



**Universitat Ramon Llull**

## **TESI DOCTORAL**

Títol    Nous Desenvolupaments en Glicosintases. Enginyeria i Aplicacions.

Realitzada per        Xavier Pérez Javierre

en el Centre         Institut Químic de Sarrià

i en el Departament    Química Orgànica i Bioquímica

Dirigida per         Antoni Planas Sauter



A la Cris,  
al Max i a la Valentina



DOROTHY: How can you talk if you haven't got a brain?

THE SCARECROW: I don't know...But some people without brains do an awful lot of talking, don't they?

**The Wizard of Oz (1939)**



### AGRAÏMENTS

En primer lloc volia agrair en Toni Planas per haver-me brindat l'oportunitat de realitzar aquest treball, per la seva direcció i supervisió. I més recentment, també vull agrair-te especialment el haver pensat i cregut en mi per formar part de la Plataforma de Biocatàlisi, etapa de molta productivitat i que guardo en gran estima.

Als meus companys de laboratori durant l'època del treball experimental, Edu, Marc, Trevor, Magda, Ana, Javier i Joan. Quan penso en aquells dies sempre acabo somrient.

També als companys i amics d'altres laboratoris, Cristina Flors, Jordi Pérez, Iban Jové i Cristina Davi per tots els moments compartits.

A tota la gent que ha col·laborat en aquest treball, Albert, Estel·la, Alex, Michael, Baigo, Xavi, Marta i David, per la vostra feina, paciència i amistat.

Pel companys de la segona etapa al Laboratori, perquè l'empenta final ha estat més fàcil amb vosaltres: Edu (again), Xavi T., Teresa, Xevi B., Victoria, Sergi, Cristina, Patri, Hugo, Carles, Ellen, Estel·la, Javi, Marta V. i Marta M.

Agrair en Francesc Broto, Santi Nonell, Jordi Abellà, Xavier Batllori i la Carme Brossa dels Laboratoris de Cromatografia, Fotoquímica, Electromètrics, Espectroscòpia i Esteroides per haver tingut sempre la porta oberta i donar-me un cop de ma en el que fes falta. També vull mencionar la col·laboració d'en Quico Canals del VHIO per tota la feina feta amb els MALDI-TOF.

Als meus pares per la dedicació i el suport, als meus iaios a qui de tant en tant se'ls escapava la frase: "Nene...¿cómo tienes lo del Planas?" Al meu germà per ser-hi sempre...fins i tot quan ens separava un oceà. Al Joan i la Lluïsa, pel dia a dia i en especial a la Cris per la immensa paciència (per dir-ho d'alguna manera) que has tingut, sobretot aquests darrers mesos!

Finalment agrair la beca pre-doctoral de l'Institut Químic de Sarrià (2003 – 2005) que em va permetre poder realitzar aquest projecte.

A tots, moltes gràcies.

Matadepera, 05 de Maig de 2015





## RESUM

La constatació de la rellevància dels carbohidrats i glicoconjugats en processos de reconeixement cel·lular, regulació i senyalització, proliferació cel·lular i resposta immunitària, així com en funcions estructurals i energètiques reconegudes clàssicament, han portat a un interès creixent en aquestes biomolècules per part de la Glicobiologia i la Ciència dels Materials. Aquest fet ha comportat la necessitat de disposar d'eines complementàries o alternatives a la química convencional per a la síntesi d'aquestes biomolècules i abastir-ne així la demanda generada. Tot això ha propiciat el desenvolupament de noves metodologies sintètiques amb la incorporació d'etapes enzimàtiques.

L'any 1998 es va desenvolupar la metodologia glicosintasa basada en un redisseny del centre actiu de glicosidases que actuen amb retenció de configuració per tal de suprimir-ne la seva activitat hidrolítica. L'ús d'aquests enzims modificats permeten la catàlisi eficient de la formació d'enllaços glicosídics quan s'empren donadors glicosídics activats amb la configuració anomèrica oposada a la del substrat de la reacció normal d'hidròlisi

En la present Tesi s'aprofundeix en la metodologia glicosintasa tant a nivell mecanístic com aplicat. Es treballa amb dues glicosintases, el mutant E134A de la  $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* i el mutant E383A de  $\beta$ -glucosidasa d'*Streptomyces* sp. amb les quals s'assoleixen les següents fites:

S'estudia la funció del residu D136 en el centre actiu de la glicosintasa E134A de la  $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*. L'anàlisi de dobles mutants, mostra que només el mutant E134A/D136E manté certa activitat glicosintasa, suggerint la seva funció com a residu assistent en el mecanisme enzimàtic.

També s'obtenen les glicosintases més actives E134S i E134G de la  $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*, on la substitució del E134 per Ser resulta en un enzim amb una activitat glicosintasa incrementada 5 vegades (en termes de  $k_{cat}/K_M$ ) en comparació amb el mutant original E134A.

Es demostra la utilitat de la glicosintasa E134A de *Bacillus licheniformis* per sintetitzar 1,3-1,4- $\beta$ -glucans artificials per polimerització dels donadors disacàrid (**Glc $\beta$ 3Glc $\alpha$ F**), trisacàrid (**Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 3Glc $\alpha$ F**) i tetrasacàrid (**Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 3Glc $\alpha$ F**). S'originen polisacàrids constituïts per unitats repetitives dels seus corresponents monòmers units per enllaços  $\beta$ -1,4. La morfologia del polisacàrid depèn de la unitat repetitiva que el forma de manera que per ( $\beta$ 4Glc $\beta$ 3Glc) $_n$  i ( $\beta$ 4Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 3Glc) $_n$  s'obtenen esferulites mentre que per ( $\beta$ 4Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 3Glc) $_n$  s'obté un precipitat amorf. Aquests polisacàrids constitueixen nous  $\beta$ -glucans amb estructures homogènies amb una proporció d'enllaços  $\beta$ -1,3 més elevada respecte als  $\beta$ -glucans existents a la natura. El grau de polimerització dels  $\beta$ -glucans obtinguts ve limitat per la solubilitat dels productes de reacció. S'observa que l'ús del mutant més actiu E134S permet estendre la polimerització i assolir polisacàrids d'alt pes molecular en funció de la concentració d'enzim. D'aquesta manera el grau de polimerització (DP) pot ser controlat per l'activitat enzimàtica.

## RESUM

---

Per avaluar la inhibició per producte de l'activitat glicosintasa del mutant E134A se sintetitza l'octasacàrid  $(\beta 4\text{Glc}\beta 4\text{Glc}\beta 4\text{Glc}\beta 3\text{Glc})_2$ , conclouent que el producte de reacció actua com inhibidor competitiu malgrat no té un efecte significatiu en els rendiments preparatius dels productes de polimerització enzimàtica.

D'altra banda s'estudia l'activitat glicosintasa del mutant E383A de la  $\beta$ -glucosidasa d'*Streptomyces* sp. S'observa que aquest presenta activitat hidrolítica i de transglicosidació, fet que queda palès amb la formació de productes secundaris en la reacció glicosintasa. Descartada que aquesta activitat hidrolítica provingui d'una contaminació d'enzim wt, es proposa un mecanisme d'hidròlisi i transglicosidació assistit per anió fluorur com a nucleòfil exogen per la formació d'aquests productes secundaris no esperats.

Finalment s'immobilitza amb èxit la glicosintasa E383A de la  $\beta$ -glucosidasa d'*Streptomyces* sp. sobre reina *Chelating Sepharose FF*. L'enzim immobilitzat no mostra millora de la seva estabilitat envers els dissolvents orgànics. No obstant, sí millora pel que fa a estabilitat d'emmagatzemament a 4°C i pH 7 en comparació amb la seva forma lliure i permet la seva reutilització fins a 9 cicles mantenint el 90% de l'activitat inicial.

### ABREVIACIONS

$\epsilon$ : coeficient d'extinció  
 $\lambda$ : longitud d'ona  
 $\eta$  o Rdt: rendiment  
A: acceptor  
Ac<sub>2</sub>O: anhídrid acètic  
ACN: acetonitril  
AcOEt: acetat d'etil  
AcOH o HAcO: àcid acètic  
AcONa: acetat de sodi  
ANTS: sal sòdica de l'àcid 8-aminonaftalè-1,3,6-trisulfònic  
Ara: arabinosa  
*B. licheniformis*: *Bacillus licheniformis*  
bp: parell de bases  
CAZY: carbohydrate active enzymes  
CCF: cromatografia de capa fina (TLC)  
Conc o C: concentration  
COSY: correlation spectroscopy (2D NMR)  
CV: coeficient de variació  
Cy: ciclohexà  
D: donador  
DAD: dyode array detector  
DAST: diethylaminosulfur trifluoride  
DESVEST: desviació estàndard  
DMF: dimetilformamida  
DMSO: dimetilsulfòxid  
DNA: àcid desoxiribonucleic  
DNP: 2,4-dinitrofenol  
dNTP: deoxynucleotide triphosphate  
DLS: dynamic light scattering  
DP: grau de polimerització  
*E. coli*: *Escherichia coli*  
E: enzim  
EC: enzyme comission  
EDC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida  
EDTA: àcid etilenediamin tetraacètic  
EOF: electro osmotic flow  
Eq.: equació  
*et al.*: et alii/alia  
EtOH: etanol  
FSE: elèctrode selectiu de fluorur  
Fuc: fucosa  
Gal: galactosa  
GalA: àcid galacturònic  
GalNAc: N-acetilgalactosamina  
Glc o G: glucosa  
GlcA: àcid glucurònic

## ABREVIACIONS

---

GlcNAc: N-acetilglucosamina

GT: glicosiltransferasa

HMBC: heteronuclear múltiple-bond correlation spectroscopy

HPCE: high performance capillary electrophoresis

HPLC: high performance líquid chromatography

HPSEC: high performance size exclusion chromatography

HSQC: heteronuclear single quantum coherence spectroscopy

I: intensitat (fluorescència)

I: inhibidor (enzimologia)

Lac: lactosa

MALDI-TOF: matrix assisted laser desorption ionization – time of flight

Man: manosa

MeOH: metanol

MeONa: metòxid de sodi

MS: mass spectrometry

$M_N$ : pes molecular en número (en caracterització de polímers)

$M_P$ : pes molecular del polímer més abundant (en caracterització de polímers).

$M_w$ : pes molecular en massa (en caracterització de polímers).

MU: metilumbel·liferona

NMR: ressonància magnètica nuclear

OCTA: ( $\beta$ 4Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 3Glc) $_2$

ON: overnight

PCR: polymerase chain reaction

PDI: índex de polidispersió

Ph: fenil

pNP: para-nitrofenil

PP: polipropilè

Py: piridina

RF: factor de resposta

Rf: factor de retenció

RID: detector d'índex de refracció

Rs: resolució

SDS-PAGE: electroforesi desnaturalitzant en gel de poliacrilamida – lauril sulfat de sodi.

t.a.: temperatura ambient

TEA o Et $_3$ N: trietilamina

THF: tetrahidrofurà

TF: tampó fosfat

tm: temps de migració

Tol: toluè

tr: temps de retenció

UV-Vis: ultravioleta-visible

Xyl o Xil o X: xilosa

$V_0$ : velocitat inicial

Vs.: versus

VWD: variable wave detector

wt: wild type





**INTRODUCCIÓ**

1	Eines sintètiques .....	1
2	Estratègies Sintètiques .....	28
3	1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de <i>Bacillus licheniformis</i> .....	32

<b>OBJECTIUS</b> .....	45
------------------------	----

**ANÀLISI I DISCUSSIÓ DE RESULTATS**

Capítol 1: Anàlisi mutacional funcional del residu D136 en l'activitat glicosintasa del mutant E134A de la  $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*

1.	Reacció glicosintasa: mecanisme .....	47
2.	Paper del residu D136 en la $\beta$ -glucanasa de <i>Bacillus licheniformis</i> .....	50
3.	Obtenció i caracterització dels dobles mutants .....	53
4.	Activitat específica dels dobles mutants .....	58
5.	Perfil de pH del doble mutant E134A/D136A .....	60

Capítol 2: Nous mutants glicosintasa de la  $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*

1.	Glicosintases més actives .....	65
2.	Anàlisi cinètic dels mutants E134G i E134S .....	66

Capítol 3: Aplicació de la metodologia glicosintasa en la síntesi de nous  $\beta$ -glucans

1.	Context .....	69
2.	Glicosintases per a la síntesi de polisacàrids .....	69
3.	Polimeritzacions enzimàtiques <i>in vitro</i> catalitzades per la glicosintasa E134A de la $\beta$ -glucanasa de <i>Bacillus licheniformis</i> .....	73
4.	Polimerització amb el mutant E134S de la $\beta$ -glucanasa .....	86

Capítol 4: Disseny d'Inhibidors per al mutant E134A de la  $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*

1.	Context .....	91
2.	Estudi de la inhibició per producte .....	92
3.	Anàlisi de l'activitat glicosintasa de la $\beta$ -glucanasa amb substrats competitiu ....	97

Capítol 5. Estudi d'especificitat per substrat i de la immobilització del mutant E383A de la  $\beta$ -glucosidasa d'*Streptomyces* sp.

1.	$\beta$ -glucosidasa d' <i>Streptomyces</i> sp. ....	101
2.	Activitat glicosintasa amb acceptors disacàrids .....	105
3.	Inactivació de possible contaminació de $\beta$ -glucosidasa wt. ....	111
4.	Immobilització del mutant E383A de la $\beta$ -glucosidasa d' <i>Streptomyces</i> sp. ....	122

<b>CONCLUSIONS</b> .....	131
--------------------------	-----

<b>PART EXPERIMENTAL</b> .....	133
--------------------------------	-----

<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	217
---------------------------	-----









## INTRODUCCIÓ

Els hidrats de carboni, en especial els oligosacàrids i polisacàrids, juguen un paper fonamental en el funcionament dels organismes vius. Malgrat que durant molt de temps se'ls va associar essencialment amb funcions estructurals i de reserva energètica, aquestes biomolècules han esdevingut de vital interès en els darrers anys, donada la seva rellevància en els processos de reconeixement cel·lular, regulació i senyalització, proliferació cel·lular i resposta immunitària (Descroix *et al.*, 2006; Stern *et al.*, 2006; Taylor & Gallo, 2006; Whitelock & Iozzo, 2005). Atesa la gran diversitat estructural i funcional, aquestes biomolècules són objecte d'estudi en nombrosos camps de la ciència, des d'on s'espera explotar el seu potencial com a dianes terapèutiques, o com a nous materials biocompatibles i amb noves propietats.

Els polisacàrids i els seus derivats presenten una gran complexitat estructural, derivada principalment de la formació d'enllaços glicosídics. La seva obtenció ha resultat una tasca difícil d'abordar des de la síntesi química tradicional, degut a la presència d'un gran nombre de funcionalitats hidroxil amb reactivitat semblant. Al final de la dècada dels 90, i donat l'interès creixent en disposar de quantitats importants d'aquests productes, es van desenvolupar noves metodologies sintètiques, amb la incorporació d'etapes enzimàtiques. Es pretenia donar resposta a la gran demanda iniciada per la glicobiologia i l'enginyeria dels materials. Darrerament, s'han assolit millores importants tant pel que fa als mètodes químics com enzimàtics per a la producció *in vitro* de polisacàrids naturals o nous polisacàrids amb propietats diferents. Amb els mètodes d'automatització en fase sòlida sorgits darrerament (Seeberger i Werz, 2005) s'ha reduït considerablement l'esforç químic sintètic, però el control regioespecífic i estereoespecífic continua sense resoldre's, limitant els resultats a l'obtenció d'oligosacàrids a nivell de mil·ligrams. D'altra banda, la síntesi enzimàtica proporciona respostes diferents per abordar el problema i esdevé una eina útil donades les seves particularitats: elevada activitat catalítica, absència de reaccions secundàries, condicions de reacció suaus i, sobretot, una alta estereoselectivitat i regioselectivitat.

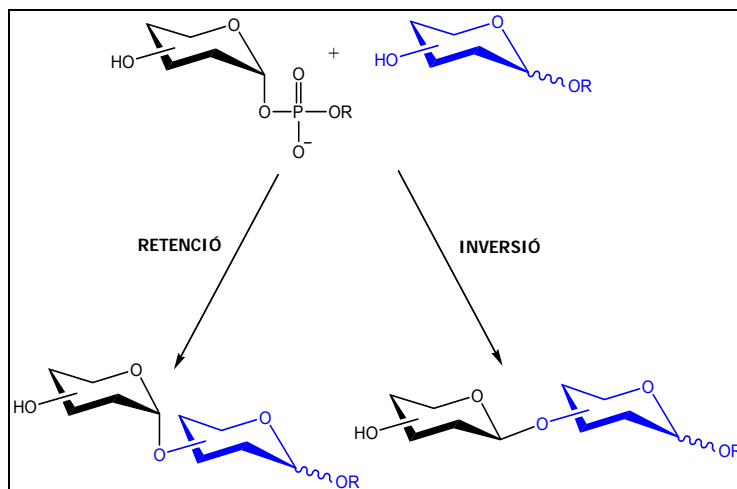
Existeix una gran varietat de proteïnes involucrades en el reconeixement i processament de carbohidrats. Això dona peu a què la síntesi *in vitro* d'aquestes molècules es pugui abastir d'un ampli ventall d'enzims amb activitats molt diverses: glicosiltransferases, glicosidases i més recentment glicosintases són les noves eines per a la química dels sacàrids.

### 1. Eines sintètiques

#### 1.1. Glicosiltransferases

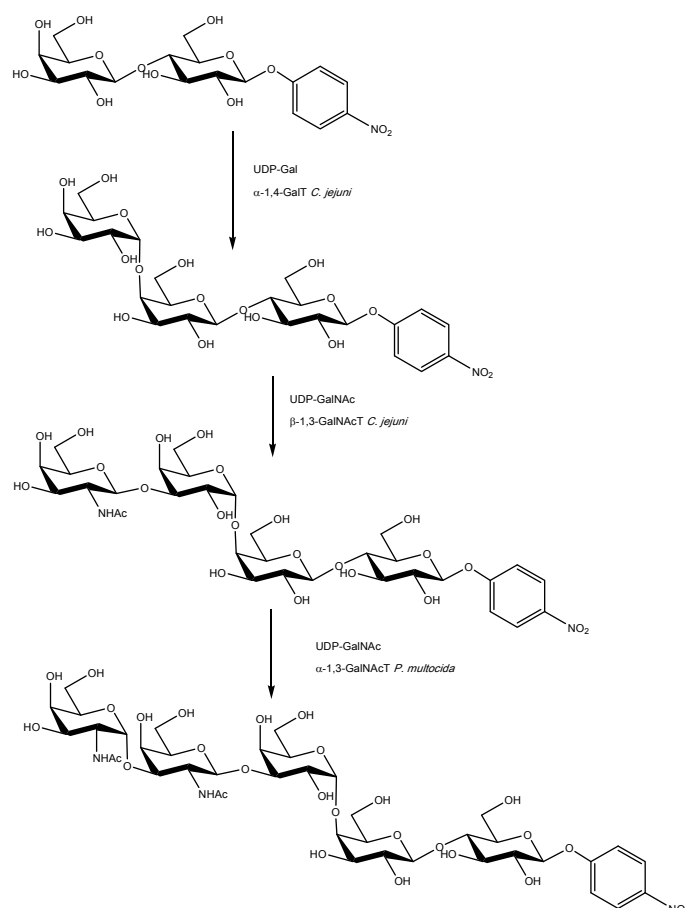
La biosíntesi d'oligosacàrids, polisacàrids i glicoconjugats corre a càrrec de les glicosiltransferases (GTs; EC 2.4.x.y.). Aquests enzims, catalitzen la transferència d'un sacàrid, normalment un monosacàrid, des d'un substrat donador a un substrat acceptor. Els acceptors més comuns corresponen a altres sacàrids, però aquests poden ser també lípids, proteïnes, àcids nucleics, antibiòtics o altres molècules petites. A banda de la transferència del residu glicosídic a l'hidroxil nucleofílic de l'acceptor, també són capaces de catalitzar la transferència a nucleòfils de

nitrogen (glicoproteïnes), sofre (tioglicòsids en plantes) i carboni (C-glicosidacions en antibiòtics). Actuen de manera processiva en la biosíntesi d'homopolisacàrids i en combinació amb altres GTs per a produir heteropolisacàrids. Les reaccions catalitzades per GTs es caracteritzen per presentar una elevada estereoespecificitat i regioespecificitat.



**Figura 1.** Mecanismes de les glicosiltransferases en relació a l'estereoquímica de l'enllaç format.

Les GTs es poden classificar en funció del donador glicosídic (Tipus Leloir o no Leloir), de l'estereoquímica de la transferència per analogia a les glicosidases (retenció o inversió de configuració, figura 1), en base a la seqüència d'aminoàcids donant lloc a 94 famílies ([www.cazy.org](http://www.cazy.org)) i del plegament (superfamílies GTA, GTB i GTC). En cèl·lules eucariotes les reaccions de glicosidació es localitzen fonamentalment al reticle endoplasmàtic i complex de Golgi i les glicosiltransferases implicades són proteïnes transmembrana amb un domini catalític C-terminal globular exposat a la part del lumen. Això implica que l'ús d'aquest enzims com a eines sintètiques *in vitro* depèn de la seva disponibilitat com a proteïnes recombinants del seu domini catalític. A l'actualitat, i atès l'alt desenvolupament de les tècniques de sobreexpressió, les glicosiltransferases han esdevingut eines de vital importància per a la preparació d'oligosacàrids i gliconjugats. Existeixen un gran nombre de GTs recombinants emprades amb èxit en síntesis. La GT més àmpliament emprada en biocatàlisi és la  $\beta$ -1,4-galactosiltransferasa de llet de vaca ( $\beta$ -1,4-GalT), que es troba a nivell comercial des de fa 30 anys. Aquest enzim catalitza la transferència d'una galactosa des del donador activat UDP-Gal a l'hidroxil en posició 4 d'una unitat d'N-acetilglucosamina (GlcNAc) donant lloc al disacàrid Gal $\beta$ -1,4GlcNAc (LacNAc). Una altra aplicació de glicosiltransferases ha estat la producció d'oligosacàrids presents a la superfície de les cèl·lules de mamífers. D'aquesta manera s'han obtingut fins a 24 oligosacàrids pertanyents a grups sanguinis de cèl·lules de mamífers i antígens associats a tumors basats en polímers d'N-acetilglucosamina (Vasilii *et al.*, 2006). També a partir de glicosiltransferases bacterianes s'han assolit estructures antigèniques de difícil síntesi per via química, com el pentasacàrid de Forssman produït per acció de dues GT de *Campylobacteri jejuni* i una altra de *Pasteurella multocida* tal i com es mostra a la figura 2 (Houliston *et al.*, 2009).



**Figura 2.** Síntesi de l'antigen de Forssman a partir de 3 glicosiltransferases bacterianes.

Malauradament, en molts casos el producte final no presenta prou valor per justificar les aproximacions quimioenzimàtiques amb GT, que resulten inviables per l'elevat cost dels substrats donadors requerits. El desenvolupament de metodologies per a regenerar-los mitjançant reaccions acoblades ha permès disminuir-ne el cost, donant lloc a síntesis més eficients. És el cas de la síntesi de l'hialurà emprant la hialuransintasa d'*Streptococcus equisimilis* (De Luca *et al.*, 1995).

Els darrers anys hi ha hagut un augment important en la incorporació de GTs a estratègies sintètiques. La contínua caracterització estructural i funcional, la seva producció a nivell recombinat i la generació de metodologies per a la regeneració dels cofactors dels donadors glicosídics han permès que esdevinguin eines sintètiques útils per a la preparació d'oligosacàrids i glicoconjugats d'alt valor afegit.

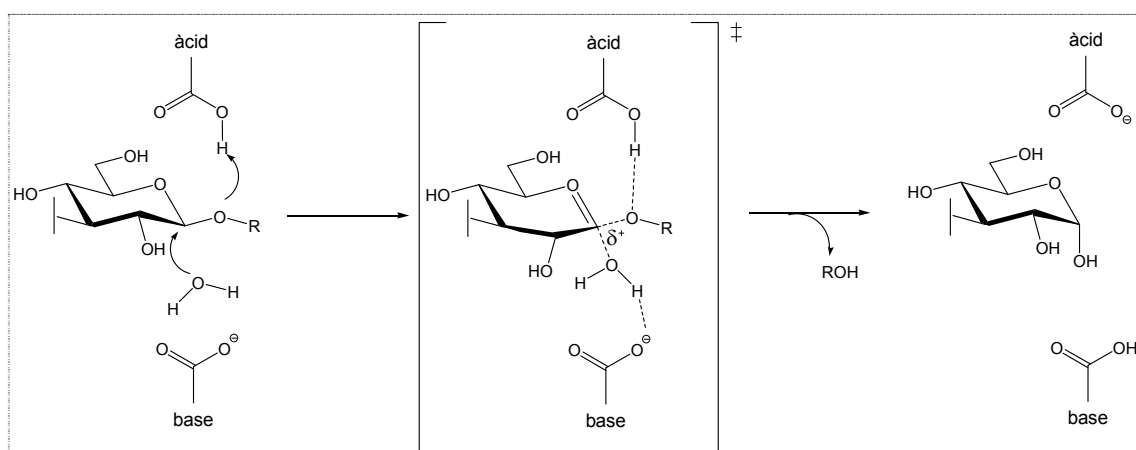
## 1.2. Glicosidases

Les glicosidases són enzims que catalitzen la hidròlisi estereoespecífica de sacàrids i glicoconjugats, actuant sobre enllaços tipus O-, S- i N-glicosídics d'anells de furanoses o piranoses. En un primer nivell es classifiquen com a *exo* o *endo*-glicosidases, atenent a la localització de l'enllaç glicosídic hidrolitzat en la cadena del substrat. D'aquesta manera, les *exo*-

glicosidases alliberen mono o disacàrids situats en un extrem de la cadena, mentre que les endo-glicosidases, poden actuar en qualsevol punt d'aquesta. La naturalesa d'aquesta activitat exo/endo depèn de la topologia del centre actiu, que en definitiva serà la que orientarà la forma d'unió del substrat a hidrolitzar. Dins de la diversitat estructural hi ha tres tipus de topologies de centre actiu: *butxaca* (pocket), *escletxa* (cleft) i *túnel* (tunnel). La primera pot acomodar extrems de sacàrids, de manera que és pròpia d'enzims exo, tals com les  $\beta$ -glucosidases,  $\beta$ -galactosidases, sialidases, neuraminidases i les exo-polisacaridases com la  $\beta$ -amilasa. Els altres dos tipus de centre actiu permeten la unió de més unitats sacarídiques i no necessàriament per l'extrem de la cadena. Les de tipus *escletxa* són presents a les endo-polisacaridases, o endo-glucanases. Les de tipus *túnel*, iguals que les anteriors però on els llaços de la proteïna cobreixen tot el centre actiu, només s'han observat en les cel·lobiohidrolases.

### 1.2.1. Mecanismes

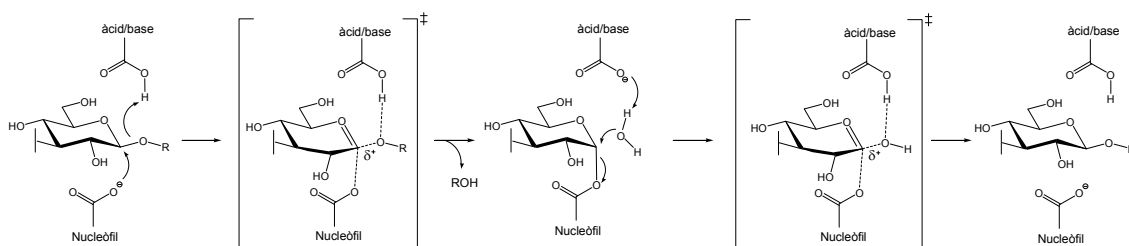
Tal i com s'ha esmentat amb les GTs, les glicosidases presenten dos mecanismes en relació a l'estereoquímica resultant de l'enllaç hidrolitzat en el substrat: d'una banda hi ha les que inverteixen la configuració anomèrica i de l'altre les que la retenen. Tot i que ambdós tipus operen per catalisi àcid-base general, els seus mecanismes distints també corresponen a una topologia diferenciada del centre actiu. Ambdós mecanismes foren proposats per Koshland (1953) i posteriorment revisats per nombrosos autors. Les glicosidases que actuen amb inversió de configuració presenten dos residus catalítics àcid general i base general separats, a una distància aproximada d'uns 10 Å l'un de l'altre (Davies i Henrissat, 1995; McCarter i Withers, 1994). El seu funcionament és a través d'una única etapa en què una molècula d'aigua produeix un desplaçament tipus  $S_N2$  hidrolitzant l'enllaç glicosídic i invertint la configuració del nou extrem reductor (figura 3).



**Figura 3.** Mecanisme catalític de les glicosidases que actuen per inversió de configuració.

Les glicosidases que actuen amb retenció de configuració segueixen un mecanisme enzimàtic de doble desplaçament via formació d'un intermedi glicosil-enzim i posterior hidròlisi (figura 4). Els residus catalítics essencials es troben a una distància de 5 Å (Davies i Henrissat, 1995;

McCarter i Withers, 1994). El mecanisme presenta dues etapes: en la primera o glicosidació, l'aminoàcid que actua d'àcid general protona l'oxigen glicosídic, mentre que el carboxilat de l'aminoàcid que actua de nucleòfil ataca el carboni anomèric, escindint l'enllaç glicosídic i donant lloc a un intermedi glicosil-enzim; la segona etapa o desglicosidació, s'inicia quan una molècula d'aigua, la nucleofília de la qual ha estat augmentada per la base conjugada del residu àcid general, ataca l'intermedi glicosil-enzim, rendint un sucre lliure amb la mateixa configuració que l'enllaç trencat.



**Figura 4.** Mecanisme catalític de les glicosidases que actuen amb retenció de configuració.

### 1.2.2. Transglicosidació amb glicosidases que actuen amb retenció de configuració.

En determinades condicions, es pot afavorir la reacció reversa de la reacció normal d'hidròlisi i emprar les glicosidases com a catalitzadors en la síntesi d'oligosacàrids. Així, atenent al mecanisme d'hidròlisi, existeixen dues estratègies per emprar aquests enzims en la síntesi d'oligosacàrids. D'una banda, desplaçant l'equilibri de la reacció anterior cap a la formació de l'enllaç glicosídic (control termodinàmic de la reacció de condensació) i de l'altra, l'ús de donadors glicosídics activats (control cinètic de la reacció de transglicosidació).

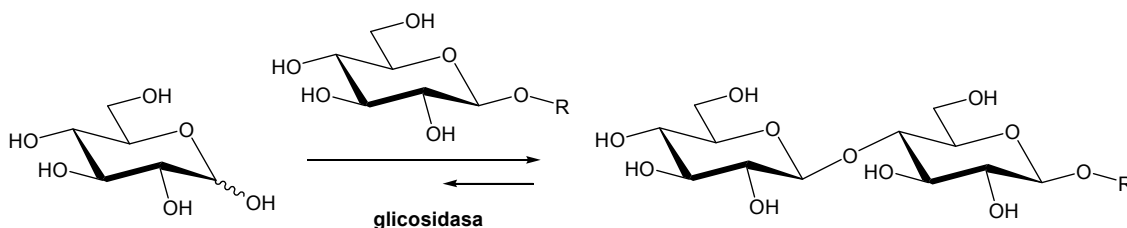
#### a) Control termodinàmic

L'equilibri hidròlisi - síntesi presenta un balanç energètic aproximat de  $4 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$  favorable a la reacció d'hidròlisi en les condicions normals d'operació de les glicosidases (Wong i Whitesides, 1994) (figura 5). Però aquest equilibri es pot desplaçar alterant algunes d'aquestes condicions de reacció (Vic i Crout, 1994):

- L'ús de concentracions de substrat elevades o l'ús d'acceptors que alhora actuïn de solvent. D'aquesta manera es minimitza la presència d'aigua en el centre actiu de manera que, i donat que en l'entorn del centre actiu un acceptor glicosídic es comporta millor que l'aigua com a acceptor, s'afavoreix la reacció de transglicosidació.
- Realitzar reaccions en medis hidroorgànics per tal de reduir l'activitat de l'aigua. En general, aquesta metodologia topa amb la inestabilitat dels enzims als dissolvents orgànics, de manera que s'empren en baixa proporció. En alguns casos concrets, però, s'han emprat proporcions elevades de cosolvent sense pèrdua d'activitat. També cal destacar que de

vegades un mateix enzim presenta una pèrdua d'activitat diferent en funció del dissolvent emprat (Scheckermann *et al.*, 1997).

- Un increment en la temperatura de reacció pot comportar en alguns casos una millora en el rendiment sintètic.



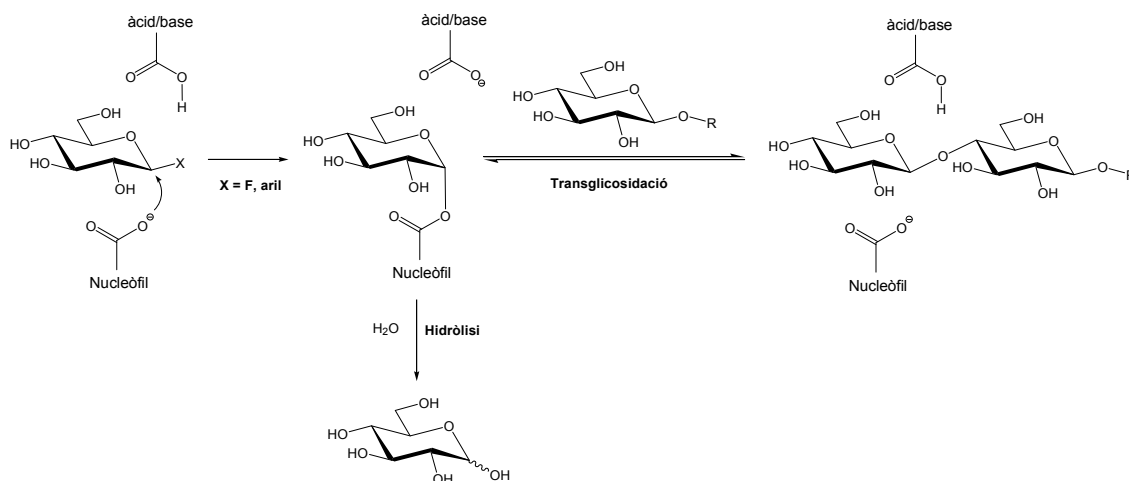
**Figura 5.** Reacció reversa d'hidròlisi catalitzada per glicosidases sota control termodinàmic.

Amb tot, l'aplicació de l'aproximació termodinàmica és relativament útil per a la preparació de sacàrids simples, sovint disacàrids. Els rendiments són baixos (<20%), convertint-se en una metodologia poc emprada per sí sola.

b) Control cinètic

Les glicosidases que actuen amb retenció de configuració, presenten un mecanisme on l'intermedi glicosil-enzim és atacat per una molècula d'aigua per rendir el producte d'hidròlisi. En determinades condicions es poden emprar acceptors diferents a l'aigua per interceptar aquest intermedi i donar lloc a un producte amb la mateixa configuració que l'enllaç a escindir inicialment. Aquesta estratègia es basa en la major reactivitat de l'acceptor glicosídic respecte a l'aigua, de manera que el seu èxit depèn de l'augment de la velocitat de formació de l'intermedi glicosil-enzim, fet que s'aconsegueix amb l'ús de donadors activats. Malgrat aquest augment de la velocitat de transglicosidació enfront de la d'hidròlisi, els rendiments no excedeixen el 40%. La reversibilitat de la segona etapa de la reacció de transglicosidació (figura 6), fa que els productes formats siguin alhora substrats per a la reacció d'hidròlisi. Com la branca hidrolítica és irreversible, a mesura que es va formant el producte d'hidròlisi l'equilibri es desplaça en aquest sentit. Es per aquest motiu, que el control de les condicions de reacció és el factor clau per a l'èxit de la metodologia (Planas i Fajjes, 2002).





**Figura 6.** Reacció de transglicosidació catalitzada per glicosidases que actuen amb retenció de configuració.

Per a una aplicació eficient del control cinètic de la reacció de transglicosidació catalitzada per glicosidases que actuen amb retenció de configuració cal seguir les següents estratègies:

- L'ús d'una alta concentració d'acceptor glicosídic, per sobre la seva  $K_d$ , per tal d'afavorir l'ocupació dels subestis destinats a l'acceptor (Finch i Yoon, 1997).
- L'ús de donadors glicosídics activats (Williams i Withers, 2000) com els fluorurs de glicosil i els aril-glicòsids. Aquests substrats presenten l'avantatge que el grup sortint (anió fluorur o fenol) és un acceptor pobre i no competeix amb l'acceptor glicosídic de la reacció; A més, aquests substrats esdevenen millors donadors (en termes de  $k_{cat}/K_M$ ) que el propi producte format, reduint la reacció en competència d'hidròlisi.

També s'han emprat altres donadors glicosídics com el vinil- $\beta$ -galactòsids, els nitropiridilglicòsids o els glicals (veure article de revisió Planas i Fajjes, 2002), que en determinades condicions han donat bons resultats.

Amb tot, la síntesi de sacàrids emprant l'aproximació cinètica presenta millors resultats que per control termodinàmic, amb rendiments de reacció que oscil·len entre el 40 - 50%. De vegades la combinació d'aquesta metodologia amb l'ús de cosolvents orgànics incrementa els rendiments sintètics, essent necessari un estudi de les condicions de reacció per a cada disseny sintètic.

### 1.2.3. Síntesi enzimàtica de polisacàrids artificials per transglicosidació amb endo-glicosidases

Una de les aplicacions rellevants de l'activitat transglicosidasa de les endo-glicosidases que actuen amb retenció de configuració és la capacitat d'autocondensar el donador glicosídic per generar polisacàrids. Si bé, degut a l'activitat hidrolítica de l'enzim, els graus de polimerització que s'obtenen no superen DPs de 30 amb rendiments moderats, aquesta metodologia ha estat emprada en la síntesi de polisacàrids. Seguidament es resumeixen les diferents aplicacions

reportades, per tal de contextualitzar l'abast de la nova tecnologia que es desenvolupa en aquesta Tesi per a la producció de polisacàrids artificials d'alt pes molecular (Capítol 3).

Els millors resultats per la síntesi *in vitro* de polisacàrids amb glicosidases s'han obtingut a partir de l'estratègia de control cinètic (reacció de transglicosidació). L'estratègia alternativa de control termodinàmic (reacció de condensació) presenta baixa eficiència i a l'actualitat es limita a la preparació de disacàrids i alquilglicòsids.

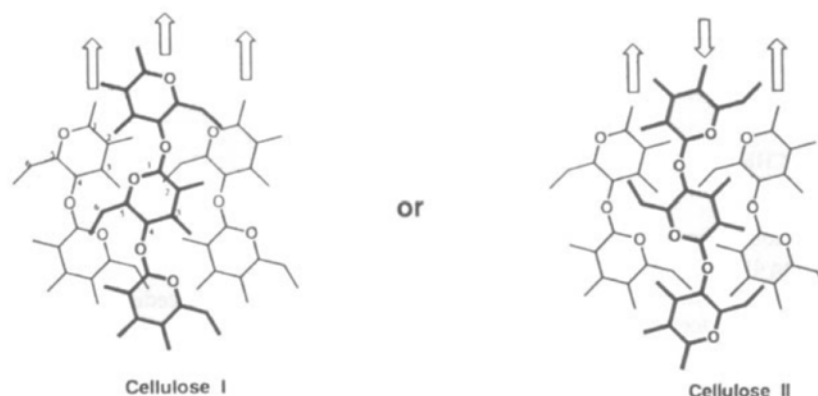
En aquest aspecte, es poden distingir dos tipus d'endo-glicosidases, les que actuen amb substrats activats i on l'enzim roman inalterat i aquelles en què la maquinària catalítica (residu nucleòfil) està present en el propi enzim. En funció de la família a la que pertanyen les glicosidases s'han desenvolupat dues aproximacions diferents.

### **A. Glicosidases amb retenció de configuració amb un residu nucleòfil catalític al centre actiu.**

Aquest grup engloba la major part de glicosidases que actuen amb retenció de configuració i que es caracteritzen per tenir presents els dos residu catalítics: l'àcid-base general i el nucleòfil. Els primers exemples empraren fluorurs de glicosil com a substrats en reaccions d'autocondensació catalitzades per cel·lulases, xilanases, amilases i  $\beta$ -glucanases.

En aquest punt, és important establir una cronologia dels treballs realitzats per a l'obtenció *in vitro* de cel·lulosa pel grup de Kobayashi i col·laboradors:

La cel·lulosa és la substància orgànica més abundant a la terra, fet que la converteix en una molècula representativa per a l'estudi dels polisacàrids. Es troba principalment com a component majoritari a les parets cel·lulars vegetals, en una proporció d'entre el 60 - 80%, juntament amb l'hemicel·lulosa (10-20%) i la lignina (10-30%). L'any 1991 Kobayashi i col·laboradors (Kobayashi et al., 1991) realitzaren la primera síntesi *in vitro* d'un polisacàrid per polimerització enzimàtica catalitzada per una cel·lulasa, emprant el fluorur de  $\beta$ -cel·lobiosil com a donador en un medi hidroorgànic ( $\text{CH}_3\text{CN}$ /tampó acetat 0.05 M, pH 5). En concret, la part insoluble del producte de reacció va resultar ser cel·lulosa sintètica. La seva estructura es confirmà per  $^{13}\text{C}$ -RMN, espectroscòpia d'IR, a més de comprovar que el producte era substrat de cel·lulases. Fou el primer exemple d'obtenció de cel·lulosa per via quimio-enzimàtica. De l'estudi es va despendre que en funció de la procedència de la cel·lulasa i de les condicions de reacció els rendiments oscil·laren entre el 8% i el 54 %, amb un grau de polimerització de fins a 22 glucoses (determinat per HPSEC del producte acetilat i emprant patrons de poliestirè). També el grau de cristal·linitat va resultar ser dependent de l'enzim emprat i de la seva puresa. Així, la part insoluble recuperada corresponia al polimorfisme de la cel·lulosa tipus II, d'elevada cristal·linitat amb un empaquetament on les cadenes es distribuïen de forma antiparal·lela (figura 7). En emprar concentracions de substrat o d'acetonitril més elevades, es van recuperar cel·lulooligosacàrids solubles en aigua amb graus de polimerització de 8 unitats de glucosa (determinats per HPLC).



**Figura 7.** Estructures al·lomòrfiques de la cel·lulosa tipus I i tipus II (Kobayashi, 2005)

Estudis posteriors (Lee et al., 1994) van permetre la síntesi del polimorfisme I de la cel·lulosa, que és la seva forma natural, per polimerització enzimàtica del substrat fluorur de  $\beta$ -cel·lobiosil amb una cel·lulasa parcialment purificada en medi hidroorgànic (figura 3.1). Aquest tipus d'empaquetament és resultat d'una agregació micel·lar de l'enzim parcialment purificat en el medi de reacció de manera que s'afavoreix l'arreglament de les cadenes de  $\beta$ -glucà amb la mateixa polaritat (empaquetament en forma paral·lela). Es tracta d'una organització metastable de la cel·lulosa a partir de la qual es pot obtenir la forma II per tractaments químics, sense que després es pugui retornar al polimorfisme tipus I. Presenta una morfologia en forma de microfibril·les que quan agreguen esdevenen fibres de cel·lulosa. Per tant, l'organització molecular de la cel·lulosa presenta principalment dos polimorfismes diferents: la cel·lulosa tipus I termodinàmicament metastable, produïda essencialment en organismes vius i la II, d'alta cristal·linitat, formada per cristalls individuals amb els eixos moleculars orientats de forma perpendicular al pla format, organitzant-se tridimensionalment de forma radial, donant lloc a esferulites. L'observació que la puresa de l'enzim i que les condicions de reacció eren claus per a obtenir un o altre polimorfisme (Kobayashi i Shoda, 1995) va comportar a l'aparició d'un nou concepte: la coroselectivitat o possibilitat de poder controlar la direcció en la que es va empaquetant la molècula durant la polimerització. Es defineix com la relació intermolecular generada en la formació d'una macromolècula en un arreglament espacial orientat, fruit d'interaccions supramoleculares (Kobayashi, 2005). D'aquesta manera, en les reaccions de polimerització, a banda de les relacions intramoleculares que apareixen en la formació d'enllaços covalents (quimioselectivitat, estereoselectivitat i regioselectivitat) cal ara sumar el concepte de coroselectivitat quan existeix un creixement preferencial en una direcció espacial i de la qual dependran les propietats físiques del material format.

Recentment, s'observà que el domini d'unió de cel·lulosa present a la cel·lulasa de *T. viride* jugava un paper important en la hidròlisi del producte però no en el procés de polimerització. Aquest fet es corroborà emprant la cel·lulasa recombinant EG II, que no presentava el mòdul d'unió de carbohidrats, i amb la qual es van obtenir els mateixos resultats que amb la proteïna completa (Nakamura et al., 2005).

Aquesta metodologia sintètica s'ha estès a altres polisacàrids com el xilà, l'amilosa o polisacàrids híbrids no naturals. D'aquesta manera, s'ha obtingut xilà artificial per polimerització enzimàtica del fluorur de  $\beta$ -xilobiosil en tampó acetat - acetonitril, amb un preparat enzimàtic amb activitat xilanasa (Kobayashi et al., 1996). El producte obtingut correspon a un polímer lineal de xiloses unides per enllaços  $\beta$ -1,4 amb un DP de 23 unitats i representa un nou material diferent als xilans naturals que presenten unitats d'àcid metilglucorònic i L-arabinosa a la cadena lateral.

També hi ha hagut intents d'obtenció d'amilosa, polímer de glucosa amb enllaços  $\alpha$ -1,4, a partir del fluorur d' $\alpha$ -maltosil per biocatàlisi d'una  $\alpha$ -amilasa. En aquest cas només s'obtingueren oligòmers d'amilosa de baix pes molecular (Kobayashi et al., 1992).

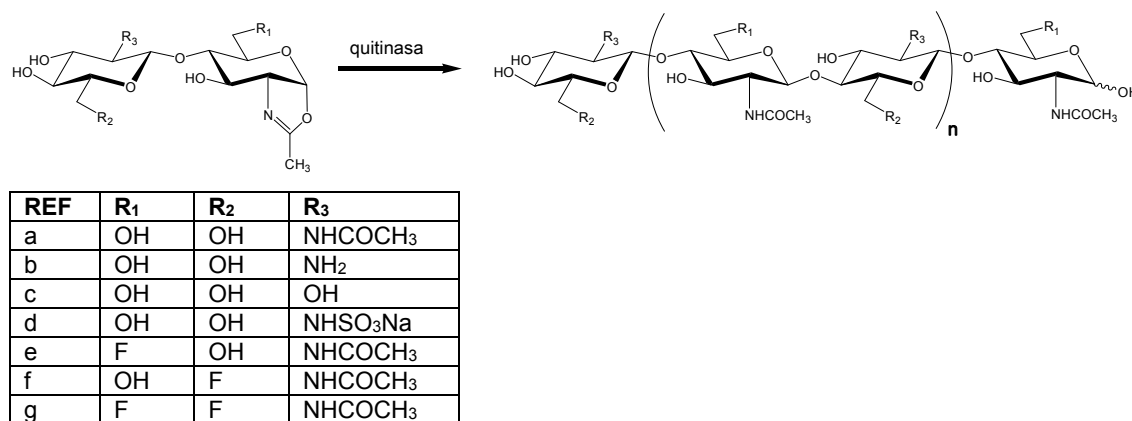
En l'àmbit dels polisacàrids no naturals, s'assolí la síntesi d'un híbrid cel·lulosa-xilà per polimerització del disacàrid sintètic fluorur de  $\beta$ -xilosil-1,4- $\beta$ -glucosil (Fujita et al., 1998) emprant una xilanasa i rendint un polímer amb DP de 12 unitats, constituït per enllaços  $\beta$ -1,4. Un altre exemple, en aquest cas un derivat de la cel·lulosa, es preparà a partir del fluorur de 6-O-metil- $\beta$ -cel·lobiosil per polimerització amb una cel·lulasa i rendint oligòmers de cel·lulosa amb l'hidroxil en C6 metilat de forma alternada (Okamoto et al., 1997). De forma similar també s'han obtingut tio-cel·luloglicòsacàrids partint de fluorur de 4-tio- $\beta$ -cel·lobiosil com a donador en medi hidroorgànic i catàlisi mitjançant la cel·lulasa Cel7B d'*Humicola insolens*.

Finalment, col·laboracions entre el Laboratori de Bioquímica de l'IQS i el grup de Driguez i col. Han donat lloc a la producció de glucans amb enllaços mixtes  $\beta$ -1,3 i  $\beta$ -1,4 per transglicosidació enzimàtica catalitzada per una 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus* emprant fluorurs de  $\beta$ -glicosil com a donadors (Viladot et al., 1997; Viladot et al., 1998; Hrmova et al., 1998).

### **B. Glicosidases amb retenció de configuració que actuen per catàlisi assistida per substrat**

A la natura, les quitinases (família 18) i hialuronidases (família 56), són enzims hidrolítics que no presenten residu nucleòfil en el centre actiu i operen segons una catàlisi assistida per substrat. El grup 2-acetamido del monosacàrid unit al subseu -1 actua de nucleòfil generant un intermedi oxazolini (Terwisscha van Scheltinga *et al.*, 1995; Williams *et al.*, 2002). L'aprofitament d'aquesta maquinària enzimàtica en sentit sintètic passa per emprar derivats 1,2-oxazolina com a substrats que mimetitzin l'intermedi de la reacció normal d'hidròlisi i a partir dels quals es pugui donar un poliaddició per obertura d'anell (figura 8, figura 9). Malgrat la presència de reaccions secundàries d'hidròlisi, els rendiments de polimerització oscil·len entre el 20 i el 75% amb graus de polimerització entre 6 i 88 unitats depenent de l'enzim i les condicions de reacció (per més detall veure la revisió Fajjes i Planas, 2007).

**B.1. Obtenció de derivats de quitina i quitosà a partir de quitinases de la família 18**



**Figura 8.** Polisacàrids artificials tipus quitina assolits per autocondensació de derivats 1,2-oxazolina en presència de quitinases de la família 18.

La primera síntesi enzimàtica de quitina va emprar l'oxazolina de la quitobiosa com a substrat. La reacció estava catalitzada per la quitinasa de *Bacillus* sp, l'activitat hidrolítica de la qual s'havia reduït establint condicions de reacció bàsiques (pH 10.6) en favor de la reacció d'autocondensació del donador glicosídic N,N'-diacetil-quitobiosa oxazolina (Kobayashi et al., 2001). Es van obtenir derivats sintètics de la quitina que presentaven unitats repetitives de GlcNAc unides per enllaços β-1,4, sense presència d'unitats de glucosamina. Es van determinar pesos moleculars superiors a 4000 Da que corresponien a polímers de 16 disacàrids units.

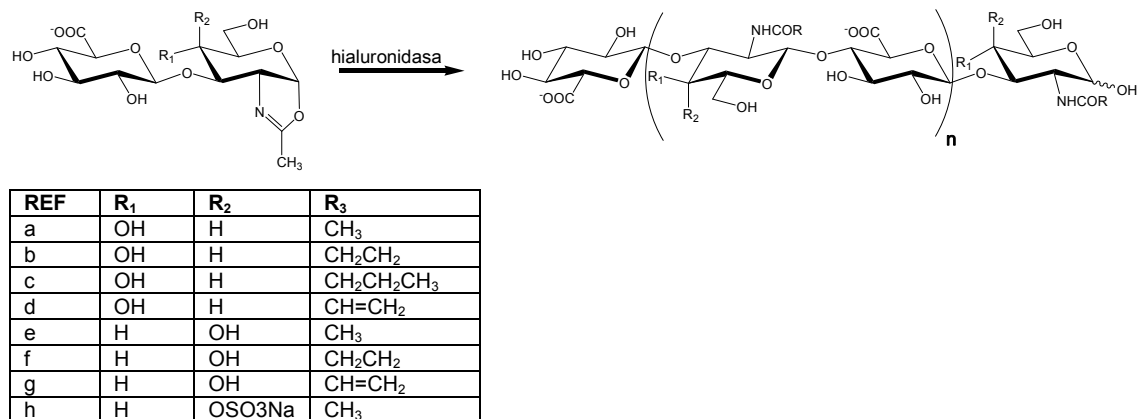
A l'any 2004, Kobayashi i col·laboradors (Sakamoto i Kobayashi, 2004) assajaren diferents quitinases amb derivats de l'oxazolina de l'N-acetil quitobiosa que presentaven diferents funcionalitats en posició C-2<sup>o</sup>, C-3 o C-6. Totes les proves donaren lloc a polimeritzacions amb control de la regioselectivitat i l'estereoquímica obtenint-se diferents híbrids de quitina amb estructures ben definides.

També es va obtenir un polisacàrid híbrid de quitina i quitosà a partir de quitinases comercials de *Bacillus* sp., *Streptomyces griseus* i *Serratia marcescens*. A partir de l'autocondensació del derivat amino en posició C-2 de l'oxazolina de l'N-acetil quitobiosa es va obtenir un polímer amb estructura alternada de N-acetilglucosamina i glucosamina unides per enllaços β-1,4 (Makino et al., 2006).

A partir de la quitinasa de *Bacillus* sp., i per autocondensació de l'oxazolina del disacàrid Glcβ4GlcNAc a pH 11, es va obtenir un híbrid de cel·lulosa i quitina amb un rendiment del 46% i que corresponia majoritàriament al dodecasacàrid (Kobayashi et al., 2006).

