2004) Specificity in lipases: A computational

study of transesterification of sucrose. *Protein Sci.* 13: 3092-3103.

Garavito RM, Ferguson-Miller S. (2001) Detergents as tools in membrane biochemistry. *J. Biol. Chem.* 276: 32403-32406.

Garofalakis G, Murray BS, Sarney DB. (2000) Surface activity and critical aggregation concentration of pure sugar esters with different sugar headgroups. *J. Colloid Interf. Sci.* 229: 391-398.

Garti N, Clement V, Leser M, Aserin A, Fanun M. (1999) Sucrose ester microemulsions. *J. Mol. Liquids* 80: 253-296.

Garti N, Aserin A, Fanun M. (2000) Non-ionic sucrose ester microemulsions for food applications. Part 1. Water solubilization. *Colloid Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 164: 27-38.

Glatter O, Orthaber D, Stradner a, Scherf G, Fanun M, Garti N, Clément V, Leser ME. (2001) Sugar-ester nonionic microemulsion: structural characterization. *J. Colloid Interf. Sci.* 241: 215-225.

Grefe L, Bessueille L, Bulone V, Brumer H. (2005) Synthesis, preliminary characterization, and application of novel surfactants from highly branched xyloglucan oligosaccharides. *Glycobiology.* 15: 437-445.

Griebenow K, Klibanov AM. (1995) Lyophilization-induced reversible changes in the secondary structure of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 10969-10976.

Griebenow K, Laureano YD, Santos AM, Montañez-Clemente I, Rodríguez L, Vidal M, Barletta G. (1999) Improved enzyme activity and enantioselectivity in organic solvents by methyl- β -cyclodextrine. *J. Am. Chem. Soc.* 121: 8157-8163.

Griebenow K, Vidal M, Baez C, Santos AM, Barletta G. (2001) Native-like enzyme properties are important for optimum activity in neat organic solvents. *J. Am. Chem. Soc.* 123: 5380-5381.

Griffin WC. (1949) Classification of surface-active agents by "HLB". *J. Soc. Cosmet. Chem.* 1: 311-326.

Griffin WC. (1954) Calculation of HLB values of non-ionic surfactants. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 5: 259-267.

Gruda I, Milette D, Brother M, Kobayashi GS, Medoff G, Brajtburg J. (1991) Structure-activity study of inhibition of Amphotericin B (Fungizone) binding to sterols, toxicity to cells, and lethality to mice by esters of sucrose. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 24-28.

Gustavsson MT, Persson PV, Iversen T, Martinelle M, Hult K, Teeri TT, Brumer

- H.** (2005) Modification of cellulose fiber surfaces by use of a lipase and xyloglucan endotransglycosylase. *Biomacromolecules*. 6: 196-203.
- Haase B, Machmuller G, Scheneider MP.** (1998) *Schriftner. Nachwachsende Rohst.* 10: 218-224.
- Hahn L, Sucker H.** (1989) Solid surfactant solutions of active ingredients in sugar esters. *Pharm. Res.* 6: 958-960.
- Haines AH.** (1976) Relative reactivities of hydroxyl groups in carbohydrates *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 33: 11-109.
- Haines AH.** (1981) The selective removal of protecting groups in carbohydrate chemistry *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 39: 13-70.
- Hamada H, Tsuruo T.** (1988) Purification of the 170- to 180-kilodalton membrane glycoprotein associated with multidrug resistance. *J. Biol. Chem.* 263: 1454-1458.
- Hanferburg D, Hommel R, Claus R, Kleber H-P.** (1986) Extracellular microbial lipids as biosurfactants. *Adv. Biochem Eng/Biotechnol.* 33: 53-93.
- Hansen FK.** (1993) Surface tension by image analysis: Fast and automatic measurements of pendant and sessile drops and bubbles. *J. Coll. Int. Sci.* 160: 209-217.
- Hathcox AK, Beuchat LR.** (1996) Inhibitory effects of surose fatty acid esters, alone and in combination with ethylenediaminetetraacetic acid and other organic acids, on viability of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiol.* 13: 213-225.
- Hay R, Park J-G, Gadzar A.** (1994) *Atlas of human tumor cell lines.* Academic Press. Elsevier. Amsterdam.
- Hayes ML.** (1984) The effects of fatty acid and their monoesters on the metabolic activity of dental plaque. *J. Dent. Res.* 63: 2-5.
- Hernick M, Fierke CA.** (2005) Zinc hydrolases: the mechanisms of zinc-dependent deacetylases. *Arch. Biochem. Biophys.* 433: 71-84.
- Hill K, Rhode O.** (1999) Sugar-based surfactants for consumer products and technical applications. *Fett/Lipid.* 101: 25-33.
- Holmberg K.** (2001) Natural surfactants. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 6: 148-159.
- Holmes MA, Matthews BW.** (1981) Binding of hydroxamic acid inhibitors to crystalline thermolysin suggests a pentacoordinate zinc intermediate in catalysis. *Biochemistry* 20: 6912-6920.
- Holmes MA, Matthews BW.** (1982) Structure of thermolysin refined at 1.6 Å

resolution. *J. Mol. Biol.* 160: 623-639.

Houdier S, Pérez S. (1995) Assessing sucrose hydroxyl acidities through semiempirical calculations. *J. Carbohydr. Chem.* 14: 1117-1132.

Hsu W-T, Clark DS. (2001) Variations in the enantioselectivity of salt-activated subtilisin induced by lyophilization. *Biotechnol. Bioeng.* 73: 231-237.

Hudson CS, Sherwood SF. (1920) The occurrence of melezitose in honey. *J. Am. Chem. Soc.* 42: 116-125.