Altres polímers híbrids de quitina i quitosà N-sulfonat (Makino et al., 2007), quitooligosacàrids amb carboxilates en posició O-6<sup>o</sup> (Ochiai et al., 2004) i polímers de quitina fluorada en posició 6 a partir de disacàrids fluoroderivats de l'oxazolina de la diacetil quitobiosa (Makino et al., 2006) es varen obtenir per autocondensació assistida per quitinases.

**B.2. Obtenció d'hialurà i condroïtina mitjançant hialuronidases de la família 56.**



**Figura 9.** Polisacàrids artificials tipus hialurà y condroïtina assolits per autocondensació de derivats 1,2-oxazolina en presència de hialuronidases de la família 56.

Les hialuronidases de la família 56 són endo-glicosidases encarregades d'hidrolitzar l'enllaç β-1,4 de l'àcid hialurònic rendint unitats de GlcNAc i GlcA, a través de catàlisi assistida per substrat mitjançant un intermedi oxazolínic (Williams et al., 2002). També són capaces d'hidrolitzar la condroïtina, el sulfat de condroïtina i el sulfat de dermatà per l'enllaç l'enllaç β-1,4 de les unitats N-acetil-D-galactominil. La polimerització té lloc per poliaddició via obertura d'anell del corresponent substrat oxazolínic. Les hialuronidases accepten un ventall important de derivats de donadors d'oxazolina i la reacció transcorre sota control regioselectiu i estereoquímic obtenint-se polímers derivats del hialurà, la condroïtina i el dermatà (Kobayashi et al, 2006).

El primer mimètic de l'hialurà natural es va obtenir per poliaddició de l'oxazolina del disacàrid GlcAβ3GlcNAc emprant la hialuronidasa bovina testicular i la hialuronidasa ovina testicular (Kobayashi et al., 2001). La reacció es desenvolupà per autocondensació dels donadors oxazolínics a través de la formació d'enllaços β-1,4. Els graus de polimerització, distribució polimèrica i rendiments depenien de l'enzim emprat.

També s'assoliren polímers d'hialurà modificat, per cicloaddició de donadors oxazolínics amb diferents N-acil grups enlloc de l'N-acetil present a la natura. Els millors resultats es van assolir amb l'N-propil, N-butiril i l'N-acrioloil hialurònic àcids derivats (Kobayashi et al., 2006).

Pel que fa a la condroïtina sintètica, els primers exemples s'assoliren per autocondensació de l'oxazolina de l'N-acetil-condrosina (Glcβ1,3GalNAc) catalitzada per hialuronidases (Kobayashi et al 2003). Es van arribar a obtenir oligòmers amb pesos moleculars corresponent s a 22-24 unitats sacarídiques, del mateix ordre que la condroïtina natural. En general, el grau de polimerització i els rendiments per amb aquest substrats són menors que els obtinguts amb àcid hialurònic degut a l'elevada reacció d'hidròlisis del donadors emprats en les condicions de reacció emprades.

Els polímers de condroïtina modificada es van produir a partir dels mateix donador descrit anteriorment, l'oxazolina de l'N-acil-condrosina, amb diferents grups N-acil. Els millors resultats s'assoliren amb els derivats N-acroleil i N-propionil, després de llargs temps de reacció (oligòmers

de 12-14 unitats i 16-18 unitats amb rendiments de 46% i 19% respectivament) (Kobayashi et al., 2003).

Els oligòmers de la condroitina 4-sulfat es varen obtenir a partir de hialuronidases per autocondensació de l'oxazolina de l'N-acetilcondrosina 4-sulfat (Fujikawa et al., 2005). Els rendiments i graus de polimerització depenien de les condicions de reacció assolint-se oligòmers amb pesos moleculars compresos entre 9000 i 18400. Hi ha la possibilitat de regular el grau de sulfatació per copolimerització d'ambdues oxazolines, N-acetil condrosina i el seu corresponent C4 sulfat derivat (Kobayashi et al., 2006).

Finalment, fou possible l'aïllament de polisacàrids híbrid de hialurònic-condroitina obtinguts per copolimerització de les oxazolines de N-acetil-condrosina i l'N-acetil hialobiuronat (Kobayashi et al., 2006).

### **C. Polimerització amb glicosidases que actuen amb retenció de configuració amb substrats no modificats.**

#### **C.1. Glicosidases que actuen amb retenció de configuració**

Per tal d'assolir bons rendiments d'auto-transglicosidació amb aquest tipus d'enzims són necessàries certes modificacions a nivell de condicions de reacció per tal de reduir la incidència de la reacció d'hidròlisi del substrat. Els exemples més importants corresponen a l'obtenció d'oligosacàrids per alimentació (Zhen et al., 2006; Cheng et al., 2006), poli-N-acetil-lactosamines (Murata et al., 2003; Murata et al., 2005) i 1,3- $\beta$ -glucooligosacàrids amb una 1,3- $\beta$ -D-glucanasa marina (Giordano et al., 2006).

#### **C.2. Transglicosilases**

Les transglicosilases són enzims que actuen amb el mateix mecanisme que les glicosidases amb retenció de configuració, però que la seva activitat predominant és la transglicosidació de donadors sacarídics simples a oligosacàrids i polisacàrids. La família més estudiada correspon a les glucansucrases i fructosiltransferases que empren sucrosa com a donador.

Les glucansucrases transfereixen la unitat de glucosa de la sucrosa per formar diferent  $\alpha$ -glucans, mentre que la fructosiltransferasa transfereix la unitat de fructosa per a la formació de fructooligosacàrids i/o fructosans (levà o inulina).

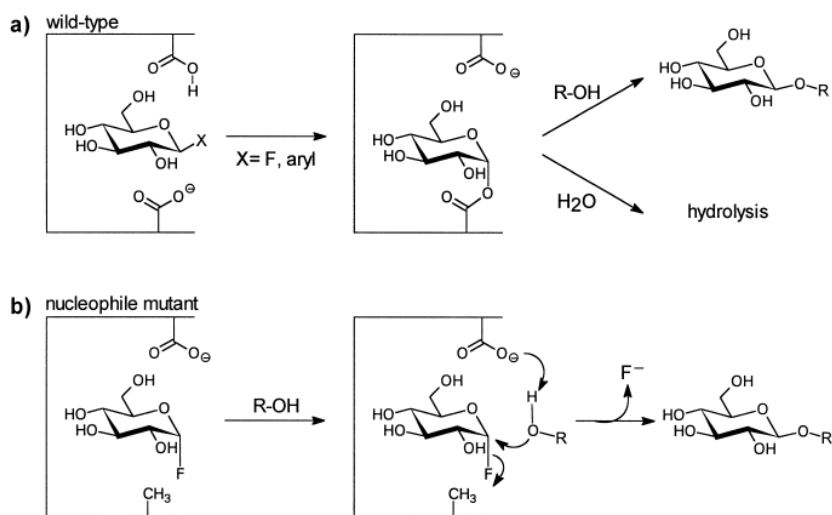
Aquesta família d'enzims presenten una alta variabilitat en especificitats per producte, ratis d'activitat i es per això que els esforços més recents s'han dirigit al desenvolupament enzimàtic per tal de poder racionalitzar les diferents activitats i millorar-ne els rendiment i propietats dels productes de reacció (Van Hijum et al., 2006; Remaud-Simeon et al., 2003).

L'any 2006, Monsan i col·laboradors (van der Veen et al., 2006) van obtenir un polímer tipus amilosa insoluble a partir d'una amilosucrase de la família 13 de *Neisseria polysaccharea*. L'estudi mutacional de l'enzim anterior va permetre l'obtenció de variants amb una alta activitat

polimerasa (increment del 60% respecte a l'activitat original) i la capacitat d'obtenir polímers amb majors graus de polimerització.

### 1.3. Glicosintases

El concepte glicosintasa va ser introduït l'any 1998 tant en exo-glicosidases (Mackenzie *et al.*, 1998) com en endo-glicosidases (Malet i Planas, 1998). Les glicosintases són glicosidases que actuen amb retenció de configuració les quals se'ls ha substituït el residu catalític que actua de nucleòfil per un residu no nucleofílic. Es tracte d'un redisseny racional del centre actiu que permet suprimir l'activitat hidrolasa afavorint l'activitat transglicosidasa. Són mutants hidrolíticament inactius, ja que sense nucleòfil no es pot formar l'intermedi glicosil-enzim, però capaços de catalitzar la síntesi regioespecífica i estereoespecífica de glicòsids en emprar donadors glicosídics activats (figura 10). Aquests donadors són fluorurs de glicosil amb la configuració anomèrica oposada a la del substrat normal de l'enzim no mutat; això és, mimetitzen la configuració anomèrica de l'intermedi glicosil-enzim i són capaços de reaccionar amb un acceptor. L'ús dels fluorurs de glicosil com a donadors respon a diverses raons: en primer lloc, l'àtom de fluor és de mida petita de manera que pot ser acomodada amb facilitat a l'espai generat en mutar el residu nucleòfil, normalment un carboxilat, per un residu més petit; d'altra banda el fluorur esdevé suficientment estable per a què la hidròlisi espontània dels fluorurs de glicosil sigui negligible enfront dels processos enzimàtics (Faijes *et al.*, 2003) i alhora suficientment reactiu per ser alliberat en una reacció enzimàtica.



**Figura 10.** Comparativa entre la metodologia glicosintasa i l'aproximació per control cinètic amb glicosidases que actuen amb retenció de configuració.

La manca del residu nucleòfil permet que el producte de transglicosidació no pugui ser hidrolitzat; aquest s'acumula, i donat que la reacció de glicosidació està afavorida cinèticament, s'obtenen rendiments de transglicosidació elevats. Al llarg dels anys, aquest procediment ha estat ampliat a nombroses exo-glicosidases i endo-glicosidases que actuen amb retenció de configuració, de



manera que a l'actualitat hi ha disponibles una important bateria de glicosintases amb especificitats diferents que permeten cobrir gran part de la síntesi d'oligosacàrids i glicoconjugats. Això respon al fet que el redisseny basat en la mutació del residu que actua de nucleòfil és d'aplicabilitat generalitzada.

### 1.3.1 Aplicacions de les glicosintases

Les glicosintases han esdevingut una metodologia completament establerta e implementada en protocols sintètics per a la síntesi d'oligosacàrids, polisacàrids i glicoconjugats. El fet que siguin catalitzadors amb l'activitat hidrolítica suprimida permeten l'obtenció de productes estables i rendiments elevats. Les aplicacions sintètiques, però, depenen del tipus de glicosintasa emprada: així les exo-glicosintases són bons catalitzadors per a la condensació de monosacàrids i per reaccions d'elongació. En canvi, les endo-glicosintases s'empren en la síntesi d'oligosacàrids i polisacàrids, així com l'assemblatge d'unitats sacarídiques importants.

Enzim (Organisme)	GH	Mutants	Donador Glicosídic	Enllaç Format	Referència
$\beta$ -glucosidasa ( <i>Agrobacterium faecalis</i> )	1	E358A E358S E358G	Glc $\alpha$ F Gal $\alpha$ F	$\beta$ -1,4 $\beta$ -1,3	Mackenzie <i>et al.</i> , 1998 Mayer <i>et al.</i> , 2000
$\beta$ -glucosidasa ( <i>Sulfolobus solfataricus</i> )	1	E387G	Glc $\alpha$ F Glc $\beta$ 2Np Gal $\beta$ 2Np	$\beta$ -1,3 $\beta$ -1,4 $\beta$ -1,6	Trincon <i>et al.</i> , 2000
$\beta$ -mannosidasa ( <i>Cellulomonas fimi</i> )	2	E519S	Man $\alpha$ F	$\beta$ -1,3 $\beta$ -1,4	Nashiru <i>et al.</i> , 2001
$\alpha$ -glucosidasa ( <i>Schizosaccharomyces pombe</i> )	31	D481G	Glc $\beta$ F	$\alpha$ -1,4 $\alpha$ -1,6	Okuyama <i>et al.</i> , 2002
$\beta$ -galactosidasa ( <i>Escherichia coli</i> )	2	E537S E794D/E537S	Gal $\alpha$ F	$\beta$ -1,6	Jakeman i Withers, 2002
$\beta$ -glucosidasa ( <i>Thermosphaera aggregans</i> )	1	E386G	Glc $\beta$ 2Np Gal $\beta$ 2Np	$\beta$ -1,3 $\beta$ -1,4 $\beta$ -1,6	Perugino <i>et al.</i> , 2003
$\beta$ -glucosidasa ( <i>Pyrococcus furiosus</i> )	1	E372A	Glc $\beta$ 2Np	$\beta$ -1,3	Perugino <i>et al.</i> , 2003
$\beta$ -glucosidasa ( <i>Thermus thermophilus</i> )	1	E338A E338G E338S	Glc $\alpha$ F Gal $\alpha$ F	$\beta$ -1,3 $\beta$ -1,6	Drone <i>et al.</i> , 2005 Teze <i>et al.</i> , 2013
$\beta$ -glucosidasa ( <i>Streptomyces sp.</i> )	1	E383A	Glc $\alpha$ F Gal $\alpha$ F	$\beta$ -1,3 $\beta$ -1,4	Fajjes <i>et al.</i> , 2006
$\beta$ -glucuronidase ( <i>Thermotoga maritima</i> )	2	E476A E476G	GluA $\alpha$ F GalA $\alpha$ F	$\beta$ -1,3	Mulleger <i>et al.</i> , 2006
exo-oligoxilanas ( <i>Bacillus halodurans</i> )	8	D263C D263N Y198F	Xil $\beta$ 4Xil $\alpha$ F	$\beta$ -1,4	Honda i Kitaoka, 2006 Honda <i>et al.</i> , 2008
$\beta$ -xilosidasa ( <i>Geobacillus stearothermophilus</i> )	52	E335A E335S E335G	Xil $\alpha$ F	$\beta$ -1,3 $\beta$ -1,4	Ben-David <i>et al.</i> , 2007
$\beta$ -glucosidase ( <i>Oryza sativa</i> )	1	E414A E414S E414G	Gal $\alpha$ F	$\beta$ -1,4 $\beta$ -1,3	Hommalai <i>et al.</i> , 2007 Pengthaisong <i>et al.</i> , 2012A Pengthaisong <i>et al.</i> , 2012B
$\beta$ -glucuronidasa ( <i>Escherichia coli</i> )	2	E504A E504G	GluA $\alpha$ F	$\beta$ -1,1	Wilkinson <i>et al.</i> , 2008
$\alpha$ -L-fucosidasa ( <i>Bifidobacterium bifidum</i> )	95	D766G	Fuc $\beta$ F	$\alpha$ -1,2	Wada <i>et al.</i> , 2008
$\alpha$ -L-fucosidasa ( <i>Sulfolobus solfataricus</i> )	29	D242S D242G	L-Fuc $\beta$ N <sub>3</sub>	$\alpha$ -1,3 $\alpha$ -1,4	Cobucci-Ponzano <i>et al.</i> , 2009
$\alpha$ -L-fucosidasa ( <i>Thermotoga maritima</i> )	29	D224G	L-Fuc $\beta$ N <sub>3</sub>	$\alpha$ -1,3 $\alpha$ -1,4	Cobucci-Ponzano <i>et al.</i> , 2009
$\alpha$ -galactosidasa ( <i>Thermotoga maritima</i> )	36	D327G	Gal $\beta$ N <sub>3</sub>	$\alpha$ -1,2 $\alpha$ -1,3 $\alpha$ -1,4 $\alpha$ -1,6	Cobucci-Ponzano <i>et al.</i> , 2011
$\beta$ -glycosidase ( <i>Thermus nonproteolyticus</i> )	1	E338A	Glc $\alpha$ F Gal $\alpha$ F D-Fuc $\alpha$ F	$\beta$ -1,3 $\beta$ -1,4	Wei <i>et al.</i> , 2013

## INTRODUCCIÓ

Enzim (Organisme)	GH	Mutants	Donador Glicosídic	Enllaç Format	Referència
$\beta$ -glucosidase ( <i>Thermotoga neapolitana</i> )	1	E349A E349G E349S	Glc $\alpha$ F Gal $\alpha$ F D-FucaF	$\beta$ -1,3 $\beta$ -1,4 $\beta$ -1,6	Pozzo <i>et al.</i> , 2014
$\beta$ -glucanase ( <i>Candida albicans</i> )	5	E292S	Glc $\alpha$ F	$\beta$ -1,6 $\beta$ -1,3 $\beta$ -1,4	Nakatani <i>et al.</i> , 2014
$\beta$ -galactosidase ( <i>Bacillus circulans</i> )	35	E233G	Gal $\alpha$ F	$\beta$ -1,3	Li i Kim, 2014
$\alpha$ -glucosidase ( <i>Thermoplasma acidophilum</i> )	31	D408G	Glc $\alpha$ 4Glc	$\alpha$ -1,4	Sungmin <i>et al.</i> , 2014 Park <i>et al.</i> , 2014

Taula 1. Exo-glicosintases descrites fins al 2014.

Enzim (Organisme)	GH	Mutants	Donador glicosídic	Enllaç Format	Referència
1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa ( <i>Bacillus licheniformis</i> )	16	E134A E134S E134G	(Glc $\beta$ 4Glc) $_n$ $\beta$ 3Glc $\alpha$ F	$\beta$ -1,4	Malet i Planas, 1998
1,4- $\beta$ -glucanasa ( <i>Humicola insolens</i> )	7	E197A E197S	Glc $\beta$ 4Glc $\alpha$ F Gal $\beta$ 4Glc $\alpha$ F	$\beta$ -1,4	Fort <i>et al.</i> , 2000
1,3- $\beta$ -glucanasa ( <i>Hordeum vulgare</i> )	17	E231A E231G E231S	Glc $\beta$ 3Glc $\alpha$ F	$\beta$ -1,3	Hrmova <i>et al.</i> , 2002
$\beta$ -mananasa Man26A ( <i>Cellvibrio japonicus</i> )	26	E320G E320S	Man $\beta$ 4Man $\alpha$ F	$\beta$ -1,4	Jahn <i>et al.</i> , 2003
1,3- $\beta$ -glucanasa ( <i>Pyrococcus furiosus</i> )	16	E170A	Glc $\beta$ 3Glc $\alpha$ F	$\beta$ -1,3 $\beta$ -1,4	van Lieshout <i>et al.</i> , 2004
glicoceramidasa ( <i>Rhodococcus</i> sp.)	5	E351S E351G E351A E351/D324	SiI3'Lac $\alpha$ F	$\beta$ -1,1	Vaughan <i>et al.</i> , 2006 Rich i Withers, 2012
1,4- $\beta$ -xilanas ( <i>Clostridium stercorarium</i> )	10	E293G E293A E293S	Xil $\beta$ 4Xil $\alpha$ F	$\beta$ -1,4	Sugimura <i>et al.</i> , 2006
1,4- $\beta$ -xilanas ( <i>Bacillus halodurans</i> )	10	E301G E301A E301S	Xil $\beta$ 4Xil $\alpha$ F	$\beta$ -1,4	Sugimura <i>et al.</i> , 2006
1,4- $\beta$ -xilanas ( <i>Cellulomonas fimi</i> Cex)	10	E233G E233A E233S	Xil $\beta$ 4Xil $\alpha$ F	$\beta$ -1,4	Sugimura <i>et al.</i> , 2006
1,4- $\beta$ -xilanas ( <i>Thermotoga maritima</i> )	10	E259G E259A E259S	Xil $\beta$ 4Xil $\alpha$ F	$\beta$ -1,4	Sugimura <i>et al.</i> , 2006
1,4- $\beta$ -xilanas ( <i>Cellulomonas fimi</i> CFX)	10	E235G	Xil $\beta$ 4Xil $\alpha$ F	$\beta$ -1,4	Kim <i>et al.</i> , 2006
1,4- $\beta$ -glucanasa ( <i>Trichoderma reesei</i> )	7	E196A	Lac $\alpha$ F	$\beta$ -1,4	Blanchard <i>et al.</i> , 2007
Xyloglucan endotransglicosidase ( <i>Populus tremula</i> x <i>tremuloides</i> )	16	E85G E85A E85S	XXXG $\alpha$ F XLLG $\alpha$ F	$\beta$ -1,4	Piens <i>et al.</i> , 2007
1,4- $\beta$ -glucanasa ( <i>Clostridium cellulolyticum</i> )	5	E307G	Cel $\alpha$ F Lac $\alpha$ F	$\beta$ -1,3 $\beta$ -1,4	Tao <i>et al.</i> , 2008
$\beta$ -N-acetylglucosaminidase ( <i>Mucor hiemalis</i> )	85	N175Q N175A	sacàrid oxazolina	$\beta$ -1,4	Umekawa <i>et al.</i> , 2009
$\beta$ -N-acetylglucosaminidase ( <i>Arthrobacter protophormiae</i> )	85	N171A	sacàrid oxazolina	$\beta$ -1,4	Huang <i>et al.</i> , 2009
Xyloglucanase ( <i>Tropaeolum majus</i> )	16	E94A E94S E94G	XXXG $\alpha$ F XLLG $\alpha$ F	$\beta$ -1,4	Gullfot <i>et al.</i> , 2009
Laminarinase ( <i>Phanerochaete chrysosporium</i> )	16	E115S	laminariheptaosil $\alpha$ F	$\beta$ -1,3 cíclic	Vasur <i>et al.</i> , 2010
Xiloglucanasa ( <i>Phaenibacillus pabulli</i> )	5	E323G E323A E323S	XLLG $\alpha$ F	$\beta$ -1,4	Spadiut <i>et al.</i> , 2011
Endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase ( <i>Streptococcus pyrogenes</i> )	18	D233A D233Q	Diversos substrats	$\beta$ -1,4	Huang <i>et al.</i> , 2012
Endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase ( <i>Streptococcus pneumoniae</i> )	85	N322A N322Q	Sacàrid oxazolina	$\beta$ -1,4	Fan <i>et al.</i> , 2012

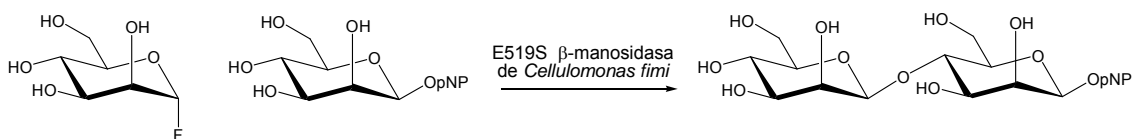
Taula 2. Endo-glicosintases descrites fins al 2014.

### 1.3.2. Exo-glicosintases

La  $\beta$ -glucosidasa d'*Agrobacterium* sp. va ser la primera exo-glicosintasa desenvolupada (Mackenzie *et al.*, 1998) a partir de la mutació del seu nucleòfil per alanina (E358A). Condensa fluorurs d' $\alpha$ -glucosil o d' $\alpha$ -galactosil amb diferents acceptors glicosídics, obtenint-se bons rendiments i una regioselectivitat d'enllaç format  $\beta$ -1,4.

La metodologia també s'aplicà a la  $\beta$ -glucosidasa de *Sulfolobus solfataricus* (Trincone *et al.*, 2000; Moracci *et al.*, 2001; Perugino *et al.*, 2003), enzim amb especificitat relaxada, la qual cosa queda palesa en la seva activitat glicosintasa. El mutant E387G transfereix donadors glucòsids o fucòsids amb formació d'enllaços glicosídics  $\beta$ -1,3,  $\beta$ -1,4 i  $\beta$ -1,6, depenent de les condicions de reacció, i permet obtenir oligosacàrids amb ramificacions amb rendiments baixos.

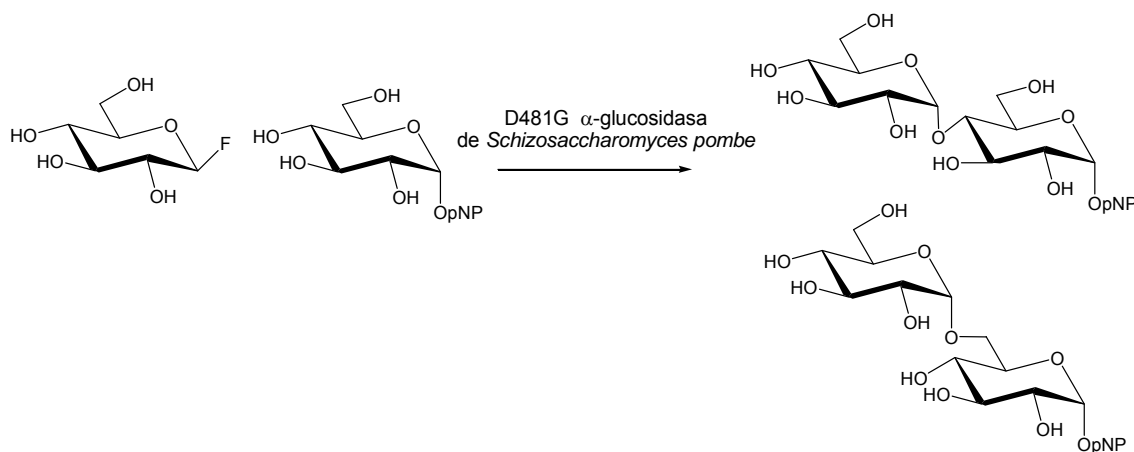
Withers i col·laboradors van obtenir els mutants E519A i E519S de la  $\beta$ -mannosidasa de *Cellulomonas fimi* (Nashiru *et al.*, 2001), que catalitzen la reacció entre el fluorur d' $\alpha$ -mannosil i el *p*-nitrofenil mannòsid rendint di i trisacàrids (8% de rendiment amb l'E519A i 74% amb l'E519S) amb nous enllaços glicosídics  $\beta$ -1,4 i  $\beta$ -1,3 (figura 11). Amb l'acceptor 4-nitrofenil gentibiòsid s'obtenen oligosacàrids ramificats. Vista la gran dificultat que presenta l'obtenció de  $\beta$ -mannòsids per síntesi química convencional, aquest enzim esdevé una eina prometedora per a assolir la seva preparació de forma fàcil i eficient.



**Figura 11.** Reacció glicosintasa catalitzada pel mutant E519S de la  $\beta$ -mannosidasa de *Cellulomonas fimi*. Es forma un enllaç  $\beta$ -1,4 entre dues unitats de mannopiranosas.

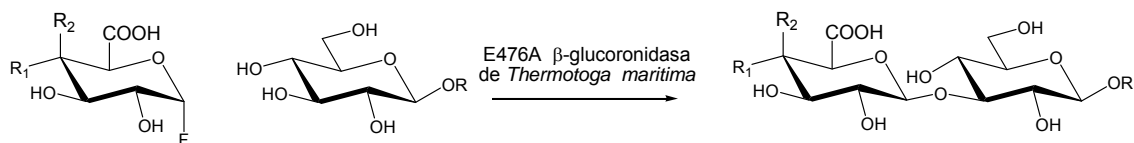
L'especificitat per enllaç format es va estendre amb el mutant D537S de la  $\beta$ -galactosidasa d'*E. coli*. Aquest enzim condensa el fluorur d' $\alpha$ -galactosil amb el *p*-nitrofenilglucòsid per formació d'un enllaç  $\beta$ -1,6 amb un rendiment del 40% (Jakeman i Withers, 2002).

L'any 2002 s'aplicà la metodologia glicosintasa a l' $\alpha$ -glucosidasa de *Schizosaccharomyces pombe* (Okuyama *et al.*, 2002), esdevenint la primera glicosintasa derivada d'una  $\alpha$ -glicosidasa. El mutant D481G d'aquesta  $\alpha$ -glicosilhidrolasa rendeix un enzim hidrolíticament inactiu però capaç de catalitzar la condensació del fluorur de  $\beta$ -glucosil i el *p*-nitrofenil glucòsid, obtenint els disacàrids maltòsids ( $\alpha$ -1,4) i isomaltòsids ( $\alpha$ -1,6) amb un rendiment del 70% (figura 12).



**Figura 12.** Reacció catalitzada per l'α-glicosintasa D481G α-glucosidasa d'*Schizosaccharomyces pombe*. S'obté un 41% de *p*-nitrofenil α-isomaltòsid i un 29% de *p*-nitrofenil α-maltòsid en emprar el donador fluorur d'α-glucosil i l'acceptor *p*-nitrofenilglucòsid.

Wither i col·laboradors convertiren la β-glucuronidasa de *Thermotoga maritima* a glicosintasa (Müllegger *et al.*, 2006). A partir de l'experiència prèvia en aquest camp, la mutació del residu nucleòfil es realitzà pels tres aminoàcids (alanina, serina i glicina) que havien donat resultats satisfactoris amb la β-glucosidasa d'*Agrobacterium* sp. i la β-manosidasa de *Cellulomonas fimi*. Sorprenentment, el mutant E476A presenta una major activitat glicosintasa que la resta, mentre que el mutant serina resulta completament inactiu. D'aquesta manera, el mutant E476A catalitza la condensació de fluorurs d'α-glucuronil i α-galacturonil amb diferents acceptors amb base glucosídica, xilosídica i glucuronídica per formació d'un enllaç β-1,3 amb bons rendiments (figura 10). Els productes formats són alhora acceptors i permeten l'elongació de l'oligosacàrid. Tanmateix, es va observar que els productes de condensació del fluorur d'α-galacturonil esdevenen acceptors pobres, la qual cosa indicaria que l'anell d'àcid galacturònic no presenta una bona unió als subetis de l'acceptor.

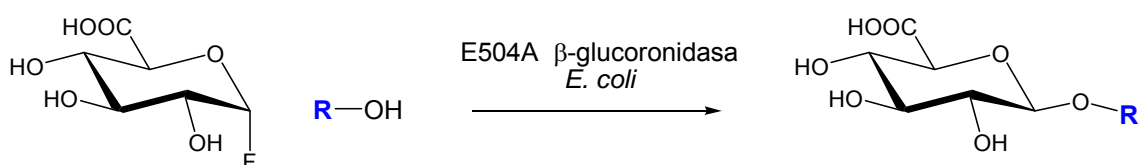


**Figura 13.** Reacció glicosintasa del fluorur d'α-glucuronil ( $R_1=OH$ ,  $R_2=H$ ) i α-galacturonil ( $R_1=H$  i  $R_2=OH$ ) catalitzada pel mutant E476A de la β-glucuronidasa de *Thermotoga maritima*.

La β-xilosidasa de *Geobacillus stearothermophilus* T-6 es va convertir amb èxit a glicosintasa per mutació del residu E335 a glicina (Ben-David *et al.*, 2007). Aquest enzim presenta una activitat relaxada envers substrats acceptors, ja que és capaç de condensar fluorurs d'α-xilobiosil amb diferents aril-glicòsids (XilpNP, GlcpNP, ManpNP i ArapNP) i monosacàrids sense aglicona cromofòrica (Xil i Glc). També condensa el fluorur de β-L-arabinofuranosil amb els acceptors anteriors amb rendiments moderats.

La metodologia glicosintasa també ha estat aplicada amb èxit a la  $\beta$ -glucosidasa d'arròs (*Oryza sativa*) per mutació del residu catalític E414 per alanina, serina i glicina (Hommalai *et al.*, 2007). Aquest darrer mutant, E414G, és el que presenta major activitat transglicosidasa per a la condensació del fluorur d' $\alpha$ -glucosil i l'acceptor *p*-nitrofenil cel·lobiosid. La condensació no s'atura en la formació del trisacàrid, assolint-se oligòmers d'entre 5 – 11 unitats de glucosa, unides per enllaços  $\beta$ -1,4. Es tracta del primer cas descrit d'una  $\beta$ -glucansintasa derivada d'una exoglicosidasa capaç de formar cel·lulooligosacàrids de cadena llarga.

Withers i col·laboradors (Wilkinson *et al.*, 2008) van presentar la glucuronilsintasa per substitució del residu E537 per alanina de la  $\beta$ -glucuronidasa d'*E. coli*. Aquest enzim és capaç de condensar el derivat  $\alpha$ -fluorur de l'àcid glucurònic amb diversos alcohols primaris, secundaris i arílics amb rendiments des de moderats fins a quantitius (figura 14).

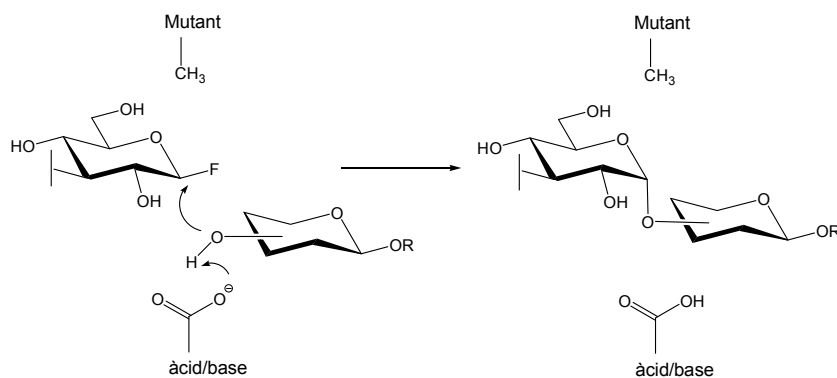


**Figura 14.** Reacció de condensació de l'àcid glucurònic amb alcohols primaris, catalitzada pel mutant E537 de la  $\beta$ -glucuronidasa d'*E. coli*.

Moracci i col·laboradors (Cobucci-Ponzano *et al.*, 2009) obtingueren dues glicosintases a partir  $\alpha$ -L-fucosidases d'organismes termòfils. Aquests enzims presenten l'òptim d'activitat a temperatures elevades lluny de l'interval d'estabilitat dels fluorurs de glicosil. S'assoliren rendiments de fins al 91% en transglicosidació emprant  $\beta$ -L-fucosil azida com a donador. Recentment, la metodologia per a  $\alpha$ -glicosintases emprant donadors  $\beta$ -glicosil azida ha estat ampliada amb el mutant D327G l' $\alpha$ -galactosidasa de *Thermotoga maritima* (Cobucci-Ponzano *et al.*, 2011) obtenint-se  $\alpha$ -galactodisacàrids amb rendiments moderats.

### ***Inversió de configuració***

El concepte glicosintasa és propi de les glicosidases que actuen amb retenció de configuració a través d'un mecanisme de doble desplaçament, la qual cosa comporta les següents consideracions: la mutació d'un residu essencial que dona lloc a un enzim sense activitat hidrolasa i l'ús d'un substrat activat que mimetitzi l'intermedi de reacció. Les glicosidases que presenten inversió de configuració operen a través d'un mecanisme de desplaçament simple i el seu redisseny per a convertir-se en glicosintases està basat en un concepte similar però diferent.



**Figura 15.** Metodologia glicosintasa aplicada a glicosidases que actuen amb inversió de configuració.

L'aproximació a la metodologia glicosintasa amb aquest tipus d'enzims passa per la mutació del residu que actua com a base i l'ús d'un substrat activat fluorur de glicosil amb la mateixa configuració anomèrica que el producte normal d'hidròlisi. Amb tot s'obté un enzim capaç de transglicosidar on la activitat hidrolítica queda disminuïda però no suprimida (figura 15).

La primera glicosidasa d'aquest tipus convertida a tipus-glicosintasa fou la exo-oligoxilanas de *Bacillus halodurans* (Honda *et al.*, 2006). El mutant D263S i el mutant D263N en menor grau eren capaços de produir xilotriòsids amb rendiments elevats partint del fluorur d' $\alpha$ -xilobiosa. Un estudi posterior sobre el mateix enzim va mostrar que el mutant Y198F era capaç d'acumular grans quantitats de xilotriosa (Honda *et al.*, 2008). La tirosina 198 correspon al residu que directament influeix en la nucleofília de la molècula d'aigua que ha d'escindir l'enllaç glicosídic, tal i com s'argumentava en un estudi anterior sobre els residus del centre actiu d'una xilanas de la família 8 (Collins *et al.*, 2005). La seva mutació per fenilalanina debilita la interacció amb la molècula d'aigua esdevenint menys nucleofílica. S'observà que el doble mutant D263S/Y198F no presentava tan bons resultats en transglicosidació com el mutant simple Y198F. Honda i col·laboradors proposaren la mutació del residu que interacciona amb l'aigua nucleofílica com a estratègia general per a l'obtenció de biocatalitzador tipus-glicosintases amb inversió de configuració.

L'any 2008, Kitaoka i col·laboradors (Wada *et al.*, 2008) presentaren la segona glicosintasa provinent d'una glicosidasa amb inversió de configuració. Es tractava del mutant D776G de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *Bifidobacterium bifidum*. Aquest enzim era capaç de sintetitzar  $\alpha$ -1,2-L-fucosillactoses a partir de fluorur de  $\beta$ -L-fucosil. Els rendiments, però, no superen el 6%, mostrant la necessitat de seguir explorant en el camp dels biocatalitzadors *inverting-glycosynthase-like* per tal de racionalitzar la metodologia.

### 1.3.3. Endo-glicosintases

El mutant E134A de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*, fou desenvolupat al laboratori de Bioquímica de l'IQS (Malet i Planas, 1998) i constituí la primera endo-glicosintasa descrita. Fins a l'actualitat s'han generat diverses glicosintases a partir d'endo-glicosidases totes elles detallades a continuació:

El mutant E197A de la 1,4- $\beta$ -glucanasa d'*Humicola insolens* (Fort *et al.*, 2000) ha esdevingut una glicosintasa interessant amb capacitat per condensar donadors cel·lobiosid i lactòsid amb diferents acceptors per formació específica d'un enllaç glicosídic  $\beta$ -1,4 (figura 16).



**Figura 16.** Condensació entre el fluorur d' $\alpha$ -lactosil i l'O-metilcel·lobiosid catalitzada pel mutant E197A de la Cel7B d'*Humicola insolens*.

Aquesta glicosintasa és capaç d'acomodar acceptors amb estructures diferents derivades de l'esquelet de la cel·lobiosa, constituint-se així en una eina amb gran utilitat per l'acoblament de fragments sacarídics. A la vegada, també accepta donadors de fluorur d' $\alpha$ -cel·lobiosil modificats a C-6<sup>ll</sup> com a substrats en reaccions de polimerització. Per analogia al treball realitzat per Withers i col. (Mayer *et al.*, 2000) amb la  $\beta$ -glucosidasa d'*Agrobacterium* sp., es construí el mutant E197S i s'analitzà la seva cinètica de reacció, observant-se un increment en l'eficiència catalítica de 34 vegades en comparació a la glicosintasa original E197A (Ducros *et al.*, 2003). Darrerament, s'ha preparat una segona generació glicosintases de la Cel7B d'*Humicola insolens* per mutació dels residus H209 i A211 situats en la zona del subseti +1, per tal de relaxar la seva especificitat i permetre la unió d'acceptors N-acetil-glucosaminil (Blanchard *et al.*, 2007A). A la glicosintasa original E197A se li sumen els dobles mutants E197A/H209A, E197A/H209G i el triple mutant E197A/H209A/A211T, per tal d'estudiar la seva activitat en la reacció entre el fluorur d' $\alpha$ -lactosil i l'acceptor O-alil N<sup>l</sup>-acetil-2<sup>ll</sup>-azido- $\beta$ -quitobiosid. S'observa com pels dos mutants dobles, es formen de forma preferent enllaços  $\beta$ -1,4 mentre que pel mutant simple i triple s'obtenen tetrasacàrids units per enllaços  $\beta$ -1,3. Aquests resultats corresponen al primer cas de modulació de la regioselectivitat de la reacció de glicosidació a partir d'un redisseny racional del centre actiu per mutació de residus concrets que afecten la unió dels substrats.

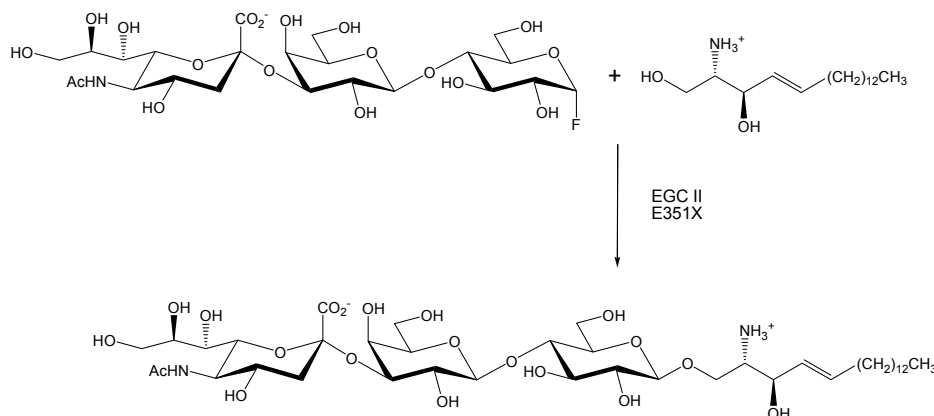
Una altra cel·lulasa de la família 7 va ser convertida a glicosintasa per mutació a alanina del seu residu nucleòfil (Blanchard *et al.*, 2007B). Es va demostrar l'activitat glicosintasa del mutant E196A de la Cel7B de *Trichoderma reesei* a partir de la reacció entre el fluorur d' $\alpha$ -lactosil i la cel·lobiosa, detectant l'aparició del tetrasacàrid lactosil  $\beta$ -1,4-cel·lobiosa. Malgrat aquesta activitat observada, aquesta glicosintasa resulta menys eficient que la derivada de la Cel7B d'*Humicola insolens*.

A partir de la  $\beta$ -glucanasa d'ordi es van obtenir els mutants E231G, E231S i E231A que presenten activitat glicosintasa (Hrmova *et al.*, 2002) i catalitzen la condensació entre el fluorur d' $\alpha$ -laminaribiosil i el *p*-nitrofenil  $\beta$ -glucòsid. També es va observar la possibilitat de polimerització del donador laminaribiosil mitjançant aquesta glicosintasa.

Pel que fa a l'activitat sobre esquelets de manosa, el mutants glicina i serina del nucleòfil de la  $\beta$ -mannanasa de *Cellvrio japonicus* van esdevenir glicosintases amb capacitat per la síntesi de  $\beta$ -mannooligosacàrids per formació d'enllaç glicosídic  $\beta$ -1,4 (Jahn *et al.*, 2003).

La 1,3-β-glucanasa de *Pyrococcus furiosus* presenta activitat glicosintasa pel seu mutant E170A i catalitza la condensació de fluorurs d'α-laminaribiosil amb diferents acceptors (Van Lieshout *et al.*, 2004). S'observa formació majoritària del producte Glcβ3Glcβ4Glcβ-MU en emprar el monosacàrid Glcβ-MU com a acceptor i recuperació del tetrasacàrid Glcβ3Glcβ4Glcβ3Glcβ-MU quan s'utilitza el disacàrid Glcβ3Glcβ-MU com a acceptor.

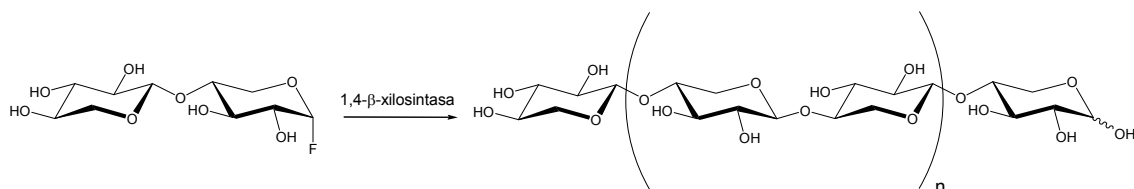
El camp dels glicoesfingolípid i en particular dels gangliòsids que contenen àcid siàlic, ha estat estudiat pel grup d'en Withers i col·laboradors (Vaughan *et al.*, 2006). Aquestes molècules presenten un paper fonamental en nombrosos processos fisiològics, essent constituents de les membranes cel·lulars dels mamífers i participant de forma activa en cadascuna de les etapes del cicle cel·lular. Estudis recents han suggerit que l'ús clínic de certs tipus de gangliòsids poden ser beneficiosos per combatre alguns símptomes de càncer i diabetis així com per promoure la regeneració del teixit nerviós (Nojiri *et al.*, 2002; Itoh *et al.*, 2001). Atesa la gran dificultat que representa la seva obtenció a gran escala per satisfer el creixent interès, es va aplicar la metodologia glicosintasa a la endoglicoceramidase II de *Rhodococcus* sp. Es desenvoluparen els mutants serina, alanina, glicina i aspartat del nucleòfil, dels quals el mutant E351S és el que presenta un millor comportament glicosintasa amb un rendiment >90% per a la producció del gangliòsid lyso-G<sub>M3</sub> (figura 17).



**Figura 17.** Reacció entre el fluorur de 3'-sialillactosil i la D-*eritro*-esfingosina catalitzada per la glicosintasa E351X (X = A,S,G) provinent de la endoglicoceramidasa II (EGC II) de *Rhodococcus* sp. per a l'obtenció del gangliòsid lyso-G<sub>M3</sub>.

L'esforç també s'ha adreçat a l'obtenció de glicosintases derivades de xilanasas de la família 10. L'any 2006, quatre xilanasas procedents de *Thermotoga maritima*, *Clostridium stercolarium*, *Bacillus halodurans* i *Cellulomonas fimi* es van convertir en les seves corresponents glicosintases per mutació dels àcids glutàmics que actuen de nucleòfil per glicina, alanina i serina (Suhimura *et al.*, 2006). Els millors resultats es van obtenir pels mutants glicina, a partir dels quals s'ha sintetitzat polímers de xilà units per enllaços β-1,4 emprant el fluorur d'α-xilobiosil com a donador amb rendiments moderats (29 – 69%) (figura 18).

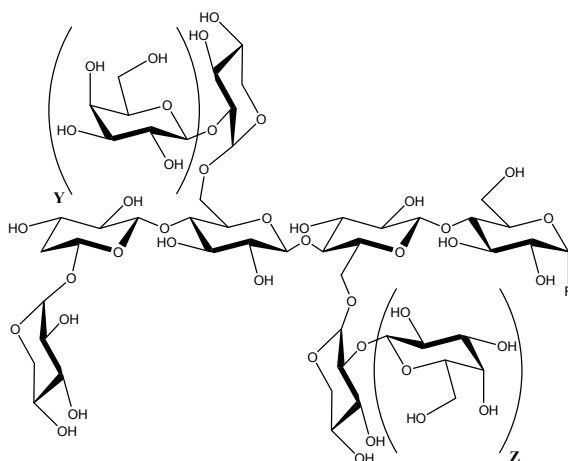




**Figura 18.** Reacció de polimerització del xilè per formació d'enllaços  $\beta$ -1,4.

També l'1,4- $\beta$ -xilanasa de *Cellulomonas fimi* (CFXcd) catalitza l'obtenció de xilooligòmers de baix grau de polimerització, a partir del producte resultant de la condensació entre el fluorur d' $\alpha$ -xilobiosil i l'acceptor *p*-nitrofenilxilobiòsid per reacció d'elongació amb successives adicions de donador (Kim *et al.*, 2006).

La xiloglucà endotransglicosidasa de *Populus tremula x tremuloides* (PttXET16-34) fou convertida a glicosintasa per mutació del residu nucleòfil E85 per alanina, serina i glicina (Piens *et al.*, 2007). S'avalua amb èxit l'habilitat del mutant alanina de produir xilooligosacàrids i polisacàrids a partir dels donadors XXXGaF i XLLGaF (veure figura 19).



**Figura 19.** Fluorurs d' $\alpha$ -xiloglucò-oligosacàrid emprats com a donadors en la reacció glicosintasa amb el mutant E85A de la PttXET16-34. XXXGaF ( $y = 0$ ;  $z = 0$ ); XLLGaF ( $y = 1$ ;  $z = 1$ ).

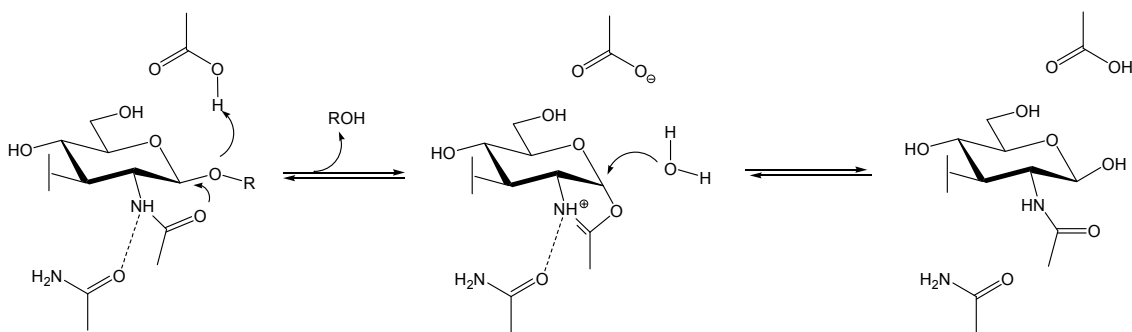
Cornish i col·laboradors (Tao *et al.*, 2008) van presentar i caracteritzar una nova glicosintasa Cel5A E307G pertanyent a la família 5. Aquest enzim catalitza la síntesi enllaços glicosídics  $\beta$ -1,3 entre el fluorur d' $\alpha$ -lactosil i el *p*-nitrofenil  $\beta$ -cel·lobiòsid. La identificació del mutant glicosintasa es va realitzar mitjançant un sistema d'*screening* per complementació química desenvolupat anteriorment al grup (Tao *et al.*, 2006).

Recentment (Vasur *et al.*, 2010), es va presentar la primera glicosintasa capaç de formar oligosacàrids cíclics, això és, de formar un enllaç glicosídic entre l'extrem reductor i l'extrem no reductor d'un oligosacàrid. En particular, el mutant E115S de la laminarasa (Lam16A) de *Phanerochaete chrysosporium* condensa la laminariheptaosa de forma intramolecular donant lloc a un  $\beta$ -1,3-heptaglucà cíclic.

Darrerament, Brumer i col·laboradors (Spadiut *et al.*, 2011) han reportat l'obtenció d'una xiloglucasintasa (PpXG5) E323G de *Paenibacillus pabuli* amb activitat front al substrat (XLLG) $\alpha$ F.

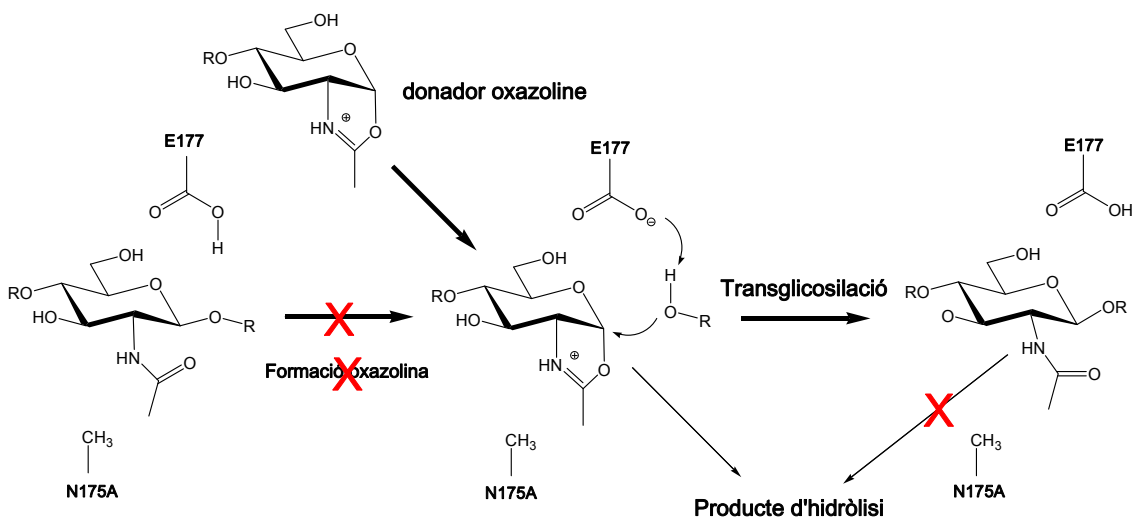
Es tracta de la primera glicosintasa productora de xiloglucans digalactosilats amb masses molars de fins a 60 kDa ( $M_w$  12000). A partir d'aquest polisacàrid fou possible obtenir xiloglucans fucosilats per acció de la  $\alpha$ -1,2-fucosiltransferasa d'*Arabidopsis thaliana* amb fucoses.

Capítol apart correspon l'aproximació glicosintasa de les N-acetilglucosaminidases. Aquestes glicosidases tenen la particularitat de seguir un mecanisme per assistència de substrat on hi ha involucrat un residu carboxílic àcid/base i una asparagina que orienta el grup acetamido situat en C2 permetent la formació de l'intermedi oxazolina que es transfereix a l'acceptor (figura 20).



**Figura 20.** Mecanisme per assistència de substrat de les N-acetilglucosaminidases.

Wang i col·laboradors (Umekawa *et al.*, 2008) van reportar l'aplicació del mutant N175A de la endo- $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa de *Mucor hiemalis* a partir d'un substrat sintètic oxazolínic per realitzar reaccions de transglicosidació. En aquest cas, l'adaptació d'una metodologia tipus glicosintasa passa per l'eliminació de l'asparagina N175 de manera que l'enzim sigui incapaç d'assistir el residu N-acetil dels substrats N-glicans per a l'obtenció de l'intermedi oxazolina, conjuntament amb l'ús d'un mímec de l'intermedi catalític consistent en un substrat oxazolínic (figura 21). Aquest mutant, tal i com passa amb la metodologia glicosintasa, prevé la hidròlisi del producte de transglicosidació.