Hutcheon GA, Halling PJ, Moore BD. (1997) Measurement and control of hydration in nonaqueous biocatalysis. *Methods Enzymol.* 286: 465-473.

Ikeda I, Klibanov AM. (1993) Lipase-catalyzed acylation of sugars solubilized in hydrophobic solvents by complexation. *Biotechnol. Bioeng.* 42: 788-791.

Illanes A. (1999) Stability of biocatalysts. *Electronic J. Biotechnol.* 2 (1): 7-15.

Israelachvili JN, Mitchell DJ, Nihman BW. (1976) Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2* 72: 1525-1568.

Ivanova IA, Turakhozaev MT, Shakirov TT. (1985) Isolation of raffinose from cottonseed meal. *Chem. Nat. Comp.* 20: 657-660.

Ivanova IA, Turakhozaev MT, Mirkina RA, Shakirov TT. (1987) Isolation of raffinose from cottonseed meal II. Utilization of product wastes. *Chem. Nat. Comp.* 22: 389-391.

Iwami Y, Schatele CF, Yamada T. (1995) Effect of sucrose monolaurate on acid production, levels of glycolytic intermediates, and enzyme activities of *Streptococcus mutants* NCTC 10449. *J. Dent. Res.* 74: 1613-1617.

Jääkeläinen S, Verma CS, Hubbard RE, Linko P, Caves LSD. (1998) Conformational change in the activation of lipase: an analysis in terms of low-frequency normal modes. *Protein Sci.* 7: 1359-1367.

Jaeger KE, Reetz TM. (1998) Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol.* 16: 396-403.

Jarosz S, Mach M. (2002) Regio- and stereoselective transformations of sucrose at the terminal positions. *Eur. J. Org. Chem.* 769-780.

Jeffrey GA, Huang D-B (1990) The hydrogen bonding in the crystal structure of raffinose pentahydrate. *Carbohydr. Res.* 206: 173

Jones JB, Holland H. (1997) *Biocatalysis*. Synopsis Scientific System. Leeds, UK.

Jones JB. (1980) en: Dunhill P, Wiseman A, Blakeborough N (eds) *Enzymic and non-*

- enzymic catalysis*, Horwood/Wiley, New York, p. 54.
- Kadereit D, Waldmann H.** (2001) Enzymatic protecting group techniques. *Chem. Rev.* 101: 3367-3396.
- Karrer R, Herberg H.** (1992) Analysis of sucrose fatty acid esters by high temperature gas chromatography. *J. High Resol. Chromatogr.* 15: 585-589.
- Kato A, Ando K, Suzuki S, Tamura G, Arima K.** (1969) Antitumor activity of monoglycerides and other esters of fatty acids. *J. Antibiotics* 22: 83-84.
- Kato A, Arima K.** (1971) Inhibitory effect of sucrose ester of lauric acid on the growth of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 42: 596-601.
- Kato S, Kobayashi H, Watanabe T.** (1987) Antimicrobial action of sucrose monolaurate on *Staphylococcus aureus*. *J. Food Hyg. Soc. Japan* 28: 261-266.
- Kawaguchi T, Hamanaka T, Mitsui T.** (1983) X-ray structural studies of some non-ionic detergent micelles. *J. Colloid Interf. Sci.* 96: 437-453.
- Kazlauskas RJ, Weissfloch ANE, Rappaport AT, L. Cuccia LA.** (1991) A rule to predict which enantiomer of a secondary alcohol reacts faster in reactions catalyzed by cholesterol esterase, lipase from *Pseudomonas cepacia*, and lipase from *Candida rugosa*. *J. Org. Chem.* 56: 2656-2665.
- Khmelnitsky YL, Budde C, Arnold JM, Usyatinsky A, Clark DS, Dordick JS.** (1997) Synthesis of water-soluble paclitaxel derivatives by enzymatic acylation. *J. Am. Chem. Soc.* 119: 11554-11555.
- Khmelnitsky YL, Welch SH, Clark DS, Dordick JS.** (1994) Salts dramatically enhance activity of enzymes suspended in organic solvents. *J. Am. Chem. Soc.* 116, 2647-2648.
- Kim JE, Han JJH, Yoon JH, Rhee JS.** (1998) Effect of salt hydrate pair on lipase-catalyzed regioselective monoacylation of sucrose. *Biotechnol. Bioeng.* 57: 121-125.
- Kitagawa M, Fan H, Raku T, Shibatani S, Maekawa Y, Hiraguri Y, Kurane R, Tokiwa I.** (1999) Selective enzymatic preparation of vinyl sugar esters using DMSO as a denaturing co-solvent. *Biotechnol. Lett.* 21: 355-359.
- Kitagawa M, Tokiwa W.** (1998) Synthesis of polymerizable sugar ester possessing long spacer catalyzed by lipase from *Alcaligenes sp.* and its chemical polymerization. *Biotechnol. Lett.* 20: 627-630.
- Kjellin URM, Claesson PM, Vulfson EN.** (2001) Studies of *N*-dodecylactobionamide, maltose 6'-*O*-dodecanoate, and octyl- β -glucoside with surface tension, surface force, and wetting techniques. *Langmuir* 17: 1941-1949.