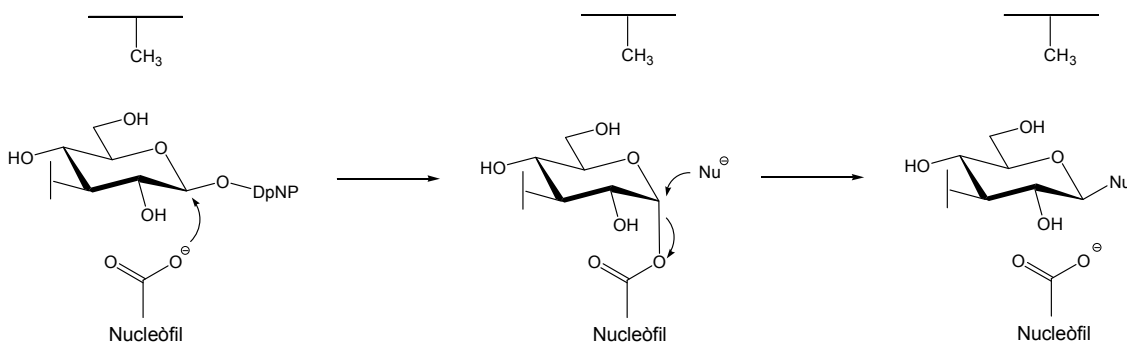
**Figura 21.** Mecanisme del mutant tipus glicosintasa N175A endo- $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa de *Mucor hiemalis*, per a la reacció de transglicosidació amb un donador oxazolínic.

La metodologia es va estendre per a l'endo- $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa d'*Anthrobacter protophormiae* i pel mutant N175Q de la endo- $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa de *Mucor hiemalis* que va resultar més eficient. Presentava activitat transglicosidasa no només amb substrats oxazolínics sinó també amb N-glicans (Huang *et al.*, 2009).

#### 1.4. Tioglicoligasa

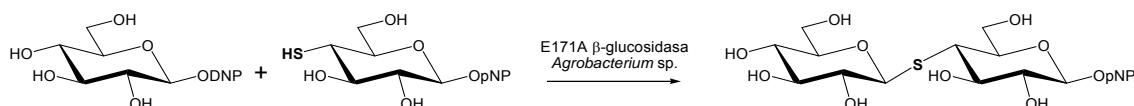
Els tioglicòsids, molècules on l'oxigen glicosídic ha estat substituït per un àtom de sofre, han esdevingut molècules de gran utilitat com anàlegs glicosídics estables en glicosidases. S'han emprat com a inhibidors competitiu i més recentment com a substrats per a la formació de complexos estables enzim-substrat en anàlisis per cristal·lografia de raigs X (Jahn *et al.*, 2003). S'han seguit diferents vies sintètiques per a la seva obtenció: l'ús de donadors activats amb tioacceptors, per  $S_N2$  emprant acceptors activats i tiosacàrids; per addició tipus Michael d'1-tiosacàrids sobre sistemes  $\alpha,\beta$ -insaturats. Nogensmenys, la seva síntesi resulta complexa, amb independència de l'estratègia emprada, amb nombroses etapes de protecció i desprotecció que condueixen a un baix rendiment i poc control de l'estereoquímica de la reacció. Tampoc la síntesi enzimàtica *in vitro* amb S-glucosiltransferases han portat a millors resultats.

L'any 2003, i seguint el mateix esquema emprat per a la síntesi d'enllaços O-glicosídics mitjançant glicosintases, Withers i col·laboradors (Jahn *et al.*, 2003) van presentar una nova estratègia per a la síntesi d'oligosacàrids amb enllaços S-glicosídics mitjançant glicosidases que actuen amb retenció de configuració, les quals se'ls ha eliminat el residu que actua d'àcid-base (figura 22).



**Figura 22.** Mutant àcid-base d'una glicosidasa que actua amb retenció de configuració i etapes de glicosidació i desglicosidació en presència d'un nucleòfil fort (Nu).

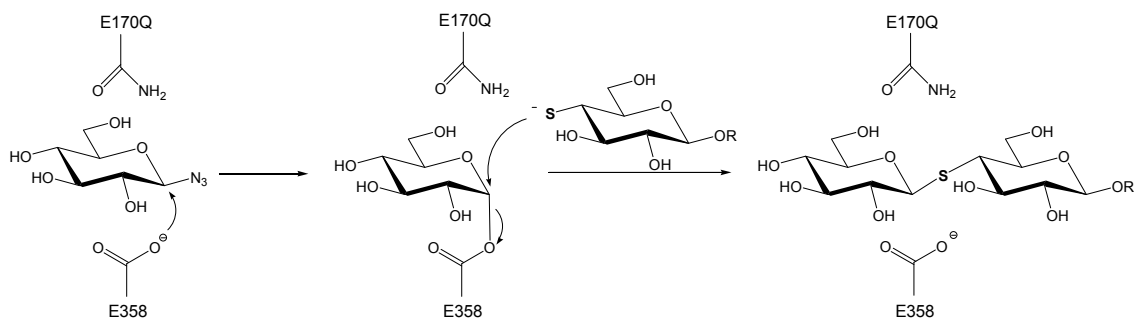
S'aprofita part de la maquinària catalítica de les glicosidases en combinació amb l'ús d'un donador amb un bon grup sortint en  $\beta$ , que no requereixi catàlisi àcida. En absència de catàlisi bàsica per l'etapa de desglicosidació, l'intermedi glicosil enzim no pot ser atacat per l'hidroxil d'un sacàrid i és necessari l'ús de nucleòfils forts per a rescatar la reacció. En aquest aspecte, els desoxitisacàrids presenten grups tiol, que esdevenen bons nucleòfils i no requereixen de catàlisi bàsica per a reaccionar en l'etapa de desglicosidació (figura 23).



**Figura 23.** Síntesi enzimàtica de tioglicòsids mitjançant l'estratègia tioglicoligasa. El mutant E171A de la  $\beta$ -glucosidasa d'*Agrobacterium* sp. catalitza la reacció entre el donador activat dinitrofenil  $\beta$ -D-glucopiranosid i l'acceptor nucleofílic *p*-nitrofenil 4-desoxi-4-tio- $\beta$ -D-glucopiranosid. DNP =dinitrofenil; pNP = para-nitrofenil

Inicialment, l'estratègia tioglicoligasa es va provar amb èxit amb els mutants alanina dels residus àcid-base de la  $\beta$ -glucosidasa d'*Agrobacterium* sp. (E171A) i la  $\beta$ -mannosidasa de *Cellulomonas fimi* (E429A), ambdues glicosidases que actuen amb retenció de configuració. En fer reaccionar els donadors dinitrofenilglucòsids i mannòsids, respectivament, amb els acceptors *p*-nitrofenil 4-desoxi-4-tio- $\beta$ -D-glucopiranosid s'obtingueren disacàrids units per enllaços S-glicosídics  $\beta$ -1,4 amb rendiments moderats del 64% i 35%. En emprar acceptors xilopiranosids els rendiments augmentaren fins al 80% i la regioselectivitat de l'enllaç va passar a ser  $\beta$ -1,3.

En una segona etapa es va realitzar un *screening* per mutagènesi aleatòria de la posició E170 (residu àcid-base) de la  $\beta$ -glucosidasa d'*Agrobacterium* sp., que havia servit com a tioglicoligasa original, per tal d'obtenir mutants d'aquesta posició que incrementessin l'activitat tioglicoligasa (Müllegger *et al.*, 2005). El mutant E170Q, va resultar ser 5 vegades més eficient que l'original E170A en emprar el 2,4-dinitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosid com a acceptor i 100 vegades més ràpid quan s'utilitzava el derivat  $\beta$ -azida de la glucosa (figura 24).



**Figura 24.** Reacció tioglicoligasa entre el  $\beta$ -azido glucòsids i un acceptor 4-desoxi-4-tio-glucòsids catalitzada pel mutant E170Q de la  $\beta$ -glucosidasa d'*Agrobacterium* sp.

Aquesta metodologia s'ha aplicat per a la glicosidació de proteïnes (Müllegger *et al.*, 2005) amb la finalitat d'obtenir estructures metabòlicament estables com a anàlegs de glicoproteïnes. La introducció d'un enllaç S-glicosídic en la cadena sacarídica de la glicoproteïna rendeix una estructura resistent a la hidròlisi per glicosidases però alhora susceptible de ser glicosidada per glicosiltransferases.

L'any 2006, continuant la recerca en el camp de les tioglicoligases, el grup d'en Withers i col·laboradors (Müllegger *et al.*, 2006) van ampliar aquesta metodologia a la  $\beta$ -glucuronidasa de *Thermotoga maritima*, enzim que també havia estat convertit a glicosintasa (veure apartat exoglicosintases). A partir dels estudis anteriors amb la  $\beta$ -glucosidasa d'*Agrobacterium* sp. s'obtingueren els mutants alanina i glutamina del residu àcid-base i s'assajà la seva activitat tioglicoligasa amb els substrats adients. Els millors resultats es van obtenir amb el mutant E383Q, i s'emprà tant l'àcid *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glucuronopiranosid com l'àcid *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-

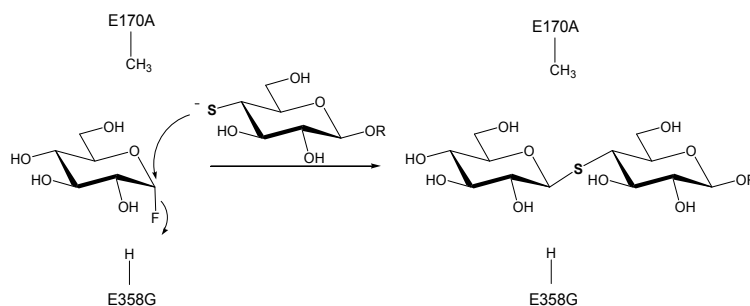
galacturonopiranosid com a donadors, i diferents *p*-nitrofenil-4-desoxi-4-tio- $\beta$ -D-glicopiranosids (glucosa, N-acetilglucosamina) i el *p*-nitrofenil-3-desoxi-3-tio- $\beta$ -D-glucopiranosid com a acceptors activats. S'obtingueren disacàrids units per enllaços S-glicosídics ( $\beta$ -1,4 i  $\beta$ -1,3 depenent de la posició del grup tiol de l'acceptor) amb rendiments compresos entre 49 i 85% ampliant l'aplicabilitat d'aquesta metodologia a noves especificitats.

Posteriorment, l'estratègia tioglicoligasa va ser aplicada amb èxit sobre  $\alpha$ -glicosidases (Kim *et al.*, 2006). Les  $\alpha$ -tioglicoligases derivades de glicosidases de la família 31, l' $\alpha$ -xilosidasa d'*E. coli* i l' $\alpha$ -glucosidasa de *Sulfolobus solfataricus*, van catalitzar reaccions de tioglicolligació emprant com a donador fluorurs d' $\alpha$ -glicosil i desoxitioglicòsids com a acceptors amb rendiments de fins al 86%.

Recentment, Withers i col·laboradors (Armstrong *et al.*, 2010) van aprofundir en l'exploració de quina era la millor mutació del residu àcid/base sobre una glicosidasa amb retenció de configuració per esdevenir una bona tioglicolligasa. Per això es va prendre la xilanasa de *Bacillus circulans* com a model i es van generar una llibreria de mutants per mutagènesi de saturació sobre l'aminoàcid àcid/base. Es va concloure que les modificacions òptimes per a per a esdevenir tioglicolligases actives eren aquelles que rendien residus petits, preferiblement polars com la treonina, la cisteïna i la serina.

### 1.4.1. Tioglicosintasa

La metodologia glicosintasa i la metodologia tioglicolligasa es poden combinar per tal de plantejar una nova estratègia per a la síntesi de tioglicòsids: les tioglicosintases (Jahn *et al.*, 2004). Són glicosidases que actuen amb retenció de configuració les quals se'ls ha eliminat tant el residu que actua de nucleòfil, com el residu que actua d'àcid-base general. Aquests dobles mutants són capaços de condensar fluorurs d' $\alpha$ -glicosil amb acceptors nucleofílics com els tiosacàrids, rendint sacàrids amb enllaços S-glicosídics. Proves preliminars amb el doble mutant E171A/E358G de la  $\beta$ -glucosidasa d'*Agrobacterium* sp., emprant el fluorur d' $\alpha$ -glucosil com a donador i el *p*-nitrofenil 4-desoxi-4-tio- $\beta$ -D-glucopiranosid i el metilumbel·liferil 4-desoxi-4-tio- $\beta$ -D-glucopiranosid com a acceptors van conduir a l'obtenció de disacàrids units per enllaços S-glicosídics  $\beta$ -1,4 amb rendiments moderats (51% i 45% respectivament) (figura 25). En el fons, l'eliminació de la maquinària catalítica de les glicosidases amb retenció de configuració, suprimeix la seva capacitat d'assistència en la reacció esdevenint motlles per a posicionar els substrats i estabilitzar les seves conformacions en l'estat de transició. D'aquesta manera, aquesta metodologia podria fer-se extensible per a l'obtenció d'altres tipus de productes sempre que s'utilitzin donadors activats amb el grup sortint en  $\alpha$  i acceptors nucleofílics que no requereixin de catàlisi bàsica.



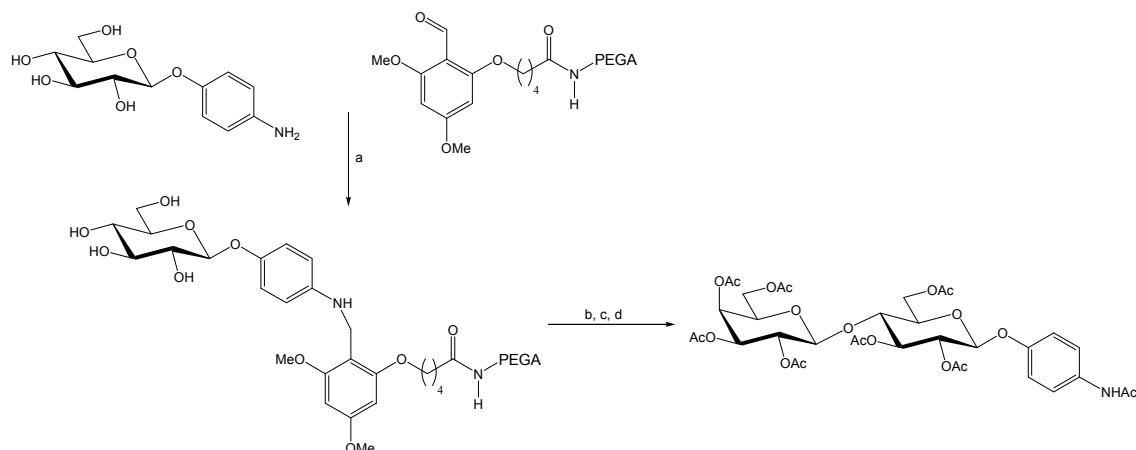
**Figura 25.** Mecanisme catalític de la tioglicosintasa E170A/E358G derivada de la  $\beta$ -glucosidasa d'*Agrobacterium* sp.

## 2. Estratègies sintètiques

Les aproximacions enzimàtiques per a la preparació d'oligosacàrids i glicoconjugats han aportat una millora important en la regioselectivitat i estereoselectivitat d'aquestes reaccions, reduint etapes sintètiques i disminuint la necessitat de grups protectors. Existeixen, però, altres estratègies provinents de camps diferents a la glicoquímica i que han permès abastir d'eines sintètiques de gran valor. Durant els darrers anys, i ja amb la metodologia glicosintasa consolidada, hi ha una voluntat de combinar-la amb aquestes estratègies operatives; la síntesi enzimàtica en fase sòlida, l'ús d'enzims immobilitzats, el disseny racional de substrats, l'evolució dirigida i la complementació química són exemples d'aquestes estratègies complementàries.

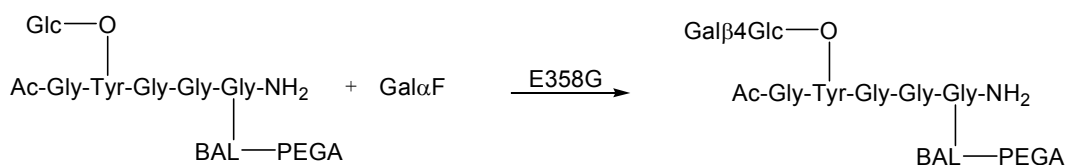
### 2.1. Síntesi d'oligosacàrids en fase sòlida

Per analogia a la síntesi de pèptids, la síntesi enzimàtica d'oligosacàrids en fase sòlida permet optimitzar l'aïllament de producte en vistes a una futura implementació automatitzable. Basant-se en treballs anteriors sobre síntesi d'oligosacàrids en fase sòlida amb glicosiltransferases, Withers i col·laboradors aplicaren aquesta metodologia amb les glicosintases E358S i E358G d'*Agrobacterium* sp. (Tolborg *et al.*, 2002). S'immobilitzà l'acceptor *p*-aminofenil glucòsid a una reïna de polietilenglicol poliacrilamida mitjançant un *linker* unit a la reïna per un enllaç amida i amb un grup aldehyd lliure per a poder reaccionar amb el grup amina de l'acceptor, per formació d'una amina secundària. S'obtingueren bons resultats en fer reaccionar l'acceptor immobilitzat amb els fluorur d' $\alpha$ -galactosil amb rendiments de condensació superiors al 80% i un 90% de recuperació del producte immobilitzat (figura 26).



**Figura 26.** Reacció d'immobilització de l'acceptor *p*-aminofenil glucòsid en la reïna PEGA i posterior glicosidació en fase sòlida catalitzada per la glicosintasa d'*Agrobacterium* sp. Etapes de la reacció: a)  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ ,  $\text{AcOH}:\text{MeOH}$  (1:99); b) glicosintasa d'Abg (1.0  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ),  $\text{Gal}\alpha\text{F}$  (20 mM), tampó fosfat (100 mM); c)  $\text{Ac}_2\text{O}:\text{Py}$  (2:1); d)  $\text{TFA}:\text{H}_2\text{O}$  (19:1).

L'estudi es va estendre a acceptors glicopeptídics. D'aquesta manera, emprant la mateixa estratègia, s'immobilitzà sobre un suport PEGA-BAL, un pentapeptid amb una tirosina glicosidada. El glicopèptid immobilitzat fou glicosidat amb èxit pel fluorur d' $\alpha$ -galactosil en presència de la glicosintasa E358G amb un rendiment del 52% de producte aïllat (figura 27).

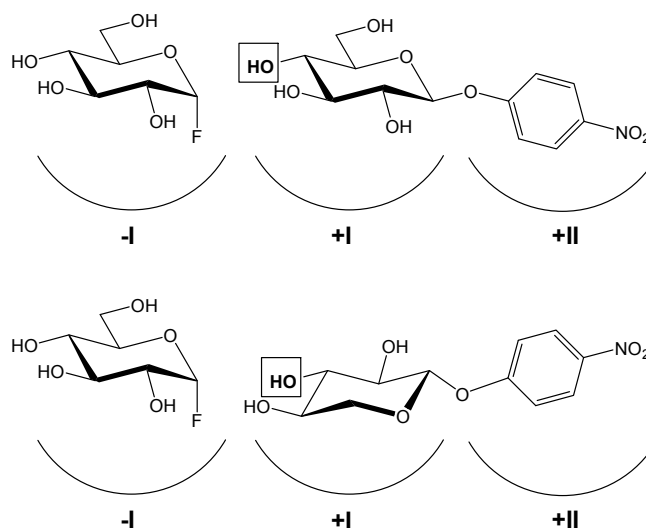


**Figura 27.** glicosidació enzimàtica en fase sòlida d'un glicopèptid catalitzada pel mutant E358G de la  $\beta$ -glucosidasa d'*Agrobacterium* sp. Condicions de glicosidació: E358G (1.0  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ),  $\text{Gal}\alpha\text{F}$  (20 mM), tampó fosfat (100 mM, pH 9).

## 2.2. Modificació de la regioselectivitat en dependència de l'acceptor

Les glicosintases permeten catalitzar la formació d'enllaços glicosídics pels quals no estaven *a priori* dissenyades; això és, és possible modificar la regioselectivitat d'una reacció glicosintasa emprant l'acceptor adient (Stick *et al.*, 2004). La modulació de la regioselectivitat per canvis en l'acceptor té el seu origen en la disposició espacial que adopten els substrats acceptors en el centre actiu de l'enzim. Normalment, en aplicar la metodologia glicosintasa, s'empren donadors amb estructures semblants a la dels substrats originals de l'enzim, mentre que per l'acceptor, és comú l'ús de  $\beta$ -aril-glicòsids a nivell de caracterització enzimàtica, car presenten una bona unió en els subestis +I i +II i permeten la monitorització de la reacció per HPLC amb detecció per absorbància a l'UV.

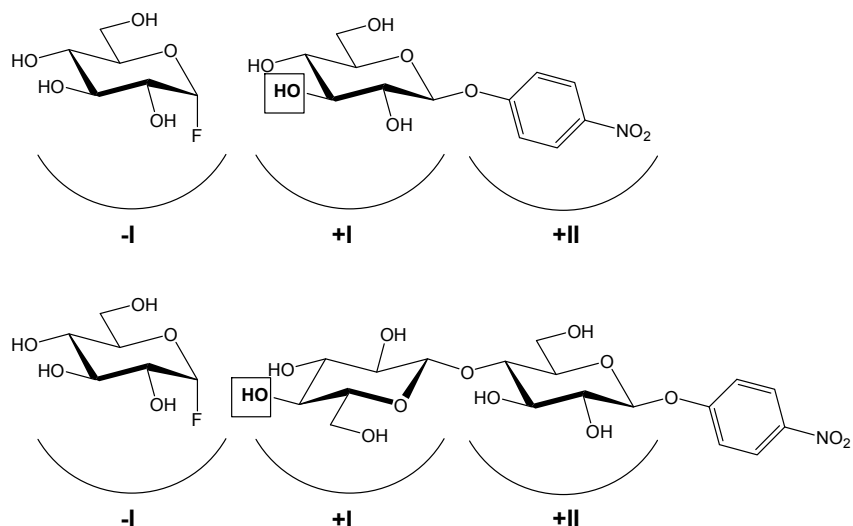
Pel cas del mutant E358S de la  $\beta$ -glucosidasa d'*Agrobacterium* sp., quan es fa reaccionar el fluorur d' $\alpha$ -glucosil amb el *p*-nitrofenil- $\beta$ -glucopiranòsid es forma un enllaç  $\beta$ -1,4, mentre que quan se substitueix l'acceptor anterior pel *p*-nitrofenilxilopiranòsid l'enllaç format és  $\beta$ -1,3 (Mackenzie *et al.*, 1998). Per a racionalitzar aquest fenomen cal atendre a les diferències presents entre ambdós acceptors que es tradueixen en una unió diferent en el centre actiu. D'aquesta manera, l'acceptor glucòsid presentarà l'hidroxil en C-4 correctament posicionat per a formar l'enllaç glicosídic amb el donador mentre que l'acceptor xilòsid, tot i presentar un mode d'unió similar (aglicona al +II), presenta l'anell de piranosa translocat, orientant l'hidroxil en C-3 per a la formació de l'enllaç glicosídic (figura 28).



**Figura 28.** representació de la disposició espacial de l'acceptor *p*-nitrofenil glucòsid i *p*-nitrofenilxilòsid en el centre actiu de la glicosintasa E358S d'*Agrobacterium* sp.

La glicosintasa E383A de la  $\beta$ -glucosidasa d'*Streptomyces* sp., amb la qual s'ha treballat en el present treball, també presenta un regioselectivitat dependent de l'acceptor, en el mateix sentit que l'exemple anterior (Faijes *et al.*, 2006). Així en fer reaccionar fluorurs de glicosil amb acceptors aril- $\beta$ -glicòsids monosacàrids s'obtenien disacàrids units per enllaços  $\beta$ -1,3, excepte en el cas d'emprar el 4-nitrofenilxil·lobiòsid, on la regioselectivitat es perdia i s'obtenien barreges d'enllaços glicosídics  $\beta$ -1,3 i  $\beta$ -1,4. Ara bé, quan l'acceptor era un 4-nitrofenildisacàrid la regioselectivitat passava a ser fonamentalment  $\beta$ -1,4 (figura 29). En aquest cas, l'efecte de l'ocupació del subseti +II per una unitat de glicopiranosa esdevé crítica a l'hora d'orientar l'acceptor en la cavitat.

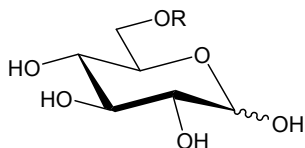




**Figura 29.** representació de la disposició espacial de l'acceptor *p*-nitrofenil glucòsid i el *p*-nitrofenil cel·lobiòsid en el centre actiu de la glicosintasa E383A d'*Streptomyces* sp.

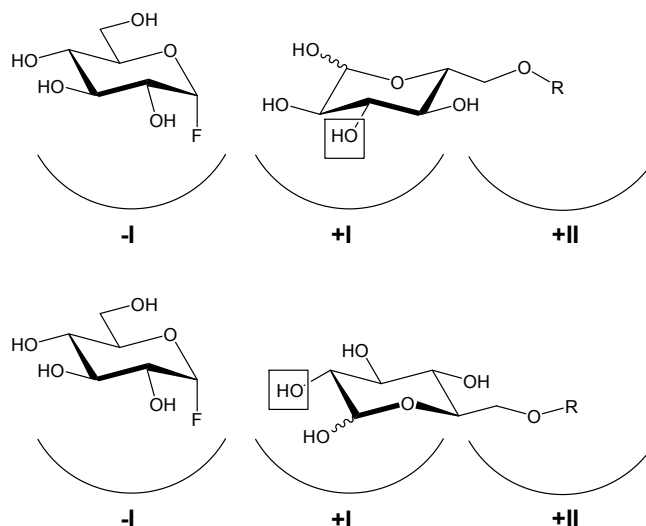
Al capítol 5 d'aquest treball es tractarà amb més detall la glicosintasa E383A de la  $\beta$ -glucosidasa d'*Streptomyces* sp.

A partir de l'observació d'aquesta dependència entre acceptor i regioselectivitat, Stick i col·laboradors (Stick *et al.*, 2004) van un pas més enllà per generar una *infidelitat estructural* en les glicosintases emprant aril èters o esters com a acceptors enlloc dels aril- $\beta$ -glicòsids (figura 30).



**Figura 30.** Acceptors emprats per a modificar la regioselectivitat de la glicosintasa E358S d'*Agrobacterium* sp. R = Bn, Bz, CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>NO<sub>2</sub>

Amb els substrats acceptors anteriors (figura 30) i emprant el fluorur d' $\alpha$ -galactosil com a donador s'obtingueren barreges de disacàrids units per enllaços  $\beta$ -1,2 i  $\beta$ -1,3 modificant la regioselectivitat característica de l'enzim que forma enllaços  $\beta$ -1,4 en emprar aril- $\beta$ -glicòsids. Aquests acceptors no naturals presenten un mode d'unió alternatiu al dels substrats naturals i els aril- $\beta$ -glicòsids. Se suggereix que el grup funcional en O-6 ocupa el subseti +II, mentre que la part glicònica s'acomoda al subseti +I, produint una rotació de l'anell i deixant a l'abast del donador els hidroxils en C-2 i C-3 per a la formació de l'enllaç glicosídic corresponent (figura 31).



**Figura 31.** Representació de la disposició espacial dels acceptor 6-O-bencil, 6-O-benzoil, i 6-O-(4-nitrobencil)-D-glucopiranosos en el centre actiu de la glicosintasa E358S d'*Agrobacterium* sp. La conformació que adopta orienta els hidroxils en C-2 i C-3 per a poder formar l'enllaç glicosídic.

### 3. 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*

Al laboratori de Bioquímica de l'IQS es treballa des de 1992 en l'estudi de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*.

Les 1,3-1,4- $\beta$ -glucanases són enzims que intervenen en el metabolisme dels  $\beta$ -glucans. Hi ha dos tipus de  $\beta$ -glucanases en funció del seu origen: les d'origen vegetal, responsables de despolimeritzar els 1,3-1,4- $\beta$ -glucans de les parets cel·lulars dels cereals durant la germinació del gra; les d'origen microbià (bacteris i fongs), que són enzims secretats al medi extracel·lular degradant polisacàrids del seu entorn que poden ser emprats com a fonts d'energia.

Les glucanases d'origen bacterià, com la de *Bacillus licheniformis*, són enzims monomèrics de pes molecular baix, elevada termoestabilitat i àmplia tolerància a les variacions de pH. Aquestes enzims tenen importants aplicacions biotecnològiques en la indústria alimentària, sobretot en la indústria cervesera i en l'elaboració de pinsos.

Segons la classificació de Henrissat (1991), les 1,3-1,4- $\beta$ -glucanases vegetals pertanyen a la família 17 de les glicosil hidrolases amb una estructura  $(\beta/\alpha)_8$  barrel i les microbianes a la família 16 amb una estructura tipus *jelly-roll*  $\beta$ -sandvitx constituïda per dues fulles  $\beta$  antiparal·leles, amb 7 i 8 cadenes respectivament. Aquestes dues famílies constitueixen un exemple d'evolució convergent: no tenen similitud de seqüència d'aminoàcids ni d'estructura tridimensional però presenten la mateixa especificitat per substrat.

A finals dels anys 80, l'equip de Biologia Molecular de l'Institut de Biotecnologia i Biomedicina de la Universitat Autònoma de Bellaterra (abans IBF) va aïllar i purificar una 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa a partir d'una soca de *Bacillus licheniformis* present en deixalles de cel·lulosa de la indústria paperera (Lloberas *et al.*, 1988a). El gen es clonà i seqüencià i l'enzim s'expressà en *Escherichia coli* (Planas *et al.*, 1992a).

La proteïna expressada es purificà per cromatografia de bescanvi catiònic i gel filtració i es caracteritzà (Planas *et al.*, 1992a; Planas *et al.*, 1992b; Pons *et al.*, 1997a). La 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* és un enzim monomèric format per 214 residus aminoàcids, un pes molecular de 24370 Da i presenta un pI bàsic de 8.5 – 8.7. Estructuralment, l'enzim mostra una elevada similitud de seqüència amb la de *B. subtilis* (68%), *B. amyloliquefaciens* (84%) i *B. macerans* (68%). Cinèticament, la seva activitat màxima la presenta a pH 7.2 i 55°C i té una vida mitjana de 70 minuts a 65°C i tampó acetat a pH 6. L'activitat específica és de 7500  $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  (mesurada per extrems reductors formats en la hidròlisi del  $\beta$ -glucà) i el valor de  $K_M$  pel  $\beta$ -glucà és de 1.5  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

És una endo-glicosidasa que té com a substrat natural els  $\beta$ -glucans d'ordi, polisacàrids de glucosa amb enllaços  $\beta$ -1,3 i  $\beta$ -1,4. Hidrolitza específicament enllaços  $\beta$ -1,4 sobre unitats de glucopiranososa 3-O substituïdes.

### 3.1. Cronologia

Per tal situar el lector sobre els coneixements que s'han anat adquirint en relació a l'estructura-funció de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*, així com el seu redisseny a glicosintasa es presenta una taula (taula 3) que resumeix els treballs més rellevants realitzats al grup des de l'any 1992.

Any	Contingut	Resultats	Publicació
1992	Expressió en <i>E. coli</i> Residus catalítics Estructura secundària per IR	Puresa > 95% enzim secretat Glu134 residu essencial per catàlisi Proteïna tipus $\beta$	Planas <i>et al.</i> , 1992 Planas <i>et al.</i> , 1992 Querol <i>et al.</i> , 1992
1993	Mecanisme i especificitat-hidròlisi	Retenció de configuració/estricte	Malet <i>et al.</i> , 1993
1994	PCR per mutagènesi dirigida Residus catalítics: mutagènesi d'escombratge Estructura producte d'hydròlisi	Mètode de mutagènesi per PCR amb 3 encebadors Glu134 i Glu138 són residus essencials Dinàmica i mecànica moleculars de substrats	Juncosa <i>et al.</i> , 1994 Juncosa <i>et al.</i> , 1994 Bernabé <i>et al.</i> , 1994
1995	Substrats sintètics: 4-MU glicòsids Contribució pont disulfur a catàlisi/estabilitat Estudis d'inhibició amb $\beta$ -glucà i cel-looligosacàrids Estructura 3D per cristal·lografia raigs X	Síntesi dels substrats 4-metilumbel·liferil glicòsids Afecta poc a l'estabilitat; no afecta l'activitat Modus d'unió cel-looligosacàrids i $\beta$ -glucà Estructura <i>jellyroll</i> $\beta$ -sandvitx	Malet <i>et al.</i> , 1995 Pons <i>et al.</i> , 1995 Planas i Malet, 1995 Hahn <i>et al.</i> , 1995
1996	Síntesi quimioenzimàtica de 4-MU glicòsids Síntesi quimioenzimàtica de tioligosacàrids	Millora de la síntesi de G4G3GOMU Tioligosacàrids com a inhibidors competitiu	Malet <i>et al.</i> , 1996 Moreau <i>et al.</i> , 1996
1997	Anàlisi mutacional del llaç principal Activitat transglicosidasa per control cinètic  Subsite mapping, perfil pH, modificació química	Correlació estructura, estabilitat i activitat Síntesi d'1,3-1,4- $\beta$ -oligosacàrids  4 subsetis; pKa residus catalítics	Pons <i>et al.</i> , 1997a Viladot <i>et al.</i> , 1997 Hrmova <i>et al.</i> , 1998 Viladot <i>et al.</i> , 1998 Malet i Planas, 1998
1998	Residus catalítics: anàlisi per rescat químic Mecanisme: anàlisi de Hammett Estabilitat: anàlisi mutacional del llaç Mecanisme: intermedi glicosil-enzim Redisseny: de glicosidasa a glicosintasa	Glu134 nucleòfil; Glu138 àcid-base general Gràfic de Hammett: $\log K_{cat}$ vs. pH és bifàsic Estabilitat vs activitat enzimàtica (N57A) Detecció de l'intermedi $\alpha$ -glicosil format <b>El mutant E134A és una glicosintasa</b>	Viladot <i>et al.</i> , 1998 Planas <i>et al.</i> , 1998 Pons <i>et al.</i> , 1997 Viladot <i>et al.</i> , 2001 Malet i Planas, 1998
1999	Complex proteïna-substrat Mecanisme: subsite mapping	Interaccions de pont d'hidrogen i stacking subsetis –I a –IV Subsetis per l'extrem reductor	Piotukh <i>et al.</i> , 1999 Viladot, 1999
2000	Mecanisme: estudis cinètics estat pre-estacionari Aplicació glicosintasa: <i>one-pot reaction</i>	Primer model mecanístic pre-estacionari Síntesi d'hexasacàrids amb glicosintases	Abel <i>et al.</i> , 2001 Fàjjes <i>et al.</i> , 2001
2001	Mecanisme: triada catalítica  Complex proteïna-substrat: anàlisi mutacional  Anàlisi cinètica amb 2-desoxiglicòsids  Mecanisme: estudis en estat pre-estacionari	Asp136 modula el pKa de l'àcid/base general  Interaccions subsetis –I i +I  Hidroxil en 2 de la glucosa del subseti –I  Model mecanístic - experiments stopped-flow	Roda, 2003  Planas <i>et al.</i> , 2010  Planas <i>et al.</i> , 2010  Abel <i>et al.</i> , 2003

Any	Contingut	Resultats	Publicació
2002	Mecanisme glicosintasa: residu catalític, perfil pH, modificació química	El Glu138 és la base general de la reacció glicosintasa amb un pKa de 5.9	Fajjes <i>et al.</i> , 2003
	Anàlisi cinètica de les reaccions en competència de la reacció glicosintasa	Hidròlisi química, autocondensació i hidròlisi espontània front a la reacció de condensació	Planas <i>et al.</i> , 2003
	Glicosintasa: especificitat per subseti -III	Gal $\beta$ 4Glc $\beta$ 3Glc $\alpha$ F és donador de la reacció glicosintasa	Fairweather <i>et al.</i> , 2003
2003	Aplicació glicosintasa: polisacàrids I	Síntesi quimio-enzimàtiques de 1,3-1,4- $\beta$ -glucans	Fajjes <i>et al.</i> , 2004
2006	Estructura cristal·logràfica de l'enzim (H-16M) i tetrasacàrid	Estructura cristal·logràfica enzim-producte	Gaiser <i>et al.</i> , 2006
2007	Review: síntesi de polisacàrids artificials	Aplicacions de glicosidases i glicosintases en la síntesi de nous polisacàrids	Fajjes i Planas, 2007
2010	Estudi dinàmica molecular	Canvis conformacionals en el substrat per a la reacció d'hidròlisi amb $\beta$ -glucanasa	Biarnés <i>et al.</i> , 2009
2011	Aplicació glicosintasa: polisacàrids II	Síntesi 1,3-1,4- $\beta$ -glucans. Control de la morfologia i el grau de polimerització.	Pérez <i>et al.</i> , 2011
2014	Mètode HTS amb sensor de fluorur	Screening activitat glicosintasa	Andres <i>et al.</i> , 2014
	Estudis bioquímics i estructurals mutant E134D	El mutant E134D presenta tant activitat hidrolasa com glicosintasa modulada per pel pH	Aragunde <i>et al.</i> 2014

Taula 3. Cronologia dels treballs realitzats sobre la  $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* des de 1992.

### 3.2. Mecanisme catalític

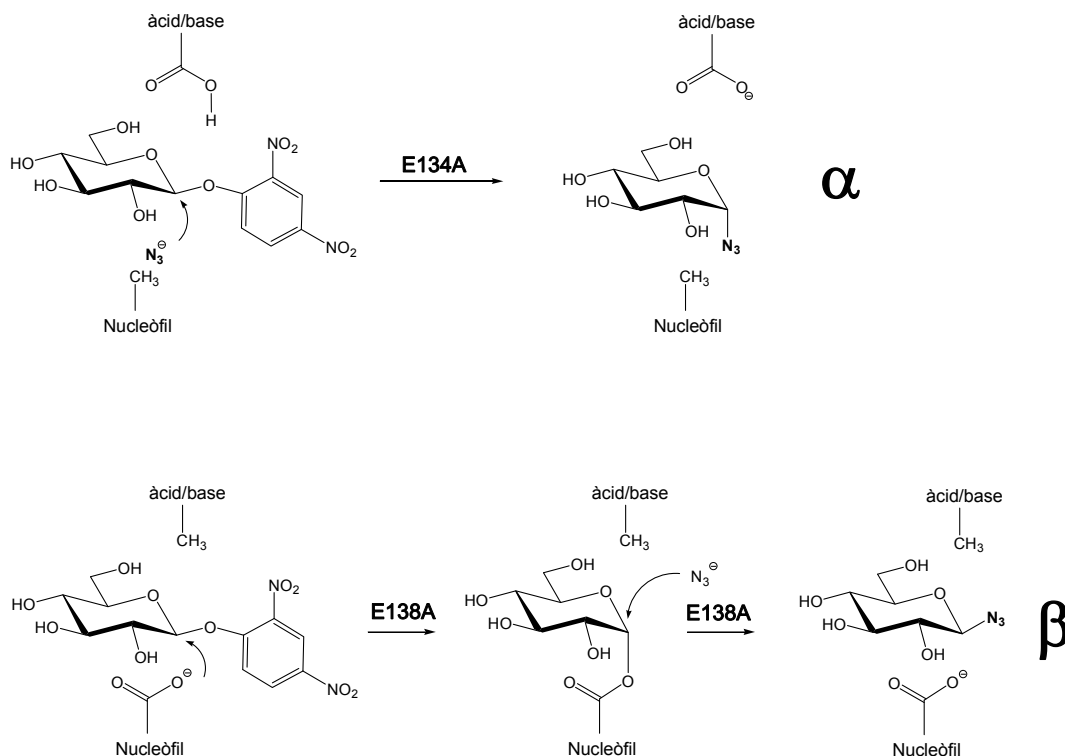
El seguiment del curs de la despolimerització enzimàtica del  $\beta$ -glucà per  $^1\text{H-RMN}$  determinà inequívocament que la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* actua segons un mecanisme de retenció de configuració anomèrica tant amb polisacàrids naturals (Malet *et al.*, 1993) com amb oligosacàrids amb aglicona cromofòrica de baix pes molecular (Malet i Planas, 1997). Aquest mecanisme és extensiu a la resta de liquenases de la família 16 de les glicosil hidrolases. Els residus catalítics de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* es van determinar per mutagènesi d'escombratge. Tots els residus Asp i Glu conservats entre les 1,3-1,4- $\beta$ -glucanases de *Bacillus* es van reemplaçar per residus isostèrics Asn i Gln, i s'analitzà l'activitat enzimàtica dels diferents mutants (Planas *et al.*, 1992b; Juncosa *et al.*, 1994a). Els resultats cinètics van mostrar que els mutants E134A i E138Q eren enzims completament inactius; d'aquesta manera els residus Glu134 i Glu138 són essencials per catalisi; a més s'observa la presència d'un tercer residu (Asp136), el qual la seva mutació no inactiva completament l'enzim però l'afecta de manera dràstica.

La primera assignació del paper funcional del nucleòfil i l'àcid/base general d'aquests residus es realitzà amb inhibidors epoxialquil glicòsids. L'experiment de marcatge d'afinitat amb aquests inhibidors de l'isoenzim de *B. amyloliquefaciens* (Hoj *et al.*, 1992) i l'estructura cristal·logràfica del complex covalent proteïna-inhibidor de l'híbrid 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa (*B. amyloliquefaciens* - *B. macerans*) amb el 3',4'-epoxibutí cel·lobiòsid (Keitel *et al.*, 1993) mostraven que l'inhibidor estava covalentment unit al Glu105, residu equivalent al Glu134 de la  $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*.

Amb els fets anteriors, es plantejà que el residu Glu134 corresponia al nucleòfil catalític i, per eliminació, el residu Glu138 esdevenia l'àcid-base general. L'estructura cristal·logràfica de l'enzim lliure mostrava que el residu Glu138 se situava a una distància propera respecte al

Glu134 (0.53 nm distància O-O entre carboxilats) per a la catàlisi, d'acord amb la situació geomètrica general de les glicosidases (McCarter *et al.*, 1994).

La identificació definitiva del paper funcional de cadascun dels residus catalítics es va determinar per la metodologia de rescat químic per addició d'un nucleòfil exogen (Viladot *et al.*, 1998). Sobre els mutants inactius E134A i E138A s'addiciona azida sòdica i el substrat activat 2,4-dinitrofenil glicòsid. El rescat de l'activitat catalítica rendeix el producte  $\alpha$ -glicosil azida pel mutant E134A i el  $\beta$ -glicosil azida pel mutant E138A, provant que el Glu134 és el residu nucleòfil mentre que el Glu138 és l'àcid-base general (figura 32).



**Figura 32.** Metodologia de rescat químic amb nucleòfil exogen de l'activitat dels mutants inactius E134A i E138A de la  $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*, corresponents als residus essencials nucleòfil i àcid-base.

El perfil de pH de la reacció enzimàtica presenta una corba típica de campana (Malet i Planas, 1997), en consonància amb la presència de dos residus catalítics essencials ionitzables. A pH àcids, per sota del  $\text{pK}_a$  dels dos residus essencials, el nucleòfil i l'àcid-base general es troben protonats, de manera que el nucleòfil no pot actuar com a tal i no es dona la reacció d'hidròlisi. A pH bàsics, ambdós residus es troben ionitzats, de manera que el residu àcid-base no pot realitzar la catàlisi àcida de l'etapa de glicosidació i en conseqüència no té lloc la hidròlisi. A pH intermedis, la reacció d'hidròlisi és possible i la seva velocitat depèn de la concentració de l'espècie iònica del residu Glu134 i d'àcid del residu Glu138.

A la taula 5 es mostren els valors de  $\text{pK}_a$  cinètics obtinguts per a les reaccions d'hidròlisi del substrat natural 1,3-1,4- $\beta$ -glucà d'ordi i el substrat sintètic  $\text{Glc}\beta\text{4Glc}\beta\text{3Glc}\beta\text{MU}$ .

Cinètica		$k_{cat}/K_M$	$k_{cat}$
Glc4Glc3Glc-MU	pK <sub>a1</sub> (Glu134)	5.4 ± 0.1	4.1 ± 0.2
	pK <sub>a2</sub> (Glu138)	7.1 ± 0.1	7.9 ± 0.2
1,3-1,4-β-glucà d'ordi	pK <sub>a1</sub> (Glu134)	n.d.	5.0 ± 0.2
	pK <sub>a2</sub> (Glu138)	n.d.	8.5 ± 0.1

**Taula 5.** pK<sub>a</sub> cinètics determinats a partir dels perfils  $k_{cat}$  i  $k_{cat}/K_M$  i per experiments de modificació química (Malet i Planas, 1997).

Pel que fa al tercer residu Asp136, es va proposar que actuava de modulador de pH de l'àcid-base general (Roda, 2003). En l'estructura cristal·logràfica de l'enzim lliure, el residu Asp136 forma un pont d'hidrogen fort amb el residu Glu134. Quan el nucleòfil es troba unit a l'inhibidor epoxibutílglicòsid, en l'estructura cristal·logràfica del complex enzim-inhibidor, l'Asp136 estableix un pont d'hidrogen amb el Glu138. En ambdós casos la distància del pont d'hidrogen és inferior a 2.8 Å.

### 3.3. Estructura de l'enzim

L'estructura tridimensional resolta per cristal·lografia de raigs X de la 1,3-1,4-β-glucanasa de *Bacillus licheniformis* (0.18 nm de resolució) (Hahn *et al.*, 1995a) mostra una estructura tipus jellyroll β-sandvitx, amb una elevada similitud amb altres 1,3-1,4-β-glucanases de la família 16 (Keitel *et al.*, 1993; Hahn *et al.*, 1995c; Hahn *et al.*, 1994; Heinemann *et al.*, 1995; Ay *et al.*, 1998). Constituïda per dues fulles β antiparal·leles, cadascuna d'elles consta de 7 i 8 cadenes respectivament, connectades per una fulla menor. A la superfície convexa de la proteïna s'uneixen ions calci que confereixen estabilitat a l'estructura nativa de la proteïna (Keitel *et al.*, 1994) i a la superfície còncava, hi ha el centre d'unió tipus esclétxa (*cleft*) (Davies i Henrissat, 1995).

Els centre actiu està definit per dos elements estructurals: la fulla β formada per 7 cadenes β antiparal·leles que dona forma al centre actiu i un llaç principal estructurat pels residus 51 a 67 que el cobreix parcialment. Aquest llaç està connectat al nucli β de la proteïna per l'únic pont disulfur present a l'enzim Cys61-Cys90. Aquest pont no és estructuralment essencial i aporta una estabilitat de 5.3 kcal·mol<sup>-1</sup> (Pons *et al.*, 1995).

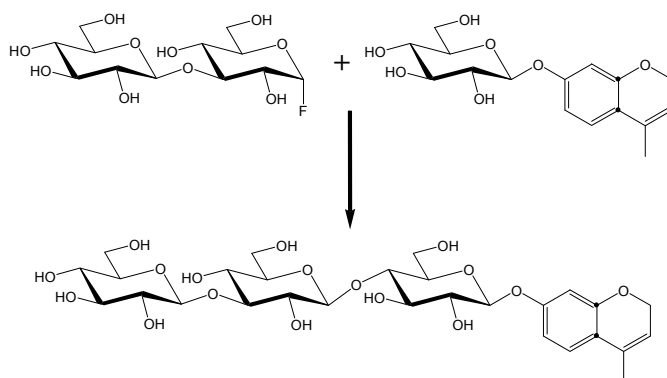
L'anàlisi cinètica amb substrats sintètics de diferent grau de polimerització va mostrar que el centre actiu està format per 6 subetis d'unió d'unitats de glucopiranososa, quatre per l'extrem no reductor (subetis -IV a -I) i dos per l'extrem reductor (+I i +II). La taula 6 resumeix els paràmetres cinètics obtinguts per a l'estudi de la reacció d'hidròlisi amb diferents substrats.

Substrat	$K_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$K_M$ (mM)	$K_I$ (mM)	$K_{cat}/K_M$ ( $M^{-1}\cdot s^{-1}$ )
G-MU				$0.348 \pm 0.008$
G3G-MU	$0.139 \pm 0.012$	$16.8 \pm 2.2$	$57 \pm 12$	$8.27 \pm 1.80$
G4G3G-MU	$4.58 \pm 0.06$	$2.69 \pm 0.06$	$37.8 \pm 1.5$	$1700 \pm 60$
G4G4G3G-MU	$8.86 \pm 0.10$	$0.79 \pm 0.02$	$36.4 \pm 1.8$	$11200 \pm 500$
G4G4G4G3G-MU	$8.78 \pm 0.20$	$0.66 \pm 0.03$	$29.3 \pm 9$	$13300 \pm 900$
G4G3G4G-OMe	$304.2 \pm 6.4$	$2.72 \pm 0.14$		$(111.8 \pm 8.0) \cdot 10^3$
G4G3G4G4G-OMe	$729.2 \pm 31.7$	$3.69 \pm 0.30$		$(197 \pm 25) \cdot 10^3$
G4G3G4G4G4G-OMe	$735.0 \pm 19.2$	$3.62 \pm 0.19$		$(203 \pm 16) \cdot 10^3$
G3G4G3G-OMe	$17.1 \pm 1.3$	$7.77 \pm 0.85$		$2200 \pm 400$
G3G4G3G4G3G-OMe	$333.2 \pm 39.3$	$3.82 \pm 0.74$		$(87 \pm 27) \cdot 10^3$

**Taula 6.** Paràmetres cinètics per a la reacció d'hidròlisi de la  $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* (55°C, pH 7.2, tampó citrat-fosfat,  $CaCl_2$  0.1 mM). El seguiment de les reaccions amb substrats-MU es realitzà per espectrofotometria UV/VIS en continu (Malet i Planas, 1997). Amb la resta de substrats el seguiment es realitzà per Somogyi-Nelson de mesura d'extrems reductors (Planas, 2000; Viladot 1999). La constant d'inhibició  $K_I$  es determinà segons un model d'inhibició acompetitiva.

### 3.4. Activitat glicosintasa de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*.

L'any 1998, Malet i Planas (1998) van demostrar que el mutant E134A de la  $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* era una glicosintasa tipus *endo* que actuava segons un mecanisme de catàlisi bàsica general. Aquest primer estudi de la glicosintasa de *Bacillus licheniformis* va prendre la reacció entre el fluorur d' $\alpha$ -laminaribiosil i l'acceptor cromofòric 4-metilumbel-liferil  $\beta$ -D-glucopiranosid com a reacció model (figura 33). Aquest mutant és capaç d'unir el fluorur d' $\alpha$ -laminaribiosil amb diferents glicòsids a través d'un mecanisme d'inversió de configuració en una sola etapa. Tal i com s'ha esmentat anteriorment, en haver-se suprimit el residu nucleòfil els productes de la reacció no poden ser hidrolitzats pel mutant, de manera que els rendiments de glicosidació són majors que quan s'empra l'enzim wt.

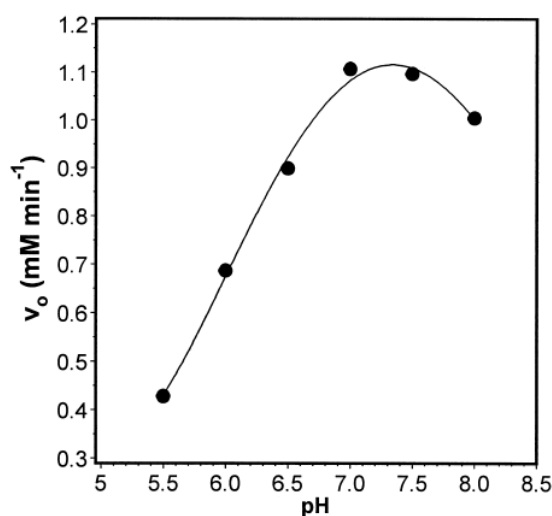


**Figura 33.** Reacció glicosintasa entre el fluorur d' $\alpha$ -laminaribiosil i l'acceptor cromofòric 4-metilumbel-liferil  $\beta$ -D-glucopiranosid catalitzada pel mutant E134A de la  $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*.

L'estudi del curs de la reacció anterior mitjançant HPLC va revelar la formació essencialment d'un nou producte cromofòric corresponent al 4-metilumbel-liferil trisacàrid (corroborat posteriorment per MALDI-TOF  $m/z$  685  $[M+Na]^+$ ).

La redigestió d'aquest producte de condensació amb l'1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* wt va conduir a la recuperació dels substrats de la reacció (laminaribiosa i 4-metilumbeliferil  $\beta$ -D-glucopiranosid). Aquest fet indicava que el producte contenia un nou enllaç  $\beta$ -1,4, ja que l'enzim wt és altament específic per a la hidròlisi d'enllaços  $\beta$ -1,4 en glucopiranoses 3-O-substituides. La regioselectivitat i estereoselectivitat del nou enllaç format es corroborà per  $^1\text{H-RMN}$  a partir d'un producte aïllat d'una reacció semipreparativa.

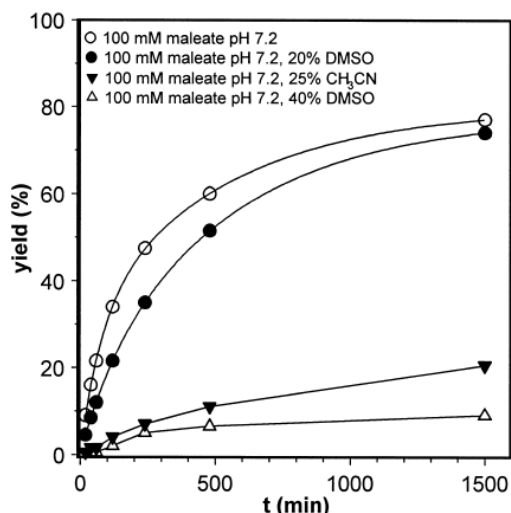
L'estudi de la reacció de condensació en funció de la temperatura va mostrar que l'òptim es desplaçava fins a 35°C, possiblement no com a conseqüència d'una pèrdua de termoestabilitat respecte de l'enzim wt (55°C) sinó degut a la inestabilitat tèrmica del donador fluorur de glicosil a temperatures superiors a 35°C. Pel que fa al perfil de pH, els rendiments màxims de reacció es donen a pH  $7.5 \pm 0.5$ . A la figura 34 es mostren els valors de velocitat inicial en funció del pH.