- Kjellin URM, Reimer J, Hansson P.** (2003) An investigation of dynamic surface tension, critical micelle concentration, and aggregation number of three non-ionic surfactants using NMR, time-resolved fluorescence quenching, and maximum bubble pressure tensiometry. *J. Colloid Interf. Sci.* 262: 506-515.
- Klibanov AM.** (1989) Enzymatic catalysis in anhydrous organic solvents. *Trends Biochem. Sci.* 14: 141-144.
- Klibanov AM.** (1995) Enzyme memory –what is remembered and why? *Nature.* 374: 596.
- Klibanov AM.** (2001) Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature.* 409: 241-246.
- Konarzycka-Bessler M, Bornscheuer UT.** (2003) A high-throughput-screening method for determining the synthetic activity of hydrolases. *Angew. Chem. Int. Ed.* 42: 1418-1419.
- Ku MA, Hang YD.** (1995) Enzymatic synthesis of esters in organic medium with lipase from *Byssoschlamys fulva*. *Biotechnol. Lett.* 17: 1081-1084.
- Laane C, Boeren S, Vos K, Veeger C.** (1987) Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotechnol. Bioeng.* 30 (1): 81-87.
- Lang S, Wullbrandt D.** (1999) Rhamnose-lipids-biosynthesis, microbial production and application potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51: 22-32.
- Latt SA, Holmquist B, Vallee BL** (1969) Thermolysin: A zinc metalloenzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 37: 333-339.
- Le Maire M, Champeil P, Möller JV.** (2000) Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. *Biochim. Biophys. Acta* 1508: 86-111.
- Lee M-Y, Dordick JS.** (2002) Enzyme activation for nonaqueous media. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 376-384.
- Lerk PC, Sucker HH, Eicke HF.** (1996) Micellization and solubilization behaviour of sucrose laurate, a new pharmaceutical excipient. *Pharm. Dev. Technol.* 1: 27-36.
- Levine IN.** (1996) *Fisicoquímica*. McGraw-Hill.
- Lichtenthaler FW, Mondel S.** (1997) Perspectives in the use of low molecular weight carbohydrates as organic raw materials. *Pure & Appl. Chem.* 69: 1853-1866.
- Liu W-H, Beppu T, Arima K.** (1973) Physical and chemical properties of the lipase of thermophilic fungus *Humicola lanuginosa* S-38. *Agric. Biol. Chem.* 37: 2493-2499.
- Liu Y, Urganonkar S, Verkade JG, Armstrong DW.** (2005) Separation and characterization of underivatized oligosaccharides using liquid chromatography and

liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1079: 146-152.

Liying Z, Li D, Qiao S, Johnson EW, Li B, Thacker PA, Han IK. (2003) Effects of stachyose on performance, diarrhoea incidence and intestinal bacteria in weanling pigs. *Arch Tierernahr.* 57: 1-10.

Lizabeth H. (2002). Serine protease mechanism and specificity. *Chem. Rev.* 102: 4501-4524.

Lloyd RC, Dickman M, Jones JB. (1998) Probing the specificity of the S₁'₁' leaving group, site of subtilisin *Bacillus lentus* using an enzyme-catalyzed transesterification reaction. *Tetrahedron: Asymmetry.* 9: 551-561.

Luntz S. (2004) Engineering lipase B from *Candida antarctica*. *Tetrahedron: Assymetry.* 15: 2743-2748.

MacLeod JK, Rasmussen HB, Wills AC. (1997) A new glycoside antimicrobial agent from *Persoonia linearis* x *pinifolia*. *J. Nat. Prod.* 60: 620-622.

Magnusson AO, Roticci-Mulder JC, Santagostino A, Hult K. (2005) Creating space for large secondary alcohols by rational redesign of *Candida antarctica* lipase B. *ChemBioChem.* 6: 1051-1056.

Maheshwari R, Bharadwaj G, Bhat M. (2000) Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 461-488.

Makino S, Ogimoto S, Koga S. (1983) Sucrose monoesters of fatty acids: their properties and interaction with proteins. *Agric. Biol. Chem.* 47: 319-326.

Margolin AL, Navia MN. (2001) Protein crystals as novel catalytic materials. *Angew. Chem. Int. Ed.* 40: 2204-2222.

Marshall DL, Bullerman LB. (1994) Antimicrobial properties of sucrose fatty acid esters. En: Akoh CC, Swanson, editors. *Carbohydrate polyesters as fat substitutes*. Marcel Dekker, New York. Pp. 149-167.

Martinelle M, Hult K. (1995a) Kinetics of acyl transfer reactions in organic media catalysed by *Candida Antarctica* lipase B. *Biochim. Biophys. Acta* 1251 (2): 191-197.

Martinelle M, Holmquist M, Hult K. (1995b) On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase. *Biochim. Biophys. Acta: Lip. Lipd. Metabol.* 1258: 272-276.

Matsui-Yuasa I, Koike N, Ohtani K, Otani S. (1994) Effect of sucrose monostearate, an emulsifier, on polyamine metabolism and phosphatidylinositol turnover in Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1224: 413-417.

- Matsumoto Y, Kato T, Suzuki H, Hirose S, Naiki Y, Hirashima M, Ueoka R.** (2000) Highly specific inhibitory effects of three-component hybrid liposomes including sugar surfactants on the growth of glioma cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 10: 2617-2619.
- Matsushima A, Kodera Y, Hiroto M, Nishimura H, Inada Y.** (1996) Bioconjugates of proteins and polyethylene glycol: potent tools in biotechnological processes. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic.* 2: 1-17.
- Matsuzaki T, Koseki K, Koiwai A.** (1988) Germination and growth-inhibition of surface lipids from *Nicotiana* species and identification of sucrose esters. *Agric. Biol. Chem.* 52: 1889-1897.
- McCabe RW, Taylor A.** (2004) An investigation of the acyl-binding site of *Candida antarctica* lipase B. *Enz. Microbiol. Technol.* 35: 393-398.
- Mellor HR, Platt FM, Dwek RA, Butters TD.** (2003) Membrane disruption and cytotoxicity of hydrophobic N-alkylated imino sugars is independent of inhibition of protein and lipid glycosylation. *Biochem. J.* 374: 307-314.
- Molinier V, Houwer PHJ, Queneau Y, Fitremann, Mackenzie G, Goodby JW.** (2003a) A bilayer to monolayer phase transition in liquid crystal glycolipids. *Chem. Commun.* 2860-2861.
- Molinier V, Wisniewski K, Bouchu A, Fitremann J, Queneau Y.** (2003b) Transesterification of sucrose in organic medium: study of acyl group migrations. *J. Carbohydr. Chem.* 22: 657-669.
- Molinier V, Fenet B, Fitremann J, Bouchu A, Queneau Y.** (2005) PFGSE-NMR study of self-diffusion of sucrose fatty acid monoesters in water. *J. Colloid Interf. Sci.* 286: 360-368.
- Monk JD, Beuchat LR, Hathcox AK.** (1996) Inhibitory effects of sucrose monolaurate, alone and in combination with organic acids, on *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Bacteriol.* 81: 7-18.
- Montañez-Clemente I, Alvira E, Macías M, Ferrer A, Fonseca M, Rodríguez J, González A, Barletta G.** (2002) Enzyme activation in organic solvents: co-lyophilization of subtilisin Carlsberg with methyl- β -cyclodextrin renders an enzyme catalyst more active than cross-lined enzyme crystals. *Biotechnol. Bioeng.* 78: 53-59.
- Morihara K, Tsuzuki H.** (1970) Thermolysin: Kinetic study with oligopeptides. *Eur. J. Biochem.* 15: 374-380.
- Mozhaev VV, Budde CL, Rich JO, Usyatinsky AY, Michels PC, Khmel'nitsky YL,**

- Clark DS, Dordick JS.** (1998) Regioselective enzymatic acylation as a tool for producing solution-phase combinatorial libraries. *Tetrahedron*. 54: 3971-3982.
- Muller AS, Gagnaire J, Queneau Y, Karaoglanian, Maitre JP, Bouchu A.** (2002) Winsor behaviour of sucrose fatty acid esters: choice of the cosurfactant and effect of the surfactant composition. *Colloid Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 203: 55-66.
- Mulloy B, Frenkiel TA, Davies DB.** (1988) Long-range carbon-proton coupling constants: application to conformational studies of oligosaccharides. *Carbohydr. Res.* 1843: 39-46.
- Muralidhar RV, Chirumamilla RR, Marchant R, Ramachandran VN, Ward OP, Nigam P.** (2002) Understanding lipase stereoselectivity. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 18: 81-97.
- Nakakuki T.** (2002) Present status and future of functional oligosaccharide development in Japan. *Pure Appl. Chem.* 74: 1245-1251.
- Nakamura S.** (1997) Using sucrose esters as food emulsifiers. *Oleochemicals* 8: 866-874.
- Neidhart DJ, Petsko GA.** (1988) The refined crystal structure of subtilisin Carlsberg at 2.5 Å resolution. *Protein Eng.* 2: 271-276.
- Nicolaou KC, Mitchell HJ.** (2001) Adventures in carbohydrate chemistry: New synthetic technologies, chemical synthesis, molecular design and chemical biology. *Angew. Chem. Int. Ed.* 40: 1576-1624.
- Niraula B, King TC, Misran M.** (2004) Evaluation of rheology property of dodecyl maltoside, sucrose dodecanoate, Brij 35p and SDS stabilized O/W emulsion: effect of head group structure on rheology property and emulsion stability. *Colloid Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 251: 59-74.
- O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F.** (2000) Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* 267: 5421-5426.
- Okabe S, Suganuma M, Tada Y, Ochiai Y, Sucoka E, Kohya A, Takahashi M, Mizutani M, Matsuzaki T, Fujiki H.** (1999) Disaccharide ester screened for inhibition of tumor necrosis factor- α release are new anti-cancer agents. *Jpn. J. Cancer Res.* 90: 669-676.
- Osipow L.** (1959) Fatty acid esters of sucrose (methods of preparation). *Ind. Eng. Chem.* 48: 1459-1462.
- Pandey A, Benjamin, S. Soccol CR, Nigam P, Krieger N, Soccol VT.** (1999) The

realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 29: 119-131.

Parada J, Bunel, S. Ibarra C, Larrazábal G, Moraga E, Gillitt ND, Bunton CA. (2000) Complexation of sucrose with cobalt(III)bis(phenantroline). *Carbohydr. Res.* 329: 195-197.

Parodi-Talice A, Araujo JM, Torres C, Perez-Victoria JM, Gamarro F, Castanys S. (2003) The overexpression of a new ABC transporter in *Leishmania* is related to phospholipid trafficking and reduced infectivity. *Biochim. Biophys. Acta.* 1612: 195-207.

Patil DR, Dordick JS, Rethwisch DG. (1991) Chemoenzymatic synthesis of novel sucrose-containing polymers. *Macromolecules* 24: 3462-3463.

Pedersen NR, Halling PJ, Pedersen LH, Wimmer R, Matthiesen, Veltman R. (2002a) Efficient transesterification of sucrose catalysed by the metalloprotease thermolysin in dimethylsulfoxide. *FEBS Lett.* 519: 181-184.

Pedersen NR, Wimmer R, Emmersen J, Degn P, Pedersen LH. (2002b) Effect of fatty acid chain length on initial reaction rates and regioselectivity of lipase-catalysed esterification of disaccharides. *Carbohydr. Res.* 337: 119-1184.

Pedersen NR, Wimmer R, Matthiesen R, Pedersen LH, Gessegge A. (2003) Synthesis of sucrose laurate using a new alkaline protease. *Tetrahedron: Asymmetry.* 14: 6676-673.