**Figura 34.** Velocitats inicial per a la condensació del fluorur d' $\alpha$ -laminaribiosil i el 4-metilumbeliferil  $\beta$ -D-glucopiranosid catalitzada pel mutant E134A de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa en funció del pH. Figura extreta de Malet i Planas, 1998.

La coaddició de dissolvents orgànics (DMSO, ACN), emprats normalment en la síntesi d'oligosacàrids amb glicosidases wt mitjançant l'aproximació cinètica, no van millorar els rendiments de glicosidació i fins i tot els van disminuir (figura 35).





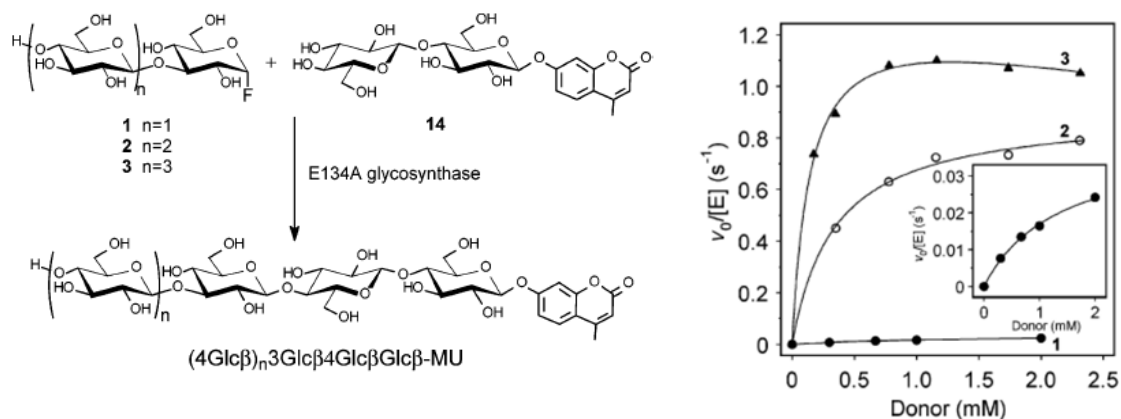
**Figura 35.** Efecte dels cosolvents orgànics en la reacció enzimàtica de condensació entre el fluorur d' $\alpha$ -laminariibiosil i el 4-metilumbel·liferil  $\beta$ -D-glucopiranosid catalitzada pel mutant E134A de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa. Figura extreta de Malet i Planas, 1998.

Emprant el fluorur d' $\alpha$ -laminariibiosil com a donador, es va portar a terme un primer anàlisi de la reactivitat amb diversos acceptors. Els resultats mostraven que el disacàrid 4-metilumbeliferil  $\beta$ -D-glucopiranosid era condensat de forma més eficient que el monosacàrid corresponent. S'observà a més una important disminució de la reactivitat en emprar el  $\beta$ -laminariibiosid com a acceptor, probablement per competir amb el donador pels mateixos lloc d'unió. Aquesta reactivitat diferencial pot reflectir també l'especificitat per substrat dels subyetis d'unió de l'extrem no reductor. Així, els subyetis +1/+2 prefereixen acomodar una unitat cel·lobiosil per davant d'una unitat laminariibiosil, tal i com s'observa en la disposició del substrat natural  $\beta$ -glucà d'ordi en el complex enzim-substrat productiu. No es va observar activitat amb el 4-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosid ni amb 4-nitrofenil- $\beta$ -D-N-acetil glucosaminòsid.

A continuació, es realitzà un estudi en profunditat de l'especificitat, cinètica i mecanisme de l'activitat glicosintasa del mutant anterior (Fajjes *et al.*, 2003):

#### ***Especificitat per donador***

Partint de l'especificitat per substrat de l'enzim wt, la mínima estructura que pot actuar com a donador correspon al fluorur d' $\alpha$ -laminariibiosil. Se sintetitzaren un seguit de donadors incrementant el grau de l'oligòmer i es van fer reaccionar amb el 4-metilumbeliferil  $\beta$ -cel·lobiosid com a acceptor (figura 36, taula 8).



**Figura 36.** Reacció entre diferents fluorurs d'α-glicosil i el 4-metilumbeliferil β-cel·lobiòsid. Figures extretes de Faijes *et al.*, 2003.

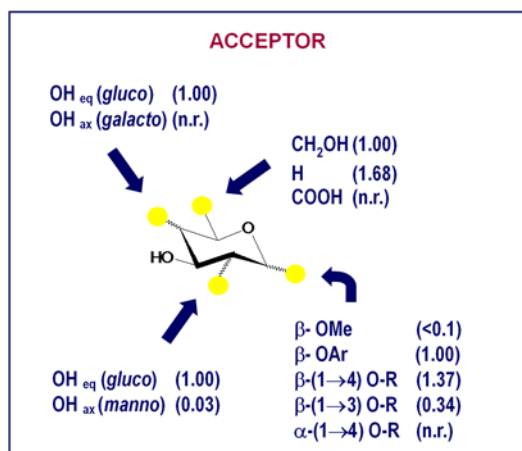
Donador	$K_M^{app}$ (mM)	$K_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$K_{cat}/K_M^{app}$ ( $mM^{-1}\cdot s^{-1}$ )
Glcβ3GlcαF	$1.36 \pm 0.18$	$0.040 \pm 0.003$	$0.030 \pm 0.006$
Glcβ4Glcβ3GlcαF	$0.34 \pm 0.04$	$0.91 \pm 0.03$	$2.65 \pm 0.42$
Glcβ4Glcβ4Glcβ3GlcαF	$0.15 \pm 0.03$	$1.35 \pm 0.09$	$8.98 \pm 2.24$

**Taula 8.** Paràmetres cinètics per a la reacció de condensació entre els donadors anteriors i l'acceptor 4-metilumbeliferil β-cel·lobiòsid catalitzada pel mutant E134A de la β-glucanasa de *Bacillus licheniformis*.

El seguiment de les reaccions de condensació mitjançant HPLC va mostrar un comportament tipus Michaelis – Menten pels donador di i trisacàrid, mentre que pel tetrasacàrid s'observà certa inhibició per substrat (figura 36, n = 3).

**Especificitat per acceptor**

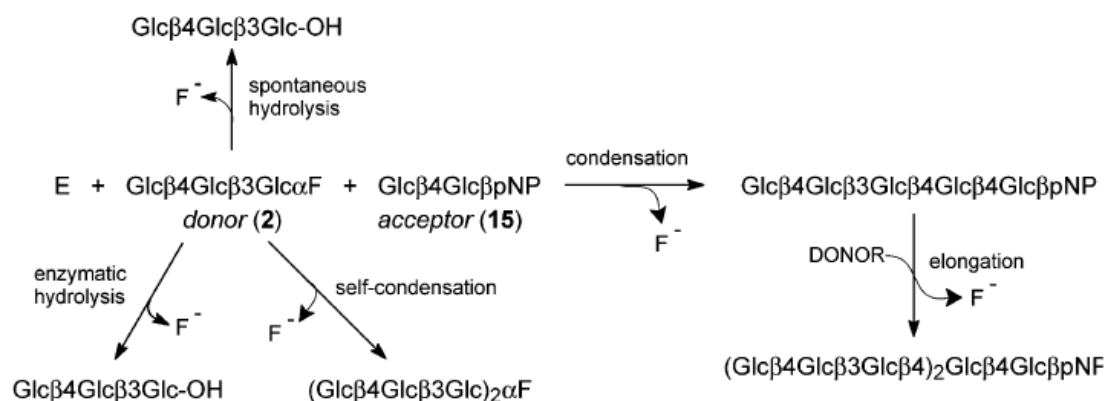
L'especificitat pels subetis de l'acceptor (+1 i +2) es va estudiar a partir d'una sèrie de substrats monosacàrids i disacàrids, emprant el fluorur d'α-laminaribiosil com a donador. En tots els casos en què hi havia conversió, l'enllaç format fou β-1,4 (determinat per RMN). S'estudiaren els rendiments relatius obtinguts a 24 hores de reacció (Figura 37).



**Figura 37.** Esquema dels acceptors glicosídics emprats en l'estudi d'especificitat. Entre parèntesi els rendiments relatius de transglicosidació transcorregudes 24 hores. Condicions de reacció: tampó maleat 50 mM, pH 7, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, [donador] = 3 mM, [acceptor] = 6 mM, [E134A] = 3 μM, 35°C. n.r.: no reacció.

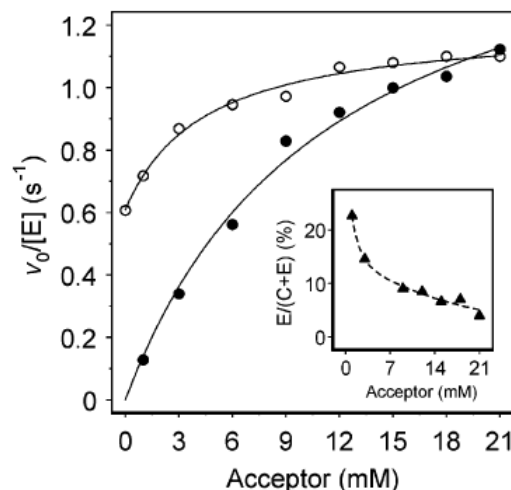
**Processos en competència**

En la majoria de reaccions glicosintasa apareixen processos secundaris que acompanyen la reacció d'interès. Per tal de poder avaluar la seva importància, es realitza un estudi de les reaccions en competència a la reacció model entre el trisacàrid  $\text{Glc}\beta\text{4Glc}\beta\text{3Glc}\alpha\text{F}$  i el disacàrid  $\text{Glc}\beta\text{4Glc}\beta\text{pNP}$  (figura 38). D'aquesta manera, tant el donador fluorur d' $\alpha$ -glicosil com el producte de transglicosidació poden actuar com a acceptors, ja que la configuració de l'hidroxil susceptible de ser atacat en l'extrem no reductor presenta la mateixa estereoquímica que l'acceptor normal. Això comporta la formació d'un producte d'autocondensació i d'un producte d'elongació respectivament. L'anàlisi de la globalitat del procés mostra que la competència entre la reacció d'autocondensació i la reacció de condensació depèn de les afinitats relatives i les concentracions. Atès que el donador emprat en l'estudi és millor acceptor que el *p*-nitrofenil  $\beta$ -cel·lobiòsid, l'autocondensació del donador resulta important a baixes concentracions d'acceptor mentre que esdevé un procés negligible en presència d'un excés d'acceptor. També existeixen dos processos més, la hidròlisi espontània i la hidròlisi enzimàtica del donador, en els quals s'allibera anió fluorur (la qual cosa permet el seu seguiment mitjançant FSE) i que resulten poc importants en les condicions de reacció glicosintasa.



**Figura 38.** Processos en competència per a la reacció entre el donador trisacàrid i l'acceptor 4-nitrofenil  $\beta$ -cel·lobiòsid catalitzada pel mutant E134A de la  $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*. Figura extreta de Fajjes *et al.*, 2003.

La reacció de condensació assoleix el 70 – 80% de rendiment quan s'empra una relació molar 1:5 donador:acceptor. El procés d'elongació esdevé el 20% de la totalitat de processos a concentracions baixes d'acceptor, però es redueix fins al 2 – 4% en emprar la relació 1:5.



**Figura 39.** Cinètiques per a la reacció de condensació donador-acceptor catalitzada pel mutant E134A de la  $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*. Productes de condensació mesurats per HPLC (●). Totalitat d'anió fluorur alliberat mesurat mitjançant FSE (○). L'insert mostra el percentatge de producte d'elongació determinat per HPLC. E/(C+E): on E correspon a la taxa d'elongació mentre que C correspon a la taxa de condensació. Condicions: tampó maleat 50 mM pH 7, 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 35°C, [E134A] = 0.04 – 0.16  $\mu\text{M}$ , [donador] = 2 mM, [acceptor] = 0 – 21 mM. Figura extreta de Faijes *et al.*, 2003.

### Especificitat subseti –III

El lloc d'unió de la  $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* està format per 6 subsetis, quatre dels quals es troben (-IV a +II). De tots ells, el subseti –III és el que dona lloc a una major contribució a l'estabilització de l'estat de transició (Malet i Planas, 1998). Per tal d'avaluar-ne l'especificitat, se sintetitzaren substrats trisacàrids on l'últim residu fos una unitat de galactosa enlloc de glucosa ( $\text{Gal}\beta 4\text{Glc}\beta 3\text{Glc}\beta\text{Mu}$ ). S'assajà l'activitat hidrolasa emprant l'enzim wt i s'observà que la relació entre  $k_{\text{cat}}/K_M$  per ambdós trisacàrids ( $\text{Glc}\beta 4\text{Glc}\beta 3\text{Glc}\beta\text{Mu}$  i  $\text{Gal}\beta 4\text{Glc}\beta 3\text{Glc}\beta\text{Mu}$ ) era d'1.3. D'aquesta manera, l'enzim admet una unitat de galactosa al subseti –III sense gairebé cap efecte sobre la unió. Una vegada comprovada la validesa del substrat  $\text{Gal}\beta 4\text{Glc}\beta 3\text{Glc}\beta\text{MU}$  en l'activitat hidrolasa amb l'enzim wt, es traslladà l'estudi a l'activitat glicosintasa amb el mutant E134A i emprant el substrat  $\text{Gal}\beta 4\text{Glc}\beta 3\text{Glc}\alpha\text{F}$  com a donador i dos substrats  $\text{Glc}\beta\text{MU}$  i  $\text{Glc}\beta 4\text{Glc}\beta\text{MU}$  com a acceptors. Alguns dels resultats obtinguts es mostren taula 11 en comparació amb els resultats obtinguts mitjançant el donador  $\text{Glc}\beta 4\text{Glc}\beta 3\text{Glc}\alpha\text{F}$  en les mateixes condicions.

Donador	Acceptador	Relació D:A	[E134A] ( $\mu\text{M}$ )	Producte Condensació (%)	Producte Elongació (%)
$\text{Glc}\beta 4\text{Glc}\beta 3\text{Glc}\alpha\text{F}$	$\text{Glc}\beta 4\text{Glc}\beta\text{MU}$	1:5	12.9	55	8
$\text{Gal}\beta 4\text{Glc}\beta 3\text{Glc}\alpha\text{F}$	$\text{Glc}\beta 4\text{Glc}\beta\text{MU}$	1:5	12.3	76	-

**Taula 11.** Rendiments de condensació i elongació per a la reacció glicosintasa catalitzada pel mutant E134A de la  $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* emprant els donadors  $\text{Glc}\beta 4\text{Glc}\beta 3\text{Glc}\alpha\text{F}$  i  $\text{Gal}\beta 4\text{Glc}\beta 3\text{Glc}\alpha\text{F}$ . Condicions de reacció: 50 mM tampó maleat, pH 7.0, 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 35°C, 20 minuts.

Els resultats de l'estudi mostraven que les velocitats de condensació per ambdós donadors eren equivalents en les mateixes condicions i que la principal diferència radicava en el fet que el donador amb una unitat de galactosa a l'extrem no reductor, no era substrat per la reacció

d'elongació i en conseqüència els rendiments de formació del pentasacàrid (reacció de condensació) eren majors que pel substrat amb glucosa.

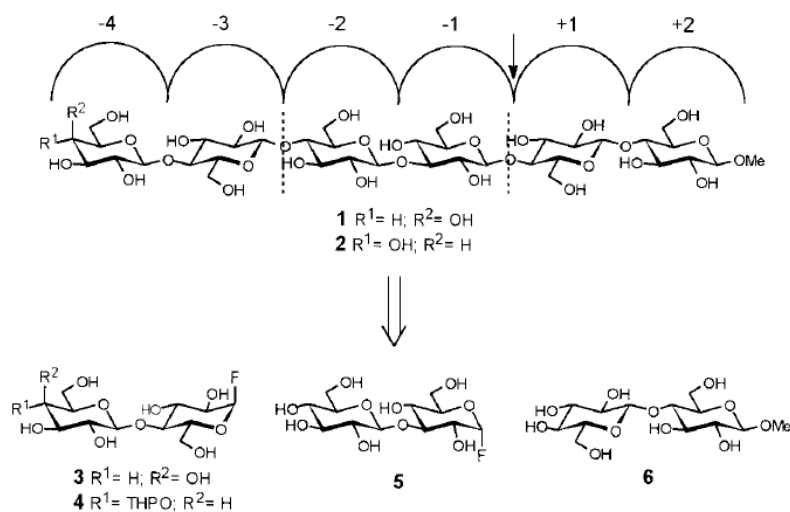
### 3.5. Aplicacions de la glicosintasa E134A de *Bacillus licheniformis*

#### 3.5.1. Síntesi de polisacàrids

La síntesi *in vitro* de polisacàrids no naturals mitjançant glicosintases, aprofitava la capacitat dels substrats donadors activats per autocondensar i formar polímers regulars. D'aquesta manera, s'assolí un nou  $\beta$ -glucà lineal d'unitat repetitiva  $4\beta\text{Glc}3\beta\text{Glc}$  per polimerització del fluorur d' $\alpha$ -laminaribiosil via formació d'enllaços glicosídics  $\beta$ -1,4 catalitzada pel mutant E134A de la  $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* (Faijes *et al.*, 2004). Aquesta activitat com a polimerasa es desenvoluparà en el capítol 3 d'aquesta Tesi.

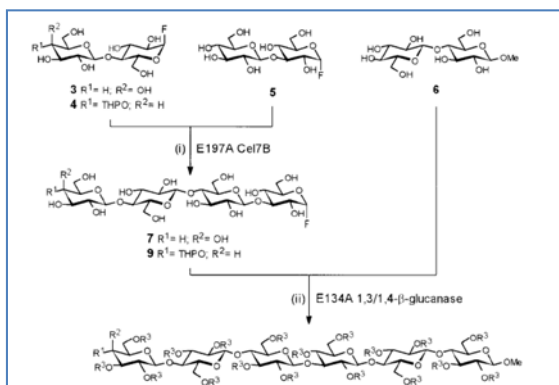
#### 3.5.2. Síntesi d'oligosacàrids

L'any 2001 (Faijes *et al.*, 2001) es va reportar un exemple d'aplicació sintètica a partir de dues endo-glicosintases amb diferent especificitat, el mutant E134A de la  $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* i el mutant E197A de la cel·lulasa Cel7B d'*Humicola insolens* per a la síntesi de substrats hexasacàrids amb enllaços mixtes  $\beta$ -1,3,  $\beta$ -1,4 (Figura 40, 1 i 2).

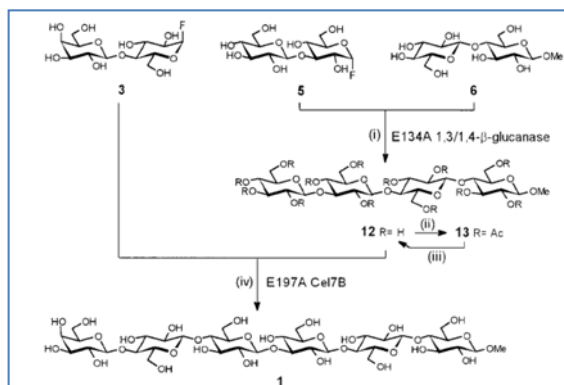


**Figura 40.** Substrats hexasacàrids sintetitzats per acoblament de dues glicosintases amb diferent especificitat. Les línies discontinues indiquen els sintons disacàridics emprats per a la síntesi. Figura extreta de Faijes *et al.*, 2001.

Per assolir la síntesi enzimàtica s'empraren dues estratègies:



**Figura 41A.** Ruta sintètica 1.  
Figura extreta de Fajjes *et al.*, 2001.



**Figura 41B.** Ruta sintètica 2.

A partir de la primera ruta sintètica (figura 41A), es realitza primer la condensació catalitzada per la glicosintasa E197A Cel7B d'una barreja equimolar de fluorur d'α-lactosil (figura 41A, **3**) i fluorur d'α-laminaribiosil (figura 41A, **5**) fins a conversió completa al tetrasacàrid corresponent. Després de 12 hores de reacció s'addiciona el metil β-cel·lobiòsid (figura 41A, **6**) i la glicosintasa E134A de la β-glucanasa. S'empra un excés molar de metil β-cel·lobiòsid de 5:1 respecte el tetrasacàrid donador (figura 41A, **7**) per evitar-ne la seva hidròlisi.

La segona estratègia s'inicia amb la reacció entre el fluorur d'α-laminaribiosil (figura 41B, **5**) i metil β-cel·lobiòsid (figura 41B, **6**) catalitzada per la glicosintasa E134A. El tetrasacàrid resultant s'obté amb un rendiment del 44%, a més de productes d'autocondensació i elongació. S'acetila el cru per a purificar el producte d'interès. El metil β-tetrasacàrid (figura 41B, **12**) aïllat s'empra com a acceptor en la segona reacció enzimàtica amb el fluorur d'α-lactosil (figura 41B, **3**) i catalisi de la E197A Cel7B.

Aquest treball, a més de constituir un exemple d'aplicació de glicosintases per a la síntesi d'un oligosacàrid d'interès, estableix un seguit d'estratègies per tal de minimitzar o eliminar les reaccions secundàries d'autocondensació del donador i d'elongació del producte de transglicosidació:

- L'ús de donadors disacàrids amb configuració oposada en l'hidroxil que actua d'acceptor
- L'ús de grups protectors temporals en l'hidroxil polimeritzable del donador
- Addició d'un excés d'acceptor per a disminuir la probabilitat que el donador actuï d'acceptor.

### OBJECTIUS

Els carbohidrats son biomolècules essencials en tots els organismes vius. Estan involucrades en nombroses funcions biològiques com a elements estructurals, reserves energètiques i com a mediadors en la senyalització cel·lular, essent elements fonamentals pels processos biològics de reconeixement cel·lular (adhesió i senyalització), interaccions hoste-patogen i processos immunològics. En els darrers anys, aquestes sacàrids i glicoconjugats (tant naturals com artificials) han esdevingut objecte d'estudi per part de la glicobiologia i la glicoquímica originant una gran demanda de metodologies sintètiques per accedir a la seva producció.

La síntesi química convencional requereix de protocols sintètics complexos amb nombroses etapes de protecció, desprotecció i activació per tal d'assolir la regioselectivitat i estereoselectivitat requerides en la síntesi d'aquestes biomolècules. De forma complementària i/o alternativa, la glicosidació enzimàtica ofereix avantatges respecte la química tradicional, proporcionant selectivitat i una alta regioselectivitat sense necessitat d'emprar grups protectors. Les glicosiltransferases i les glicosidases són els enzims que a la natura s'encarreguen de la formació i hidròlisi d'enllaços glicosídics, respectivament. En determinades condicions, les glicosidases tenen la capacitat de catalitzar reaccions de transglicosidació, i presenten certes avantatges respecte les glicosiltransferases; això és, una manipulació més senzilla i en general una elevada estabilitat, l'ús de substrats menys complexos i costosos, i una especificitat més relaxada que permet ampliar la seva aplicabilitat a un gran nombre de substrats.

Tanmateix, l'ús de glicosidases per a la síntesi de carbohidrats presenta un desavantatge important, i és el fet que l'activitat hidrolítica pròpia de l'enzim segueix present, afectant el rendiment de les reaccions sintasa degut a l'aparició de productes secundaris d'hidròlisi.

La metodologia glicosintasa va ser introduïda l'any 1998 tant sobre endo-glicosidases com sobre exo-glicosidases. Està basat en un redisseny racional de centre actiu d'aquests enzims que consisteix en mutar el residu que actua de nucleòfil per una altre residu que no pot fer aquesta funció de manera que l'enzim resultant té l'activitat hidrolítica suprimida. Aquesta mutació impedeix la formació de l'intermedi glicosil-enzim del mecanisme d'hidròlisi. Les mutacions aplicades més comuns consisteixen en la substitució del residu nucleòfil per Ala, Gly i Ser. Amb tot, és necessari l'ús de donadors glicosídics activats amb la configuració anomèrica oposada a la del substrat de la reacció normal d'hidròlisi. Aquests donadors mimetitzen l'intermedi glicosil-enzim i són capaços de transferir-se a un acceptor adient rendint a un nou enllaç glicosídic.

A l'actualitat la metodologia glicosintasa s'ha estès a 16 famílies de glicosidases que actuen amb retenció de configuració proporcionant un ampli ventall d'activitats específiques. Ha esdevingut una eina sintètica útil proporcionant noves solucions a la síntesi de carbohidrats i glicoconjugats.

## OBJECTIUS

---

En aquest context, l'objectiu general del present treball és l'aprofundiment en la metodologia glicosintasa tant a nivell mecanístic com aplicat. Per assolir aquest objectiu es treballa amb dues glicosintases, el mutant E134A de la  $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* i el mutant E383A de  $\beta$ -glucosidasa d'*Streptomyces* sp. El treball es pot desglossar amb els següents objectius concrets:

- ✓ Anàlisi funcional del residu D136 en l'activitat de la glicosintasa E134A de *Bacillus licheniformis*.
- ✓ Exploració de noves glicosintases de la  $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* per mutació del residu nucleòfil.
- ✓ Obtenció de nous oligosacàrids i polisacàrids per aplicació de la metodologia glicosintasa.
- ✓ Estudi de l'especificitat per substrat i de la immobilització de la glicosintasa E383A de la  $\beta$ -glucosidasa d'*Streptomyces* sp.



## **ANÀLISI I DISCUSSIÓ DE RESULTATS**

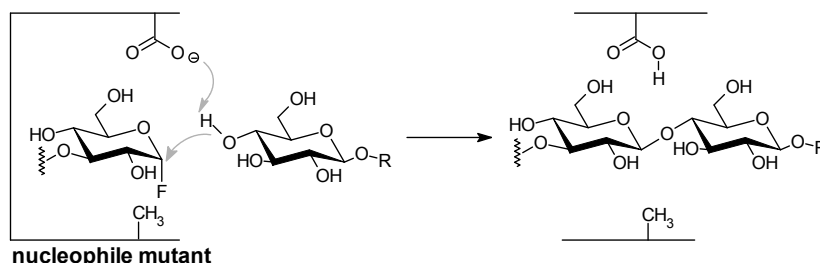


## Capítol 1: Anàlisi mutacional/funcional del residu D136 en l'activitat glicosintasa del mutant E134A de la $\beta$ -glucanasa

### INTRODUCCIÓ

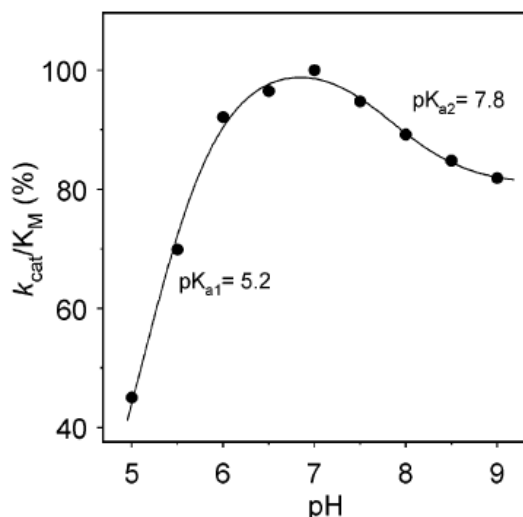
#### 1. Reacció glicosintasa: mecanisme

El mutant E134A de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* és una glicosintasa de tipus *endo* que actua segons un mecanisme de catàlisi bàsica general. De la seva caracterització detallada (Faijes et al., 2003) es desprèn que el residu E138, que actua com a àcid general en el mecanisme d'hidròlisi de l'enzim wt, exerceix el paper de base general, augmentant la nucleofília de l'hidroxil en C4 de l'acceptor. A la figura 2.1 es mostra el mecanisme per a la reacció glicosintasa.



**Figura 2.1.** Reacció de transglicosidació catalitzada pel mutant E134A de la  $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*.

En el mateix estudi es realitzà un perfil de pH del mutant glicosintasa (figura 2.2) per a la reacció entre el donador disacàrid Glc $\beta$ 3Glc $\alpha$ F i l'acceptor Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ NP, en condicions saturants d'acceptor (24 mM).



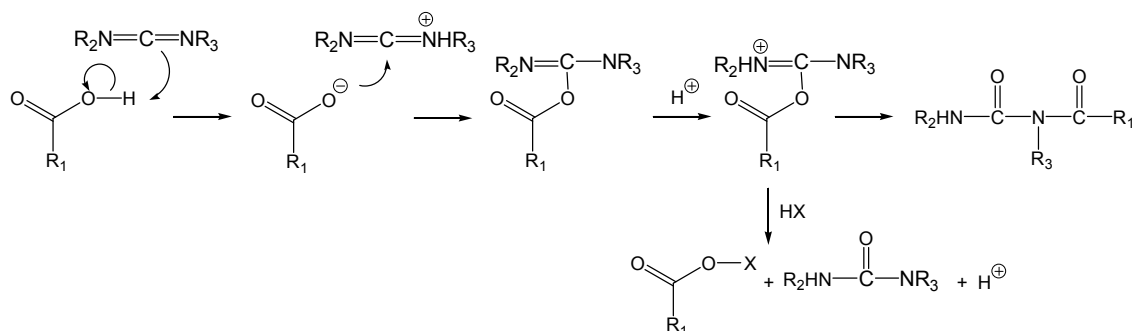
**Figura 2.2.** Dependència de  $k_{cat}/K_M$  del donador front del pH per a la condensació de Glc $\beta$ 3Glc $\alpha$ F amb Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ NP, catalitzada pel mutant E134A de la  $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*, en tampó citrat/fosfat 50 mM, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, força iònica constant ( $I = 0.5$  M), 35°C. Figura extreta de Faijes *et al.*, 2003.

L'anàlisi del perfil de pH sobre  $k_{cat}/K_M$  del donador en la reacció glicosintasa mostra una corba típica de catàlisi bàsica. Per a  $pH < 5$  l'enzim resulta inactiu. La seva activitat augmenta a mesura que s'eleva el pH fins a un màxim a pH proper a 7. Es determina un  $pK_a$  cinètic de 5.2 corresponent al residu que actua com a base general. D'acord amb el mecanisme proposat a la figura 2.1, el residu E138 actuarà de base general i aquest  $pK_a$  de 5.2 correspondria a la seva ionització. El perfil de pH del mecanisme hidrolític de l'enzim wt mostra que el  $pK_a$  cinètic d'aquest residu, que en aquesta ocasió actua d'àcid general, és de 7.0. La davallada del  $pK_a$  pel mutant E134A s'explica pel fet que en aquest mutant ha desaparegut la càrrega negativa del residu nucleòfil i en conseqüència permet una ionització del residu E138 a pHs inferiors. La distribució electrònica del mutant E134A és equivalent a la que existeix en l'enzim wt quan s'ha format l'intermedi glicosil-enzim, que alhora permet la ionització del residu E138 per actuar com a base en l'etapa de desglicosidació.

El perfil de pH per al mutant E134A, però, mostra que per a pH major de 7 apareix una davallada de l'activitat glicosintasa, fins a un 70% de l'activitat total. Aquest fet indica que un altre residu amb incidència directa sobre l'activitat, però sense ser-ne essencial, s'està ionitzant. El centre actiu de la  $\beta$ -glucanasa consta, a més dels dos residus essencials E134 i E138, d'un tercer residu D136 que es troba estabilitzant el nucleòfil E134 (tríada catalítica). En absència de residu nucleòfil, es planteja la hipòtesi que el residu D136 estabilitza la forma carboxilat del residu E138, permetent-lo actuar com a base general. A més aquest residu seria el responsable del segon  $pK_a$  de 7.8 observat al perfil de pH del mutant glicosintasa, car és l'únic residu ionitzable situat a una distància inferior a 5 Å del residu E138, com mostra l'estructura cristal·logràfica de l'enzim lliure (Hahn et al., 1995).

Per tant, es proposa que l'D136, tercer residu que completa la tríada catalítica de la  $\beta$ -glucanasa wt, passa a estabilitzar el residu E138 en el mutant glicosintasa, i es el responsable de la segona ionització observada al perfil de pH. En aquest primer capítol es vol donar resposta a la hipòtesi plantejada.

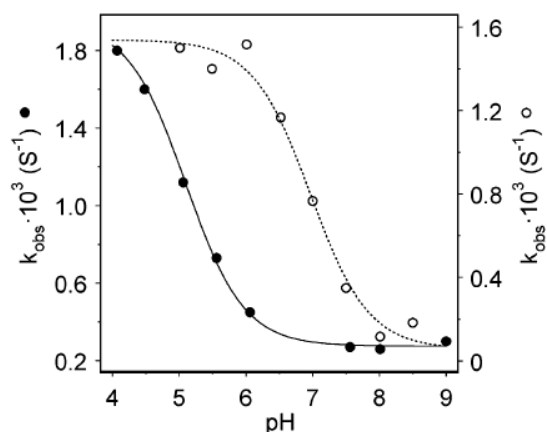
Els estudis de modificació química del mutant E134A (Faijes et al., 2003), mostraven que l'activitat glicosintasa es redueix quan l'enzim se sotmet a un tractament amb EDC. La inactivació enzimàtica s'associa a la modificació dels carboxilats del centre actiu. El procés és irreversible i segueix una corba de decaïment monoexponencial amb una activitat residual, després d'un temps d'incubació llarg. D'altra banda, la inactivació de l'enzim wt amb EDC rendeix un enzim completament inactiu, sense activitat residual. Aquest fet comportaria l'existència d'una accessibilitat i/o reactivitat diferent dels residus carboxílics essencials per ambdós enzims. De fet, la reacció amb EDC s'inicia per protonació del nitrogen de la carbodiimida per part d'un àcid carboxílic, seguit d'un atac nucleofílic en l'àtom de carboni central per part de l'anió carboxilat (figura 2.3.):



**Figura 2.3.** Mecanismes proposats per a la reacció d'una carbodiimida amb l'àcid carboxílic de la cadena lateral d'un glutamat o aspartat per a rendir l'O-acilisourea (Chan et al., 1988; Timkovich, 1977; Hoare i Koshland, 1967).

En el cas que l'D136 i el E138 formin un pont d'hidrogen en l'enzim glicosintasa, aquest hidrogen activaria l'atac de la carbodiimida que podria reaccionar amb qualsevol dels dos; Per tant, si es derivatitza el E138 l'enzim esdevé inactiu, mentre que si es modifica l'D136, en no ser essencial, l'activitat glicosintasa queda alterada però restarà una activitat residual. A més la derivatització de l'D136 protegiria el E138 d'un possible atac, donat que per impediment estèric l'accessibilitat envers el residu base general seria molt baixa. Pel que fa a l'enzim wt, el residu E134 es troba formant un pont d'hidrogen amb l'D136. D'aquesta manera el E138 resta accessible a l'atac de l'agent químic. En conseqüència s'obté un enzim completament inactiu. Com a nota final, cal destacar que l'enzim no es modifica en presència d'un lligand específic del centre actiu, com és l'hexasacàrid Galβ4Glcβ4Glcβ3Glcβ4Glcβ4GlcβOME (Faijes et al, 2001), la qual cosa reforça l'afirmació que la modificació química té lloc en els residus carboxílics del centre actiu.

El perfil de pH per a la glicosintasa E134A sotmesa a inactivació amb EDC dona lloc a un pK<sub>a</sub> aparent de 5.3 ± 0.2, mentre que per l'enzim wt el pK<sub>a</sub> és de 7.0 ± 0.1. (figura 2.4). Els valors de pK<sub>a</sub> obtinguts per a l'enzim modificat químicament són consistents amb els valors de pK<sub>a</sub> determinats a partir dels perfils de pH de l'enzim glicosintasa i el wt, observant-se en ambdós casos un davallada del pK<sub>a</sub> del residu E138 d'entre 1.7 – 1.8 unitats de pH, després d'eliminar el residu que actua de nucleòfil E134.



**Figura 2.4.** Perfil de pH de l'activitat glicosintasa del mutant E134A de la  $\beta$ -glucanasa en presència d'EDC. (O) Perfil de pH de l'activitat hidrolasa de la  $\beta$ -glucanasa wt. Condicions: tampó ternari a força iònica constant (pH 4-9), [E134A] = 26  $\mu$ M, [EDC] = 120 mM. Figura extreta de Faijes *et al.*, 2003.

Finalment s'analitza el doble mutant E134A/E138A. Resulta inactiu per a l'activitat hidrolasa amb una  $k_{cat}$  residual (Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 3Glc-2,4DNP) del mateix ordre de magnitud que l'obtinguda pel mutant E134A. A més, l'activitat es rescata amb azida de sodi donant lloc a l' $\alpha$ -glicosil azida, d'igual forma que el mutant E134A (Viladot *et al.*, 1998). Aquests resultats palesen que la topologia del centre actiu no es veu alterada per la doble mutació i que la hidròlisi del grup activat 2,4-DNP no requereix d'assistència protònica d'un àcid general en l'enzim. El doble mutant no presenta activitat glicosintasa. De totes maneres l'addició d'azida de sodi en presència de donador Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 3Glc $\alpha$ F rendeix un adducte  $\beta$ -glicosil azido, fruit de la seva acció com a nucleòfil (Faijes *et al.*, 2003)

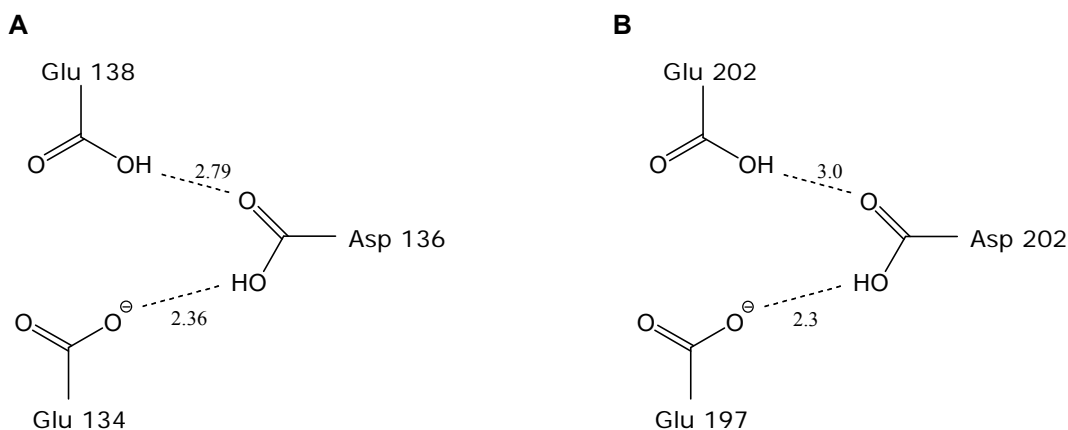
Els resultats anteriors han donat solidesa a l'assignació del residu E138 com a base general en l'activitat glicosintasa. Els experiments realitzats en aquest treball, juntament amb tota la informació generada al grup sobre la  $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* pretenen donar llum a la funció que aconsegueix el residu D136 en l'activitat glicosintasa.

## 2. Paper del residu D136 en la $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*

Les diferents famílies de glicosil hidrolases que actuen amb retenció de configuració a nivell estructural conserven els residus nucleòfil i àcid base general. A més, les famílies 7 i 16 o clan B de glicosil hidrolases comparteixen un tercer residu, un aspartat, situat a distància de pont d'hidrogen del residu nucleòfil i àcid/base general. Aquest tercer residu es correspon amb l'D136 de la  $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* i tal i com s'observa a l'estructura cristal·logràfica de l'enzim wt (Hahn *et al.*, 1995), es troba formant un pont d'hidrogen fort amb el residu nucleòfil E134. L'estructura cristal·logràfica del complex covalent proteïna-inhibidor de l'hibrid 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa (*B. amyloquefaciens* – *B. macerans*), amb el 3'-4'-epoxibutí cel·lobiosid (Keitel *et al.*, 2003) mostra que l'inhibidor està unit covalentment amb el nucleòfil E105 (equivalent al residu E134 en *Bacillus licheniformis*), establint-se un pont d'hidrogen amb

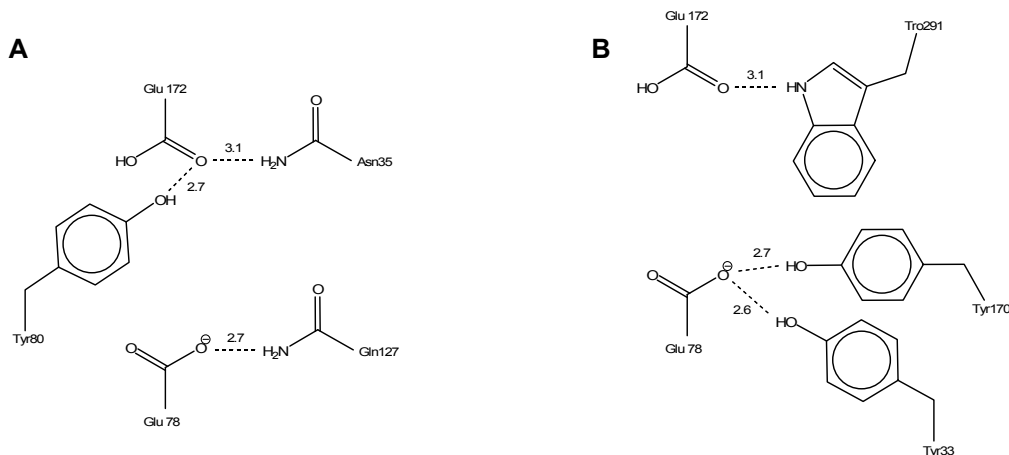
el residu equivalent a l'D136. En tots dos casos les distàncies de pont d'hidrogen són inferiors a 2.8 Å, la qual cosa indica que la mobilitat d'aquest residu en l'entorn del centre actiu permet la interacció amb ambdós residus essencials i en conseqüència actuar com a modulador dels  $pK_a$  dels residus essencials. Els tres residus formen part d'una tríade catalítica, pròxima en la seqüència d'aminoàcids i integrant de la mateixa estructura secundària.

A continuació es mostren dues tríades catalítiques d'enzims de diferents famílies (figura 2.5). En ambdues figures el residu glutamat situat a la part inferior actua de nucleòfil i el de la part superior d'àcid-base general:



**Figura 2.5.** A: Tríade catalítica de la  $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* (família 16). B: Tríade catalítica corresponent a l'endoglucanasa I de *Fusarium oxysporum* (família 7).

La resta de famílies de glicosil hidrolases no presenten una tríade definida i la modulació del  $pK_a$  dels residus essencials es realitza per interaccions independents amb diversos aminoàcids presents al centre actiu. A tall d'exemple (figura 2.6), l'endo-1,4- $\beta$ -xylanasa de *Bacillus circulans*, pertanyent a la família 11, estabilitza el residu nucleòfil Glu78 amb una glutamina (Q127) i la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Hordeum vulgare* (Família 17) presenta una estabilització del residu nucleòfil (E78) per interaccions amb dues tirosines, mentre que el residu àcid/base general (E172) es troba modulats per una treonina.



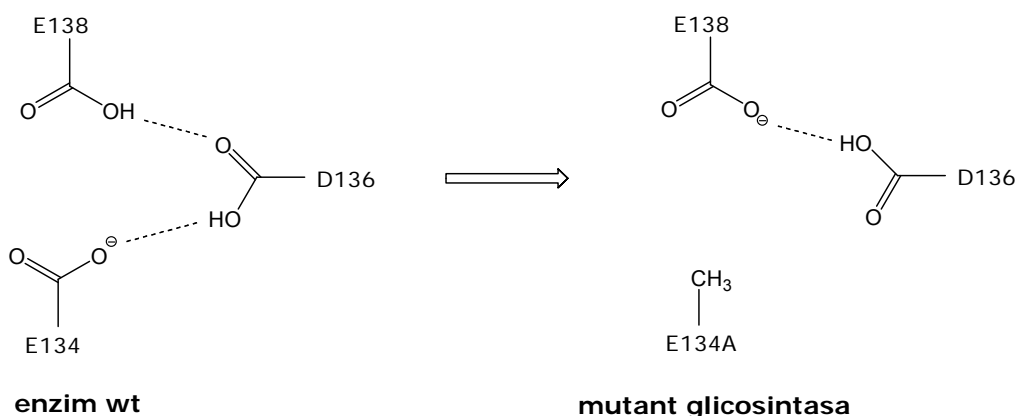
**Figura 2.6.** Exemples de centres actius de glicosil hidrolases. A) endo-1,4-β-xylanasa de *Bacillus circulans* (Família 11). B) 1,3-1,4-β-glucanasa de *Hordeum vulgare* (Família 17).

La corroboració de la funcionalitat de l'D136 en l'enzim wt, s'aborda a partir de l'anàlisi del mutant D136A, realitzant cinètiques comparatives entre l'enzim wt i el mutant obtingut, emprant diferents substrats. Els paràmetres cinètics de  $k_{cat}$  i  $K_M$  de l'enzim wt i el mutant D136A indiquen que el residu D136 no intervé en la unió enzim-substrat però sí influeix en la catàlisi. El perfil de  $k_{cat}/K_M$  front a pH pel mutant D136A presenta un  $pK_a$  cinètic pel residu nucleòfil similar a l'obtingut pel wt però el  $pK_a$  de l'àcid/base general es desplaça 1.5 unitats fins a un valor de 8.6.

Enzim		$K_{cat}/K_M$ (mM)	$k_{cat}$ ( $M^{-1}\cdot s^{-1}$ )
WT	$pK_{a1}(E134)$	$5.4 \pm 0.1$	$4.1 \pm 0.1$
	$pK_{a2}(E138)$	$7.1 \pm 0.1$	$7.9 \pm 0.2$
D136A	$pK_{a1}(E134)$	$5.6 \pm 0.1$	$5.3 \pm 0.1$
	$pK_{a2}(E138)$	$8.6 \pm 0.1$	$9.3 \pm 0.1$

**Taula 2.7.**  $pK_a$  cinètics corresponents a la dependència de la reacció amb el substrat Glcβ4Glcβ3GlcβMU front al pH (Roda 2003, Viladot et al, 2001; Viladot et al., 1998, Malet i Planas, 1997).

Sobre els fonaments anteriors, es planteja aprofundir en el paper del residu D136 en el mutant glicosintasa i explorar les conseqüències de l'eliminació del residu nucleòfil en el pas de tríada catalítica a parella catalítica en l'activitat glicosintasa (figura 2.8.)



**Figura 2.8.** Esquema dels residus essencials de la β-glucanasa wt i mutant E134A en el pas de tríada a díada catalítica.



En aquest sentit, l'estudi de la funció del residu D136 en l'activitat glicosintasa es divideix en els següents punts:

- ✓ Obtenció dels dobles mutants i caracterització física-química dels dobles mutants E134A/D136A, E134A/D136N i E134A/D136E.
- ✓ Estudi de l'activitat específica dels dobles mutants
- ✓ Perfil de pH

## RESULTATS I DISCUSSIÓ

### 3. Obtenció i caracterització dels dobles mutants E134A/D136A, E134A/D136N i E134A/D136E.

Per estudiar la funció de l'D136 en l'activitat glicosintasa del mutant E134A de la  $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*, s'analitzen tres mutants d'aquest residu obtinguts a partir del mutant glicosintasa E134A (taula 2.9.). El residu D136 se substitueix per alanina, asparagina i glutamat respectivament, per tal d'explorar la seva incidència en la modulació del pK<sub>a</sub> del E138 en el mecanisme glicosintasa. La mutació per alanina proporciona la supressió total de la cadena lateral i, per tant, l'eliminació de qualsevol interacció electrostàtica. La substitució per asparagina dóna lloc a un residu no ionitzable (amida) però que manté la capacitat com a donador i acceptor de ponts d'hidrogen; finalment, la mutació per glutamat, no varia la funcionalitat de la cadena lateral però n'altera la longitud.

Mutació	Aminoàcid introduït	Efecte
<b>E134A/D136A</b>	Alanina	Supressió cadena lateral
<b>E134A/D136N</b>	Asparagina	Substitució grup carboxilat per amida
<b>E134A/D136E</b>	Glutamat	Perllongament cadena lateral en un metilè

Taula 2.9. Mutacions realitzades del residu D136.

Els dobles mutants s'obtenen per mutagènesi dirigida mitjançant síntesi completa de plàsmids segons el mètode QuikChange™ (Stratagene).

#### 3.1. Espectrometria de masses MALDI-TOF

L'anàlisi dels mutants es realitza per espectrometria de masses MALDI-TOF. Els resultats es troben a la taula 2.10 i es comparen amb els resultats d'una mostra d'E134A que s'empra de referència. Les anàlisis MALDI-TOF es realitzen per triplicat.

Mutant	P.M. Observat (Da)	P.M. Teòric (Da)	Error (%)
E134A	24449	24455	0,03
E134A/D136E	24463	24469	0,03
E134A/D136N	24446	24454	0,03
E134A/D136A	24408	24411	0,01

**Taula 2.10.** Resultats de l'espectre de masses MALDI-TOF pels tres dobles mutants. El mutant E134A es fa servir de referència.

També es comprova la correcta mutació del residu D136 comparant la variació de pesos moleculars dels diferents dobles mutants respecte de l'E134A.

Mutant	P.M. Observat (Da)	$\Delta P_{M\text{Observat}}$ (Da)	P.M. Teòric (Da)	$\Delta P_{M\text{Teòric}}$ (Da)
E134A	24449	-	24455	-
E134A/D136E	24463	+14	24469	+14
E134A/D136N	24446	-3	24454	-1
E134A/D136A	24408	-41	24411	-44

**Taula 2.11.** Diferències de pesos moleculars entre el mutant E134A i els dobles mutants E134A/D136A, D134A/D136E i E134A/D136N.

Malgrat les petites diferències entre els increments de pesos moleculars observat i teòric respecte l'E134A, els valors de pes molecular determinats pels tres mutants (taula 2.11) presenten un error inferior al 0,05 %, considerat el màxim atribuïble a la tècnica. D'aquesta manera, es confirma la correcta expressió dels dobles mutants desitjats.

Nota: les  $\beta$ -glucanases de *Bacillus licheniformis* presenten un processament del pèptid senyal diferent depenent de la soca hoste on s'expressen. Així, l'expressió en la soca BL21SI dona lloc a una proteïna que presenta la seqüència d'aminoàcids del mutant més 2 aminoàcids extres (Ala, Ser) per l'extrem N-terminal i que pertanyen a aquest pèptid senyal.

### 3.2. Anàlisi per fluorescència de les corbes de desnaturalització amb urea

La desnaturalització de proteïnes mitjançant agents caotrópics és un mètode emprat per a estimar la seva l'estabilitat conformacional. En condicions fisiològiques, l'equilibri entre proteïna nativa i desnaturalitzada es troba desplaçat cap a la forma nativa; en presència d'agents desnaturalitzants com la urea, però, l'equilibri es desplaça cap a la forma desplegada.

En el present treball es realitzen cinètiques de desnaturalització en urea, com a primera aproximació per a determinar de forma qualitativa el correcte plegament de les proteïnes expressades. Se segueix la fluorescència de les proteïnes al llarg del temps. Aquesta depèn bàsicament de la presència de residus aromàtics (fenilalanines, tirosines i triptòfans), les bandes d'absorció dels quals es localitzen a la zona del UV proper. A la pràctica, i donat que el rendiment quàntic de fluorescència de la fenilalanina és baix i la seva longitud d'ona màxima d'absorció dista de la resta de residus, l'estudi de la fluorescència es realitza a 280 nm de longitud d'ona d'absorció. D'aquesta manera, l'espectre d'emissió de fluorescència dels dobles mutants estudiats es correspon a l'emissió dels seus triptòfans i en menor grau de les tirosines.

Els fluoròfors amb grups aromàtics, presenten un moment dipolar en l'estat excitat major que en l'estat fonamental. Això comporta, que en l'estat excitat puguin polaritzar les molècules adjacents, en el cas que la seva polaritzabilitat sigui elevada, i donar lloc a dipòls induïts. Aquests dipòls poden interaccionar amb els estats transitoris del fluoròfor i, en conseqüència, produir una relaxació de l'estat excitat i disminuir la seva energia.

Es mesura la fluorescència dels dobles mutants E134A/D136A, E134A/D136N i E134A/D136E, i es compara amb la del mutant glicosintasa E134A i l'enzim wt. La cinètica de desnaturalització és realitzada en tampó HEPES 0,1 M i urea 8M a pH 7 i 30°C, a una concentració final d'enzim de 1,64  $\mu\text{M}$  (40  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ).

La fluorescència dels diferents mutants i l'enzim ( $\lambda_{\text{exc}}$  280 nm,  $\lambda_{\text{ems}}$  290 - 500 nm ) wt front al temps es presenta en les següents figures (2.12 – 2.16):

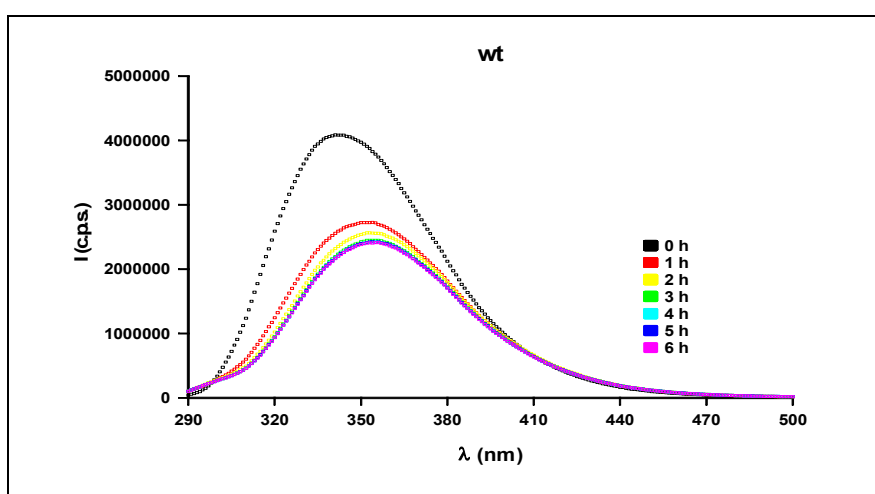


Figura 2.12. Cinètica de desnaturalització amb 8M urea de la  $\beta$ -glucanasa wt.