Pedersen NR, Wimmer R, Matthiesen R, Pedersen LH, Gessegge A. (2003) Synthesis of sucrose laurate using a new alkaline protease. *Tetrahedron: Asymmetry.* 14: 6676-673.

Pedersen S, Larsen AM, Aasmul P. (1998) Method of enzyme immobilization on a particulate silica carrier for synthesis in organic media. *US Patent 5776741.*

Pérez-Victoria I, Morales JC. (2006a) Complementary regioselective esterification of non-reducing oligosaccharides catalyzed by different hydrolases. *Tetrahedron* 62: 878-886.

Pérez-Victoria I, Morales JC. (2006b) Regioselectivity in acylation of oligosaccharides catalyzed by the metalloprotease thermolysin. *Tetrahedron* 62: 2361-2369.

Pérez-Victoria JM, Chiquero MJ, Conseil G, Dayan G, Di Pietro A, Barron D, Castanys S, Gamarro F. (1999). Correlation between the affinity of flavonoids binding to the cytosolic site of *Leishmania tropica* multidrug transporter and their efficiency to revert parasite resistance to daunomycin. *Biochemistry* 38: 1736-1743.

- Pérez-Victoria JM.** (2000) Estrategias de inhibición de la glicoproteína-P de *Leishmania* para revertir la multirresistencia a fármacos. Tesis Doctoral, Universidad de Granada, Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra” CSIC
- Pérez-Victoria JM, Di Pietro A, Barron D, Ravelo AG, Castanys S, Gamarro F.** (2002) Multidrug resistance phenotype mediated by the P-glycoprotein-like transporter in *Leishmania*: a search for reversal agents. *Curr. Drug Targets.* 3: 311-333.
- Persson M, Wehtje E, Adlercreutz P.** (2002) Factors governing the activity of lyophilised and immobilised lipase preparations in organic solvents. *ChemBioChem.* 3: 566-571.
- Peters GH, Svendsen A, Langberg H, Vind J, Patkar SA, Toxvaerd S, Kinnunen PJK.** (1998) Active serine involved in the stabilization of the active site loop in the *Humicola lanuginosa* lipase. *Biochemistry* **37**: 12375–12383
- Pleiss J, Fischer M, Schmid RD.** (1998) Anatomy of lipase binding sites: the scissile binding site. *Chem. Phys. Lipids* 93: 67-80.
- Plou FJ, Cruces MA, Pastor E, Ferrer M, Bernabé M, Ballesteros A.** (1999) Acylation of sucrose with vinyl esters using immobilized hydrolases: demonstration that chemical catalysis may interfere with enzymatic catalysis. *Biotechnol. Lett.* 21: 635-639.
- Plou FJ, Cruces MA, Ferrer M, Fuentes G, Pastor E, Bernabé M, Christensen M, Comelles F, Parra JL, Ballesteros A.** (2002) Enzymatic acylation of di- and trisaccharides with fatty acids: choosing the appropriate enzyme, support and solvent. *J. Biotechnol.* 96: 55-66.
- Polat T, Bazin HG, Lindhardt RJ.** (1997) Enzyme catalyzed regioselective synthesis of sucrose fatty acid ester surfactants. *J. Carbohydr. Chem.* 16: 1319-1335.
- Polat T, Lindhardt RJ.** (2001) Synthesis and applications of sucrose-based esters. *J. Surf. Det.* 4: 415-421.
- Polderman B.** (1990) Proteolytic enzymes, p.108-123 de Gerhartz W (ed). *Proteolytic enzymes in industry: production and applications.* VCH Publishers, Weinheim, Germany.
- Potier P, Bouchu A, Descotes G, Queneau Y.** (2000) Proteinase N-catalyzed transesterifications in DMSO-water and DMF-water: preparation of sucrose monomethacrylate. *Tetrahedron Lett.* 41: 3597-3600.
- Potier P, Bouchu A, Gagnaire J, Queneau Y.** (2001) Proteinase N-catalyzed regioselective esterification of sucrose and other mono- and disaccharides.

Tetrahedron: Asymmetry. 12: 2409-2419.

Prasad AK, Soerensen MD, Parmar VS, Wengel J. (1995) Tri-*O*-acyl 2-deoxy-D-ribofuranose: An effective enzyme-assisted one-pot synthesis from 2-deoxy-D-ribose and transformation into 2'-deoxynucleosides. *Tetrahedron Lett.* 36: 6136-6166.

Pulido R, Ortiz FL, Gotor V. (1992) Enzymatic regioselective acylation of hexoses and pentoses using oxime esters. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1.* 2891.

Pulido R, Gotor V. (1993) Enzymatic regioselective acylation of hexoses and pentoses using oxime esters. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1.* 589.

Pulido R, Gotor V. (1994). Towards the selective acylation of secondary hydroxyl groups of carbohydrates using oxime esters in an enzyme-catalyzed process. *Carbohydr. Res.* 252: 55-68.

Raku T, Kitagawa M, Shimakawa, Tokiwa Y. (2003) Enzymatic synthesis of hydrophilic undecylenic sugar esters and their biodegradability. *Biotechnol. Lett.* 161: 161-166.

Rao MB, Tanskale AP, Ghatge MS, Deshpande VV. (1998) Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 597-635.

Reetz MT. (2002) Lipases as practical biocatalysts. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6: 145-150.

Rejasse B, Maugard T, Legoy MD. (2003) Enzymatic procedures for the synthesis of water-soluble retinol derivatives in organic media. *Enz. Microb. Technol.* 32: 312-330.

Rentel C-O, Bowstra JA, Naisbett B, Junginger HE. (1999) Niosomes as a novel peroral vaccine delivery system. *Int. J. Pharm.* 186: 161-167.

Reyes-Duarte D, López-Cortés N, Ferrer M, Plou FJ, Ballesteros A. (2005) Parameters affecting productivity in the lipase-catalyzed synthesis of sucrose palmitate. *Biocatal. Biotransform.* 23: 19-27.

Rich JO, Bedell BA, Dordick JS. (1995) Controlling enzyme-catalyzed regioselectivity in sugar ester synthesis. *Biotechnol. Bioeng.* 45: 426-434.

Rich JO, Dordick JS. (1997) Controlling subtilisin activity and selectivity in organic media by imprinting with nucleophilic substrates. *J. Am. Chem. Soc.* 119: 3245-3252.

Riva S, Chopineau J, Kieboom APG, Klibanov AM. (1988) Protease-catalyzed regioselective esterifications of sugars and related compounds in anhydrous dimethylformamide. *J. Am. Chem. Soc.* 110: 584-589.

Riva S, Nonini M, Ottolina G, Danieli B. (1998) Subtilisin-catalyzed esterification of

di- and oligosaccharides containing a D-fructose moiety. *Carbohydr. Res.* 314: 259-266.

Rogalska E, Cudrey C, Ferrato F, Verger R. (1993) Stereoselective hydrolysis of triglycerides by animal and microbial lipases. *Chirality* 5: 24-30.

Rosen MJ. (1972) The relationship of structure to properties of surfactants. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 49: 293-297.

Rosenthal KS, Koussale F. (1983) Critical micelle concentration determination of non-ionic detergents with coomassie brilliant blue G-250. *Anal. Chem.* 55: 1115-1117.

Roy I, Gupta MN. (2004) Freeze-drying of proteins: some emerging concerns. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 39: 165-177.

Ru MT, Hirokane SY, Lo AS, Dordick JS, Reimer JA, Clark DS. (2000) On the salt-induced activation of lyophilized enzymes in organic solvents: effect of salt kosmotropicity on enzyme activity. *J. Am. Chem. Soc.* 122: 1565-1571.

Rubio E, Fernandez-Mayoralas A, Klibanov AM. (1991) Effect of the solvent on the enzyme regioselectivity. *J. Am. Chem. Soc.* 113: 695-696.

Rupley JA, Careri (1991) Protein hydration and function. *Adv. Protein Chem.* 41: 37-172.

Russell AJ, Klibanov AM. (1988) Inhibitor-induced enzyme activation in organic solvents. *J. Biol. Chem.* 263: 11624-11626.

Saleki-Gerhardt A, Stowell JG, Byrn SR, Zografu G. (1995) Hydration and dehydration of crystalline and amorphous forms of raffinose. *J. Pharm. Sci.* 84: 318-323.

Salis A, Svensson I, Monduzzi M, Solinas V, Adlercreutz P. (2003) The atypical lipase B from *Candida antarctica* is better adapted for organic media than the typical lipase from *Thermomyces lanuginosa*. *Biochim. Biophys. Acta: Proteins & Proteomics.* 1646: 145-151.

Sarney DB, Kapeller H, Fregapane G, Vulfson EN. (1994) Chemo-enzymatic synthesis of disaccharides fatty acid esters. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71: 711-714.

Sarney DB, Vulfson EN. (1995) Application of enzymes to the synthesis of surfactants. *Trends Biotechnol.* 13: 164-172.

Scalabrini P, Rossi M, Spettoli P, Matteuzzi D. (1998) Characterization of Bifidobacterium strains for use in soymilk fermentation. *Int J Food Microbiol.* 39: 213-219.

Scheckermann C, Schlotterbeck A, Schmidt M, Wray V, Lang S. (1995) Enzymatic

monoacylation of fructose by two procedures. *Enzyme Microb. Technol.* 17: 157-162.

Schmid RD, Verger R. (1998) Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. *Angew. Chem. Int. Ed.* 37: 1608-1633.

Schmitke JL, Wescott CR, Klibanov AM. (1996) The mechanistic dissection of the plunge in the enzymatic activity upon transition from water to anhydrous solvents. *J. Am. Chem. Soc.* 118: 3360-3365.

Schnell B, Strauss UT, Verdino P, Faber K, Kappe CO. (2000) Synthesis of enantiomerically pure 4-aryl-3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-ones via enzymatic resolution: preparation of the antihypertensive agent (*R*)-SQ 32926. *Tetrahedron: Asymmetry.* 11: 1449-1453.

Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currens MJ, Seniff D, Boyd MR (1988) Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Research* 48: 4827-4833.

Secundo F, Carrea G, Vecchio G, Zambianchi F. (1999) Spectroscopic investigation of lipase from *Pseudomonas cepacia* solubilized in 1,4-dioxane by non-covalent complexation with methoxypoly(ethylene glycol). *Biotechnol. Bioeng.* 64: 624-629.

Sharma R, Chisti Y, Banerjee UC. (2001) Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol. Adv.* 19: 627-662.

Silverman RB. (2002) *The Organic Chemistry of Enzyme-Catalyzed Reactions.* Academic Press.

Simerska P, Pisvejcova, Kuzma M, Sedmera P, Kien V, Nicotra S, Riva S. (2004) Regioselective enzymatic acylation of *N*-acetylhexosamines. *J. Mol. Catal., B: Enzymatic* 29: 219-225.

Smiricky-Tjardes MR, Grieshop CM, Flickinger EA, Bauer LL, Fahey GC Jr. (2003) Dietary galactooligosaccharides affect ileal and total-tract nutrient digestibility, ileal and fecal bacterial concentrations, and ideal fermentative characteristics of growing pigs. *J. Anim. Sci.* 81: 2535-2545.