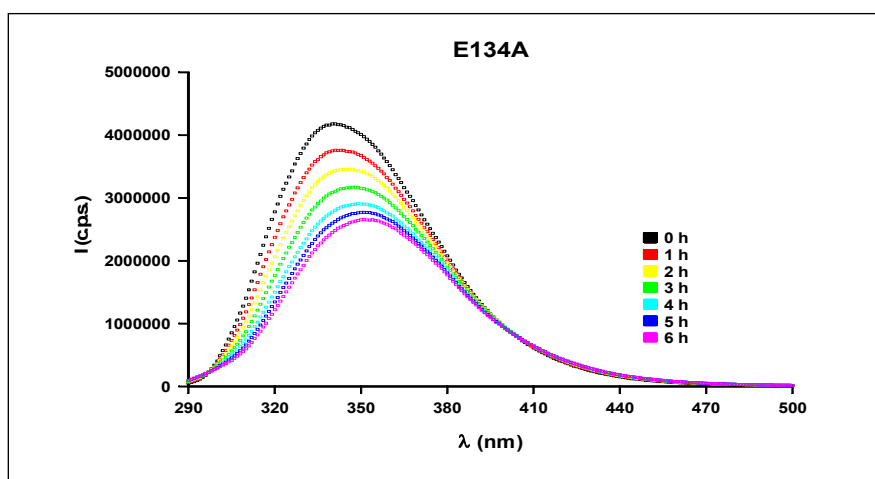


Figura 2.13. Cinètica de desnaturalització amb 8M urea del mutant E134A de la  $\beta$ -glucanasa.

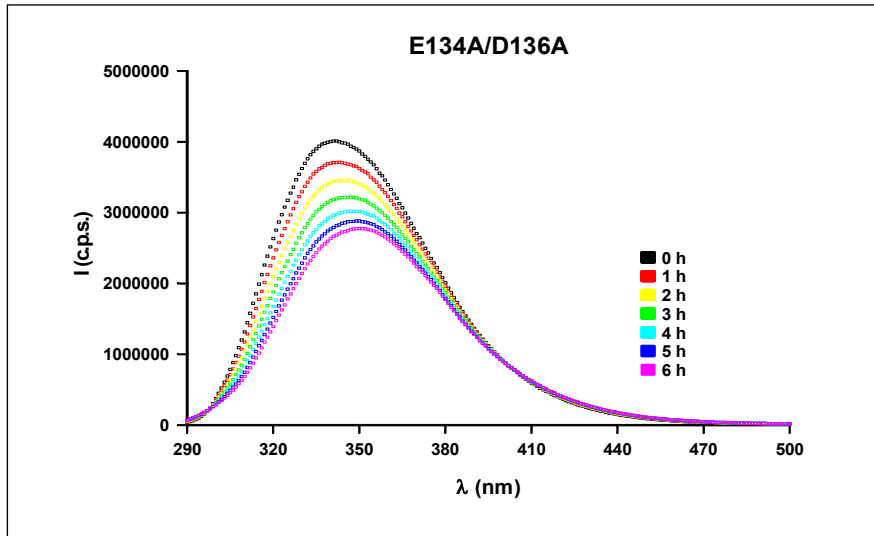


Figura 2.14. Cinètica de desnaturalització amb 8M urea del mutant E134A/D136A de la  $\beta$ -glucanasa.

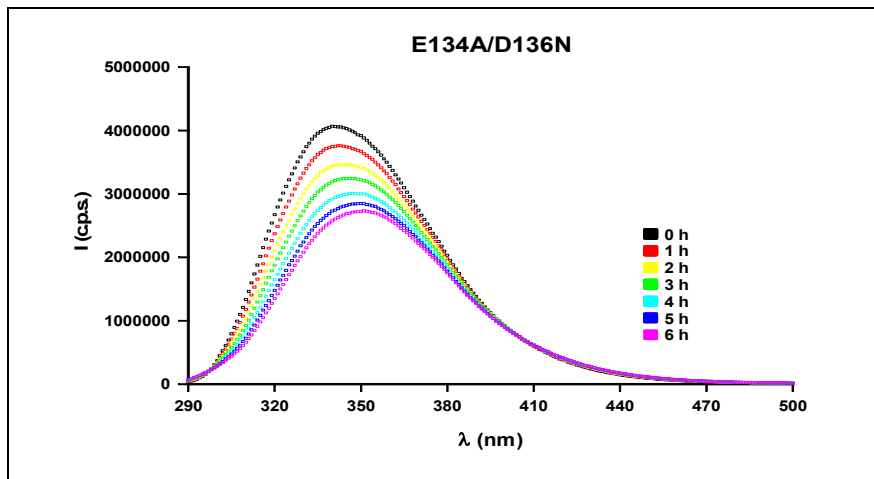


Figura 2.15. Cinètica de desnaturalització amb 8M urea del mutant E134A/D136N de la  $\beta$ -glucanasa.

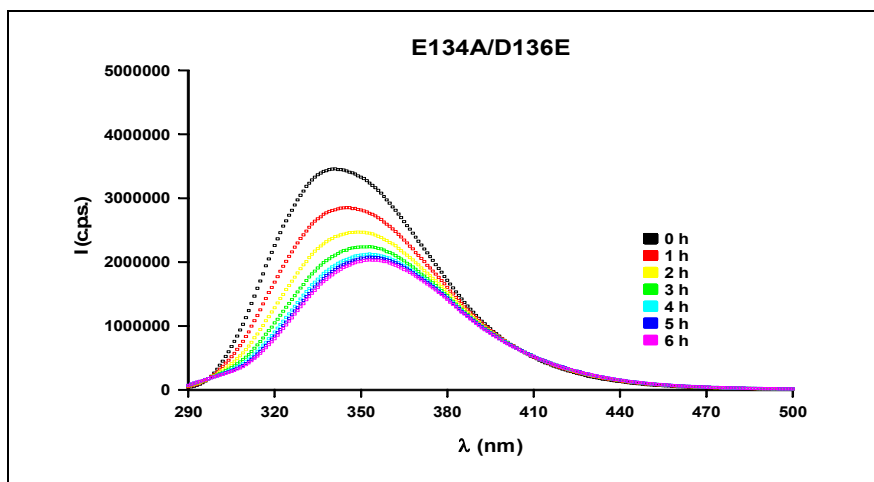


Figura 2.16. Cinètica de desnaturalització amb 8M urea del mutant E134A/D136E de la  $\beta$ -glucanasa.

Totes les cinètiques de desnaturalització mostren una disminució progressiva de la fluorescència amb el temps, resultat de l'efecte desnaturalitzant de la urea. D'aquesta manera les cadenes proteiques s'obren i els residus hidrofòbics, responsables de la fluorescència, s'atansen per evitar la seva exposició al dissolvent, donant lloc a una disminució de la fluorescència. D'altra banda, s'observa un desplaçament del màxim de fluorescència de 341 nm fins a longituds d'ona superiors. Això és degut a què els dipols permanents i induïts del dissolvent interaccionen amb l'estat excitat dels fluoròfors aromàtics, relaxen la seva energia de transició i provoquen un desplaçament del màxim d'emissió de la proteïna a longitud d'ona majors.

Es compara la disminució de la intensitat de fluorescència a partir de la relació  $I/I_0$  al llarg del temps (a  $\lambda$  de màxima fluorescència) per a tots el mutants (figura 2.17.)

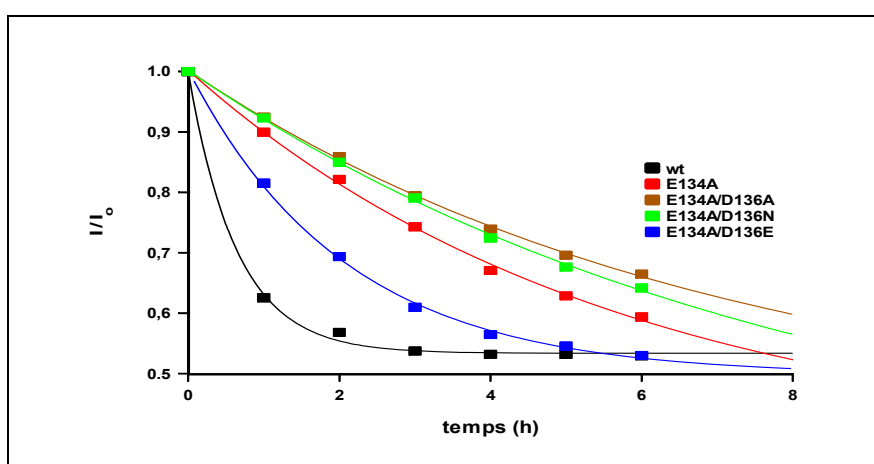


Figura 2.17. Representació  $I/I_0$  en funció del temps d'incubació amb urea a  $\lambda = 341$  nm.

La disminució de la fluorescència a  $\lambda = 341$  nm i 4 hores d'incubació en urea (taula 2.18) mostra que l'efecte de desestabilització és més important per l'enzim wt que pels mutants, els quals presenten una cinètica de desnaturalització més lenta.

$\beta$ -glucanasa	$I_0$ (c.p.s.)	$I_{4h}$ (c.p.s.)	$I_{4h}/I_0$
wt	4086364	2164074	0,53
E134A/D136E	3461854	1954755	0,56
E134A	4180603	2805036	0,67
E134A/D136N	4061209	2942103	0,72
E134A/D136A	4011700	2964677	0,74

Taula 2.18. Intensitats de fluorescència i intensitats relatives a 4 hores a  $\lambda = 341$  nm.

Amb tot, els enzims presenten la màxima emissió a longituds d'ona semblants (al voltant de 341 nm) i una disminució d'intensitat de fluorescència a les 4 hores ( $I_{4h}/I_0$ ) d'entre 53 al 74%, valors similars que permeten concloure que el plegament de tots els mutants és equivalent.

#### 4. Activitat específica dels dobles mutants

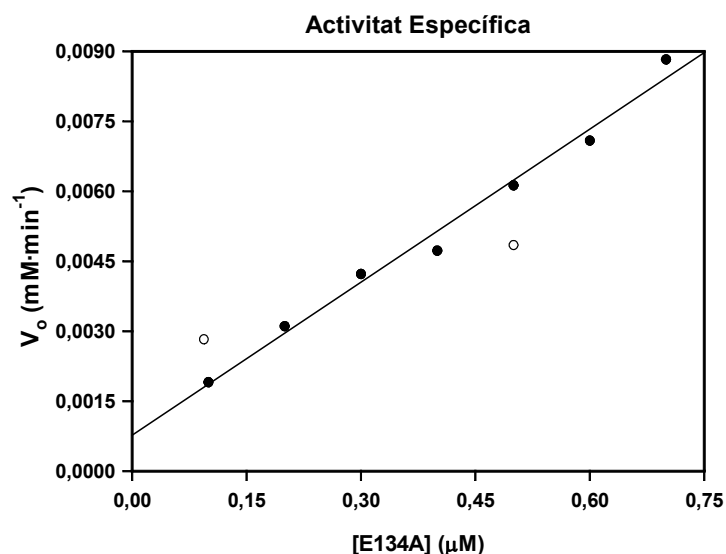
Es determina l'activitat específica dels dobles mutants a partir de la reacció entre el donador Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 3Glc $\alpha$ F i l'acceptor Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP mesurant la formació de producte pentasacàrid (Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 3Glc $\beta$ 3Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP).

Les condicions de l'assaig d'activitat es descriuen a la taula següent:

Donador	[Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 3Glc $\alpha$ F] = 1 mM
Acceptador	[Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP] = 5 mM
Tampó	Citrat:Fosfat 50 mM:50mM pH 7, 35°C, 0.1 mM CaCl <sub>2</sub>
Força iònica	0.5 M, ajustada amb KCl
Enzim	[E134A] = 0 – 0.7 $\mu$ M
Condicions HPLC	MeOH:H <sub>2</sub> O (14:86), 1 ml·min <sup>-1</sup> , 35°C, detecció Abs $\lambda$ = 301 nm,

**Taula 2.19.** Condicions de l'assaig per a determinar l'activitat específica del mutant glicosintasa E134A de la  $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*.

Es representa la  $V_o$  (mM·min<sup>-1</sup>) enfront de la concentració d'E134A emprada. S'ajusta la següent recta:



**Figura 2.20.** Recta patró per a la determinació de la concentració de proteïna activa. Condicions: [Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 3Glc $\alpha$ F] = 1 mM, [Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP] = 5 mM, tampó citrat:fosfat 50 mM:50mM pH 7 a 35°C, [CaCl<sub>2</sub>] = 0.1 mM, I = 0.5 M, [E134A] = 0 - 0.7  $\mu$ M; HPLC: MeOH:H<sub>2</sub>O (14:86), 1 ml·min<sup>-1</sup>, 35°C, detecció Abs  $\lambda$  = 301 nm.

La determinació de la concentració de proteïna activa dels diferents estocs d'E134A és realitza a partir de la recta patró que es mostra a la figura 2.20.

La determinació de l'activitat dels dobles mutants E134A/D136E, E134A/D136A i E134A/D136N, es preparen estocs de sengles dobles mutants i es mesura la seva concentració

per absorbància. S'assagen diferents cinètiques en les condicions de reacció esmentades a la taula 2.19., i emprant una concentració de proteïna total de 8 - 10  $\mu\text{M}$  (per absorbància).

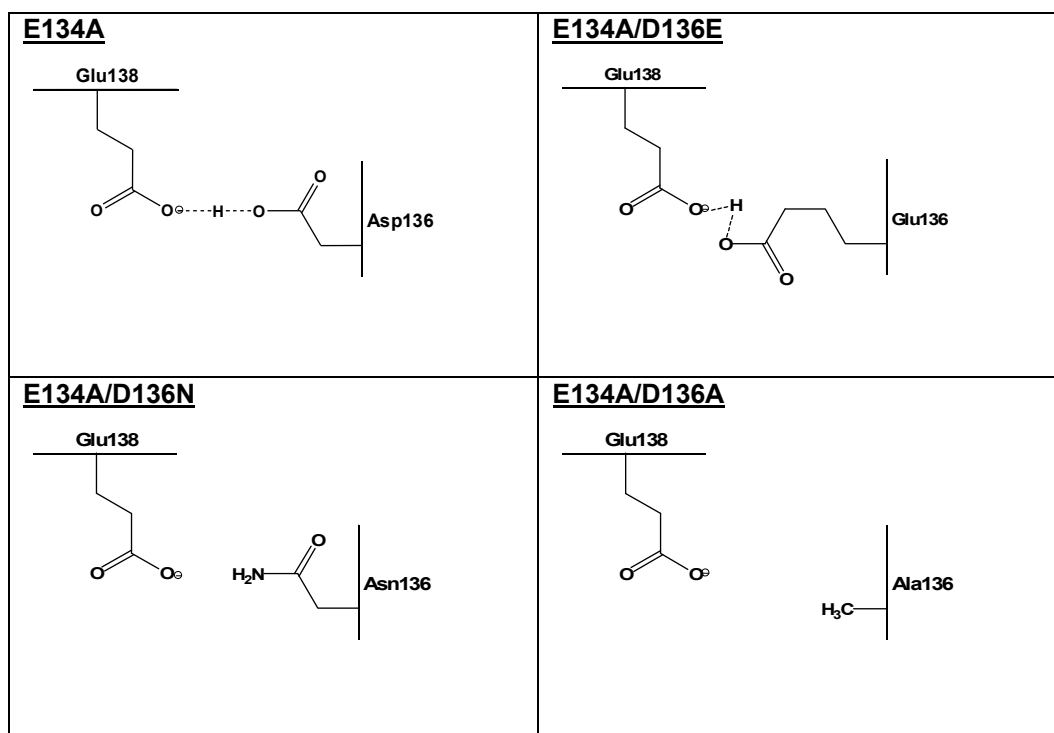
Els resultats es troben a la taula 2.21.

Mutant	pH	[Enzim] ( $\mu\text{M}$ )	$V_0/[E]$ ( $\text{s}^{-1}$ )
E134A	7	0.1 – 0.7	0.1930
E134A/D136E	7	8	0.0097
E134A/D136A	7	8	$< 4 \cdot 10^{-7}$
	9	10	$< 4 \cdot 10^{-7}$
E134A/D136N	7	8	$< 4 \cdot 10^{-7}$
	9	10	$< 4 \cdot 10^{-7}$
	10	10	$< 4 \cdot 10^{-7}$

**Taula 2.21.** Activitat específica dels diferents dobles mutants estudiats i del mutant glicosintasa E134A.

Tan sols el doble mutant E134A/D136E presenta activitat glicosintasa, malgrat resulta 20 vegades inferior a l'activitat del mutant E134A, que es pren com a referència, en les mateixes condicions de reacció. Tant el doble mutant E134A/D136A com el E134A/D136N són inactius, tot i que s'observa una certa activitat residual a temps de reacció superiors a 24 hores pel E134A/D136N (taula 2.21).

La representació esquemàtica de la disposició del residus 136 i 138 en el mutant E134A i els dobles mutants E134A/D136E, E134A/D136N, E134A/D136A es mostra a la figura 2.22.



**Figura 2.22.** Disposició dels residus 138 i 136 pel mutant E134A i pels dobles mutants E134A/D136E, E134A/D136N, E134A/D136A.

La modulació del pK<sub>a</sub> del residu E138 (base) per part de l'D136 constitueix un fet determinant per a la viabilitat de la reacció glicosintasa. D'aquesta manera, la mutació D136E dóna lloc a un enzim que manté activitat glicosintasa, però en una proporció 20 vegades inferior a la del mutant E134A. La substitució d'un aspartat per un glutamat no fa variar la funcionalitat del residu, es conserva la capacitat d'aquest per formar un pont d'hidrogen amb el E138, però el canvi estèric suposa una geometria diferent entre residus i en conseqüència una disminució de la capacitat del residu 136 d'estabilitzar la càrrega negativa del E138.

En canvi, el pas d'aspartat a asparagina (D136N), no repercuteix de forma important en la geometria del residu però substitueix la funcionalitat àcid carboxílic de l'aspartat per una amida. El pont d'hidrogen que s'estableix entre un carboxilat i un grup hidroxil presenta en general una energia d'enllaç superior a 20 KJ·mol<sup>-1</sup>. Els grup amida són bons acceptor de pont d'hidrogen, però en actuar com a donadors presenten energies d'enllaç moderades (de l'ordre de 8 KJ·mol<sup>-1</sup>). Aquest fet es tradueix en una menor capacitat d'estabilització de la càrrega negativa del residu E138, respecte al residu original D136 i palesa la inactivitat que presenta el doble mutant E134A/D136N per a la reacció glicosintasa. Tot i així, s'observa una certa activitat residual d'aquest enzim en una cinètica superior a 24 hores.

Per últim, la substitució de l'aspartat per una alanina (D136A), suposa tant un canvi estèric com funcional; es disminueix dràsticament la cadena lateral fins a un metil, de manera que es perd tota possibilitat d'establir ponts d'hidrogen. El doble mutant E134A/D136A resulta completament inactiu.

### **5. Perfil de pH del doble mutant E134/D136E.**

La dependència de l'activitat glicosintasa enfront del pH pel doble mutant E134A/D136E s'estudia a partir de la reacció entre el donador Glcβ3GlcαF i l'acceptor Glcβ4GlcβpNP, en una marge de pHs de 5 – 9.84. Les cinètiques es realitzen a diferents concentracions de donador (0.5 – 1 mM), sempre per sota de la seva K<sub>M</sub>, en tampó citrat-fosfat, força iònica constant i en condicions saturants d'acceptor (24 mM). Les dades de formació de producte enfront del temps s'ajusten a una recta, el pendent inicial de la qual correspon a la V<sub>0</sub> del procés. Es representa la velocitat inicial per unitat d'enzim front de la concentració de donador emprada i del pendent de la recta que s'ajusta s'obtenen els valors de k<sub>cat</sub><sup>app</sup>/K<sub>M</sub><sup>app</sup> per a cada pH. També es realitza el perfil de pH amb el mutant glicosintasa original E134A. Les dades per ambdós enzims es presenten a la taula 2.23.



pH	E134A/D136E		E134A	
	$k_{cat}^{app} / K_M^{app}$ ( $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )	Error ( $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )	$k_{cat}^{app} / K_M^{app}$ ( $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )	Error ( $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )
4,89	$0,74 \cdot 10^{-5}$	$7,19 \cdot 10^{-6}$	$3,13 \cdot 10^{-4}$	$2,74 \cdot 10^{-5}$
5,29	$1,75 \cdot 10^{-5}$	$1,60 \cdot 10^{-6}$	$5,14 \cdot 10^{-4}$	$1,23 \cdot 10^{-5}$
6,04	$5,30 \cdot 10^{-5}$	$3,96 \cdot 10^{-7}$	$11,81 \cdot 10^{-4}$	$9,03 \cdot 10^{-5}$
6,45	$8,39 \cdot 10^{-5}$	$7,60 \cdot 10^{-6}$	$13,76 \cdot 10^{-4}$	$9,27 \cdot 10^{-5}$
6,92	$11,16 \cdot 10^{-5}$	$1,07 \cdot 10^{-5}$	$18,85 \cdot 10^{-4}$	$9,07 \cdot 10^{-5}$
7,28	$10,13 \cdot 10^{-5}$	$2,49 \cdot 10^{-6}$	$21,08 \cdot 10^{-4}$	$1,03 \cdot 10^{-4}$
7,75	$9,19 \cdot 10^{-5}$	$5,80 \cdot 10^{-6}$	$19,10 \cdot 10^{-4}$	$7,97 \cdot 10^{-5}$
8,02	$9,08 \cdot 10^{-5}$	$5,89 \cdot 10^{-6}$	$17,40 \cdot 10^{-5}$	$9,74 \cdot 10^{-5}$
8,34	$9,13 \cdot 10^{-5}$	$6,67 \cdot 10^{-7}$	$16,03 \cdot 10^{-4}$	$2,11 \cdot 10^{-5}$
9,10	-	-	$15,55 \cdot 10^{-4}$	$1,49 \cdot 10^{-4}$
9,84	$8,11 \cdot 10^{-5}$	$7,19 \cdot 10^{-6}$	$13,98 \cdot 10^{-4}$	$8,53 \cdot 10^{-6}$

Taula 2.23. Valors de  $k_{cat}^{app} / K_M^{app}$  i error per a cada pH i enzim.

En treballs anteriors (Faijes et al., 2003) es realitzà un perfil de pH pel mutant E134A, La representació dels valors de  $k_{cat}/K_M$  pel donador en funció del pH es corresponien a un procés de doble ionització, descrit per l'esquema cinètic (figura 2.24):

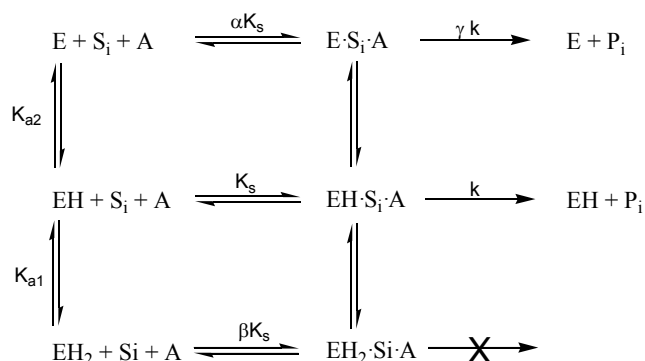


Figura 2.24. Esquema cinètic corresponent a la reacció de transglicosidació catalitzada pel mutant E134A de la  $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*.

E correspon a l'enzim que presenta tres estats d'ionització diferents (E, EH i EH<sub>2</sub>) relacionats per dos valors de pK<sub>a</sub> (pK<sub>a1</sub> i pK<sub>a2</sub>), S<sub>i</sub> representa el donador, A l'acceptor de la reacció i P<sub>i</sub> el producte de transglicosidació. A pH baixos, l'enzim no presenta activitat (estat d'ionització EH<sub>2</sub>), mentre que a pH propers a 7 s'obtenen els valors màxims de  $k_{cat}/K_M$ . A pH elevats s'observa una activitat residual. D'aquesta manera, es conclou que ambdós estats d'ionització EH i E donen lloc a activitat glicosintasa, essent EH la forma més activa.

L'equació que descriu el model es presenta a continuació:

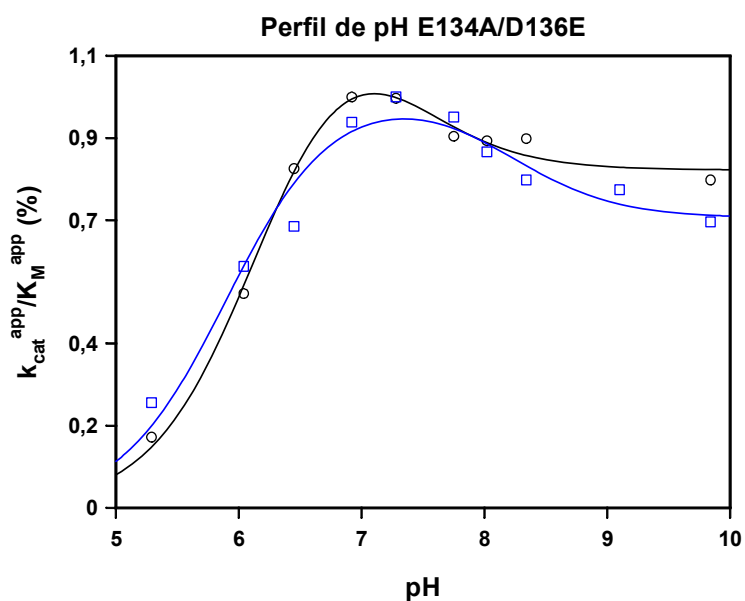
$$\left(\frac{k_{cat}}{K_M}\right)_{donador} = A \cdot \frac{1 + B \cdot 10^{pH - pK_{a2}}}{1 + 10^{pK_{a1} - pH} + 10^{pH - pK_{a2}}}$$

on  $A = (k/K_s)$  i  $B = (\gamma/\alpha)$

**Equació 2.25.** Equació que descriu el model enzimàtic plantejat a la figura 2.24.

Els valors de  $pK_a$  cinètics obtinguts per Planas i col·laboradors (Faijes et al., 2003) en ajustar les dades a l'equació 2.25. van ser de  $5.2 \pm 0.1$  i  $7.8 \pm 0.1$ .

Partint de l'equació anterior i amb les dades obtingudes pel doble mutant i el mutant glicosintasa, es normalitzen els valors de  $k_{cat}/K_M$  respecte al seu valor màxim i s'expressen com a tant per cent. Es representen ambdós perfils per a poder ser comparats,



**Figura 2.26.** Perfil de pH normalitzat dels mutants E134A (□) i E134A/D136E (○), S'ajusta l'equació 2.25.

Els valors de  $pK_a$  obtinguts en l'ajust es troben a la següent taula:

Mutant	$pK_{a1}$	$pK_{a2}$
<b>E134A/D136E</b>	$6,16 \pm 0,07$	$7,32 \pm 0,21$
<b>E134A</b>	$5,90 \pm 0,11$	$8,19 \pm 0,40$

**Taula 2.26.** Valors de  $pK_{a1}$  i  $pK_{a2}$  pel mutant E134A i el doble mutant E134A/D136E obtinguts amb l'ajust de les dades de sengles perfils de pH a l'equació 2.25.

El perfil de pH per ambdós enzims correspon a un mecanisme de catàlisi bàsica general. Els  $pK_{a1}$  per ambdós mutants es troben al voltant de 6 i corresponen a la ionització del residu E138. La mutació de l'D136 sembla no alterar el  $pK_{a1}$  d'aquest residu donat que la substitució d'un aspartat per un glutamat permet seguir realitzant la funció de modulador. Pel que fa al  $pK_{a2}$ , s'observa una diferència de valor entre els dos mutants. La ionització del residu 136 és dona a pH superiors a 8 pel mutant E134A i permet establir el residu base general E138 en un marge més ampli de pH. El  $pK_{a2}$  del mutant E134A/D136E és de 7.3, la qual cosa palesa una reducció de la finestra d'estabilització d'aquest residu sobre el E138. L'augment de la cadena lateral de 136 en realitzar la mutació dona lloc a noves configuracions espacials d'aquest residu i en conseqüència la distància de l'àcid carboxílic per a fer de pantalla a la càrrega negativa de 138 no és l'òptima; això permet la ionització d'aquest residu a pH inferior que abans doncs les configuracions per a assolir un pont d'hidrogen amb E138 han disminuït. El seu  $pK_a$  disminueix i amb ell l'efecte estabilitzador sobre E138 i l'activitat final de l'enzim.

En resum, s'obtenen els dobles mutants E134A/D136E, E134A/D136N i E134A/D136A a nivell de proteïna pura i la seva caracterització química-física mostra que el seu perfil de desnaturalització és semblant a la del mutant glicosintasa E134A. A més, l'estudi d'activitat mostra que només el doble mutant E134A/D136E manté certa activitat glicosintasa, evidenciant que la supressió de la càrrega negativa en el residu 136 resulta en un mutant inactiu. El perfil de pH del doble mutant E134A/D136E presenta un  $pK_{a1}$  semblant al mutant E134A, mentre que s'observa una reducció important en el  $pK_{a2}$ . La mutació D136E dona lloc a un enzim amb un efecte estabilitzador inferior sobre el residu E138 i en conseqüència fa disminuir la seva activitat.



## Capítol 2: Nous mutants glicosintasa de la $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*.

### INTRODUCCIÓ

#### 1. Glicosintases més actives

A banda de la mutació del residu que actua de nucleòfil per alanina, existeixen altres mutants en la mateixa posició amb activitat glicosintasa, molts d'ells amb una eficiència més elevada. Les glicosintases originals (Malet et al., 1998 i Mackenzie et al., 1998) presentaven la mutació alanina al residu que actuava de nucleòfil en l'activitat glicosidasa. L'any 2000 apareixen les primeres glicosintases amb una mutació diferent al residu nucleòfil, això és, Withers i col·laboradors substitueixen el nucleòfil de la  $\beta$ -glucosidasa d'*Agrobacterium faecalis* per serina (E358S) i obtenen activitats relatives de fins a 24 vegades més elevades en comparació amb la glicosintasa original E358A (Mayer et al., 2000). A més, aquest augment de reactivitat disminueix els temps de síntesi i amplia el repertori de substrats.

El desenvolupament d'un assaig enzimàtic acoblat en placa per a detectar activitat glicosintasa va permetre a Withers i col·laboradors donar un pas més i cercar noves glicosintases per evolució dirigida (Mayer et al., 2001). L'estudi trobà dues noves mutacions del residu nucleòfil que donen lloc a activitat glicosintasa, que sumades a les dues obtingudes amb anterioritat fan un total de quatre mutants de la  $\beta$ -glucosidasa d'*Agrobacterium faecalis* que esdevenen glicosintases: E358A, E358S i les dues noves E358G i E358C. Les constants cinètiques de segon ordre relatives pels quatre mutants són 102:44:2:1 (E358G, E358S, E358A, E358C) determinades a partir de la reacció entre el donador Gal $\alpha$ F i l'acceptor Glc $\beta$ pNP.

La glicosintasa desenvolupada pel grup d'en Moracci (Trincon et al., 2000) ja presentava d'entrada una mutació en el residu que actuava de nucleòfil diferent a alanina; en concret es tractava del mutant E387G de la  $\beta$ -glucosidasa de *Sulfolobus solfataricus*.

Amb tot, a banda de la clàssica mutació del residu nucleòfil per alanina, la mutació per serina, glicina, cisteïna o glutamina també han donat lloc a glicosintases actives (taula 1 i taula 2). En molts casos, els mutants serina i glicina han mostrat un increment en la reactivitat glicosintasa respecte al mutant alanina i fins i tot en els casos en que aquest últim era inactiu.

El mutant E134A de la  $\beta$ -glucanasa ha estat àmpliament estudiat al Laboratori de Bioquímica de l'IQS convertint-se en una glicosintasa amb aplicacions sintètiques. En aquest treball, i amb la voluntat d'explorar glicosintases més actives, es preparen els mutants E134G i E134S de la  $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* per a avaluar-ne la seva activitat com a glicosintases.

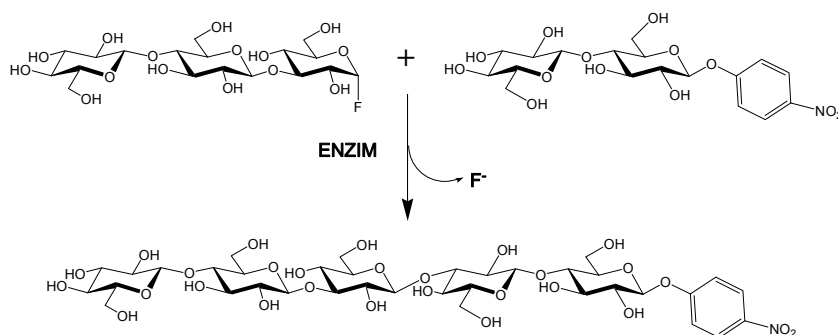
L'obtenció dels mutants E134G i E134S de la  $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* es realitza per la metodologia del *Megaprimer* (veure part experimental).

Els resultats d'aquest capítol es troben publicats a la revista *Biomacromolecules*, 2011, 12, 494 - 501 (Pérez et al., 2011).

RESULTATS I DISCUSSIÓ

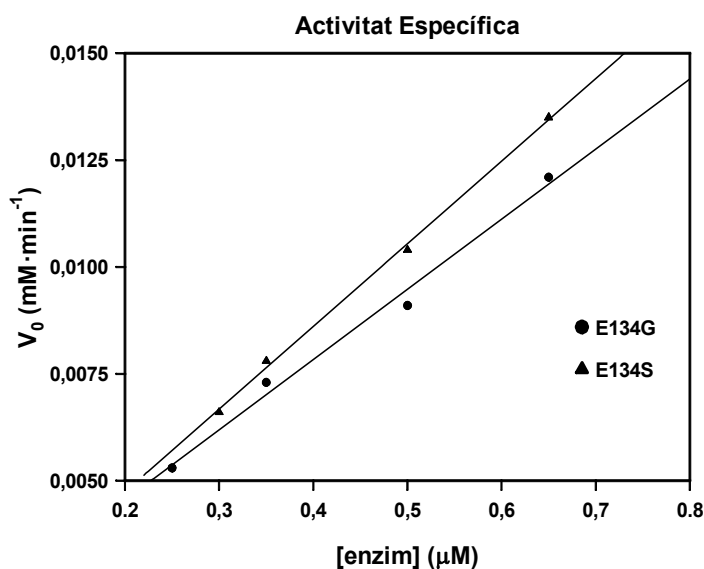
2. Anàlisi cinètic dels mutants E134G i E134S de la  $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*

Els nous mutants del residu nucleòfil se sotmeten a un estudi cinètic en les mateixes condicions que la glicosintasa original E134A. Per a mesurar l'activitat glicosintasa es mesura la formació de producte de transglicosidació per a la següent reacció:



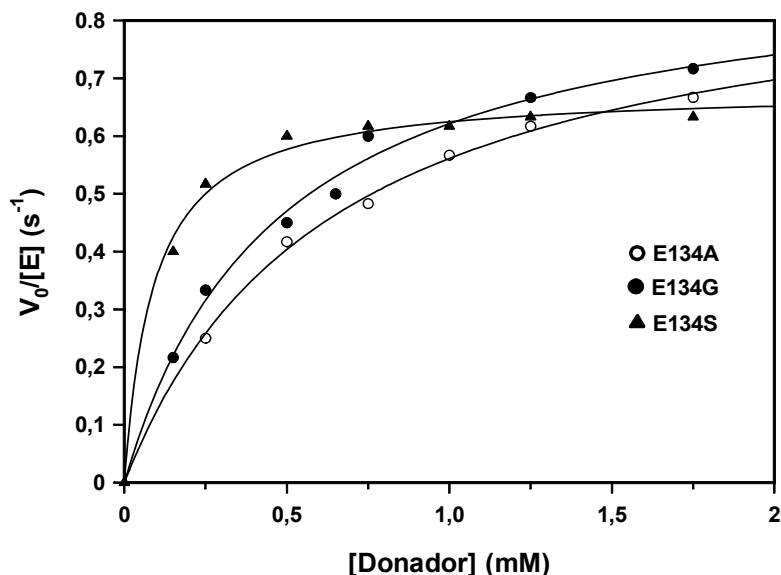
**Figura 3.1.** Reacció de transglicosidació emprada per a la mesura de l'activitat glicosintasa dels mutants E134G i E134S de la  $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*.

A partir d'estocs dels nous mutant, la concentració dels quals es mesura per espectrofotometria d'absorbància a l'UV ( $\epsilon_{280} 3.55 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), es determina la velocitat inicial ( $V_0$ ) de transglicosidació a diferents concentracions d'enzim (0.25 – 0.65  $\mu\text{M}$ ). La representació de  $V_0$  ( $\text{mM} \cdot \text{s}^{-1}$ ) enfront de la concentració dels mutants dóna lloc a les activitats específiques del mutants per a la reacció de transglicosidació (figura 3.2.)



**Figura 3.2.** Activitat específica dels mutant E134G i E134S de la  $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*. Condicions:  $[\text{Glc}\beta 4\text{Glc}\beta 3\text{Glc}\alpha\text{F}] = 1 \text{ mM}$ ,  $[\text{Glc}\beta 4\text{Glc}\beta\text{pNP}] = 5 \text{ mM}$ , tampó fosfat  $50 \text{ mM}$  pH 7 a  $35^\circ\text{C}$ ,  $[\text{CaCl}_2] = 0.1 \text{ mM}$ ,  $[\text{E}] = 0.25 - 0.65 \mu\text{M}$ ; HPLC: MeOH:H<sub>2</sub>O (14:86),  $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $35^\circ\text{C}$ , detecció Abs  $\lambda = 301 \text{ nm}$ .

S'obtenen els paràmetres cinètics de  $k_{cat}^{app}$  i  $K_M^{app}$  del donador per als nous mutants de la  $\beta$ -glucanasa emprant la mateixa reacció esmentada anteriorment (condensació entre el donador Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 3Glc $\alpha$ F i l'acceptor Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ NP). Es fixa la concentració d'acceptor (7.8 mM) i es varia la concentració de donador (0,1 – 1,75 mM). A la figura 3.3 s'observen les cinètiques per a tots els mutants, inclosa la glicosintasa original E134A:



**Figura 3.3.** Cinètica de la reacció de condensació entre el donador Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 3Glc $\alpha$ F i l'acceptor Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ NP catalitzada pels diferents mutants glicosintasa E134A (○) E134G (●) i E134S (▲), en tampó fosfat pH 7 a 35°C i 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>. [Donador] = 0,15 – 1,75 mM; [Acceptor] = 7.8 mM; [Enzim] = 0.1  $\mu$ M. El seguiment de la reacció es realitza per HPLC, monitoritzant la formació del producte de condensació pentasacàrid Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 3Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ NP.

S'observa com la millora en l'eficiència enzimàtica (1.6 vegades) del mutant E134G respecte l'E134A, en termes de  $k_{cat}/K_M$ , respon a una disminució del valor de la  $K_M$  del donador, mentre que la  $k_{cat}$  roman gairebé inalterada per ambdós mutants.

A partir de les dades cinètiques s'obtenen el paràmetres cinètics per a la reacció glicosintasa que es resumeixen a la taula 3.4.:

	<b>E134G</b>	<b>E134S</b>	<b>E134A</b>
$k_{cat}^{app}$ ( $s^{-1}$ )	0,92 $\pm$ 0,04	0,68 $\pm$ 0,01	0,90 $\pm$ 0,03
$K_M^{app}$ (mM)	0,47 $\pm$ 0,06	0,09 $\pm$ 0,01	0,68 $\pm$ 0,07
$k_{cat}^{app}/K_M^{app}$ ( $s^{-1}\cdot mM^{-1}$ )	1,96 $\pm$ 0,33	7,48 $\pm$ 1,03	1,33 $\pm$ 0,16

**Taula 3.4.** Paràmetres cinètics de la reacció glicosintasa entre el donador Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 3Glc $\alpha$ F i l'acceptor Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP catalitzada pels diferents mutants. Condicions de reacció: tampó fosfat pH 7 a 35°C i 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>. [Donador] = 0,15 – 1,75 mM; [Acceptor] = 7.8 mM; [Enzim] = 0.1  $\mu$ M.

En síntesi, en termes de  $k_{cat}$ , el mutant E134S presenta una conversió inferior als mutants E134G i E134A. Malgrat això, el valor de la  $K_M$  aparent és gairebé un ordre de magnitud inferior, resultant en un increment de 5 vegades de la seva  $k_{cat}/K_M$  en comparació amb el mutant original E134A. Aquest valor de la  $K_M$  aparent suggereix la presència d'una interacció específica entre la cadena lateral de la serina i l'àtom de fluor del donador, probablement a través d'un pont d'hidrogen. En aquest cas, al contrari que altres enzims convertits a glicosintases (Hrmova et al., 2002; Mayer et al., 2001; Jahn et al., 2003), el mutant glicina no esdevé la millor glicosintasa, mostrant únicament una eficiència d'1.5 vegades respecte el mutant alanina original.



## Capítol 3: Aplicació de la metodologia glicosintasa en la síntesi de nous $\beta$ -glucans

### INTRODUCCIÓ

#### 1. Context

Els oligo i polisacàrids presenten una elevada diversitat estructural i funcional, intervenint activament en molts processos cabdals dels sistemes biològics. La seva importància en els mecanismes biològics ha conduït a un creixent interès pel seu estudi en nombrosos àmbits de la ciència, sobretot en el camp de la glicobiologia, com a possibles dianes d'enzims o receptors involucrats en alguna funció metabòlica, i en el camp de l'enginyeria de materials, com a nous materials biocompatibles i amb propietats interessants per a preservar el medi ambient. La gran demanda generada fa necessàries metodologies sintètiques eficients per a la seva preparació. Però la síntesi d'oligosacàrids i polisacàrids requereix el control de l'estereoselectivitat i la regioselectivitat en cada etapa de reacció, tasca difícil d'abordar des de la síntesi química convencional, tal com s'ha explicat a la introducció. En aquest context, les glicosiltransferases i les glicosidases esdevenen eines sintètiques de gran utilitat per a la manipulació *in vitro* de carbohidrats. Ambdós biocatalitzadors presenten característiques diferents i en conseqüència la seva aplicació dependrà de l'objectiu sintètic perseguit.

Si bé la transglicosidació sota control cinètic catalitzada per glicosidases que actuen amb retenció de configuració permet la síntesi de polisacàrids artificials, els rendiments i graus de polimerització assolits són limitats degut a l'activitat hidrolasa intrínsec d'aquests enzims (veure introducció). En aquest capítol es presenten els antecedents en l'ús de glicosintases per a la preparació de polisacàrids així com els resultats de l'aplicació d'aquesta metodologia per a l'obtenció de nous polímers.

#### 2. Glicosintases per a la síntesi de polisacàrids

Les *endo*-glicosintases, a diferència de les *exo*-glicosintases, presenten un centre actiu extens, que els permet acceptar oligosacàrids com a substrats, i per tant poden ser emprades per l'obtenció *in vitro* de nous polímers per autocondensació de substrats activats. Donat que són polimeritzacions enzimàtiques, aquestes presenten les característiques de regioselectivitat, estereoselectivitat i coroselectivitat que les converteixen en eines sintètiques amb gran potencial, en la mesura en què la modulació de les condicions de reacció permetin la modificació de les característiques del producte obtingut (taula 3.1).

Enzim (Organisme)	GH	Residu mutat	Enllaç Format	Referència
<b>1,3-1,4-<math>\beta</math>-glucanasa</b> ( <i>Bacillus licheniformis</i> )	16	E134	$\beta$ -1,4	Malet i Planas, 1998
<b>1,4-<math>\beta</math>-glucanasa</b> ( <i>Humicola insolens</i> )	7	E197	$\beta$ -1,4	Fort <i>et al.</i> , 2000
<b>1,3-<math>\beta</math>-glucanasa</b> ( <i>Hordeum vulgare</i> )	17	E231	$\beta$ -1,3	Hrmova <i>et al.</i> , 2002
<b>1,4-<math>\beta</math>-xilanas</b> a ( <i>Clostridium stercorarium</i> )	10	E293	$\beta$ -1,4	Sugimura <i>et al.</i> , 2006
<b>1,4-<math>\beta</math>-xilanas</b> a ( <i>Bacillus halodurans</i> )	10	E301	$\beta$ -1,4	Sugimura <i>et al.</i> , 2006
<b>1,4-<math>\beta</math>-xilanas</b> a ( <i>Cellulomonas fimi</i> Cex)	10	E233	$\beta$ -1,4	Sugimura <i>et al.</i> , 2006
<b>1,4-<math>\beta</math>-xilanas</b> a ( <i>Thermotoga maritima</i> )	10	E259	$\beta$ -1,4	Sugimura <i>et al.</i> , 2006
<b>Xyloglucan endotransglicosidase</b> ( <i>Populus tremula</i> x <i>tremuloides</i> )	16	E85	$\beta$ -1,4	Piens <i>et al.</i> , 2007
<b>Xyloglucanasa</b> ( <i>Tropaeolum majus</i> )	16	E94	$\beta$ -1,4	Gullfot <i>et al.</i> , 2009
<b>Xiloglucanasa</b> ( <i>Paenibacillus pabuli</i> )	5	E323	$\beta$ -1,4	Spadiut <i>et al.</i> , 2011

Taula 3.1. Glicosintases derivades d'endo-glicosidases que catalitzen reaccions de polimerització per autocondensació del substrat donador.

### 2.1. 1,4- $\beta$ -glucans

Un dels primers exemples de polimeritzacions amb glicosintases s'assolí amb el mutant E197A de la Cel7B d'*Humicola insolens*, permetent sintetitzar el polisacàrid de cel·lulosa tipus II de baix pes molecular per autocondensació del fluorur d' $\alpha$ -cel·lobiosil amb rendiments quantitatius (Fort *et al.*, 2000). També s'assajaren amb èxit altres fluorurs de cel·lobiosil modificats en C-6<sup>II</sup> com a substrats per a la reacció d'autocondensació (figura 3.2).

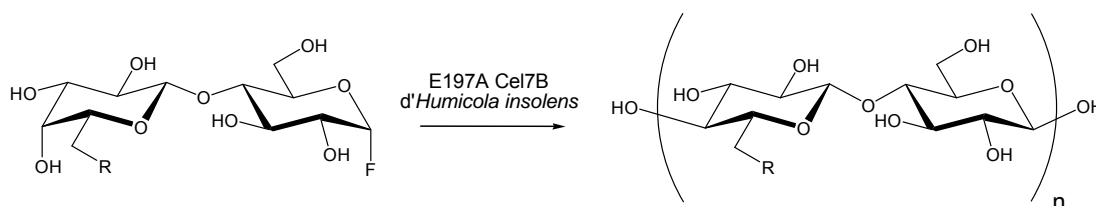


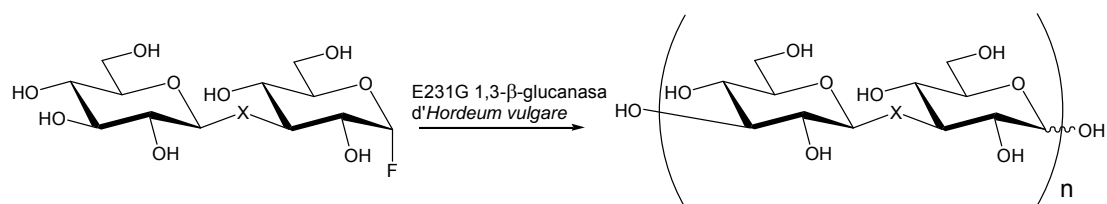
Figura 3.2. Reaccions de polimerització catalitzades pel mutant E197A de la Cel7B emprant fluorurs d' $\alpha$ -cel·lobiosil modificats en C-6<sup>II</sup>.

Així, per R = Br i R =  $\alpha$ -S-xilopiranosil s'aïllaren polímers insolubles, mentre que per R = NH<sub>2</sub> s'obtingué un polímer soluble a pH 7, tots ells per formació d'enllaços  $\beta$ -1,4 entre les unitats de monòmer (Fort *et al.*, 2000a; Ducros *et al.*, 2003). L'especificitat relaxada d'aquesta glicosintasa, a permès el seu ús en la síntesi de diferents oligo i polisacàrids: cel·lodextrines (Fort *et al.*, 2000b), cel·lulooligosacàrids funcionalitzats (Boyer *et al.*, 2002), xiloglucans (Faure *et al.*, 2006) i xilooligosacàrids (Saura-Valls *et al.*, 2006) i flavonoids glicosilats (Yang *et al.*, 2007).

### 2.2. 1,3- $\beta$ -glucans

La glicosintasa derivada de l'1,3- $\beta$ -glucanasa d'ordi va permetre autocondensar el fluorur d' $\alpha$ -laminaribiosil i obtenir un polímer de glucosa amb enllaços  $\beta$ -1,3 (Hrmova *et al.*, 2002). La caracterització per <sup>13</sup>C-RMN del producte evidencià un espectre molt semblant al del curdlà ( $\beta$ -1,3-

glucà lineal), fet que quedà corroborat en realitzar l'anàlisi per metilació. El grau de polimerització determinat per espectrometria MALDI-TOF s'estimà al voltant de 30 unitats.



**Figura 3.3.** Polimerització del fluorur d' $\alpha$ -laminaribiosil (X = O) i fluorur de 3-tio- $\alpha$ -laminaribiosil (X = S) catalitzada pel mutant E231G de la 1,3- $\beta$ -glucanasa d'*Hordeum vulgare*.

L'enzim també permeté l'autocondensació del fluorur de 3-tio- $\alpha$ -laminaribiosil, obtenint oligosacàrids amb enllaços alternats S i O-glicosídics. En aquest cas, els graus de polimerització foren inferiors que amb el substrat original (6 -18). A la figura 3.3 es mostra la reacció per ambdós substrats .

Els 1,3- $\beta$ -glucans, àmpliament presents en microorganismes i algues marines com a components de membrana o reserva energètica, no són molècules pròpies del metabolisme dels mamífers i actuen sobre aquests en l'estimulació del seu sistema immunitari. A banda del seu efecte sobre la immunomodulació, presenten gran potencial com a agents terapèutics, amb activitat antibacteriana, antivírica o anticancerígena (Descroix *et al.*, 2006).

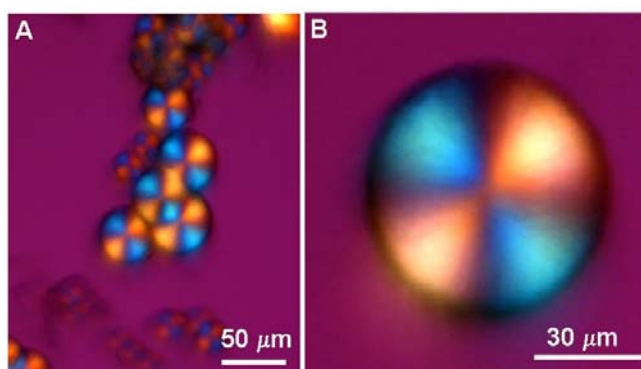
### 2.3. 1,4- $\beta$ -xilans

Més recentment, es troben exemples de síntesis d'1,4- $\beta$ -xilans a partir de glicosintases derivades de glicosidases pertanyents a la família 10 (Sugimura *et al.*, 2006). Els mutants E259G de *Thermotoga maritima*, E293G de *Clostridium stercorarium*, E301G de *Bacillus halodurans* i E233G de *Cellulomonas fimi* Cex (descrits a la introducció d'aquest treball) eren capaços de catalitzar l'autocondensació del fluorur d' $\alpha$ -xilobiosil rendint polímers de xilà units per enllaços  $\beta$ -1.4. Els rendiments oscil·laren entre el 29% i el 69% depenent de la xilosintasa emprada. S'estimà que el grau de polimerització estava al voltant de 22 unitats per  $^1\text{H}$ -RMN, per comparació de l'integral del senyal dels protons anomèrics de les xiloses enllaçades amb l'integral del protó anomèric de la xilosa situada a l'extrem no reductor.

Aquest resultat té rellevància en la mesura en què els xilans naturals no estan formats únicament de xiloses sinó que presenten ramificacions d'arabinosa i àcid glucurònic. Aquest homopolímer, doncs, esdevé una estructura inexistent a la natura i permet ampliar el ventall de nous polisacàrids obtinguts amb glicosintases.

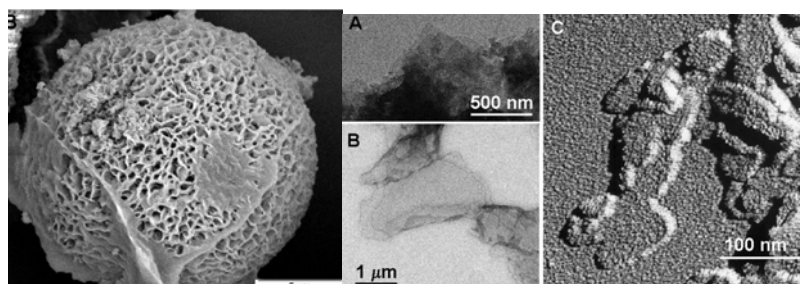
### 2.4. 1,3-1,4- $\beta$ -glucans

En el grup es va sintetitzar el primer polisacàrid "no-natural" per la metodologia glicosintasa, per autocondensació del fluorur d' $\alpha$ -laminaribiosil catalitzada pel mutant E134A de la  $\beta$ -glucanasa. S'obtingué un polisacàrid regular amb enllaços  $\beta$ -1,3 i  $\beta$ -1,4 alternats amb rendiments elevats. Es va realitzar un primer estudi estructural del polisacàrid  $-(\beta 4\text{Glc}\beta 3\text{Glc})-$  (Faijes *et al.*, 2004). La caracterització química es va dur a terme a partir d'un anàlisi de metilació, de  $^{13}\text{C}$ -RMN i espectrometria de masses per MALDI-TOF. Els resultats indicaven que el polisacàrid estava constituït per entre 6 i 12 unitats de glucosa, unides per enllaços alternats  $\beta$ -1,3,  $\beta$ -1,4. A nivell morfològic, la microscòpia per llum polaritzada va mostrar que el producte consistia en esferulites de diàmetres compresos entre 5 i 50  $\mu\text{m}$  (figura 3.4).