Söderberg I, Drummond CJ, Furlong DN, Godkin S, Matthews B. (1995) Non-ionic sugar-based surfactants: self assembly and air/water interfacial activity. *Colloid Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 102: 91-97.

Söderman O, Johansson I. (2000) Polyhydroxyl-based surfactants and their physicochemical properties and applications. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 4: 391-401.

- Soedjak H, Spradlin JE.** (1994) Enzymatic transesterification of sugars in anhydrous pyridine. *Biocatalysis* 11: 241-248.
- Soultani S, Engasser, Ghoul M.** (2001) Effect of acyl donor chain length and sugar/acyl donor molar ratio on enzymatic synthesis of fatty acid fructose esters. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic.* 11: 725-731.
- Soultani S, Ognier S, Engasser, Ghoul M.** (2003) Comparative study of some surface active properties of fructose esters and commercial sucrose esters. *Colloid Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 227: 35-44.
- Stermitz FR, Cashman KK, Halligan KM, Morel C, Tegos GP, Lewis K.** (2003) Polyacylated neohesperidosides from *Geranium caespitosum*: bacterial multidrug resistance pump inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13: 1915-1918.
- St-Jacques M, Sundararajan PR, Taylor KJ, Marchessault RH.** (1976) Nuclear magnetic resonance and conformational studies on amylose and model compounds in dimethyl sulfoxide solution. *J. Am. Chem. Soc.* 98: 4386-4391.
- Stubenrausch C.** (2001) Sugar surfactants – aggregation, interfacial and adsorption phenomena. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 6: 160-170.
- Takeda Y, Takechi A, Masuda T, Otsuka H.** (1998) An acyclic monoterpene glucosyl ester from *Lantana lilacia*. *Planta Med.* 64: 78-79.
- Tanaka N.** (2001) Skin preparations containing sucrose fatty acid esters. *Japanese Patent* 2,001,106,640.
- Tanford C.** (1980) *The hydrophobic effect*. Wiley Interscience, New York.
- Terradas F, Teston-Henry M, Fitzpatrick PA, Klibanov AM.** (1993) Marked dependence of enzyme proquiral selectivity on the solvent. *J. Am. Chem. Soc.* 115: 390-396.
- Therisod M, Klibanov AM.** (1986) Facile enzymatic preparation of monoacylated sugars. *J. Am. Chem. Soc.* 108: 5638-5640.
- Therisod M, Klibanov AM.** (1987) Regioselective acylation of secondary hydroxyl groups in sugars catalyzed by lipases in organic solvents. *J. Am. Chem. Soc.* 109: 3977-3981.
- Thiem J.** (1995) Applications of enzymes in synthetic carbohydrate chemistry. *FEMS Microbiol. Rev.* 16: 193-211.
- Thomas LV, Davies EA, Delves-Broughton J, Wimpenny JWT.** (1998) Synergist effect of sucrose fatty acid esters on nisin inhibition of Gram-positive bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 85: 1013-1022.

Thomson CA, Delaquis PJ, Mazza G. (1999) Detection and measurement of microbial lipase activity: a review. *Critical reviews Food Sci. Nutr.* 39: 165-187.

Tronrud DE, Monzingo AF, Matthews BW. (1986) Crystallographic structural analysis of phosphoramidates as inhibitors and transition-state analogs of thermolysin. *Eur J Biochem.* 157: 261-268.

Tsao L, Dou K, Sun G, Lyu Y, Koroteev AM, Krasnov GB. (2003) Reactivity of the hydroxy groups in melezitose and their selective protection. *Russian J. Org. Chem.* 39: 384-391.

Tsuchido T, Svarachorn A, Soga H, Takano M. (1990) Lysis and aberrant morphology of *Bacillus subtilis* cells caused by surfactants and their relation to autolysin activity. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 34: 781-785.

Ueoka R, Matsumoto Y, Hirose S, Goto K, Goto M, Furusaki S. (2002) Remarkably enhanced inhibitory effects of three-component hybrid liposomes including sugar surfactants on the growth of lung carcinoma cells. *Chem. Pharm. Bull.* 50: 563-565.

Uppenberg J, Hansen MT, Patkar S, Jones TA. (1994a) The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure* 2: 293-308.

Uppenberg J, Patkar S, Bergfors T, Jones TA. (1994b) Crystalization and preliminary X-ray studies of lipase B from *Candida antarctica*. *J. Mol. Biol.* 235: 790-792.

Valivety RH, Halling PJ, Macrae AR. (1992a). Reaction rate with suspended lipase catalyst shows similar dependence on water activity in different organic solvents *Biochim. Biophys. Acta* 1118: 218-222.

Valivety RH, Halling PJ, Macrae AR. (1992c). *Rhizomucor miehei* lipase remains highly active at water activity below 0.0001. *FEBS J.* 301: 258-260.

Valivety RH, Halling PJ, Peilow AD, Macrae AR. (1992b). Lipases from different sources vary widely in dependence of catalytic activity on water activity. *Biochim. Biophys. Acta* 1122: 143-146.

Vermerie A, de Muyneck C, Vandebossche G, Eehaute W, Geerts ML, Remon JP. (1996) Sucrose laurate gels as a percutaneous delivery system for Oestradiol in rabbits. *J. Pharm. Pharmacol.* 463-472

Vögtle F. (1993) *Supramolecular chemistry: an introduction.* Wiley.

von Rybinski (1996) Alkyl glycosides and polyglycosides. *Curr. Opin. Colloid*

Interface Sci. 1: 587-587.

von Rybinski, Hill K (1998) Alkyl polyglycosides – properties and applications of a new class of surfactants. *Angew. Chem. Int. Ed.* 14: 4699-4709.