**Figura 3.4.** Producte obtingut per reacció glicosintasa del disacàrid  $\text{Glc}\beta 3\text{Glc}\alpha\text{F}$  observat per microscòpia de llum polaritzada.

Les imatges obtingudes per SEM de mostres liofilitzades van confirmar la morfologia esfèrica i revelaren una superfície amb aparença porosa (figura 3.5). Finalment l'anàlisi per TEM indicava que les estructures elementals que formaven les esferulites corresponien a làmines (figura 3.6) amb una mida compresa entre 1.5 i 11 nm. La mitjana de gruix de les làmines va de  $7.3 \pm 3.5$  nm. L'anàlisi cristal·logràfic del producte glicosintasa no va aportar informació determinant sobre la direccionalitat (paral·lela o antiparal·lela) de les cadenes de glucosa.



**Figura 3.5 i 3.6.** Imatge per SEM del producte glicosintasa. Imatges de TEM de les estructures tipus làmina. **A** i **B** revelades amb acetat d'uranil 2%. **C** ombrejada amb aliatge tungstè/tàntal.

Amb l'objectiu d'explorar les capacitats sintètiques de la glicosintasa derivada de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa, s'estudia la polimerització de diferents donadors glicosídics per establir una metodologia per a la síntesi de  $\beta$ -glucans amb enllaços mixtes i amb una seqüència definida  $[(4\text{Glc}\beta 4)_m\text{Glc}\beta 3\text{Glc}\beta]_n$ .

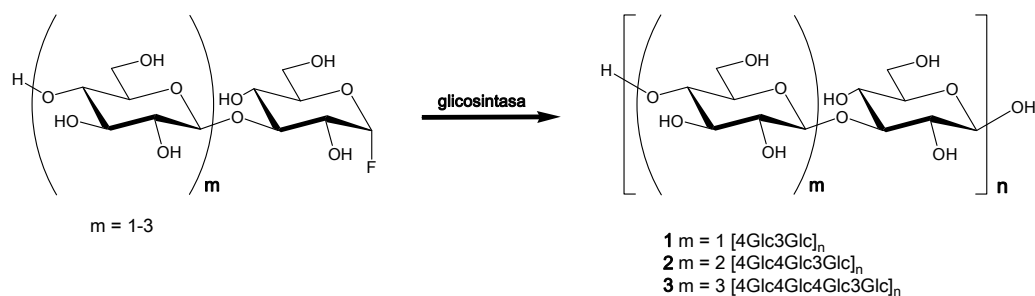
Tal i com es va determinar anteriorment, la condensació entre les sèries de donadors  $(\text{Glc}\beta 4)_n\text{Glc}\beta 3\text{Glc}\alpha\text{F}$  ( $n = 0 - 2$ ) i l'acceptor 4-nitrofenil  $\beta$ -cel·lobiòsid amb la glicosintasa E134A mostrava un increment en la reactivitat de 300 unitats en termes de  $k_{\text{cat}}/k_M$  quan es passava del disacàrid donador al tetrasacàrid (Faijes *et al.*, 2003). En absència de l'acceptor, la reacció autocondensació dels donadors segueix un perfil d'activitat similar, esdevenint el trisacàrid i el tetrasacàrid substrats més actius que el disacàrid per a la reacció de polimerització.

Els resultats d'aquest capítol es troben publicats a la revista *Biomacromolecules*, 2011, 12, 494 - 501 (Pérez *et al.*, 2011).

### RESULTATS i DISCUSSIÓ

#### 3. Polimeritzacions enzimàtiques *in vitro* catalitzades per la glicosintasa E134A de la $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*.

Les polimeritzacions enzimàtiques per autocondensació dels substrats es realitzen a partir dels donadors  $\text{Glc}\beta 3\text{Glc}\alpha\text{F}$ ,  $\text{Glc}\beta 4\text{Glc}\beta 3\text{Glc}\alpha\text{F}$  i  $\text{Glc}\beta 4\text{Glc}\beta 4\text{Glc}\beta 3\text{Glc}\alpha\text{F}$  segons es mostra a la figura 3.7.



**Figura 3.7.** Reaccions de polimerització catalitzades pel mutant E134A de la  $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*.

Les reaccions tenen lloc a pH 7.2 i 35°C variant les concentracions de donador i enzim, com es mostra a la taula 3.8.

### CAPÍTOL 3: APLICACIÓ DE LA METODOLOGIA GLICOSINTASA EN LA SINTESI DE NOUS $\beta$ -GLUCANS

REF#	[Donador] (mM)	[E134A] ( $\mu$ M)	Tampó	Assecat	Rendiment (%)	M <sub>w</sub> (kDa)	N(#Glc)	Mn (kDa)	PDI	Mp (kDa)
<b>Donador: Glc<math>\beta</math>3Glc<math>\alpha</math>F (polímer 1)</b>										
AP1	233	41	TF	liofilització	78	9.5	29(59)	5.0	1.9	9.1
<b>Donador: Glc<math>\beta</math>4Glc<math>\beta</math>3Glc<math>\alpha</math>F (polímer 2)</b>										
XP241	64	8.2	TF	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> /buit	73	15.5	29(87)	10.1	1.5	17.5
XP247	47	8.2	TF	liofilització	60	12.5	26(77)	8.5	1.5	12.0
XP248	53	8.2	TF	etanol/N <sub>2</sub>	70	14.5	30(89)	9.3	1.5	14.6
XP249	47	8.2	DMSO 10%	liofilització	60	12.6	26(78)	8.5	1.5	13.0
XP250	45	8.2	TF	liofilització	52	13.9	29(86)	9.7	1.4	14.5
AP7	160	20.5	TF	liofilització	100	13.9	29(86)	6.7	2.0	3.2, 16.3
AP9	160	41	TF	liofilització	100	14.6	30(90)	6.9	2.1	3.7, 17.3
AP15	160	41	TF	liofilització	93	12.0	25(75)	6.3	1.9	16.1
<b>Donador: Glc<math>\beta</math>4Glc<math>\beta</math>4Glc<math>\beta</math>3Glc<math>\alpha</math>F (polímer 3)</b>										
XP223*	16	8.2	TF	liofilització	60	-	-	-	-	-
XP252	16	8.2	DMSO 20%	liofilització	55	8.4	13(51)	5.3	1.6	7.7
XP253	13	8.2	TF	liofilització	60	9.3	14(57)	5.8	1.6	9.3
AP3	120	41	TF	liofilització	60	12.9	20(79)	7.5	1.7	16.2

**Taula 3.8.** Condicions de reacció en les polimeritzacions catalitzades pel mutant E134A de la  $\beta$ -glucanasa. Les reaccions transcorren amb agitació orbital (100 – 250 rpm). N: número de condensacions; Glc: número d'unitats glucosil, calculades a partir de M<sub>w</sub>. Els precipitats s'assequen per liofilització, mitjançant dessecador de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/buit o amb rentat amb etanol/corrent N<sub>2</sub>. \*Mostra XP223 realitzada sense agitació; no es disposa d'anàlisi per HPSEC.

Tal i com es va determinar anteriorment (Faijes *et al.*, 2003), en aquestes condicions de temperatura i pH, la reacció glicosintasa és òptima i l'única reacció secundària, la hidròlisi espontània del fluorur d' $\alpha$ -glucosil, és mínima amb una constant d'hydròlisi  $k_h$  de  $2.57 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ .

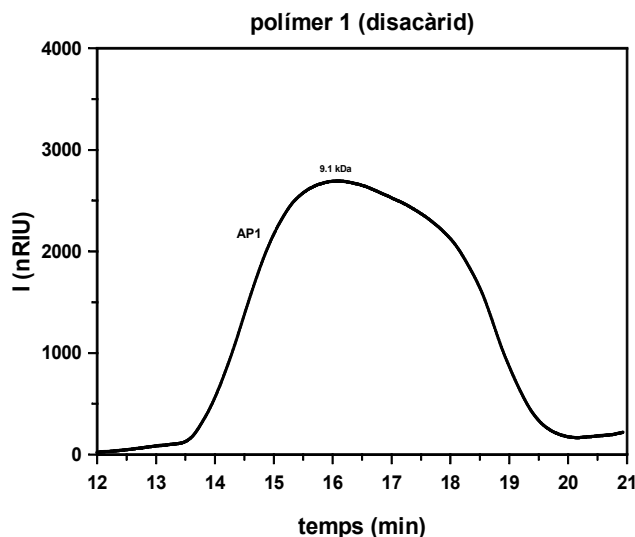
Tots els substrats emprats en les reaccions de polimerització han estat sintetitzats segons es detalla a la part experimental.

La caracterització dels productes obtinguts s'ha realitzat per <sup>13</sup>C-RMN, MALDI-TOF-MS, microscòpia electrònica d'escombratge (SEM), microscòpia de llum polaritzada, *dynamic light scattering* (DLS), difracció de raigs-X, HPLC i HPSEC.

La cromatografia d'exclusió per mida (HPSEC) s'empra per a la determinació del grau de polimerització i la distribució de masses dels polímers obtinguts. La calibració es realitza mitjançant patrons de dextrà en el rang 1 – 55 kDa (veure part experimental).

#### 3.1. Autocondensació del Glc $\beta$ 3Glc $\alpha$ F

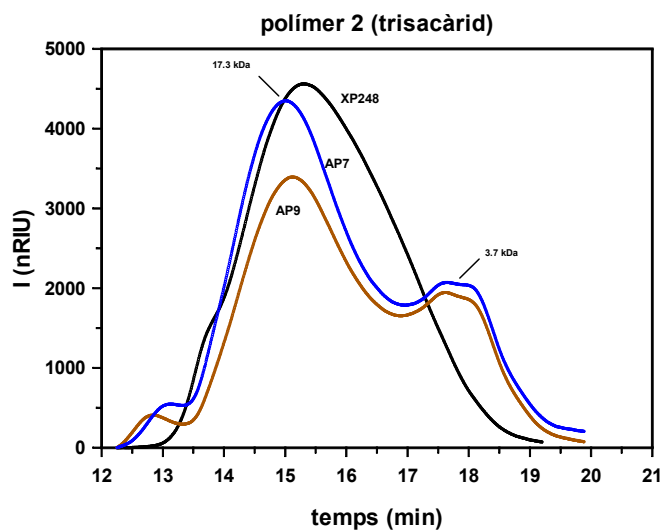
El **polímer 1**, obtingut per autocondensació del fluorur d' $\alpha$ -lamimaribiosil a una elevada concentració de donador (taula 3.8, AP1), presenta un M<sub>w</sub> de 9.5 kDa, que correspon a aproximadament 29 condensacions (un grau de polimerització de 59 unitats de Glc) (figura 3.9). La mida d'aquest polisacàrid és lleugerament superior a la descrita anteriorment al grup (Faijes *et al.*, 2004) degut a una optimització en les condicions de reacció i una millora de l'activitat específica del mutant E134A. En paral·lel s'assaja una reacció a baixa concentració inicial de donador (32 mM) a partir de la qual no s'obtingué precipitat.



**Figura 3.9.** Cromatograma d'HPSEC corresponent al polisacàrid obtingut per autocondensació del disacàrid Glc $\beta$ 3Glc $\alpha$ F. S'empra una concentració inicial de disacàrid de 233 mM i 41  $\mu$ M d'E134A.

### 3.2. Autocondensació del Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 3Glc $\alpha$ F

Per a l'obtenció del **polímer 2**, s'estudien diferents condicions de reacció. En emprar una elevada concentració de donador (160 mM) i enzim (taula 3.8, Ap7, AP9 i AP15), s'obtenen conversions quantitatives. La distribució de pesos moleculars determinada per HPSEC mostra que els polímers tenen perfils bimodals amb dos pics intensos, el primer a 3.7 kDa i el segon sobre els 17 kDa. Els valors d' $M_w$  estan compresos entre 12 i 14.6 kDa (PDI 1.9 – 2.1) que corresponen a polímers d'unes 90 unitats de glucosa. En emprar una baixa concentració d'enzim i donador (taula 3.8, XP247 i XP258), els rendiments de formació de polímers insolubles no excedeixen el 70% i la distribució de massa molecular passa a ser monomodal (figura 3.10). Els valors d' $M_w$  s'incrementen lleugerament de 12.5 a 14.5 kDa amb l'increment de concentració del donador i els valors d' $M_p$  abasten el valor de població d'elevat pes molecular obtingut a elevades concentracions de donador. Aquest fet suggereix que la taxa de formació i la quantitat de polímers d'alt pes molecular formats en emprar una elevada concentració de substrat i enzim condueixen a dissolucions sobresaturades que en precipitar atrapen els polímers de baix pes molecular, amb el resultat d'un perfil polimèric bimodal.



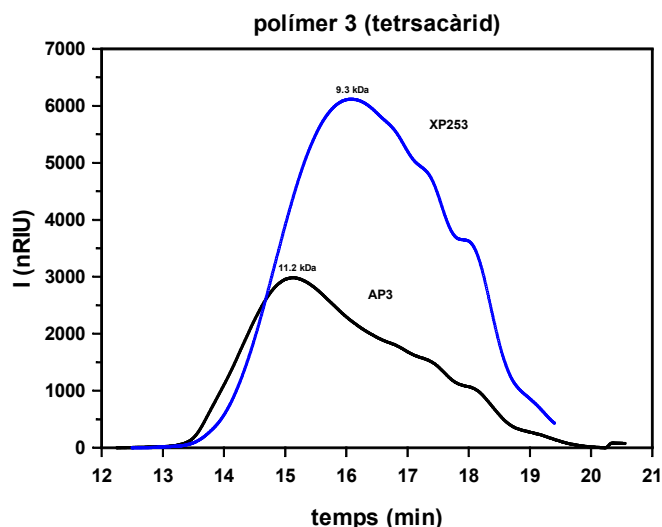
**Figura 3.10.** Cromatograma d'HPSEC corresponents a polisacàrids obtinguts per autocondensació del trisacàrid  $\text{Glc}\beta_4\text{Glc}\beta_3\text{Glc}\alpha\text{F}$ . Les mostres #AP9 i #AP7, realitzades a alta concentració de donador i d'enzim mostren perfils bimodals mentre que per la mostra #XP248 realitzada a baixes concentracions d'enzim i substrat s'obté un perfil monomodal.

L'única policondensació realitzada a partir d'una concentració inicial de trisacàrid baixa (4 mM) no dóna cap precipitat.

### 3.3. Autocondensació del $\text{Glc}\beta_4\text{Glc}\beta_4\text{Glc}\beta_3\text{Glc}\alpha\text{F}$

De la mateixa manera que amb el donador trisacàrid, s'estudien diverses condicions de reacció per a l'obtenció del **polímer 3**. Només s'observa formació de producte insoluble per a concentracions de donador superiors a 4 mM. A baixa concentració d'enzim i substrat (taula 3.8, XP253) la distribució polimèrica presenta un perfil monomodal, tal i com s'observa amb el **polímer 2**, però el valor de  $M_w$  (9.3 kDa) esdevé més baix, probablement degut a una major insolubilitat del polímer. A altes concentracions de substrat (taula 3.8, AP3), el valor d'  $M_w$  s'incrementa fins a 12.9 kDa i es manté una distribució polimèrica monomodal, de forma oposada al **polímer 2** (figura 3.11). Aquest fet probablement té a veure amb una diferent relació entre la taxa de condensació i la taxa de precipitació per ambdós polímers.





**Figura 3.11.** Cromatograma d'HPSEC corresponent a polisacàrids obtinguts per autocondensació del tetrascàrid  $\text{Glc}\beta 4\text{Glc}\beta 4\text{Glc}\beta 3\text{Glc}\alpha\text{F}$ . Tant la mostra #AP3, realitzada a alta concentració de donador i d'enzim, com la mostra #XP253, realitzada a baixes concentracions d'enzim i substrat, mostren perfils monomodals.

Per tal d'incrementar la solubilitat dels polímers obtinguts, es realitzen reaccions amb DMSO com a cosolvent orgànic, fins a un màxim del 20%, on l'activitat de l'enzim roman intacte (Malet i Planas, 1998). Els resultats mostren rendiments i perfils polimèrics similars als obtinguts en absència de DMSO, de manera que no s'observa cap efecte en l'ús de dissolvents orgànics (taula 3.8, XP249, XP252)

També s'estudia l'efecte de l'increment de pH en les reaccions de polimerització. Per les diferents reaccions realitzades a pH 9 (taula 3.12, XP301, XP302) només es recuperen polímers de baix pes molecular solubles en aigua, tant pel donador triscàrid com tetrascàrid. Aquest punt es pot explicar per la disminució de l'activitat enzimàtica a aquest pH així com per la inestabilitat del fluorur de glicosil a pH alcalins (Faijes *et al.*, 2003).

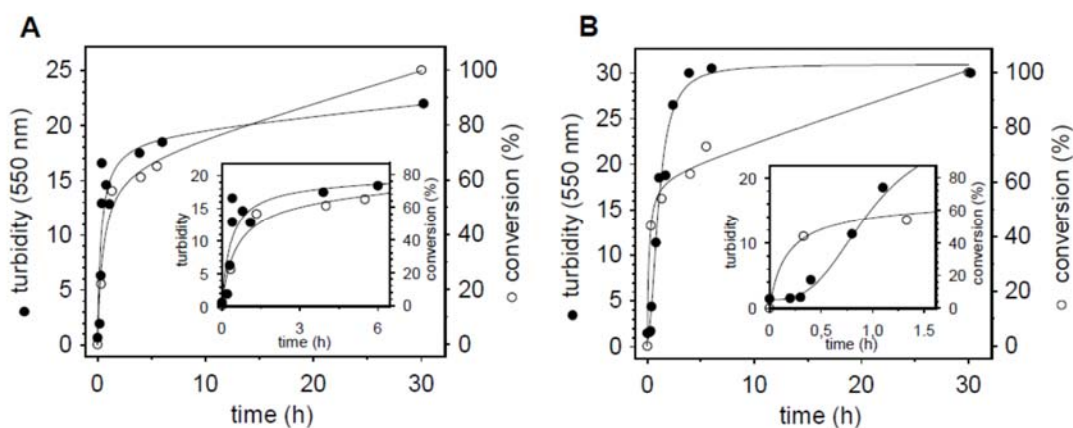
REF#	[Donador] (mM)	[E134A] ( $\mu\text{M}$ )	Tampó	Rendiment (%)
XP301	35 (triscàrid)	10.3	TF pH 9	no precipita
XP302	13 (tetrascàrid)	10.3	TF pH 9	no precipita

**Taula 3.12.** Condicions de reacció en les polimeritzacions realitzades a pH 9.

Malgrat les diferències en estructura, els tres polímers (1 – 3), presenten valors de  $M_w$  entre 10 i 15 kDa amb un elevat índex de polidispersió (1.5 – 2.1); la mida dels polímers no es veu significativament alterada per les concentracions de donador i enzim emprades en les reaccions. Atès que els productes esdevenen insolubles durant la reacció glicosintasa, la mida dels polímers sembla venir governada per la insolubilitat del producte.

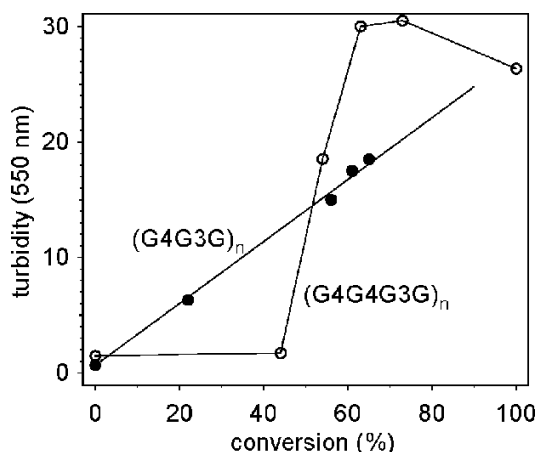
### 3.4. Estudi de la taxa de condensació vs. la taxa de precipitació

Atès que la reacció glicosintasa de polimerització té lloc en dissolució aquosa, la polimerització pot procedir, en principi, fins el punt en què el producte esdevé insoluble. Per tal de determinar la relació entre ambdues taxes, es preparen reaccions en idèntiques condicions per a l'obtenció dels **polímers 2 i 3**. La taxa de condensació és monitoritzada a través de l'alliberament de fluorur mitjançant un elèctrode selectiu de fluorur (tal i com es reporta a Faijes *et al.*, 2003) mentre que la taxa de precipitació es mesura per turbidimetria (expressada com a absorbància a 550 nm) (figura 3.13).



**Figura 3.13.** Seguiment de la conversió (alliberament de fluorur expressat com a (%)) relatiu a la concentració inicial de donador i de la precipitació de producte (absorbància a 550 nm) per a la formació dels **polímers 2 (A)** i **3 (B)**.

Per a la reacció d'autocondensació del trisacàrid (formació del **polímer 2**), la precipitació s'inicia des del començament i s'incrementa de forma lineal amb el grau de conversió. Pel que fa al tetrasacàrid (formació del **polímer 3**), en ser un substrat més actiu, la reacció transcorre de forma més ràpida i no s'observa precipitat fins que s'assoleix el 40% de conversió (figura 3.14); seguidament el polímer precipita de forma molt ràpida. La hipòtesi contempla que el producte de condensació pateix una elongació molt ràpida mentre que el polímer roman en dissolució (sobresaturat) fins que precipita de forma sobtada. Si la hipòtesi fos real, es podria estendre el grau de polimerització més enllà del límit de solubilitat incrementant la velocitat de reacció, això és, emprant una glicosintasa més activa.



**Figura 3.14.** Precipitació (per turbidimetria) front a conversió (alliberament de fluorur) per a la formació dels polímers **2** i **3**, mitjançant la glicosintasa E134A de la  $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*.

### 3.5. Caracterització estructural dels polímers 1 – 3.

La caracterització estructural dels homopolímers 1 – 3 es realitza per  $^{13}\text{C}$ -RMN i MALDI-TOF-MS. Tots els polímers resulten solubles en 100% DMSO.

#### **RMN**

Els espectres de  $^{13}\text{C}$ -RMN dels polímers obtinguts per a l'autocondensació del di, tri i tetrasacàrids (polímers 1 - 3) presenten un increment del senyal a  $\delta_c$  80 ppm corresponent a la formació d'un nou enllaç glicosídic  $\beta$ -1,4 entre les unitats de monòmer i la desaparició del senyal a  $\delta_c$  69 ppm assignable al C-4 no substituït de l'extrem no reductor del donador glicosídic. Es confirma que es tracta d'estructures repetitives dels seus corresponents monòmers unides per enllaços  $\beta$ -1,4. La caracterització amb experiments 2D-RMN per als polímers **2** i **3** permet l'assignació dels espectres  $^{13}\text{C}$ -RMN i  $^1\text{H}$ -RMN (veure part experimental).

#### **MALDI-TOF-MS**

Tal i com s'ha determinat per HPSEC, els polímers obtinguts en les autocondensacions dels diferents donadors són polidispersos. Mitjançant la tècnica MALDI-TOF-MS només és possible ionitzar aquells oligòmers de baix pes molecular, donada la seva desorció preferencial en les condicions d'ionització per MALDI. Les masses observades són en forma d'adductes  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  de les espècies que conformen el polímer. S'observen increments de massa ( $\Delta m/z$ ) entre les espècies detectades coincidents amb la massa teòrica de les unitats repetitives dels polímers. D'aquesta manera, pel **polímer 1** (autocondensació del disacàrid) s'obtenen increments de massa de 324 Da corresponents a una unitat de laminaribiosa enllaçada. Pels polímers basats en el trisacàrid (**polímer 2**), els increments de massa són de 486 Da que corresponen a la massa d'una unitat de  $\text{Glc}\beta\text{4Glc}\beta\text{3Glc}$

### CAPÍTOL 3: APLICACIÓ DE LA METODOLOGIA GLICOSINTASA EN LA SINTESI DE NOUS $\beta$ -GLUCANS

enllaçada. Finalment, pel **polímer 3** (autocondensació del tetrasacàrid) s'observen increments de massa de 648 Da. A tall d'exemple es mostren els senyals dels espectres MALDI-TOF de les mostres AP1, XP247 i XP252 que corresponen a productes obtinguts per autocondensació del disacàrid, trisacàrid i tetrasacàrid respectivament (taules 3.15, 3.16 i 3.17).

m/z experimental	#Glc	DP	m/z teòric [M+Na] <sup>+</sup>	error (%)	$\Delta_{\text{massa}}$ experimental
1016	6	2	1014	0,17	
1339	8	3	1338	0,05	323
1664	10	4	1663	0,07	325
1988	12	5	1987	0,03	324
2311	14	6	2311	0,01	323
2636	16	7	2636	0,02	325
2960	18	8	2960	0,00	324
3283	20	9	3284	0,03	323
3609	22	10	3609	0,00	325
3934	24	11	3933	0,02	325
4256	26	12	4257	0,02	323
4583	28	13	4581	0,03	327
4906	30	14	4906	0,01	323
5229	32	15	5230	0,02	323
5555	34	16	5554	0,01	326
5875	36	17	5879	0,06	320
					324

Taula 3.15. Assignació dels senyals de l'espectre MALDI-TOF corresponents a la mostra AP1.

m/z experimental	#Glc	DP	m/z teòric [M+Na] <sup>+</sup>	error (%)	$\Delta_{\text{massa}}$ experimental
1502	9	3	1500	0,12	
1989	12	4	1987	0,12	487
2476	15	5	2473	0,12	487
2962	18	6	2960	0,08	486
3449	21	7	3446	0,09	487
3936	24	8	3932	0,09	487
4422	27	9	4419	0,07	486
4908	30	10	4905	0,06	486
5395	33	11	5392	0,06	487
5881	36	12	5878	0,05	486
6367	39	13	6364,5	0,04	486
6853	42	14	6851	0,03	486
7339	45	15	7337	0,02	486
7825	48	16	7824	0,02	486
8311	51	17	8310	0,01	486
8797	54	18	8797	0,00	486
					486

Taula 3.16. Assignació dels senyals de l'espectre MALDI-TOF corresponents a la mostra XP247.

m/z experimental	#Glc	DP	m/z teòric [M+Na] <sup>+</sup>	error (%)	$\Delta_{\text{massa}}$ experimental
1339	8	2	1338	0,07	
1988	12	3	1987	0,07	649
2637	16	4	2635	0,07	649
3286	20	5	3284	0,06	649
3934	24	6	3932	0,05	649
4583	28	7	4581	0,04	648
5231	32	8	5230	0,03	648
5879	36	9	5878	0,02	648
6527	40	10	6527	0,01	648
7193	44	11	7175	0,24	666
7841	48	12	7824	0,22	648
8489	52	13	8472	0,19	648
					648

Taula 3.17. Assignació dels senyals de l'espectre MALDI-TOF corresponents a la mostra XP252.

Amb tot, la informació aportada per l'espectrometria MALDI-TOF i l'RMN determina l'estructura dels polímers obtinguts, formada a partir d'unitats dels seus respectius monòmers enllaçades de forma lineal per enllaços  $\beta$ -1,4. La proporció d'enllaços  $\beta$ -1,3 enfront a  $\beta$ -1,4 vindrà determinada pel donador emprat, essent pel cas del disacàrid fluorur de laminaribiosil del 50%.

#### Microscòpia electrònica d'escombratge (SEM)

L'anàlisi per SEM mostra que el producte de condensació del disacàrid (**polímer 1**) s'organitza en esferulites de diàmetre mitjà 20  $\mu\text{m}$  (figura 3.18), corroborant els resultats prèviament obtinguts al laboratori (Fajjes et al., 2004).

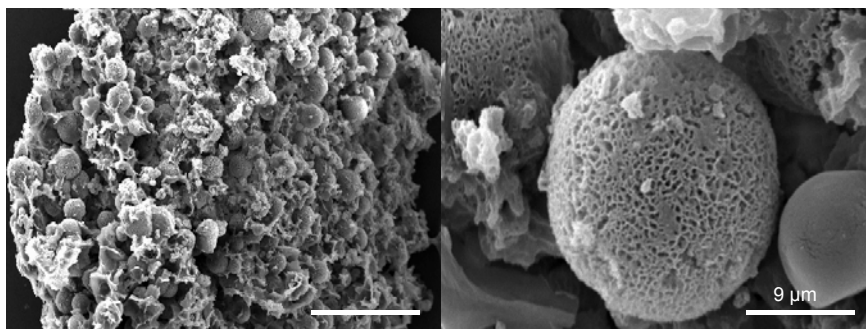
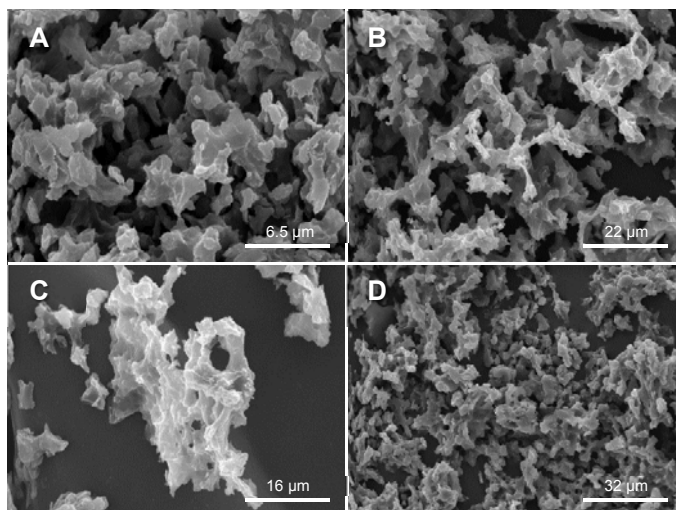


Figura 3.18. Micrografies SEM de la mostra AP1. S'observen les esferulites formades d'aproximadament 20  $\mu\text{m}$  de diàmetre.

A les micrografies s'observa que el material és força homogeni. La superfície de les esferes té aspecte porós i no conté sals.

Pel que fa al **polímer 2**, obtingut per autocondensació del trisacàrid, l'anàlisi per SEM no mostra formació d'esferulites. El producte presenta una morfologia amorfa, amb la superfície col·lapsada, sense detalls de porositat. No mostra birefringència quan se sotmet a microscòpia de llum polaritzada. A la figura 3.19, es mostren les micrografies SEM de quatre mostres de **polímer 2**

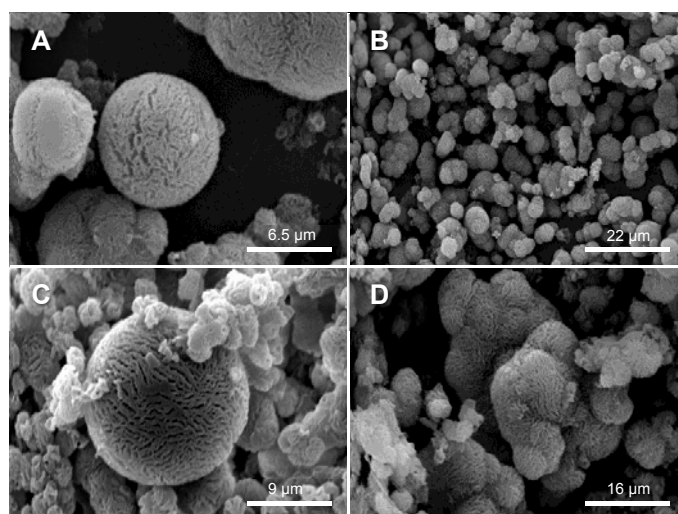
assecades per liofilització. La micrografia D correspon a un producte obtingut a partir d'una concentració inicial de trisacàrid més baixa (35 mM) respecte a la resta (45 – 48 mM).



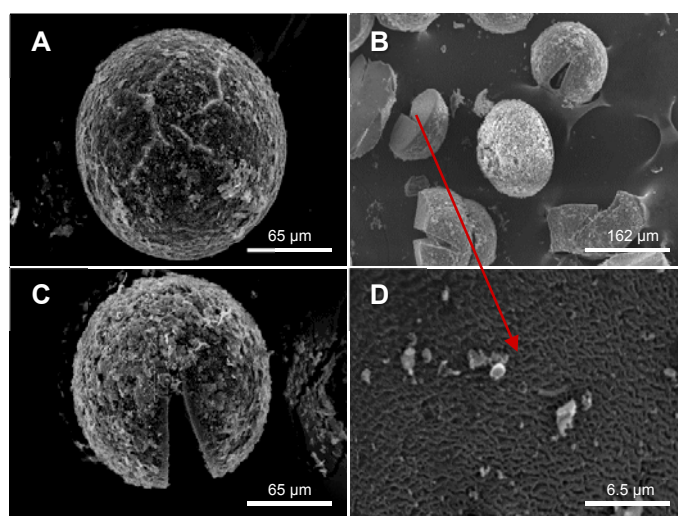
**Figura 3.19.** Micrografies SEM del producte glicosintasa obtingut per autocondensació del trisacàrid  $\text{Glc}\beta_4\text{Glc}\beta_3\text{Glc}\alpha\text{F}$ , corresponents a mostres assecades per liofilització. Totes les reaccions realitzades a 35 - 37°C, amb agitació orbital de 150 rpm i  $[\text{E134A}] = 8.2 \mu\text{M}$ . (A)  $[\text{Donador}] = 48 \text{ mM}$ ; (B)  $[\text{Donador}] = 48 \text{ mM}$ ; (C)  $[\text{Donador}] = 45 \text{ mM}$ ; (D)  $[\text{Donador}] = 35 \text{ mM}$ .

La morfologia d'aquest polímer és similar a la de l'1,3-1,4- $\beta$ -glucà d'ordi, on la unitat repetitiva més abundant és el trisacàrid  $\text{Glc}\beta_4\text{Glc}\beta_3\text{Glc}$  i en menor grau el tetrasacàrid  $\text{Glc}\beta_4\text{Glc}\beta_4\text{Glc}\beta_3\text{Glc}$ . Aquest fet suggereix que la presència d'aquesta unitat trisacàridica en el polímer pot distorsionar les interaccions entre les cadenes per a empaquetar-se en una estructura d'ordre superior.

L'anàlisi per SEM mostra que el **polímer 3** (autocondensació del tetrasacàrid) forma esferulites d'aproximadament 6 - 10  $\mu\text{m}$  de diàmetre i que aquesta morfologia no depèn de l'assecat (figura 3.20) ni de la concentració de substrat inicial. Quan la reacció té lloc sense agitació (taula 3.8, XP223), les micrografies SEM revelen l'obtenció d'esferes de gran mida (175  $\mu\text{m}$ ), amb estructura interna porosa (figura 3.21).

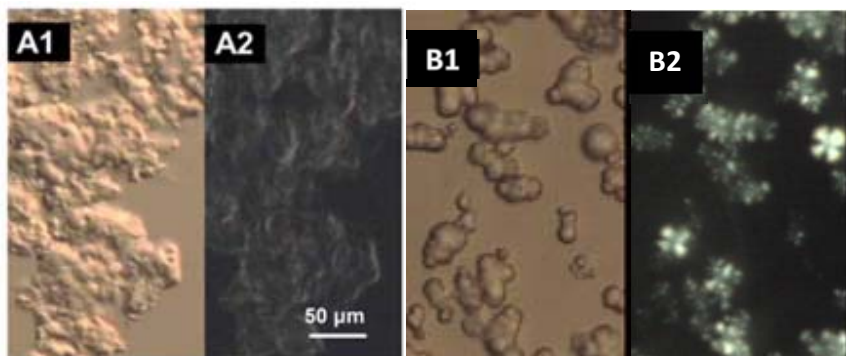


**Figura 3.20.** Micrografies SEM del producte glicosintasa obtingut per autocondensació del tetrasacàrid  $\text{Glc}\beta_4\text{Glc}\beta_4\text{Glc}\beta_3\text{Glc}\alpha\text{F}$ , corresponents a mostres assecades per liofilització (**A**, **B** i **D**) i EtOH/N<sub>2</sub> (**C**). Totes les reaccions realitzades a 35 - 37°C, amb agitació orbital de 150 - 250 rpm i  $[\text{E134A}] = 8.2 - 10.3 \mu\text{M}$ . (**A**)  $[\text{Donador}] = 38 \text{ mM}$ ; (**B**)  $[\text{Donador}] = 16 \text{ mM}$ , 20% DMSO; (**C**)  $[\text{Donador}] = 13 \text{ mM}$ ; (**D**)  $[\text{Donador}] = 18 \text{ mM}$ .



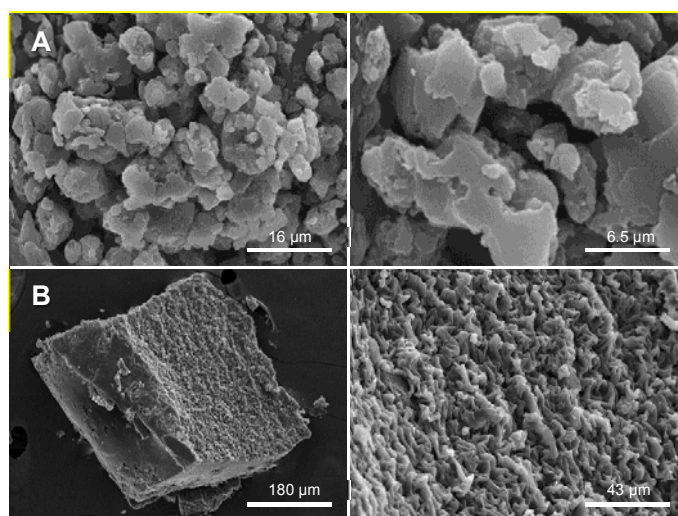
**Figura 3.21.** Micrografies SEM de la mostra XP223. Correspon a una reacció realitzada a 35°C,  $[\text{donador}] = 75 \text{ mM}$ ,  $[\text{E134A}] = 8.2 \mu\text{M}$ , 3 dies, sense agitació i assecat per liofilització. S'observen esferes de gran mida (175  $\mu\text{m}$  de diàmetre) amb la superfície col·lapsada (**A**, **C**). Les esferes trencades (**B**) mostren una morfologia interna d'aspecte porós (**D**). Possiblement les ruptures es deguin als processos mecànics als quals s'ha sotmès la mostra.

Les esferulites són nivells organitzatius superiors en polímers cristal·lins. Aquestes estructures esfèriques estan constituïdes de nombroses làmines cristal·lines, que han crescut de forma radial en tres dimensions i estan connectades per segments moleculars amorfs. Són fàcilment observables per microscòpia emprant llum polaritzada, exhibint un patró característic amb àrees de birefringència circular anomenades creu de malta. A continuació es mostra les micrografia dels polímers 2 i 3 amb llum normal i polaritzada (figura 3.22).



**Figura 3.22.** Observacions amb llum polaritzada dels **polímers 2 i 3**. Llum normal (A1) i polaritzada pel **polímer 2**. Llum normal (B1) i polaritzada (B2) pel **polímer 3**.

A banda de la liofització, els diferents polímers insolubles també se sotmeten alternativament a assecats per corrent de  $N_2$  després d'una maceració amb etanol, i a pressió reduïda en atmosfera de  $P_2O_5$ . Els polímers del trisacàrid sempre adopten morfologies heterogènies amb independència del mètode d'assecat. Amb tot, a pressió reduïda, les estructures presenten una aparença més compacta (figura 3.23).

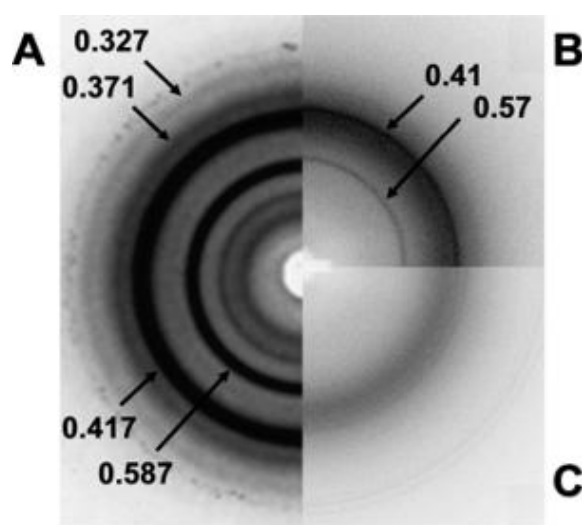


**Figura 3.23.** Micrografies SEM del producte glicosintasa obtingut per autocondensació del trisacàrid  $Glc\beta_4Glc\beta_3Glc\alpha_F$ , corresponents a mostres assecades amb EtOH/corrent de  $N_2$  (**A**) i dessecador amb  $P_2O_5$  (**B**).



### Difracció de Raigs X

Per tal d'avaluar la cristal·linitat dels diferents polímers es registren diagrames de difracció de raig-X. En un treball anterior, ja s'observava que el **polímer 1** estava format de *platelets* cristal·lins amb un empaquetament de cadena semblant als cristalls de cel·lulosa tipus I (Fajjes *et al.*, 2004). En aquest treball, els dos polímers que formen esferulites presenten difracció; així el **polímer 1** segueix mostrant una elevada cristal·linitat mentre que pel **polímer 3** s'obté una baixa difracció (només dos anells de difracció definits). El **polímer 2** no mostra difracció indicant que la seva organització no esferulítica presenta poca o cap cristal·linitat (figura 3.24).



**Figura 3.24.** Diagrames de difracció de raigs-X pels polímers 1 – 3 (A – C).

### 3.6. Condensació creuda de trisacàrid i tetrasacàrid

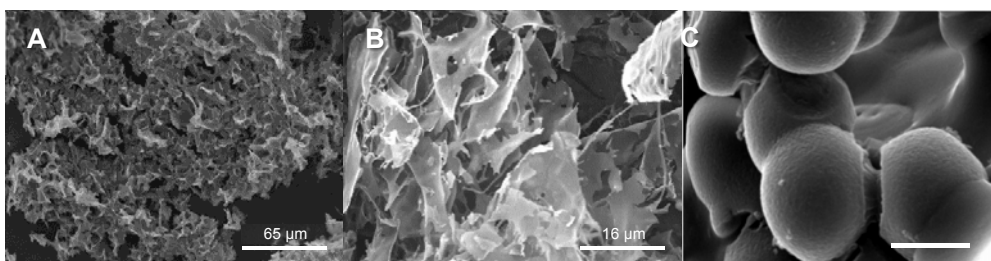
Es realitzen experiments preliminars de condensacions creuades entre el donador trisacàridic i el donador tetrasacàridic a diferents relacions molars (taula 3.25).

REF#	[tri]/[tetra] (mM)	[substrat] (mM)	[E134A] ( $\mu$ M)	Recuperació
XP308	10,5	25	10	Np
XP309	1,0	26	10	Np
XP310	0,1	25	10	Np
XP258	3,9	54	8	22 mg
XP367	1,1	158	41	43 mg

**Taula 3.25.** Condicions de reacció per a les condensacions creuades amb tri i tetrasacàrid.

En emprar relacions molars tri/tetra de 0.1, 1 i 10 amb una concentració total de substrat de 25 mM (taula 3.25, XP308 – 310) s'obtenen polímers solubles en aigua (<10kDa), concentració en la qual en emprar únicament trisacàrid o tetrasacàrid com a donadors s'obtenen polímers insolubles. Quan s'incrementa la concentració del donador fins a 50 mM s'obtenen polímers insolubles en aigua (taula 3.25., XP258). Basats en els valors de  $k_{cat}/K_M$  obtinguts per ambdós substrats amb la glicosintasa E134A (Faijes *et al.*, 2003), una relació molar de 3.9 correspondria a una reactivitat igual per ambdós substrats donant lloc a una incorporació equimolar en el polímer.

Les dues reaccions on es recupera producte insoluble (taula 3.25., XP258 i XP367) s'analitzen per SEM mostrant una morfologia amorfa, semblant a l'observada en el **polímer 2** obtingut a partir del trisacàrid (figura 3.26). Només quan la relació tri/tetra és de 0.1 (3% de trisacàrid inicial front a 97% de tetrasacàrid), malgrat no es recupera precipitat, en el cru de reacció assecat s'observen esferulites com en el **polímer 3** obtingut per autocondensació del tetrasacàrid.



**Figura 3.26.** Micrografies SEM de les mostres XP258 (A) i XP367 (B): el sòlid aïllat i assecat per liofilització presenta una morfologia semblant al **polímer 2** resultant de l'autocondensació del trisacàrid. XP310 (C): a baixa proporció de trisacàrid (3%), es tornen a observar esferulites com en el **polímer 3**.

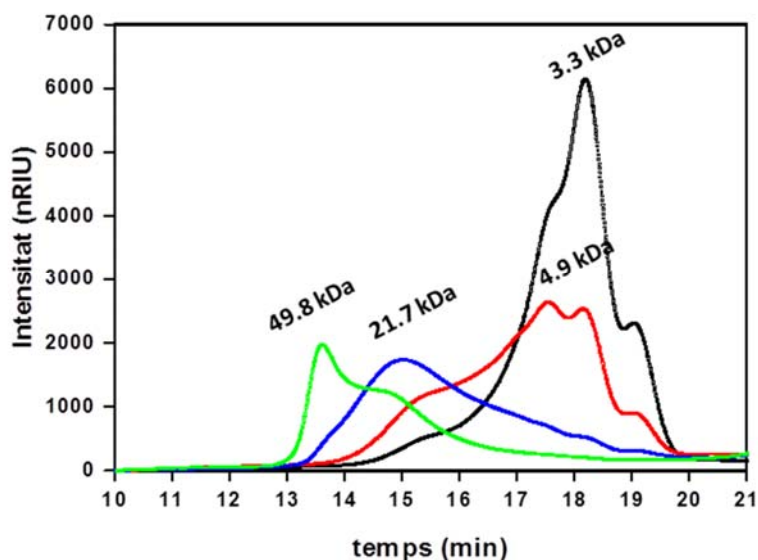
#### 4. Polimerització amb el mutant E134S de la $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*.

Tal i com s'ha descrit anteriorment, els polímers (1 – 3) obtinguts per autocondensació presenten valors de  $M_w$  compresos entre 10 i 15 kDa, assenyalant que el grau de polimerització no es veu significativament alterat per les concentracions de donador i enzim emprades en les reaccions. La mida final d'aquests polímers sembla venir governada per la seva solubilitat, de manera que a major activitat enzimàtica seria possible obtenir polímers més llargs. Si aquesta hipòtesi fos certa, l'ús d'una glicosintasa més ràpida permetria ampliar el grau de polimerització més enllà d'aquest límit de solubilitat.

Per tal de comprovar aquesta hipòtesi, s'empra el mutant E134S de la  $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*, obtingut en el present treball, i que resulta ser una glicosintasa més activa que el mutant original E134A, per a catalitzar un conjunt de reaccions d'autocondensació del donador tetrasacàrid emprant concentracions creixents d'aquest mutant i mantenint la resta de condicions constants.

L'anàlisi per HPSEC dels diferents polímers mostra que el perfil de pesos moleculars és dependent de la concentració d'enzim (figura 3.27). A concentració d'enzim baixa (0.8  $\mu$ M), s'obté un polímer

amb un valor d' $M_w$  de 5 kDa corresponent a 31 unitats de glucosa. A mesura que s'empren concentracions creixents d'enzim, els polímers insolubles aïllats són de major mida, fins a assolir un valor de  $M_w$  de 30.5 kDa (188 unitats de glucosa) en emprar 41  $\mu$ M d'enzim.



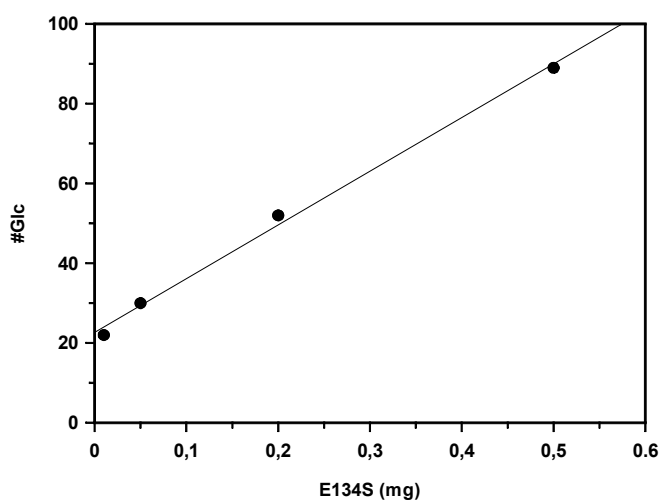
**Figura 3.27.** Anàlisi per HPSEC dels productes de polimerització obtinguts per autocondensació del tetrasacàrid amb el mutant E134S de la  $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* (●: E134S (0.8  $\mu$ M); ●: E134S (4.1  $\mu$ M) ●: E134S (16.4  $\mu$ M) ●: E134S (41.0  $\mu$ M)). Els valors d' $M_p$  es troben indicats en kDa.

Els resultats de l'anàlisi per HPSEC permeten el càlcul dels diferents paràmetres dels polímers obtinguts (taula 3.28).

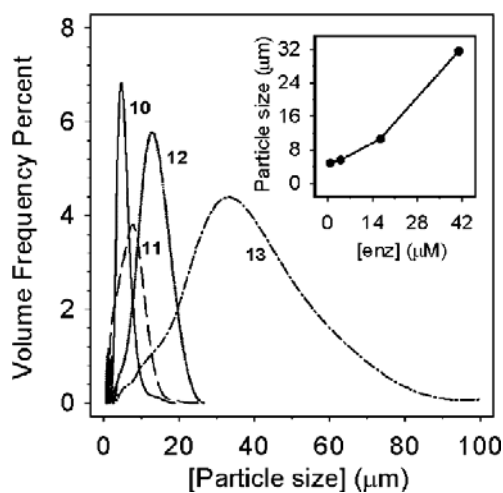
[E134S] (mg)	[E134S] ( $\mu$ M)	Rendiment (%)	$M_w$ (kDa)	N (#Glc)	$M_n$ (kDa)	$M_p$ (kDa)	PDI
0.01	0.8	75	5.013	8(31)	3.6	3.3	1.4
0.05	4.1	77	8.3	13(51)	4.9	4.9	1.7
0.2	16.4	77	17.4	27(107)	8.6	21.7	2.0
0.5	41.0	84	29.8	47(188)	14.5	49.7	2.1

**Taula 3.28.** paràmetres del polisacàrids obtinguts per HPSEC

A la figura 3.29, es mostra com la relació entre la concentració d'enzim i la massa molecular mitjana del polímer es lineal. També la morfologia resulta dependent de la concentració enzimàtica, tal i com s'observa per SEM. A major concentració d'enzim la mida de les esferulites s'incrementa, i els elements laminars de les esferulites esdevenen més compactes. L'anàlisi de la distribució de la mida de partícula per DLS (*dynamic light scattering*) confirma la dependència entre mida de partícula i concentració enzimàtica (figura 3.30).



**Figura 3.29.** Dependència entre el valor  $M_N$  dels polímers i la concentració de glicosintasa E134S emprada per a la seva obtenció.



**Figura 3.30.** Determinació de la mida de les partícules esfèriques per DLS. Insert: relació entre la mida de partícula i la concentració enzimàtica.

A partir dels resultats anteriors s'extreuen dues conclusions:

D'una banda, s'observa que l'obtenció de graus de polimerització més elevats depèn de l'activitat de l'enzim. Així, amb el mutant E134S s'assoleixen polímers més llargs que amb el mutant original E134A en emprar quantitats d'enzim del mateix ordre (41  $\mu\text{m}$ ). Amb el mutant serina es recupera un  $\beta$ -glucà amb  $M_w = 14510$  que equival a 88 glucoses amb un  $DP = 22$ ; mentre que pel mutant alanina, i amb el tetrasacàrid com a substrat, es recuperen polímers de fins a  $M_w = 7479$ , el que equival a 45 unitats de glucosa i un  $DP = 11$ .

De l'altra, la dependència lineal entre  $M_w$  i la concentració d'enzim emprada permetria controlar la mida del material a obtenir modificant les quantitats d'enzim inicials. Aquest fet esdevé un primer punt en la voluntat d'establir un esquema controlable en la síntesi de nous  $\beta$ 1,3-1,4-glucans amb estructures definides, tant pel que fa a la mida dels nous polímers com a la seqüència d'enllaços  $\beta$ -1,3 i  $\beta$ -1,4.

Es demostra la capacitat de la glicosintasa E134A de *Bacillus licheniformis* de sintetitzar 1,3-1,4- $\beta$ -glucans artificials per polimerització dels donadors disacàrid (**Glc $\beta$ 3Glc $\alpha$ F**), trisacàrid (**Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 3Glc $\alpha$ F**) i tetrasacàrid (**Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 3Glc $\alpha$ F**). La reacció transcorre via autocondensació dels substrats donadors, originant polisacàrids constituïts per unitats repetitives dels seus corresponents monòmers units per enllaços  $\beta$ -1,4.

La morfologia del polisacàrid depèn de la unitat repetitiva que el forma; així per  $(\beta$ 4Glc $\beta$ 3Glc) $_n$  i  $(\beta$ 4Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 3Glc) $_n$  s'obtenen esferulites mentre que per  $(\beta$ 4Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 3Glc) $_n$  s'obté un precipitat amorf.