Vulliez-Le Normand B, Eisele JL. (1993) Determination of detergent critical micelle concentration by solubilization of a colored dye. *Anal. Biochem.* 208: 241-243.

Wang Q, Dordick JS, Linhardt RJ. (2002) Synthesis and applications of carbohydrate-containing polymers. *Chem. Mater.* 14: 3232-3244.

Wang Y-F, Lalonde JL, Momongan M, Bergbreiter DE, Wong C-H. (1988) Lipase-catalyzed irreversible transesterifications using enol ester as acylating reagents: preparative enantio- and regioselective synthesis of alcohols, glycerol derivatives, sugars, and organometallics. *J. Am. Chem. Soc.* 110: 7200-7205.

Watanabe T, Matsue R, Honda Y, Kuwahara M. (1995) Differential activities of a lipase and a protease toward straight- and branched-chain acyl donors in transesterification to carbohydrates in an organic medium. *Carbohydr. Res.* 275: 215-220.

Watanabe T. (1999) Sucrose fatty acid esters: past, present and future. *Foods Food Ingredients J. Jpn.* 180: 18-25.

Watanabe T, Katayama S, Matsubara M, Honda Y, Kuwahara M. (2000) Antibacterial carbohydrate monoesters suppressing cell growth of *Streptococcus mutants* in the presence of sucrose. *Curr. Microbiol.* 41: 210-213.

Weaver LH, Kester WR, Matthews BW. (1977) A crystallographic study of the complex of phosphoramidon with thermolysin. A model for the presumed catalytic transition state and for the binding of extended substrates. *J. Mol. Biol.* 114: 119-132.

Weber HK, Stecher H, Faber K. (1995) Sensitivity of microbial lipases to acetaldehyde formed by acyl-transfer reactions from vinyl esters. *Biotechnol. Lett.* 17: 803-808.

Weber HK, Zuegg J, Faber K, Pleiss J. (1997) Molecular reasons for lipase-sensitivity against acetaldehyde. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic.* 3: 131-138.

Weber N, Weitkamp P, Mukherjee KD. (2003) *Thermomyces lanuginosus* lipase-catalyzed transesterification of sterols by methyl oleate. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 105: 624-626.

Wege HA, Holgado-Terriza JA, Gálvez-Ruiz MJ and Cabrerizo-Vílchez MA. (1999) Development of a new Langmuir-type pendant-drop film balance. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 12: 339-349.

- Wiese M, Berger O, Stierhof YD, Wolfram M, Fuchs M, Overath P.** Gene cloning and cellular localization of a membrane-bound acid phosphatase of *Leishmania mexicana*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 82: 153-165.
- Woudenberg-van Oosterom M, van Rantwijk F, Sheldon RA.** (1996) Regioselective acylation of disaccharides in *tert*-butyl alcohol catalyzed by *Candida antarctica* lipase. *Biotechnol. Bioeng.* 49: 328-333.
- Xiao Y, Wu Q, Wang N, Lin X.** (2004) Regioselective monoacylation of cyclomaltoheptaose at the C-2 secondary hydroxyl groups by the alkaline protease from *Bacillus subtilis* in nonaqueous media. *Carbohydr. Res.* 339: 1279-1283.
- Xu K, Klibanov AM.** (1996) pH control of the catalytic activity of cross-linked enzyme crystals in organic solvents. *J. Am. Chem. Soc.* 118: 9815-9819.
- Yan Y, Bornscheuer UT, Cao L, Schmid RD.** (1999) Lipase-catalyzed solid-phase synthesis of sugar fatty acid esters. Removal of byproducts by azeotropic distillation. *Enzyme Microb. Technol.* 25: 725-728.
- Yaver DS, Lamsa M, Munds R, Brown SH, Otani S, Franssen L, Johnstone JA, Brody H.** (2000) Using DNA-tagged mutagenesis to improve heterologous protein production in *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genetics Biol.* 29: 28-37.
- Yoshimoto K, Itatani Y, Tsuda T.** (1980) ¹³C-Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectra of *O*-acylglucoses. Additivity of shift parameters and its application to structure elucidations. *Chem. Pharm. Bull.* 28: 2065-2076.
- Yun J-W.** (1996) Fructooligosaccharides: Occurrence, preparation and application. *Enzyme Microb. Tehcnol.* 19: 107-117.
- Zaks A, Klibanov AM.** (1984) Enzymatic catalysis in organic media at 100 °C. *Science* 224: 1249-1251.
- Zaks A, Klibanov AM.** (1985) Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 3192-3196.
- Zaks A, Klibanov AM.** (1988a) The effect of water on enzyme action in organic media. *J. Biol. Chem.* 263 (17): 8017-8021.
- Zaks A, Klibanov AM.** (1988b) Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents. *J. Biol. Chem.* 263 (7): 3194-3201.
- Zale SE, Klibanov AM.** (1986) Why does ribonuclease irreversibly inactivate at high temperatures? *Biochemistry* 25: 5432-5444.
- Zhang L, Somasundaran, Maltesh C.** (1997) Adorption of *n*-dodecyl- β -D-maltoside on solids. *J. Colloid Interf. Sci.* 191: 202-208.

Zhu J, Shi Z. (2003) ESI-MS studies of polyether surfactant behaviours in reversed-phase HPLC system. *Int. J. Mass Spectrom.* 226: 369-378.

Zhu Y-P, Rosen MJ, Vinson PK, Morral SW. (1999) Surface properties of *N*-alkanoyl-*N*-metilglucamines and related materials. *J. Surf. Det.* 2: 383-390.