Amb el mutant glicosintasa més actiu E134S, s'observa una dependència lineal entre la concentració d'enzim i el  $M_w$  del polímer obtingut, de manera que el grau de polimerització (DP) pot ser controlable per l'activitat enzimàtica.

La presència de 1,3-1,4- $\beta$ -glucans es troba àmpliament distribuït en cereals i gramínies. Aquests  $\beta$ -glucans poden arribar a assolir graus de polimerització de 1200 unitats de glucosa amb una proporció d'enllaços  $\beta$ -1,3 no superior al 25 - 30%. Els polisacàrids obtinguts en aquest treball esdevenen nous  $\beta$ -glucans amb estructures homogènies amb una proporció d'enllaços  $\beta$ -1,3 més elevada respecte els  $\beta$ -glucans existents a la natura.

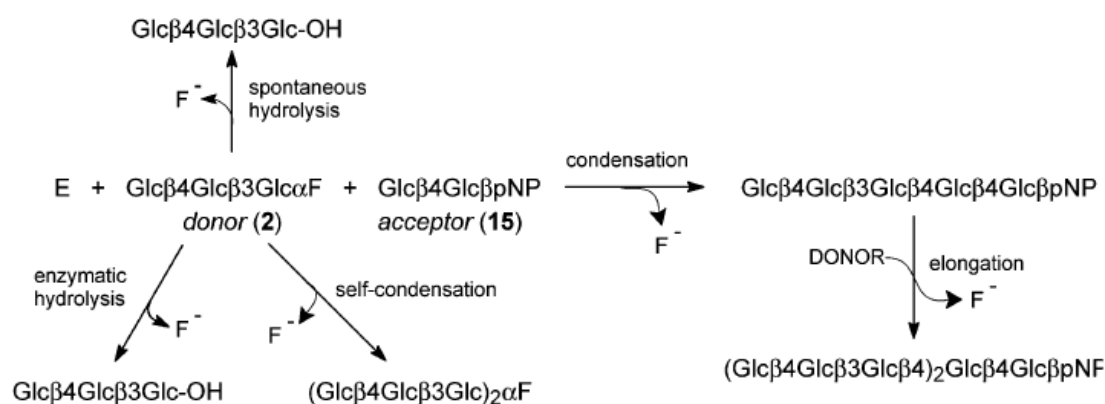


## Capítol 4: Disseny d'Inhibidors per al mutant E134A de la $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*

### INTRODUCCIÓ

#### 1. Context

Tal i com s'ha esmentat a la introducció, en la metodologia glicosintasa de la  $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* apareixen processos que es troben en competència amb la reacció condensació donador-acceptor. En l'estudi realitzat sobre la reacció entre el fluorur de 3-O-cel·lobiosil- $\alpha$ -D-glucopiranosil i el p-nitrofenil  $\beta$ -cel·lobiòsid (Faijes *et al.*, 2003, figura 4.1) es determinà la importància de les reaccions secundàries d'autocondensació i d'elongació, així com les reaccions d'hidròlisi del fluorur de glicosil.

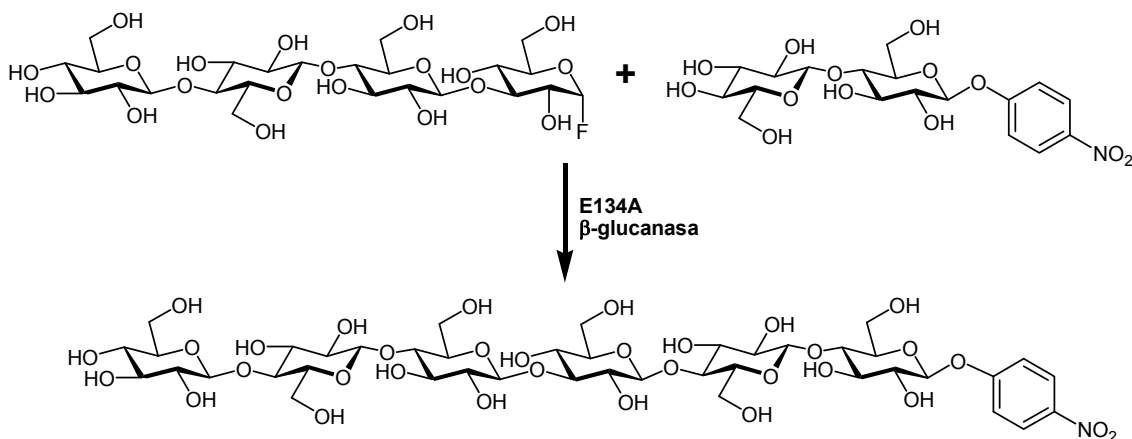


**Figura 4.1.** Processos en competència per a la reacció glicosintasa de la E134A de la  $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* entre el donador trisacàrid  $\text{Glc}\beta 4\text{Glc}\beta 3\text{Glc}\alpha\text{F}$  i l'acceptor p-nitrofenil  $\beta$ -D-cel·lobiòsid.

Els resultats indicaven que les reaccions d'autocondensació i elongació adquirien una notable importància respecte a la reacció de condensació quan no s'emprava un excés d'acceptor inicial; resulta, per tant, imprescindible el control d'aquestes reaccions per a un ús eficient de la metodologia glicosintasa i és per això que s'empren diferents estratègies en funció de quin sigui el procés d'interès (Faijes *et al.*, 2001; Fairweather *et al.*, 2002; Faijes *et al.*, 2003).

A més de les reaccions en competència indicades, és possible hi hagi inhibició per producte, ja que tant els productes de les reaccions de condensació com els de les reacció d'autocondensació, presenten l'estructura adient per a ocupar els subetis del centre actiu, de manera que fan possible la seva actuació com a inhibidor.

En aquest capítol es pretén caracteritzar cinèticament la inhibició per producte de la reacció glicosintasa de formació d'un hexasacàrid (figura 4.2) catalitzada pel mutant E134A de la  $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*, amb la finalitat d'ampliar la informació sobre el mecanisme amb què actua l'enzim.



**Figura 4.2.** Reacció glicosintasa de formació de l'hexasacàrid que es pren com a model per a l'estudi d'inhibició.

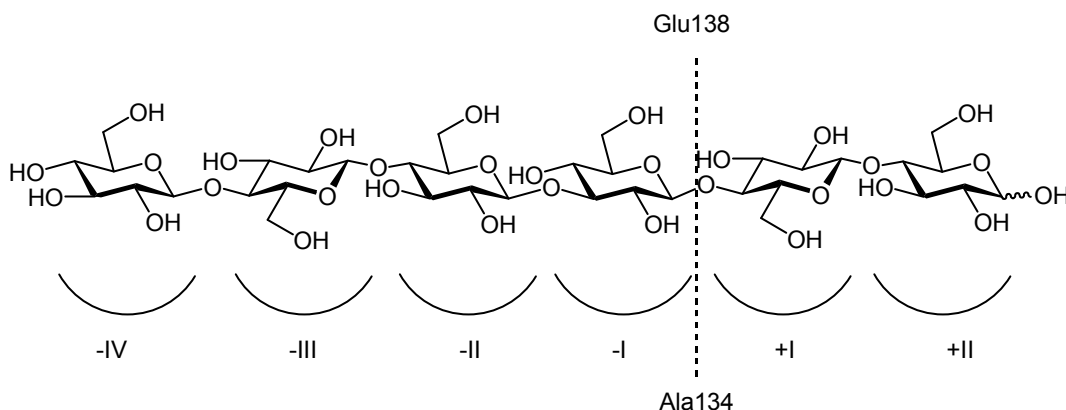
Els objectius concrets del present capítol són:

- El disseny d'un substrat inhibidor
- L'obtenció del substrat inhibidor mitjançant un esquema sintètic quimio-enzimàtic
- L'estudi de la inhibició competitiva en la reacció glicosintasa

## RESULTATS I DISCUSSIÓ

### 2. Estudi de l'inhibició per producte

La glicosintasa E134A de la  $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* presenta un centre actiu constituït per 6 subsetis, quatre per l'extrem no reductor (-VI a -I) i dos per l'extrem reductor (+I a +II), essent els subsetis -I i -II estrictament específics per a l'estructura de laminaribiosa Glc $\beta$ 3Glc. Per tant, en termes d'inhibició per producte el millor inhibidor correspondria a l'hexasacàrid que es mostra a la figura 4.3, on tots els subsetis del centre actiu restarien ocupats.



**Figura 4.3.** Centre actiu de la  $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*, constituït per 6 subsetis.

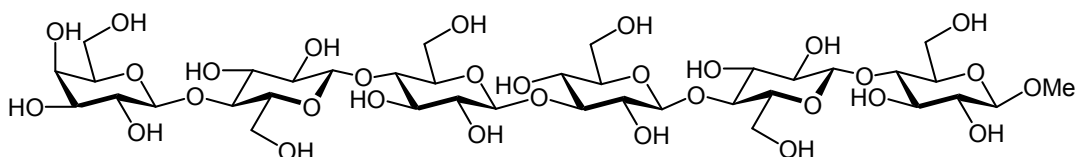


Aquest hexasacàrid es pot obtenir a partir de la reacció glicosintasa entre el donador tetrasacàrid Glc4Glc4Glc3GlcF i la cel·lobiosa. Malgrat tot, aquest hexasacàrid no és adient per tal d'avaluar la inhibició per producte corresponent a la reacció glicosintasa del mutant E134A:

-D'una banda, pot participar en els processos d'autocondensació i elongació que estan en competència (figura 4.1), de manera que influiria de forma important en el grau de conversió de la reacció.

-De l'altra, és preferible tenir bloquejat l'hidroxil de l'extrem reductor, per exemple amb un grup O-metil.

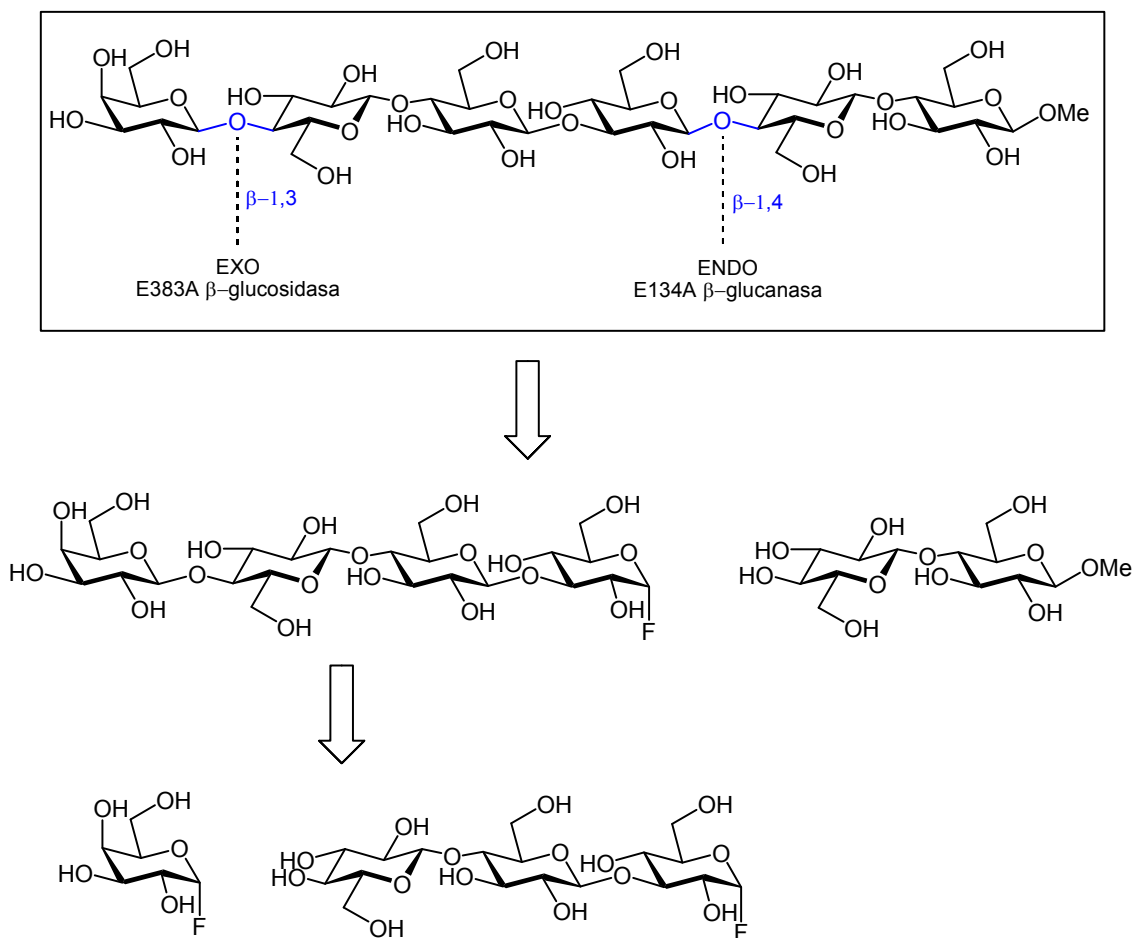
Per tal de solucionar el primer punt es planteja l'ús de l'estratègia *capped donor* (Fairwaither *et al.*, 2002), que preveu la utilització d'un producte amb la configuració de l'hidroxil reactiu de l'extrem no reductor oposada a la necessària per a que pugui actuar d'acceptor; això es tradueix en l'ús d'un inhibidor que presentaria una unitat de galactosa a l'extrem no reductor i que per tant no podria autocondensar o elongar com a acceptor (figura 4.4).



**Figura 4.4.** Producte amb la configuració de l'hidroxil reactiu de l'extrem no reductor oposada a l'adient per a actuar d'acceptor en una reacció catalitzada per la glicosintasa E134A de la  $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* (Gal $\beta$ 4Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 3Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ OMe).

## 2.1. Disseny de la síntesi de l'inhibidor

La molècula objectiu ja ha estat prèviament sintetitzada mitjançant síntesi en tàndem amb addició seqüencial de dues endo-glicosintases, l'E134A de la  $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* i la E197A de la Cel7B d'*Humicola insolens* (Faijes *et al.*, 2001) on s'assoliren rendiments del 80%. En aquest treball es proposa una altra via de síntesi segons es descriu a la figura 4.5:



**Figura 4.5.** Esquema sintètic tipus tàndem per a l'obtenció de l'inhibidor hexasacàrid.

La primera reacció a realitzar correspon a la transglicosidació amb el mutant E383A de la  $\beta$ -glucosidasa d'*Streptomyces* sp, emprant com a donador el fluorur d' $\alpha$ -galactosil i l'acceptor fluorur de  $\beta$ -D-glucopiranosil-(1,4)- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1,3)- $\alpha$ -D-glucopiranosid. El producte d'aquesta primera reacció actuarà d'acceptor en la segona reacció enzimàtica. D'aquesta manera, els *building blocks* a sintetitzar són el fluorur d' $\alpha$ -galactosil, el trisacàrid Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 3Glc $\alpha$ F i el disacàrid O-metil- $\beta$ -cel·lobiosid.

La metodologia a seguir serà la de tàndem sequencial, de manera que inicialment es realitza la transglicosidació catalitzada pel mutant E383A de la  $\beta$ -glucosidasa rendint el tetrasàcarid que servirà com a donador de la següent reacció. Seguidament s'addiciona el mutant E134A de la  $\beta$ -glucanasa juntament amb l'acceptor disacàrid per aquesta segona reacció.

També es contempen les possibles reaccions secundàries no desitjades que poden ocórrer en la metodologia tàndem, això és, la condensació entre el fluorur de galactosil i l'acceptor disacàrid de la segona reacció per part de la glicosintasa de la  $\beta$ -glucosidasa o la condensació entre l'acceptor trisacàrid de la primera reacció amb l'acceptor de la segona formant-se el pentasacàrid corresponent.

Per tal de reduir aquestes reaccions secundàries, es planteja la utilització de la metodologia d'immobilització de la glicosintasa E383A, desenvolupada en aquest mateix treball (capítol 5, Fajjes *et al.*, 2006). D'aquesta manera la primera glicosintasa pot eliminar-se del medi de

reacció una vegada s'ha donat lloc la reacció, alhora que permet la utilització d'un excés de monosacàrid en la primera reacció per tal de minimitzar l'acceptor 1 no reaccionat. Amb tot, l'esquema final plantejat es descriu a la figura 4.6.

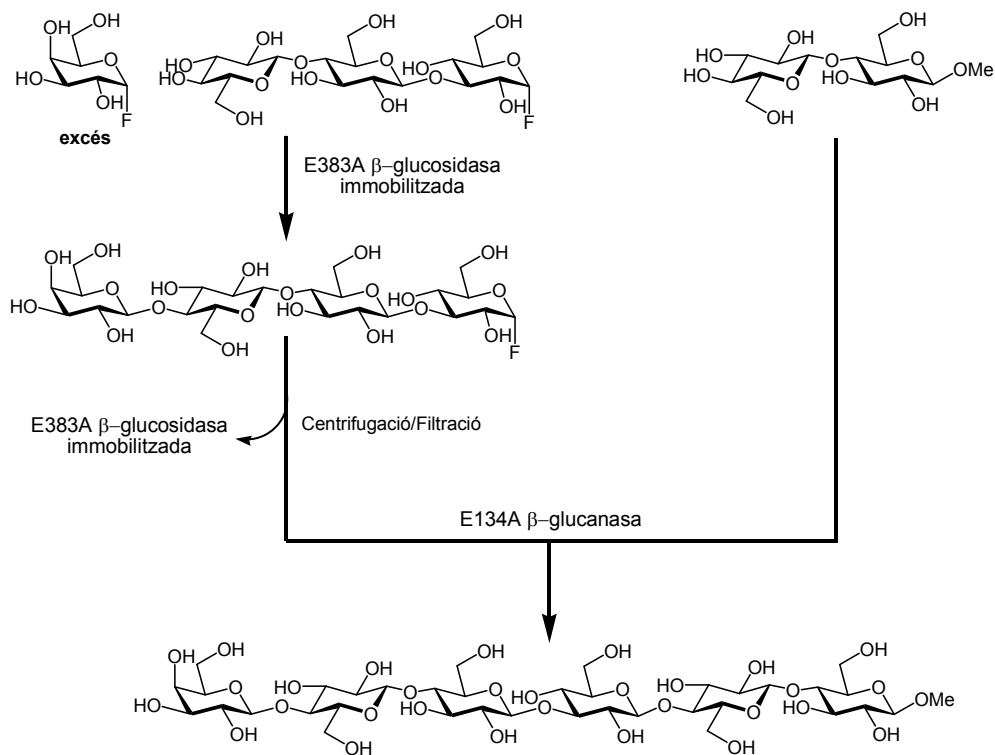


Figura.4.6. Esquema sintètic per a l'obtenció de l'inhibidor hexasacàrid.

## 2.2. Intent d'obtenció de l'inhibidor

De forma preliminar a la realització del tàndem seqüencial, es comprova el funcionament de la reacció de condensació entre el fluorur d' $\alpha$ -galactosil i l'acceptor trisacàrid (figura 4.7). Per confirmar que l'enllaç format en la primera reacció del tàndem proposat correspon a  $\beta$ -1,4, es realitza una condensació a nivell semipreparatiu, i es caracteritza per espectroscòpica el producte format.

La reacció s'atura a les 24 hores i el cru es purifica per cromatografia LOBAR<sup>®</sup>, prèvia acetilació, recuperant-se una fracció que conté el tetrasacàrid d'interès amb un rendiment del 20%.

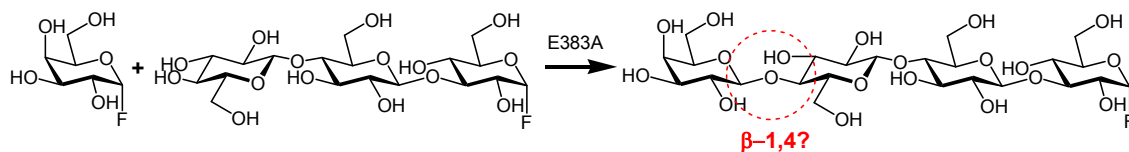
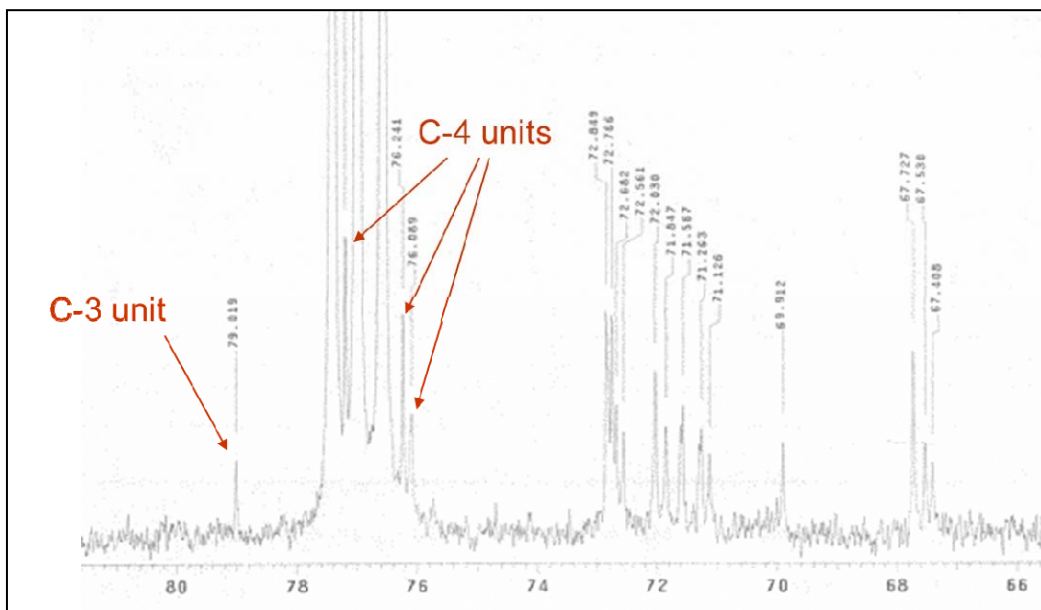


Figura 4.7. Primera reacció del tàndem seqüencial catalitzada per la glicosintasa E383A de la  $\beta$ -glucosidasa d'*Streptomyces* sp.

L'anàlisi per  $^{13}\text{C}$ -RMN mostra un senyal a 79.02 ppm corresponent al C3<sup>I</sup> unit per enllaç glicosídic (figura 4.8). A l'interval de desplaçaments de 76 – 77 ppm, on apareixen els senyals corresponents a C-4 units, s'observen tres senyals (77.21, 77.24 i 76.1 ppm) indicant que, a més del producte esperat, a la fracció hi ha present un altre producte. Amb tot, en aparèixer només un senyal corresponent a C-3 unit, sí que es pot concloure que el nou enllaç format enzimàticament és  $\beta$ -1,4. Aquest fet fa que es continuï endavant amb el protocol sintètic en tàndem, malgrat el rendiment baix d'aquesta assaig previ i les dificultats observades en l'aïllament del producte.



**Figura 4.8.**  $^{13}\text{C}$ -RMN del producte purificat per cromatografia LOBAR i obtingut en l'assaig previ.

Es realitzen tres intents d'obtenció de l'inhibidor, emprant en tots ells el mutant E383A de la  $\beta$ -glucosidasa immobilitzat i treballant amb una relació entre el Gal $\alpha$ F i el Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 3Glc $\alpha$ F de 2:1 en la primera reacció (per tal d'assegurar el consum complet de l'acceptor en la primera reacció). Com la primera glicosintasa (E383A  $\beta$ -glucosidasa) s'elimina del medi de reacció en finalitzar la primera condensació, l'excés de Gal $\alpha$ F no formarà productes secundaris ja que no és substrat per la segona glicosintasa, el mutant E134A de la  $\beta$ -glucanasa.

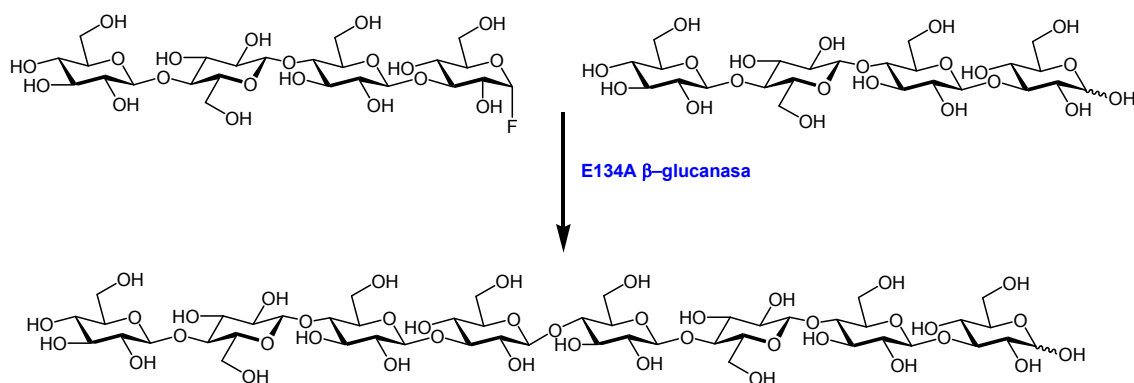
Totes les reaccions se segueixen per CCF. En tots els casos, la primera reacció del tàndem s'atura en observar-se consum total del trisacàrid acceptor, malgrat que en cap cas s'observa una formació nítida del tetrasacàrid objectiu.

Amb els resultats anteriors no es pot concloure la formació de l'hexasacàrid Gal $\beta$ 4Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 3Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ OMe objectiu. En aquest punt s'abandona aquesta via per a l'obtenció del substrat inhibidor hexasacàrid i es proposa una nova metodologia per tal de mesurar l'activitat glicosintasa del mutant E134A de la  $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb un substrat competitiu.

**3. Anàlisi de l'activitat glicosintasa de la  $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* amb substrats competitiu.**

Donat els resultats negatius per a l'obtenció de l'hexasacàrid inhibidor, es planteja un estudi d'inhibició alternatiu emprant l'octasacàrid  $(\beta 4\text{Glc}\beta 4\text{Glc}\beta 3\text{Glc})_2$  com a substrat competitiu en la reacció entre el donador  $\text{Glc}\beta 4\text{Glc}\beta 3\text{Glc}\alpha\text{F}$  i l'acceptor  $\text{Glc}\beta 4\text{Glc}\beta\text{NP}$ .

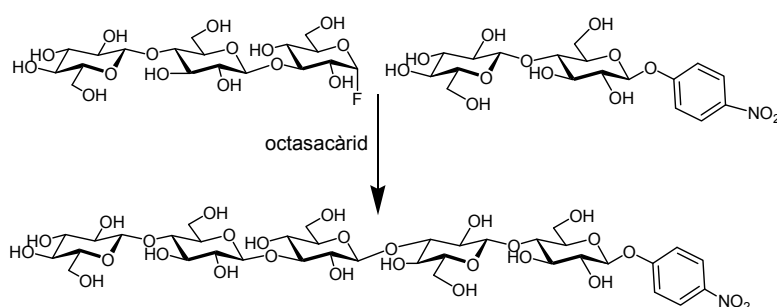
Aquest substrat s'obté a partir d'una reacció glicosintasa entre dos substrats tetrasacàrids emprant el mutant E134A de la  $\beta$ -glucanasa (figura 4.9). L'addició del donador es realitza de forma progressiva per tal de minimitzar la reacció d'autocondensació. La reacció transcorre durant 22 hores en tampó fosfat a pH 7.2, 35°C i agitació orbital.



**Figura 4.9.** Reacció enzimàtica entre el donador tetrasacàrid  $\text{Glc}\beta 4\text{Glc}\beta 4\text{Glc}\beta 3\text{Glc}\alpha\text{F}$  i l'acceptor  $\text{Glc}\beta 4\text{Glc}\beta 4\text{Glc}\beta 3\text{Glc}$ , catalitzada pel mutant E134A de la  $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*, per a l'obtenció del substrat competitiu octasacàrid.

L'aïllament de producte es realitza per cromatografia de fase normal obtenint-se 25 mg (12% de rendiment) d'octasacàrid que s'empren en la realització de l'estudi d'inhibició competitiva.

La determinació de la constant d'inhibició per a la reacció model de condensació entre el donador  $\text{Glc}\beta 4\text{Glc}\beta 3\text{Glc}\alpha\text{F}$  i l'acceptor  $\text{Glc}\beta 4\text{Glc}\beta\text{NP}$  catalitzada pel mutant E134A de la  $\beta$ -glucanasa (figura 4.10), es realitza a partir de l'anàlisi de Dixon emprant l'inhibidor competitiu octasacàrid.



**Figura 4.10.** Reacció glicosintasa entre el donador  $\text{Glc}\beta 4\text{Glc}\beta 3\text{Glc}\alpha\text{F}$  i l'acceptor  $\text{Glc}\beta 4\text{Glc}\beta\text{NP}$  amb la presència del substrat competitiu octasacàrid.

Les cinètiques es realitzen a tres nivells de substrat donador, variant la concentració d'inhibidor octasacàrid. A la taula 4.11. es mostra la velocitat inicials de formació del pentasacàrid  $(\text{Glc}\beta 4\text{Glc}\beta 3\text{Glc}\beta 4\text{Glc}\beta 4\text{Glc}\beta\text{NP})$  per a cada cinètica.

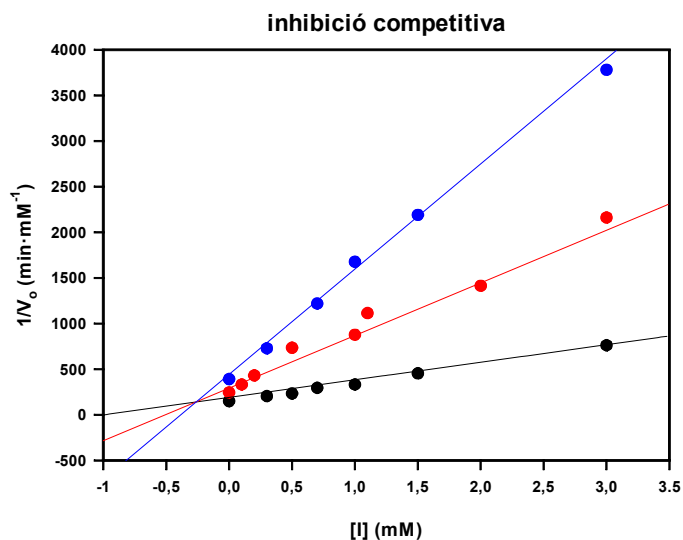
[Donador] (mM)	[Inhibidor] (mM)	$V_0$ (mM·min <sup>-1</sup> )·10 <sup>4</sup>
0,25	0	25.5
	0,3	13.7
	0,7	8.19
	1	5.96
	1,5	4.56
	3	2.64
0,5	0	40.7
	0,1	30.0
	0,2	23.1
	0,5	13.6
	1	11.4
	1,1	9.00
	2	7.06
	3	4.62
1,5	0	66.1
	0,3	48.6
	0,5	42.6
	0,7	33.7
	1	30.0
	1,5	21.9
	3	13.1

**Taula 4.11.** Velocitat inicial de formació de pentasacàrid per a cada cinètica realitzada. Condicions de reacció: tampó fosfat 50 mM, pH 7, 35°C, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>; [Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 3Glc $\alpha$ F] = 0.25, 0.5, 1.5 mM; [Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP] = 5 mM; [I] = 0 – 3 mM; [E134A] = 0.5  $\mu$ M. Seguiment per HPLC: columna Novapak 4  $\mu$ m (Waters); fase mòbil MeOH 13-14%; 1 ml·min<sup>-1</sup>, detecció per absorbància a l'UV ( $\lambda$  = 301 nm).

El càlcul de la  $K_i$  es determina per regressió lineal de les dades experimentals del model d'inhibició competitiva linealitzat com (Dixon Plot):

$$\frac{1}{V_0} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{K_M}{K_I \cdot V_{\max}} \cdot \frac{[I]}{[S]}$$

Es representa l'invers de la velocitat inicial en funció de la concentració d'inhibidor emprada i s'obtenen les següents rectes (figura 4.12):



**Figura 4.12.** Regressió multilinear de les equacions de Dixon corresponents a cada concentració de donador (●: [Donador] = 0.25 mM; ●: [Donador] = 0.5 mM; ●: [Donador] = 1.5 mM).

Tal i com és esperable en un model d'inhibició competitiva, la intercepció de les rectes en el diagrama de Dixon es troba al quadrant d'abscisses negatives. A partir de la regressió anterior s'obtenen els següents paràmetres cinètics:

	Coefficients	Error
$1/V_{\max}$ (min·mM <sup>-1</sup> )	142	34
$K_M/V_{\max}$ (mM <sup>2</sup> ·min <sup>-1</sup> )	75.7	16
$K_M/(K_I \cdot V_{\max})$ (min·mM <sup>-1</sup> )	288	7.3

A partir dels quals es determinen les constants cinètiques per a la reacció estudiada:

$$k_{cat} = 0.23 \pm 0.97 \text{ s}^{-1}$$

$$K_M = 0.53 \pm 0.24 \text{ mM}$$

$$K_I = 0.26 \pm 0.06 \text{ mM}$$

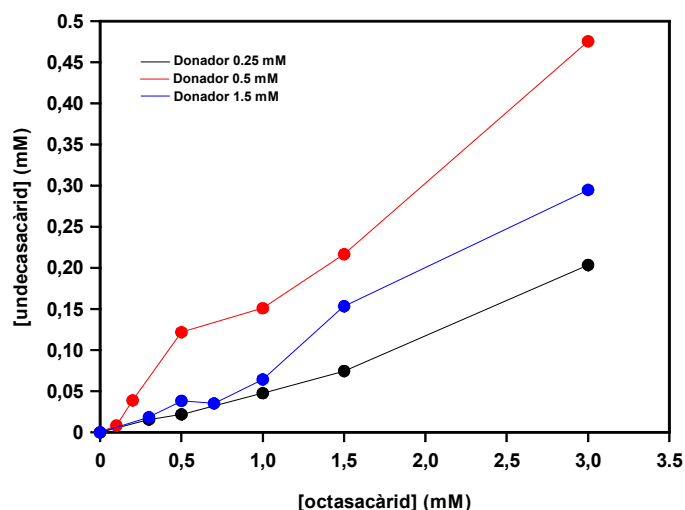
El valor de  $K_M$  per a la reacció d'estudi és del mateix ordre que la obtinguda en absència de substrat competitiu ( $K_M$  0.68 mM) mentre que la constant d'inhibició resulta ser la meitat ( $K_I$  0.26 mM), indicant un efecte important en la inhibició de la reacció de condensació.

Aquest octasacàrid avaluat com inhibidor correspon al primer producte d'autocondensació en la reacció de polimerització del tetrasacàrid Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 3Glc $\alpha$ F. Per aquest motiu, és important determinar en quin grau aquest substrat ha actuat com a acceptor en les cinètiques d'inhibició anteriors.

A partir de crús de reacció de les cinètiques d'inhibició congelats després de la primera hora d'incubació, es pot determinar el consum d'inhibidor octasacàrid com a acceptor. Les mostres

s'analitzen per HPCE seguint el procediment establert amb anterioritat al laboratori (Monegal *et al.*, 2005).

Es monitoritza formació d'undecasacàrid, que correspon al producte de la reacció entre el donador Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 3Glc $\alpha$ F i l'inhibidor octasacàrid (figura 4.13).



**Figura 4.13.** Formació d'undecasacàrid en funció de la concentració inicial de substrat competitiu octasacàrid a diferents concentracions de donador trisacàrid (●: [Donador] = 0.25 mM; ●: [Donador] = 0.5 mM; ●: [Donador] = 1.5 mM) i 5 mM d'acceptor disacàridic Glc $\beta$ 4Glc $\alpha$ NP. Totes les cinètiques corresponen a 1 hora de reacció.

En condicions equimolars donador – inhibidor a 0.25 mM, la formació d'undecasàrid representa el 10% del consum del donador. En incrementar la concentració a 0.5 mM, el consum s'apuja fins a un 25% per després tornar a descendir fins al 10% en emprar 1.5 mM de donador, segurament degut a què el procés d'autocondensació del trisacàrid donador comença a esdevenir important a partir d'aquesta concentració.

En resum, es dissenya un esquema sintètic en tàndem seqüencial de dues glicosintases per a l'obtenció d'un inhibidor hexasacàrid per al mutant E134A de la  $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*. Els intents per a l'obtenció del tetrasacàrid Gal $\beta$ 4Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 3Glc $\alpha$ F en la primera etapa del tàndem amb la glicosintasa E383A de la  $\beta$ -glucosidasa d'*Streptomyces* sp. no són satisfactoris.

Se sintetitza de forma enzimàtica l'octasacàrid ( $\beta$ 4Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 3Glc) $_2$  i s'empra en l'estudi d'inhibició competitiva per a la reacció glicosintasa de la  $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*. S'obté una  $K_i$  de 0.26 mM, del mateix ordre que la  $K_M$  del substrat trisacàrid Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 3Glc $\alpha$ F, indicant que l'efecte d'inhibició per producte pot resultar molt important a nivell de velocitat inicial en les reaccions de polimerització.

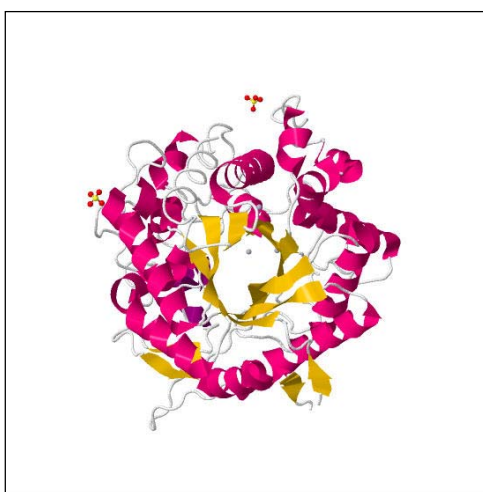


## Capítol 5. Estudi de l'especificitat per substrat i de la immobilització del mutant E383A de la $\beta$ -glucosidasa d'*Streptomyces* sp.

### INTRODUCCIÓ

#### 1. $\beta$ -glucosidasa d'*Streptomyces* sp.

La  $\beta$ -glucosidasa d'*Streptomyces* sp. (Bgl3; EC 3.2.1.21) és una exo-glicosidasa de la família 1 que actua amb retenció de configuració alliberant unitats de glucosa de l'extrem no reductor de diversos  $\beta$ -oligosacàrids. La clonació, caracterització i cristal·lització d'aquest enzim fou realitzada a l'Institut de Biotecnologia i Biomedicina a l'UAB (Pérez-Pons et al., 1994a i b, Pérez-Pons et al., 1995a i b, Guash et al., 1999; figura 5.1).



**Figura 5.1.**  $\beta$ -glucosidasa d'*Streptomyces* sp. (pdb 1GON).

Presenta una elevada activitat hidrolítica sobre glucosil i fucosil glicòsids, i en menor grau, sobre galactosil i xilosil glicòsids. A la taula 5.2 es mostra la reactivitat front a diferents oligosacàrids de glucopiranososa.

Polisacàrid	enllaç	Reactivitat
cel·lobiosa	$\beta$ -1,4	1
cel·lotriosa	$\beta$ -1,4	1.1
cel·lotetraosa	$\beta$ -1,4	1.28
Soforosa	$\beta$ -1,2	1.07
laminaribiosa	$\beta$ -1,3	0.74
Gentibiosa	$\beta$ -1,6	-
Sacarosa	$\alpha$ -1,2	-
Maltosa	$\alpha$ -1,4	-

**Taula 5.2.** Activitats hidrolítiques de la  $\beta$ -glucosidasa d'*Streptomyces* sp. sobre diferents polisacàrids en relació a l'activitat que presenta front de la cel·lobiosa.

S'ha estudiat la seva activitat transglicosidasa sota condicions de control cinètic i emprant el 4-nitrofenil  $\beta$ -D-galactòsid com a donador activat i la D-xilosa com a acceptor, obtenint-se els corresponents disacàrids amb una regioselectivitat relaxada:  $\beta$ -1,3 (40%),  $\beta$ -1,2 (26%) i  $\beta$ -1,4 (4%) (Montero et al., 1998).

A partir de l'arregliment de seqüència i experiments de mutagènesi dirigida, s'identificaren els dos residus catalítics essencials, el E383 i el E178. El mutant E178A presentava una activitat 3500 vegades inferior a la de l'enzim wt, mentre que la mutació E383A representava una disminució d'activitat de  $10^6$  vegades. El rescat químic dels mutants inactius, amb azida de sodi com a nucleòfil exogen, va permetre l'assignació del residu E178 com a àcid-base general i el E383 com a residu nucleòfil (Vallmitjana et al., 2001).

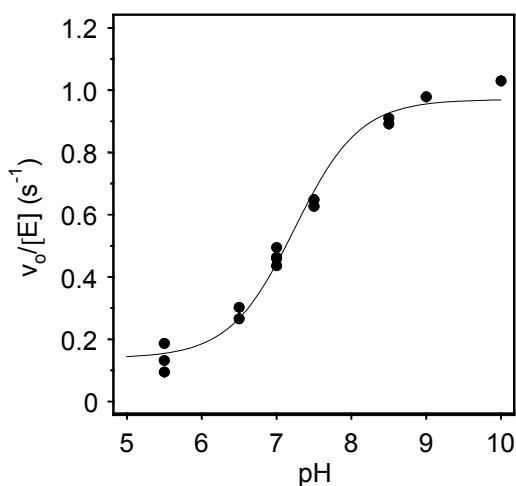
L'any 1999 es determinà l'estructura tridimensional de la forma nativa així com de complexes amb anàlegs de substrats no hidrolitzables (Guasch et al., 1999). S'observà la presència d'un centre actiu tipus butxaca, amb tres subsetis, un per l'extrem no reductor (-I) i dos per l'extrem reductor (+I i +II) a partir de l'enllaç a escindir.

### 1.1. Mutant E383A de la $\beta$ -glucosidasa d'*Streptomyces* sp.

Atesa la seva promiscuïtat per substrat, la  $\beta$ -glucosidasa representava un candidat interessant per a aplicar la metodologia glicosintasa per mutació del seu residu nucleòfil per alanina.

D'aquesta manera, el mutant E383A de la  $\beta$ -glucosidasa d'*Streptomyces* sp. donà lloc a una exoglicosintasa emprada inicialment en la condensació del fluorur d' $\alpha$ -glucosil i el *p*-nitrofenil  $\beta$ -D-glucòsid per a obtenir un disacàrid per formació d'un enllaç  $\beta$ -1,3 amb rendiment quantitatiu. Aquesta reacció es va prendre com a model per a establir les condicions òptimes i realitzar així un estudi d'especificitat per aquest mutant (Faijes et al., 2006).

El perfil de pH del mutant glicosintasa per a la reacció anterior, es realitzà emprant les concentracions de 0.9 mM pel donador i 5 mM per l'acceptor, en tampó fosfat 50mM, 35°C i força iònica constant ( $I = 0.15$  M) per un marge de pH comprès entre 5.5 i 10 (figura 5.3).



**Figura 5.3.** Perfil de pH del mutant E383A de la  $\beta$ -glucosidasa d'*Streptomyces* sp. per a la condensació de Glc $\alpha$ F (0.9 mM) i Glc $\beta$ NP (5.0 mM), en tampó fosfat 50 mM, força iònica constant ( $I = 0.15$  M) i 35°C.

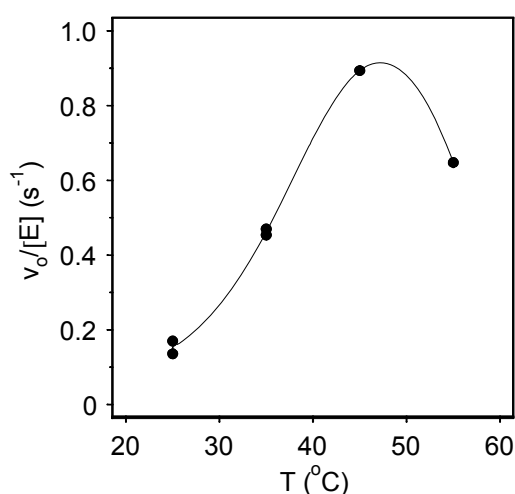
El perfil de pH mostrava un comportament corresponent a un mecanisme per catàlisi bàsica general, amb una activitat residual a pH 5.5 i una activitat màxima per pH > 8. Les dades

## CAPÍTOL 5. ESTUDI DE L'ESPECIFICITAT PER SUBSTRAT I DE LA IMMOBILITZACIÓ DEL MUTANT E383A DE LA $\beta$ -GLUCOSIDASA D'*Streptomyces* sp.

d'activitat front a pH s'ajustaren a l'equació 5.1, a partir de la qual s'obtingué un  $pK_a$  cinètic aparent de 7.24, assignable a la ionització del residu Glu178 que actua com a base general en el mecanisme glicosintasa.

$$\frac{v}{[E]} = A_{\text{res}} + \frac{B_{\text{max}}}{1 + 10^{(pK_a - pH)}} \quad (\text{Equació 5.1})$$

El perfil de temperatura es portà a terme en tampó fosfat 50 mM a pH 7 entre 25°C i 55°C (figura 5.4.), observant-se que l'enzim assoleix la màxima activitat a 45°C. Donada la naturalesa dels donadors emprats es fixà en 35°C la temperatura de treball per tal de minimitzar el fenomen d'hidròlisi espontània dels fluorurs de glicosil en relació a l'activitat glicosintasa.



**Figura 5.4.** Perfil de temperatura mutant E383A de la  $\beta$ -glucosidasa d'*Streptomyces* sp. per a la condensació de Glc $\alpha$ F (0.9 mM) i Glc $\beta$ NP (5.0 mM), en tampó fosfat 50 mM, força iònica constant (I = 0.15 M) i 35°C.

Pel que fa a l'estudi d'especificitat, s'assajaren els donadors fluorur d' $\alpha$ -glucosil, fluorur d' $\alpha$ -galactosil i fluorur d' $\alpha$ -xilosil i diferents acceptors mono i disacàrids (taula 5.5)

**CAPÍTOL 5. ESTUDI DE L'ESPECIFICITAT PER SUBSTRAT I DE LA IMMOBILITZACIÓ DEL MUTANT E383A DE LA  $\beta$ -GLUCOSIDASA D'*Streptomyces* sp.**

Donador		fluorur d' $\alpha$ -glucosil			fluorur d' $\alpha$ -galactosil		
Acceptor		Enllaç format (% rendiment) <sup>1</sup>	$v/[E] \cdot 10^2$ (s <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	Reactivitat (%) <sup>3</sup>	Enllaç format (% rendiment) <sup>1</sup>	$v/[E] \cdot 10^2$ (s <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	Reactivitat (%) <sup>3</sup>
1		$\beta$ -1,3 (96)	46.14	100	$\beta$ -1,3 (77)	9.44	100
2		$\beta$ -1,3 (100)	1.80	3.9	$\beta$ -1,3 (14)	0.017	0.2
3		$\beta$ -1,3 (54) $\beta$ -1,4 (28)	0.28	0.6	$\beta$ -1,3 (25) $\beta$ -1,4 (12)	0.034	0.3
4		$\beta$ -1,3 (53)	0.45	1	$\beta$ -1,3 (47)	0.38	4.0
5		$\beta$ -1,3 (30)	0.02	0.04	n.r.	---	---
6		n.r.	--	--	n.r.	---	---
7		$\beta$ -1,4 (80)	0.70	1.5			
8		$\beta$ -1,4	9.72	21			

**Taula 5.5.** Reaccions preparatives entre el fluorur d' $\alpha$ -glucosil i el fluorur d' $\alpha$ -galactosil diferents acceptors catalitzades pel mutant E383A de la  $\beta$ -glucosidasa d'*Streptomyces* sp. <sup>1</sup>Reacció preparativa: tampó fosfat pH 7.0 a 35°C, relació molar donador:acceptor 1:5, [E383A] = 2 – 28 $\mu$ M. Rendiments de producte aïllat després de purificar. <sup>2</sup>Velocitats inicials de formació de producte (seguiment per HPLC). Condicions: tampó fosfat pH 7.0 a 35°C, [Glc $\alpha$ F] = 0.9 mM, [acceptor] = 5 mM. <sup>3</sup>Reactivitat expressada com a percentatge de la velocitat inicial relativa a la de l'acceptor Glc $\beta$ NP. n.r.: no reacciona.

Tal i com s'observa a la taula anterior, els fluorurs d' $\alpha$ -glucosil i  $\alpha$ -galactosil són bons donadors, al contrari que el fluorur d' $\alpha$ -xilosil amb el qual no s'observa activitat glicosintasa amb cap dels acceptors assajats. D'aquesta manera, l'absència del grup hidroximetil en C5 presenta un efecte dramàtic en l'activitat enzimàtica. Estudis realitzats en aquest enzim i altres  $\beta$ -glicosidases de la família 1 han mostrat energies de desestabilització de l'estat de transició d'entre 15 – 19 kJ·mol<sup>-1</sup> per al subseti -I amb substrats sense hidroxils en C-6 respecte dels substrats que sí en presenten (Vallmitjana et al., 2001).

Les reactivitats relatives presentades a les taules anteriors, van ser avaluades a partir de les velocitats inicials de condensació. S'observa com el donador glucosídic reacciona 5 vegades més ràpid que el respectiu donador galactosil amb l'acceptor *p*-nitrofenil  $\beta$ -D-glucòsid, resultats que es troben en concordança amb les cinètiques realitzades amb l'enzim wt (Pérez-Pons et al., 1994). Pels acceptors, la seqüència de reactivitats és Glc>Gal $\approx$ Xyl $\approx$ Man>>Fuc. Amb aquests

acceptors monosacàrids, la glicosintasa E383A rendeix disacàrids units per enllaços  $\beta$ -1,3, excepte pel cas de l'acceptor xilòsid on s'obtenen dos regioisòmers  $\beta$ -1,3 i  $\beta$ -1,4. Pel que fa als acceptors disacàrids, el cel·lobiòsid resulta millor substrat que el laminaribiòsid, si bé, ambdós presenten una activitat inferior a la de l'acceptor glucosídic, possiblement pel fet que poden unir-se al subseti -I, competint així amb el donador. L'enllaç format és  $\beta$ -1,4, fet que palesa la importància de les interaccions enzim-ligand en el subseti +II per a posicionar l'acceptor.

Amb tot, la reactivitat d'aquest enzim mostra que es tracta d'una glicosintasa interessant per tal d'obtenir unitats disacàridiques amb enllaços  $\beta$ -1,3 a partir de diferents monòmers, amb aplicacions posteriors com a *building blocks* en esquemes sintètics més complexos. Una segona aplicació, comú per les exo-glicosintases, podria explotar la capacitat d'aquest enzim per perllongar cadenes sacarídiques en reaccions d'elongació.

Per tal d'explorar aquesta potencialitat del mutant E383A de la  $\beta$ -glucosidasa d'*Streptomyces* sp. per formar oligosacàrids d'interès com a baules sintètiques, es parteix de l'estudi d'especificitat per acceptor prèviament realitzat al laboratori de Bioquímica de l'IQS (Faijes et al., 2006), i s'amplia per a acceptors di i trisacàridics emprant els fluorurs d' $\alpha$ -glucosil i galactosil com a donadors (taula 5.6).

Donador	Accepter	Antecedents
Glc $\alpha$ F	Glc $\beta$ pNP	Faijes et al., 2006
	Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP	Faijes et al., 2006
	Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 3Glc $\beta$ pNP	no estudiat
Gal $\alpha$ F	Glc $\beta$ pNP	Faijes et al., 2006
	Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP	no estudiat
	Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 3Glc $\beta$ pNP	no estudiat

**Taula 5.6.** Combinacions donador-acceptor estudiades en el present treball.

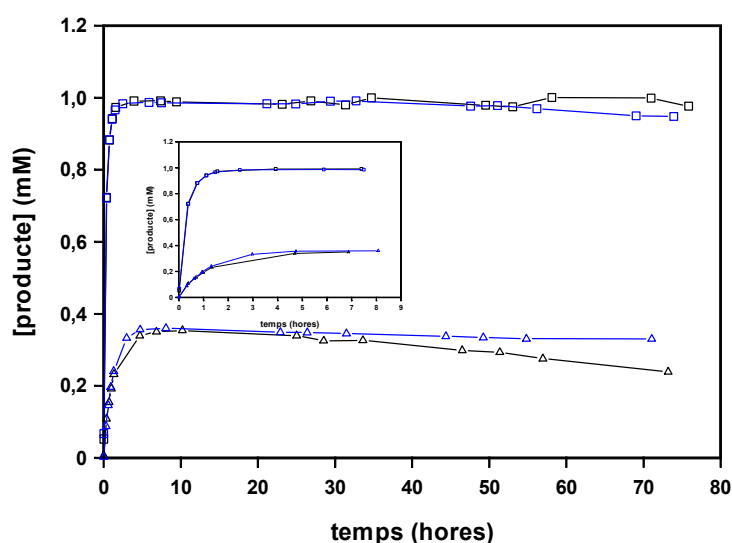
## RESULTATS I DISCUSSIÓ

### 2. Activitat glicosintasa amb acceptors disacàrids

Les cinètiques de condensació catalitzades pel mutant E383A de la  $\beta$ -glucosidasa es realitzen tant a pH 7, establert com a pH de treball pels estudis anteriors (Faijes et al., 2006), com a pH 8.5 on l'enzim presenta màxima activitat; d'aquesta manera es pretén augmentar la velocitat de formació del producte glicosintasa per tal de disminuir la formació de productes secundaris. Se segueixen durant 70 hores, prenent alíquotes del cru de reacció a intervals regulars de temps, diluint-les i analitzant-les per HPLC (columna C18 Nova-Pak 4  $\mu$ m, Waters); detecció per absorbància a UV  $\lambda = 301$ ). Els productes s'identifiquen per coinjecció de patrons prèviament caracteritzats per RMN.

## 2.1. Reacció glicosintasa amb l'acceptor Glc $\beta$ pNP

Abans d'iniciar l'estudi, es realitzen condensacions amb l'acceptor monosacàrid *p*-nitrofenil  $\beta$ -D-glucòsid en les mateixes condicions de treball que s'empraran per l'acceptor disacàrid. Els resultats mostren la formació d'un únic producte de condensació, per ambdós donadors (figura 5.7). Pel fluorur d' $\alpha$ -glucosil s'assoleixen rendiments quantitatius per a la formació de *p*-nitrofenil  $\beta$ -D-laminaribiosid (Glc $\beta$ 3Glc $\beta$ pNP) tant a pH 7 com a pH 8.5, completant-se la reacció a les 30 hores del seu inici. En els seguiments de reacció utilitzant el fluorur d' $\alpha$ -galactosil s'observa la formació d'un únic producte, identificat com a Gal $\beta$ 3Glc $\beta$ pNP. Els rendiments són del 35% per ambdós pHs, tot i que s'observa una lleugera disminució de la concentració de producte amb el temps per a la reacció a pH 7.



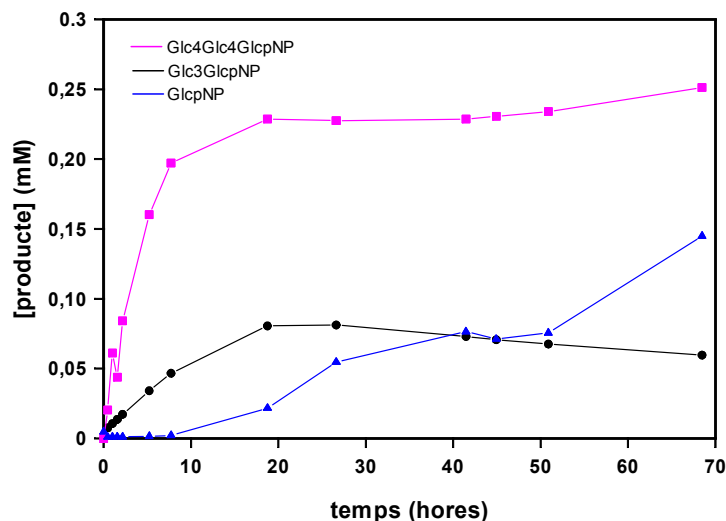
**Figura 5.7.** Corbes de progrés per a les reaccions amb l'acceptor monosacàridic Glc $\beta$ pNP. Condicions de reacció: [donador] = 1mM, [Glc $\beta$ pNP] = 5 mM, tampó fosfat 50 mM pH 7 (--) i pH 8.5 (--) a 35°C, [E383A] = 3  $\mu$ M; Glc $\alpha$ F (●), Gal $\alpha$ F (▲).

## 2.2. Reacció glicosintasa entre el fluorur d' $\alpha$ -glucosil i l'acceptor Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP

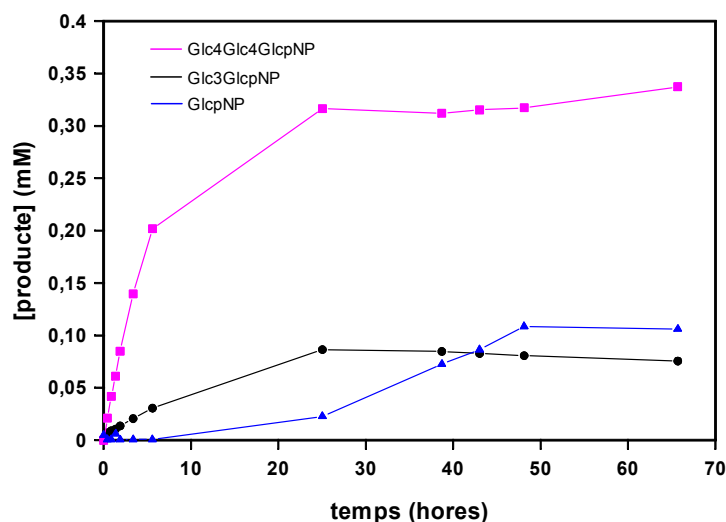
La reacció entre el donador fluorur d' $\alpha$ -glucosil i l'acceptor *p*-nitrofenil  $\beta$ -cel·lobiosid dona lloc a la formació de tres productes que s'identifiquen per coinjecció amb patrons independents com a Glc $\beta$ pNP, Glc $\beta$ 3Glc $\beta$ pNP i Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP (taula 5.8). Els seguiments de reacció per ambdós pHs es troben a les figures 5.9 i 5.10.

Identificació	rendiment màxim pH 7 (%)	rendiment màxim pH 8.5 (%)
Glc $\beta$ pNP	15	10
Glc $\beta$ 3Glc $\beta$ pNP	8	9
Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP	25	35

**Taula 5.8.** productes i grau de conversió (HPLC) obtinguts per a la condensació entre el fluorur d' $\alpha$ -glucosil i el *p*-nitrofenil  $\beta$ -cel·lobiosid catalitzada per la glicosintasa E383A de la  $\beta$ -glucosidasa.



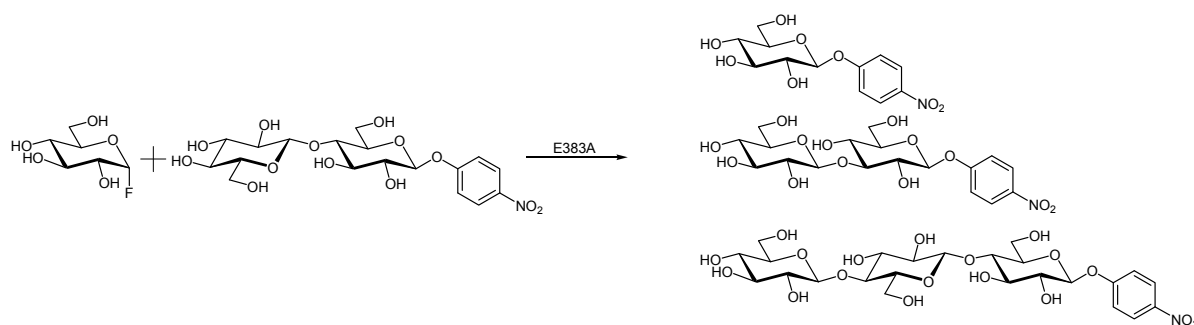
**Figura 5.9.** Corba de progrés per a la reacció entre el donador  $\text{Glc}\alpha\text{F}$  i l'acceptor  $\text{Glc}\beta\text{4Glc}\beta\text{pNP}$ . Condicions de reacció:  $[\text{Glc}\alpha\text{F}] = 1\text{mM}$ ,  $[\text{Glc}\beta\text{4Glc}\beta\text{pNP}] = 5\text{mM}$ , tampó fosfat  $50\text{mM}$  pH 7 a  $35^\circ\text{C}$ ,  $[\text{E383A}] = 10\ \mu\text{M}$ .



**Figura 5.10.** Corba de progrés per a la reacció entre el donador  $\text{Glc}\alpha\text{F}$  i l'acceptor  $\text{Glc}\beta\text{4Glc}\beta\text{pNP}$ . Condicions de reacció:  $[\text{Glc}\alpha\text{F}] = 1\text{mM}$ ,  $[\text{Glc}\beta\text{4Glc}\beta\text{pNP}] = 5\text{mM}$ , tampó fosfat  $50\text{mM}$  pH 8.5 a  $35^\circ\text{C}$ ,  $[\text{E383A}] = 10\ \mu\text{M}$ .

Atenent a estudis anteriors, el producte majoritari esperat és el trisacàrid  $\text{Glc}\beta\text{4Glc}\beta\text{4Glc}\beta\text{pNP}$ , corresponent a la reacció de transglicosidació. A més, els rendiments recuperats (25% i 35%) són lluny de reproduir els resultats anteriors on s'assolien conversions del 80%. Pel que fa al segon producte detectat, el monosacàrid  $\text{Glc}\beta\text{pNP}$ , presenta com a única via de formació la hidròlisi de l'acceptor cel·lobiòsid. Per últim el disacàrid  $\text{Glc}\beta\text{3Glc}\beta\text{pNP}$ , també identificat per HPLC, només es pot obtenir a partir de la hidròlisi de l'acceptor seguida d'una transglicosidació entre un dels productes d'hydròlisi ( $\text{Glc}\beta\text{pNP}$ ) i el donador inicial  $\text{Glc}\alpha\text{F}$ .

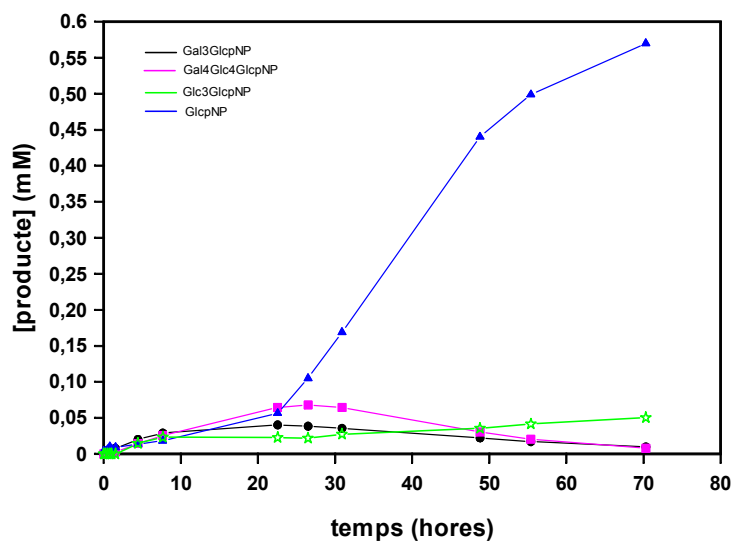
Per tant, es pot resumir el procés observat amb el següent esquema (figura 5.11):



**Figura 5.11.** Reacció entre el donador  $\text{Glc}\alpha\text{F}$  i l'acceptor  $\text{Glc}\beta\text{4Glc}\beta\text{pNP}$  catalitzada pel mutant E383A de la  $\beta$ -glucosidasa.

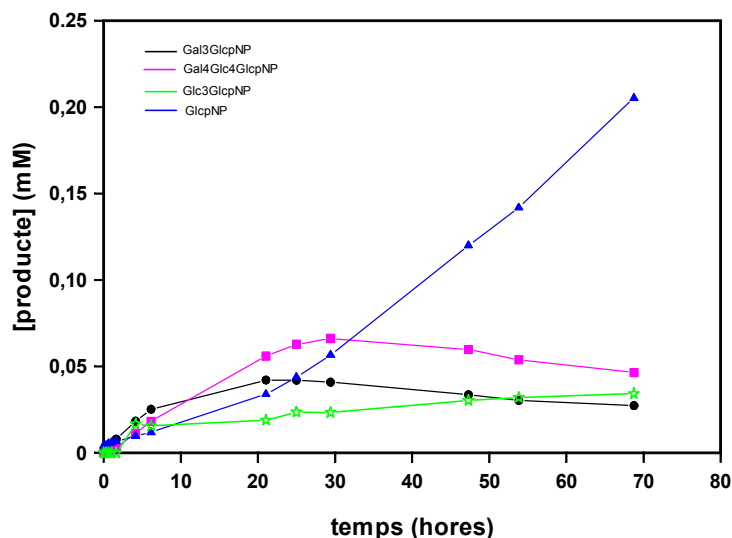
### 2.3. Reacció glicosintasa entre el fluorur d' $\alpha$ -galactosil i l'acceptor $\text{Glc}\beta\text{4Glc}\beta\text{pNP}$

En emprar el donador galactosil, els resultats novament sorprenen. La reacció entre el fluorur d' $\alpha$ -galactosil i l'acceptor  $\text{Glc}\beta\text{4Glc}\beta\text{pNP}$  rendeix la formació de quatre nous productes que s'identifiquen per coinjecció amb patrons independents. Els seguiments de reacció per ambdós pHs es troben a les figures 5.12 i 5.13.



**Figura 5.12.** Corba de progrés per a la reacció entre el donador  $\text{Gal}\alpha\text{F}$  i l'acceptor  $\text{Glc}\beta\text{4Glc}\beta\text{pNP}$ . Condicions de reacció:  $[\text{Gal}\alpha\text{F}] = 1\text{ mM}$ ,  $[\text{Glc}\beta\text{4Glc}\beta\text{pNP}] = 5\text{ mM}$ , tampó fosfat  $50\text{ mM}$  pH 7 a  $35^\circ\text{C}$ ,  $[\text{E383A}] = 10\text{ }\mu\text{M}$ .





**Figura 5.13.** Corba de progrés per a la reacció entre el donador Gal $\alpha$ F i l'acceptor Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP. Condicions de reacció: [Gal $\alpha$ F] = 1mM, [Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP] = 5 mM, tampó fosfat 50 mM pH 8.5 a 35°C, [E383A] = 10  $\mu$ M.

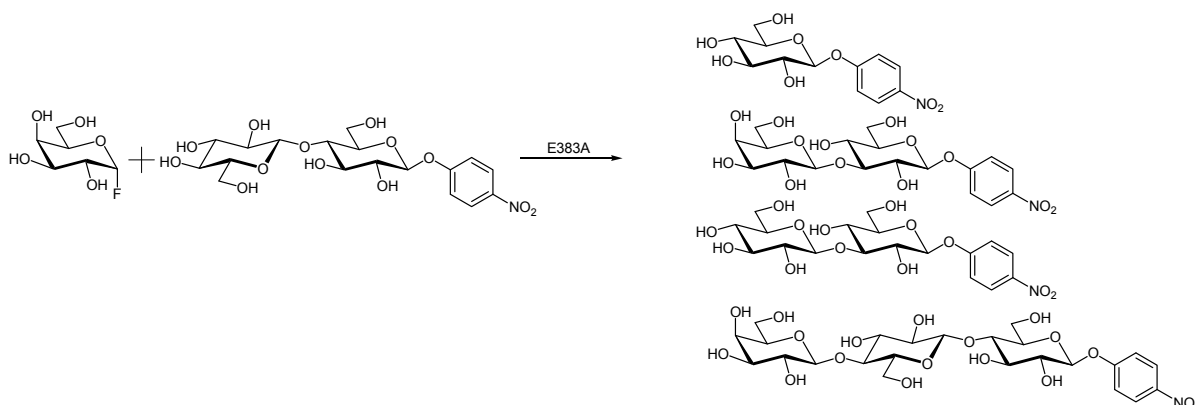
Els productes obtinguts per ambdues reaccions són els següents (taula 5.14):

Identificació	rendiment màxim pH 7 (%)	rendiment màxim pH 8.5 (%)
Glc $\beta$ pNP	60	20
Gal $\beta$ 3Glc $\beta$ pNP	4	4
Glc $\beta$ 3Glc $\beta$ pNP	5	4
Gal $\beta$ 4Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP*	7	7

**Taula 5.14.** Productes i rendiments obtinguts per a la condensació entre el fluorur d' $\alpha$ -galactosil i el *p*-nitrofenil  $\beta$ -cel·lobiosid catalitzada per la glicosintasa E383A de la  $\beta$ -glucosidasa.

S'observa que a temps llargs augmenta la formació del monosacàrid Glc $\beta$ pNP, provinent de la hidròlisi de l'acceptor, amb més importància a pH 7. Els dos disacàrids formats corresponen al Gal $\beta$ 3Glc $\beta$ pNP i el Glc $\beta$ 3Glc $\beta$ pNP. La seva formació requereix una etapa prèvia d'hidròlisi de *p*-nitrofenil cel·lobiosid i una posterior transglicosidació amb el monosacàrid format Glc $\beta$ pNP. En aquest punt, per explicar la formació del *p*-nitrofenil  $\beta$ -D-laminaribiosid (Glc $\beta$ 3Glc $\beta$ pNP) s'ha d'acceptar el paper de la glucosa alliberada en la hidròlisi de l'acceptor com a donador. Per últim i malgrat no es disposa d'un patró de coinjecció per la darrera espècie detectada, s'assigna temptativament com a Gal $\beta$ 4Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP, atès el seu temps de retenció (21.5 minuts). Es tracte del producte que s'esperava obtenir com a majoritari i que respondria a la condensació entre el donador i l'acceptor inicials.

Per tant, en el procés observat intervenen les següents estructures (figura 5.15):



**Figura 5.15.** Reacció entre el donador Gal $\alpha$ F i l'acceptor Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP catalitzada pel mutant E383A de la  $\beta$ -glucosidasa.

En resum, en les reaccions on s'empra el *p*-nitrofenil  $\beta$ -cel·lobiosid com a acceptor s'identifiquen uns productes de reacció que comporten les següents implicacions:

- Hi ha hidròlisi de l'acceptor disacàrid per l'enllaç glicosídic  $\beta$ -1,4.
- Hi ha una transglicosidació posterior amb el Glc $\beta$ pNP alliberat de la hidròlisi anterior, ja que s'obtenen productes amb regioselectivitat  $\beta$ -1,3.
- La formació del disacàrid Glc $\beta$ 3Glc $\beta$ pNP en la reacció amb el donador Gal $\alpha$ F només es pot formar mitjançant la hidròlisi de l'acceptor Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP i la posterior transglicosidació dels dos productes de l'esmentada hidròlisi (Glc + Glc $\beta$ pNP).

Per tal d'identificar si l'origen de l'activitat hidrolítica de la glicosintasa E383A de la  $\beta$ -glucosidasa d'*Streptomyces* sp és pròpia o hi ha una contaminació per enzim wt, es plantegen un seguit d'experiments amb inactivadors de  $\beta$ -glucosidases.

La formació d'aquets productes suggereix la presència d'una activitat hidrolítica que genera productes que, per transglicosidació, podrien donar lloc als productes finals observats. Per tant, es vol identificar si l'origen de l'activitat hidrolítica de la glicosintasa E383A de la  $\beta$ -glucosidasa d'*Streptomyces* sp. és pròpia o hi ha una contaminació per enzim wt. Per això s'estudia la inactivació de l'activitat hidrolítica de la  $\beta$ -glucosidasa d' *Streptomyces* sp. així com del seu mutant E383A glicosintasa.

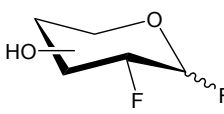
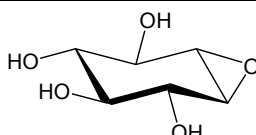
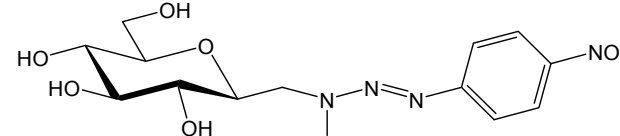
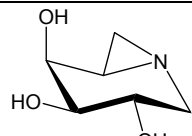
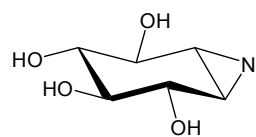
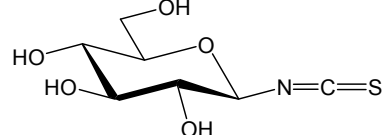
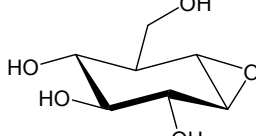
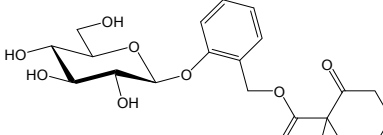
### 3. Inactivació de possible contaminació de $\beta$ -glucosidasa wt.

#### 3.1. Inactivadors

Diverses molècules s'han emprat com a inactivadors de les  $\beta$ -glucosidases que actuen amb retenció de configuració. Els fluorurs de 2-desoxi-2-fluoro-glicosil han estat àmpliament utilitzats com a inhibidors irreversibles en estudis mecanístics per Withers i col·laboradors (Withers et al., 1988). Són inactivadors basats en el mecanisme enzimàtic, que aprofiten la lentitud de la hidròlisi de l'intermedi 2-desoxi-2-fluoro-glicosil-enzim, donant lloc a una acumulació de l'intermedi. En un exemple més recent (Moracci et al., 1998), es va emprar el 2,4-dinitrofenil 2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -glucòsid per a la inactivació de contaminació d'enzim wt en el mutant inactiu E387A de la  $\beta$ -glucosidasa de *Solfolobus solfataricus* (posteriorment desenvolupat com a glicosintasa). La incubació d'aquest enzim en presència de l'inactivador durant 12 hores va rendir un enzim completament inactiu sense capacitat de recuperar l'activitat per rescat químic amb nucleòfils externs.

Altres inhibidors emprats són el conuritol B epòxid (Legler, 1977), el glucosil metiltriazè (Marshall et al., 1981), el derivat aziridina triol de la piperidina (Tong et al., 1988), el conuritol aziridina (Caron et al., 1989), l'isotiocianat de  $\beta$ -D-glucosil (Shulman et al., 1976) i el cyclophellitol (Withers et al., 1991). A la taula 5.16 es troba un resum dels principals inactivadors emprats en estudis mecanístics per les  $\beta$ -glucosidases (per ampliar la informació veure la revisió Withers i Aebersold, 1995).

**CAPÍTOL 5. ESTUDI DE L'ESPECIFICITAT PER SUBSTRAT I DE LA IMMOBILITZACIÓ DEL MUTANT E383A DE LA  $\beta$ -GLUCOSIDASA D'*Streptomyces* sp.**

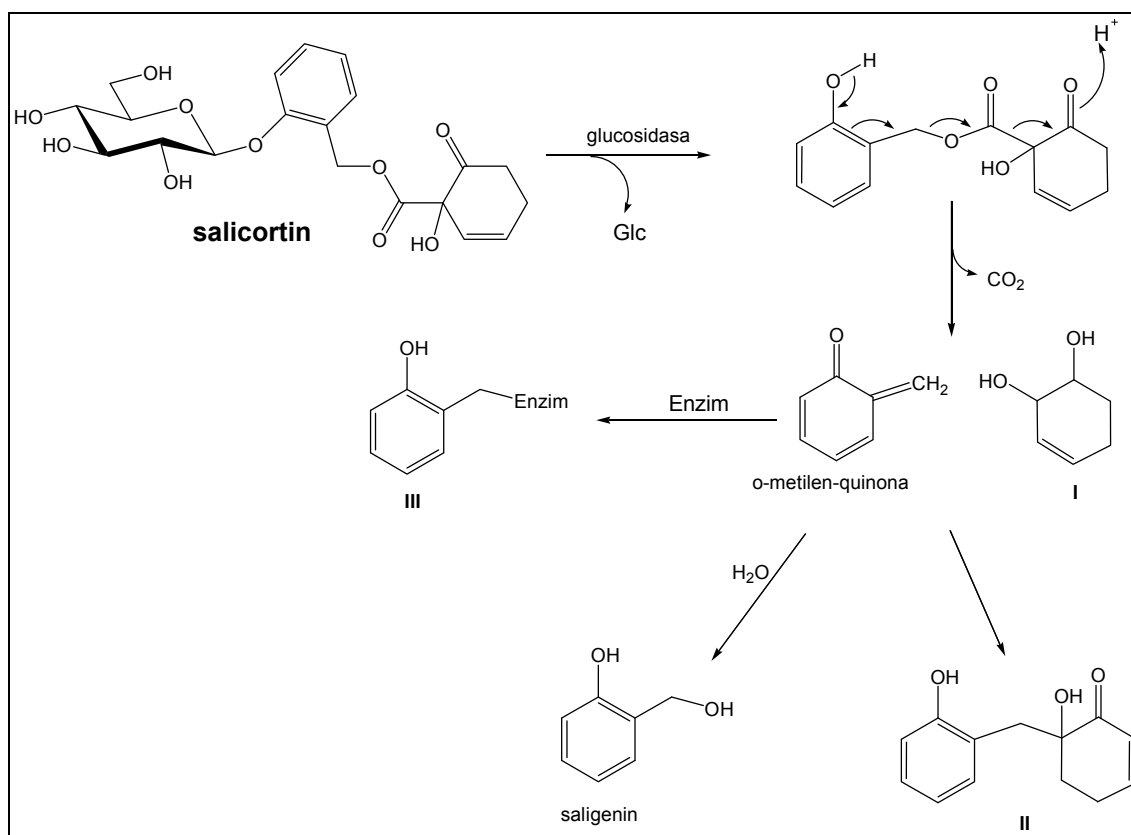
#	Inactivador	Referència
1		Withers et al., 1988
2		Legler, 1977
3		Marshall et al., 1981
4		Tong et al., 1988
5		Caron et al., 1989
6		Shulman et al., 1976
7		Withers et al., 1991
8		Zhu et al., 1998

**Taula 5.16.** Inactivadors de  $\beta$ -glucoisidases. 1: fluorur de 2-desoxi-2-fluoro-glicosil, 2: condritol B epòxid, 3:  $\beta$ -D-glicosilmetil *p*-nitrofeniltriazenè, 4: aziridiniltriol, 5: condritol aziridina, 6:  $\beta$ -D-glucosil isotiocianat, 7: ciclohellitol, 8: salicortin.

Tret del condritol B epòxid (taula 5.16, #2) i el salicortin (taula 5.16, #8), la resta d'inhibidors no es poden adquirir de forma comercial. Aquest producte, però, basa la seva inactivació en la protonació de l'oxigen de l'epòxid pel residu àcid-base general del centre actiu seguit d'un atac del nucleòfil al compost activat per formació d'un enllaç covalent. A més, la manca de l'hidroxil en C-5 que fa que aquesta molècula presenti una analogia estructural amb la xilosa i l'element de simetria originat pel grup epoxi dona lloc a que la molècula funcioni d'inactivador tant d' $\alpha$  com de  $\beta$ -glucosidases. L'encaix poc específic dóna peu a que la seva unió no sigui en el nucleòfil del centre catalític.

## CAPÍTOL 5. ESTUDI DE L'ESPECIFICITAT PER SUBSTRAT I DE LA IMMOBILITZACIÓ DEL MUTANT E383A DE LA $\beta$ -GLUCOSIDASA D'*Streptomyces* sp.

L'any 1998 es va descriure un nou inactivador de  $\beta$ -glucosidases (Zhu et al., 1998), que actuava en base al mecanisme catalític, incrementant així l'especificitat envers una unió adient. L'inactivador és un producte natural present en la majoria de membres de la família Salicaceae anomenat salicortin (taula 5.16, #8). El mecanisme d'inactivació del salicortin transcorre via un intermedi quinona format per la fragmentació de l'aglicona de la molècula. Aquesta fragmentació dóna lloc a dos productes, l'*o*-metilen-quinona i l'enol I (figura 5.17). L'evolució preferent comprèn la recombinació d'ambdós productes per donar II. Un petita part de la quinona, però, és capturada per l'aigua per donar el producte estable, el saligenin. L'altra part reacciona amb els residus nucleòfils de l'enzim que es troben al centre actiu o a prop d'aquest, rendint un enzim sense activitat.



**Figura 5.17.** Mecanisme d'acció del salicortin.

La incubació de salicortin amb el mutant inactiu E358A de la  $\beta$ -glucosidasa d'*Agrobacterium faecalis* va mostrar que l'*o*-metilen-quinona no s'alliberava del centre actiu i en conseqüència no era capturat en punts allunyats del centre actiu (Zhu et al., 1998). L'anàlisi per HPLC/MS no mostrava cap modificació de l'enzim demostrant la necessària presència d'activitat enzimàtica per a poder generar el producte *o*-metilen-quinona.

La incubació d'una mescla (1:10) de  $\beta$ -glucosidasa wt d'*Agrobacterium faecalis* i mutant inactiu E358A amb salicortin va rendir la inactivació de l'enzim wt mentre no s'observà cap modificació en el mutant inactiu (Zhu et al., 1998). Es va assegurar doncs, que l'aglicona alliberada després

de la hidròlisi, així com l'espècie reactiva o-metilen-quinona, reaccionen a l'entorn del centre actiu de l'enzim on es genera i el medi aquós no permet que assoleixen una altra molècula d'enzim. En resum, el salicortin és un inactivador específic per a  $\beta$ -glucosidases i no interfereix en l'activitat del mutant hidrolíticament inactiu, esdevenint així el candidat idoni per als estudis d'inactivació de la possible contaminació wt del mutant E383A de la  $\beta$ -glucosidasa d'*Streptomyces* sp.

### 3.2. Cinètiques d'inactivació amb salicortin i wt.

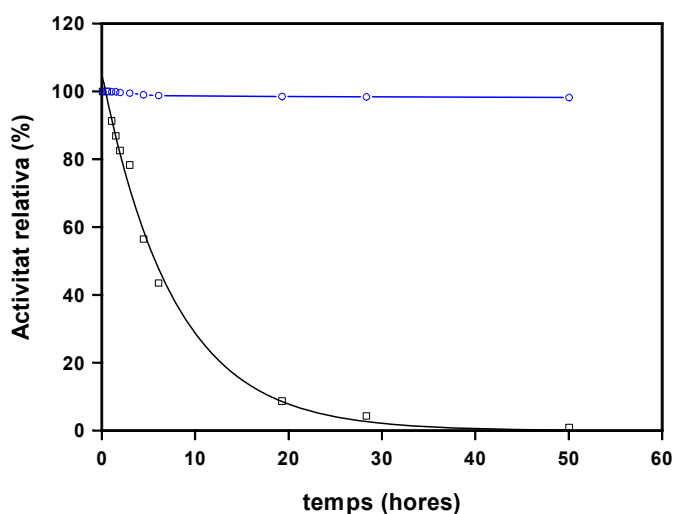
Sobre un lot fresc de  $\beta$ -glucosidasa wt d'*Streptomyces* sp. (obtingut segons es descriu a la part experimental) es determina l'activitat hidrolítica a partir de l'assaig estàndard que compren l'ús del substrat *p*-nitrofenil  $\beta$ -D-glucòsid (mesura de l'activitat hidrolítica per seguiment de l'alliberament de l'aglicona cromofòrica a  $\lambda = 400$  nm), així com amb el substrat *p*-nitrofenil  $\beta$ -cel·lobiòsid, en les mateixes condicions que a l'estudi d'especificitat per substrat (tampó fosfat 50 mM pH 7, 35°C i seguiment per HPLC i detecció per absorbància a 301 nm). Paral·lelament, es realitzen les mateixes cinètiques pel mutant glicosintasa E383A. Els resultats (taula 5.18) mostren que l'activitat hidrolítica del mutant glicosintasa és de l'ordre de  $10^5$  vegades inferior a la de l'enzim wt.

substrat	$v_o/[E]$ ( $s^{-1}$ ) wt	$v_o/[E]$ ( $s^{-1}$ ) E383A
Glc $\beta$ pNP	7.3	$6 \cdot 10^{-5}$
Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP	1.35	$3 \cdot 10^{-5}$

**Taula 5.18.** Velocitats inicials d'hidròlisi de la  $\beta$ -glucosidasa wt i del mutant E383A emprant els substrats mono i disacàrids.

Per tal d'establir les condicions òptimes d'inactivació amb salicortin, es realitza un estudi previ amb la  $\beta$ -glucosidasa wt amb l'objectiu de verificar l'irreversibilitat de la inactivació, així com el temps d'incubació requerit.

La  $\beta$ -glucosidasa wt (0.2  $\mu$ M) s'incuba amb salicortin (20 mM) en tampó fosfat 50 mM a pH 7 i 37°C. Es prenen alíquotes a intervals regulars de temps i es mesura l'activitat hidrolítica (5.5 nM de  $\beta$ -glucosidasa, 0.5 mM de Glc $\beta$ pNP, en tampó fosfat 50 mM pH 7 a 30°C). Paral·lelament es prepara un control negatiu amb 0.2  $\mu$ M d'enzim i absència de salicortin que se sotmet a les mateixes condicions que la mostra inicial (figura 5.19).



**Figura 5.19.** Inactivació de la  $\beta$ -glucosidasa amb salicortin en funció del temps d'incubació. (□)  $\beta$ -glucosidasa wt inactivada; (○) control negatiu.

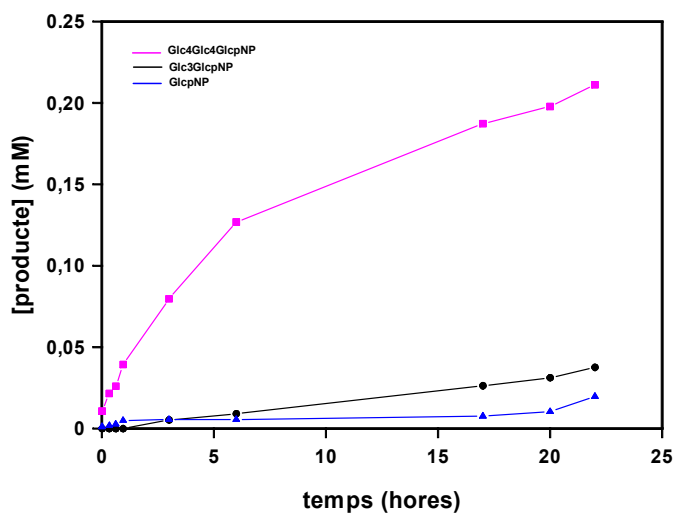
La inactivació per salicortin segueix una tendència exponencial amb el temps. S'observa com transcorregudes 28 hores d'incubació, l'enzim incubat amb salicortin presenta un 4% d'activitat hidrolítica respecte el control negatiu, el qual manté una activitat superior al 98% durant tot el seguiment. Aquesta lleugera inactivació del control negatiu s'atribueix a les condicions d'incubació (37°C).

### 3.3. Incubació del mutant E383A amb salicortin.

La incubació del mutant E383A de la  $\beta$ -glucosidasa d'*Streptomyces* sp. amb salicortin (E383A 50  $\mu$ M, tampó fosfat 50 mM a pH 7 i 37°C, salicortin 25 mM) es manté durant 30 hores, passades les quals es conserva la dissolució a 4°C fins a la determinació de l'activitat sintasa. Paral·lelament es prepara un control negatiu en absència de salicortin que se sotmet a les mateixes condicions de temperatura.

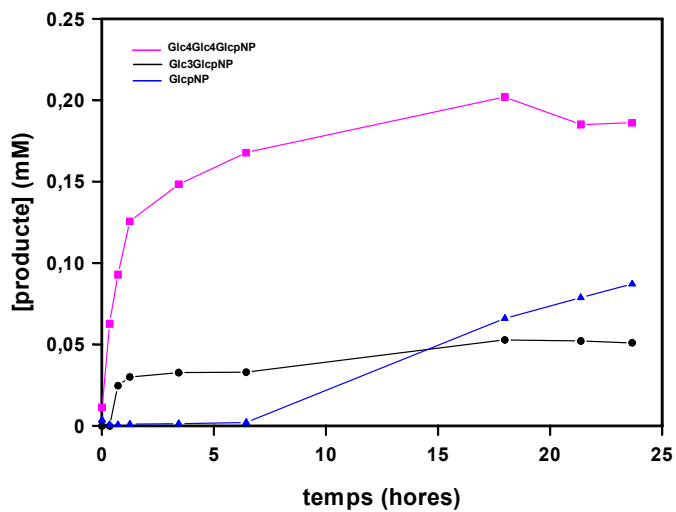
L'efecte del salicortin sobre el mutant E383A es comprova incubant ambdues mostres amb el donador Glc $\alpha$ F i l'acceptor Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP en les mateixes condicions que es van emprar per als seguiments de reacció (apartat 2).

El curs de reacció entre el fluorur d' $\alpha$ -glucosil i el *p*-nitrofenil  $\beta$ -cel·lobiòsid en presència d'E383A tractat amb salicortin produeix tres productes identificats com: Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP, Glc $\beta$ 3Glc $\beta$ pNP i Glc $\beta$ pNP (figura 5.20), que corresponen als mateixos productes observats en la reacció amb el mutant sense inactivar.



**Figura 5.20.** Corba de progrés de la reacció entre el Glc $\alpha$ F i el Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP en tampó fosfat 50 mM pH 7 i 35°C, amb E383A (9  $\mu$ M) tractat amb salicortin.

A més, el control negatiu (figura 5.21)



**Figura 5.21.** Corba de progrés de la reacció entre el Glc $\alpha$ F i el Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP en tampó fosfat 50 mM pH 7 i 35°C, amb E383A (9  $\mu$ M) no tractat amb salicortin (control negatiu).

A la taula 5.22, es mostren els rendiments de formació dels productes de reacció per als tres casos.



**CAPÍTOL 5. ESTUDI DE L'ESPECIFICITAT PER SUBSTRAT I DE LA IMMOBILITZACIÓ DEL MUTANT E383A DE LA  $\beta$ -GLUCOSIDASA D'*Streptomyces* sp.**

Producte	$\eta_{\text{màxim E383A no inactivat}} (\%)$	$\eta_{\text{màxim E383A inactivat}} (\%)$	$\eta_{\text{màxim control negatiu}} (\%)$
Glc $\beta$ pNP	5	3	8
Glc $\beta$ 3Glc $\beta$ pNP	8	4	5
Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP	23	21	20

**Taula 5.22.** Productes i rendiments màxims obtinguts a 24°C de reacció emprant el mutant E383A de la  $\beta$ -glucosidasa d'*Streptomyces* sp. amb i sense tractar amb salicortin.

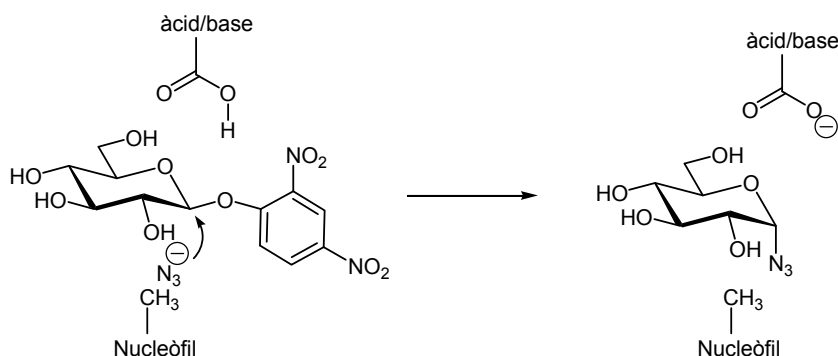
Comparant els rendiments màxims de formació de cadascun dels productes de reacció, no s'observen canvis significatius entre l'ús de la glicosintasa no inactivada, inactivada o incubada sense salicortin (control negatiu). En tot cas, hi ha una minsa davallada de l'activitat tant hidrolítica com de transglicosidació respecte al mutant no inactivat fruit de l'ús d'una concentració d'enzim inferior a la de l'estudi inicial (9  $\mu$ M enlloc de 10  $\mu$ M), així com a les 30 hores d'incubació a 30°C.

Per tant, el comportament anòmal que presenta el mutant E383A de la  $\beta$ -glucosidasa d'*Streptomyces* sp. en la síntesi d'oligosacàrids no és conseqüència d'una contaminació amb enzim wt, sinó que el mutant presenta activitat hidrolítica.

### 3.4. Rescat químic amb anió fluorur i discussió

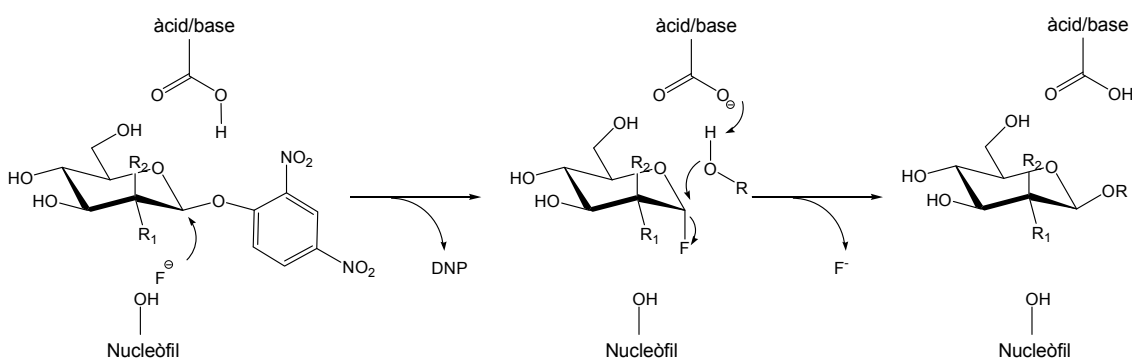
La mutació E383A del residu nucleòfil de la  $\beta$ -glucosidasa dóna lloc a un enzim sense capacitat per formar l'intermedi glicosil-enzim en la primera etapa de glicosidació. És per tant, un enzim hidrolíticament inactiu fins i tot en presència de substrats activats com el 2,4-dinitrofenil  $\beta$ -D-glucòsid. Així doncs, com es pot recuperar l'activitat hidrolítica i de transglicosidació d'aquest mutant? Es planteja la hipòtesi del requeriment d'una assistència catalítica externa.

La metodologia de rescat químic ha estat àmpliament emprada per a la identificació dels residus catalítics i la determinació del seu paper funcional en glicosidases que actuen amb retenció de configuració. Es basa en la recuperació de l'activitat de mutants inactius dels residus catalítics mitjançant nucleòfils exògens com l'azida o el formiat (Viladot et al., 1998). Així, l'addició d'azida sobre un mutant alanina del residu nucleòfil pot reactivar la reacció a través d'un desplaçament  $S_N2$ , rendint el producte  $\alpha$ -glicosil azida. L'azida presenta una mida adient per ocupar la cavitat creada a la cara  $\alpha$  del centre actiu, on s'ha eliminat el residu nucleòfil (figura 5.23).



**Figura 5.23.** Metodologia de rescat químic amb nucleòfil exogen de l'activitat hidrolasa d'una  $\beta$ -glucosidasa mutada en la posició que actua de nucleòfil, emprant un substrat activat i l'azida.

En relació als processos estudiats en aquest treball, l'única molècula amb capacitat d'actuar com a nucleòfil exogen és l'anió fluorur. Els antecedents mostren que malgrat la seva baixa nucleofília en dissolució aquosa, hi ha descrit un rescat per anió fluorur de l'activitat hidrolítica d'una glicosintasa (Zechel et al., 2001). En concret, els mutants del residu nucleòfil E358 de la  $\beta$ -glucosidasa d'*Agrobacterium* sp. i els mutants del residu E519 de la  $\beta$ -mannosidasa de *Cellulomonas fimi* (amb alanina, glicina i serina), hidrolíticament inactius, recuperaven part d'aquesta activitat en incubar-los amb substrats 2,4-dinitrofenil  $\beta$ -D-glicòsids en presència d'una sal de fluorur (KF 2M, pH 6, 25°C). L'anió fluorur actua enlloc del residu nucleòfil absent, de manera que s'allibera l'aglicona cromofòrica del substrat, assolint-se la formació de fluorur d' $\alpha$ -glicosil al centre actiu. En aquest punt, aquest fluorur d' $\alpha$ -glicosil pot actuar de donador en la reacció de transglicosidació amb una segona molècula de 2,4-dinitrofenil  $\beta$ -D-glicòsid per a formar el disacàrid corresponent (figura 5.24).

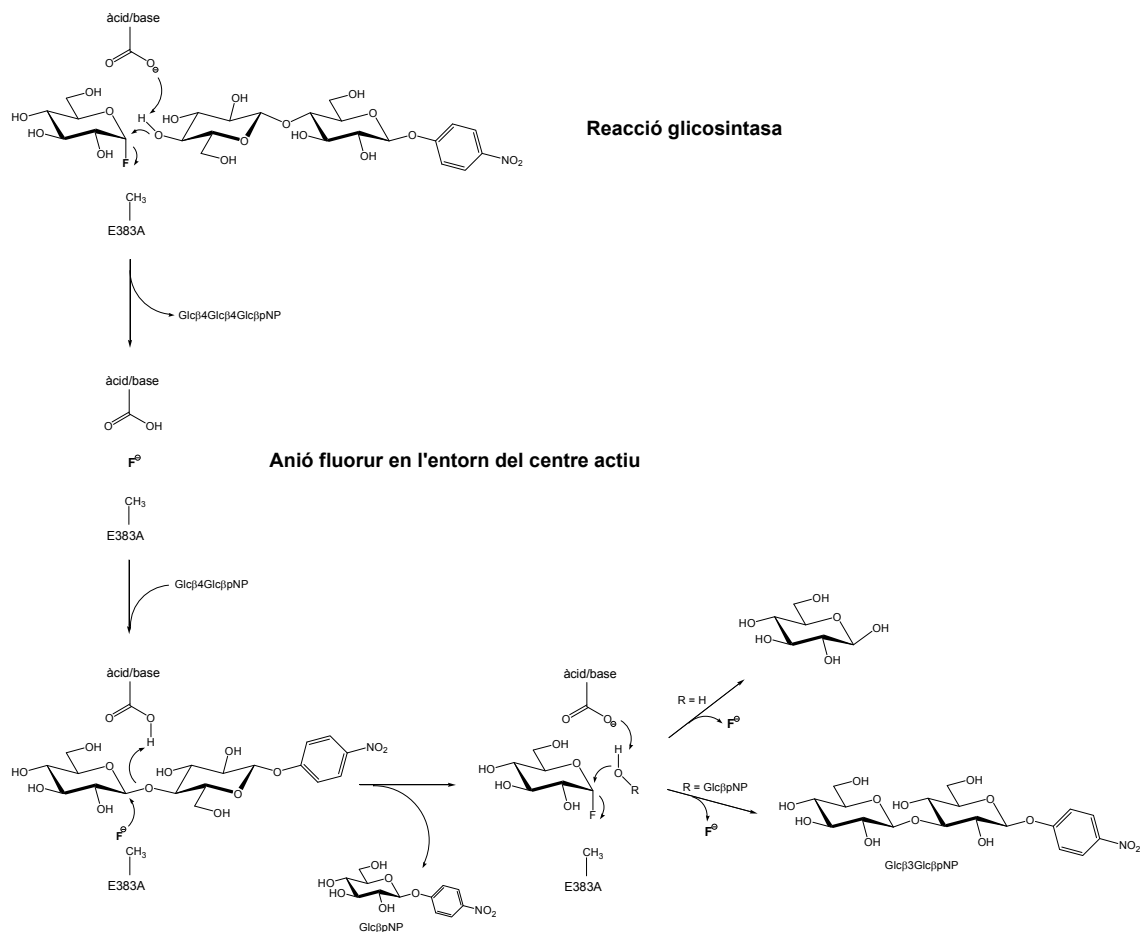


**Figura 5.24.** Mutant serina d'una glicosidasa catalitzant la fluoració nucleofílica del 2,4-dinitrofenil  $\beta$ -D-glicòsid ( $R_1=OH$ ,  $R_2=H$ ) i mannòsid ( $R_1=H$ ,  $R_2=OH$ ), seguida de la transferència del fluorur d' $\alpha$ -glicosil a una segona molècula de substrat inicial. DNP = 2,4-dinitrofenil.

A partir d'aquests antecedents, es proposa un mecanisme assistit per anió fluorur per a la hidròlisi i transglicosidació catalitzades pel mutant E383A de la  $\beta$ -glucosidasa. Per a poder rescatar l'activitat hidrolasa dels mutant glicosintasa amb fluorur, Withers i col·laboradors (Nashiru et al., 2001; Zechel et al., 2001) van emprar una concentració molt elevada d'aquest (2 M KF), lluny de les condicions de la reacció objecte de l'estudi (Glc $\alpha$ F + Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ NP). En aquest cas, l'ió fluorur es trobaria al centre actiu de l'enzim provinent del donador de la reacció una vegada

**CAPÍTOL 5. ESTUDI DE L'ESPECIFICITAT PER SUBSTRAT I DE LA IMMOBILITZACIÓ DEL MUTANT E383A DE LA  $\beta$ -GLUCOSIDASA D'*Streptomyces* sp.**

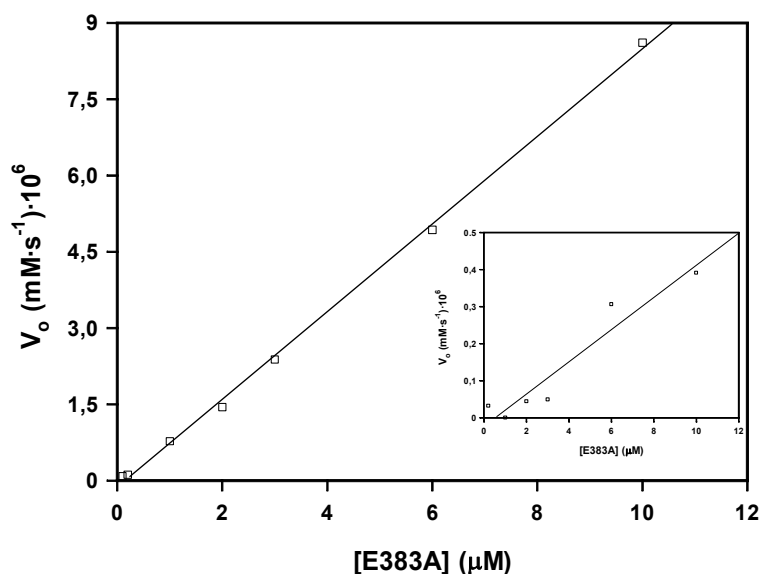
catalitzada la reacció de condensació per assolir el trisacàrid. Si el fluorur no difon, pot romandre al centre catalític del mutant, afavorint l'atac d'aquest sobre un nou substrat posicionat al centre actiu. A la figura 5.25 es mostra un esquema dels processos proposats per a la reacció d'hidròlisi i transglicosidació. D'aquesta manera, una vegada s'ha produït la reacció glicosintasa i s'ha consumit el donador fluorur d' $\alpha$ -glucosil, l'anió fluorur roman a l'entorn del centre actiu, possiblement estabilitzat per interaccions electrostàtiques amb algun residu proper. Si l'acceptor Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP ocupa el centre actiu, el fluorur pot actuar mimetitzant el residu nucleòfil i hidrolitzar l'acceptor formant *in situ* el fluorur d' $\alpha$ -glicosil i alliberant una molècula de *p*-nitrofenil  $\beta$ -D-glucòsid. El fluorur de glicosil generat al centre actiu pot reaccionar amb una molècula d'aigua per donar glucosa o bé formar el Glc $\beta$ 3Glc $\beta$ pNP per reacció amb una molècula de Glc $\beta$ pNP.



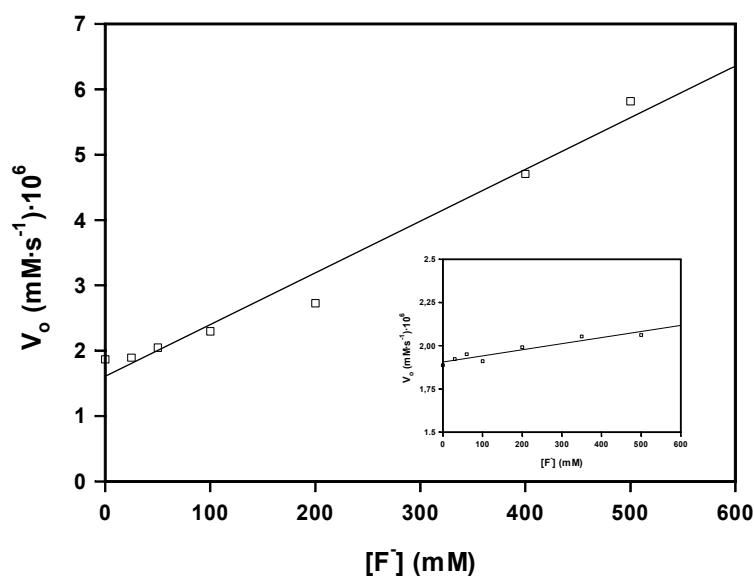
**Figura 5.25.** Proposta de mecanisme d'hidròlisi i transglicosidació catalitzat pel mutant E383A per rendir productes secundaris obtinguts en els seguiments de reacció amb acceptors disacàrids. L'ió fluorur actua com a nucleòfil exogen en un inusual rescat químic.

Per tal de comprovar la hipòtesi, es realitza l'anàlisi de les cinètiques d'hidròlisi del mutant E383A de la  $\beta$ -glucosidasa d'*Streptomyces* sp. en presència d'anió fluorur emprant el substrat activat 2,4-dinitrofenil  $\beta$ -D-glucòsid, que presenta alta reactivitat amb un bon grup sortint (2,4-dinitrofenol, pKa 4.0). Totes les cinètiques es realitzen a la mateixa concentració de substrat, en tampó fosfat a pH 7.0 i 35°C. Les velocitats inicials, variant la concentració de fluorur i d'enzim, es determinen per mesura de l'alliberament del 2,4-dinitrofenol per absorbància a l'UV ( $\lambda = 400$ ,  $\Delta\epsilon = 9907 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) en funció del temps ( $t < 30 \text{ min}$ ).

El seguiment d'hidròlisi del 2,4-dinitrofenil  $\beta$ -D-glucòsid en presència de concentracions creixents de fluorur de sodi (0 – 500 mM) i en absència d'enzim, mostra com la velocitat inicial d'hidròlisi augmenta amb la concentració de fluorur amb una constant cinètica de  $k = 3.5\cdot 10^{-10} \text{ s}^{-1}$ . En presència d'enzim ( $[\text{E383A}] = 2 \mu\text{M}$ ), es produeix un increment d'aquesta constant  $k = 7.9\cdot 10^{-9} \text{ s}^{-1}$  (figura 5.26). D'altra banda, es compara l'activitat específica del mutant E383A per a la reacció d'hidròlisi del substrat activat en presència i absència de nucleòfil (figura 5.27). La constant  $k = 4.3\cdot 10^{-8} \text{ mM}\cdot(\mu\text{M}\cdot\text{s})^{-1}$  correspon al pendent de la recta resultant de representar la velocitat inicial d'hidròlisi enfront de la concentració d'enzim. Aquest pendent s'incrementa fins a  $8.6\cdot 10^{-7} \text{ mM}\cdot(\mu\text{M}\cdot\text{s})^{-1}$  en realitzar les cinètiques d'hidròlisi en presència de 300 mM d'anió fluorur, valor que correspon a una reactivació de la hidròlisi de 20 vegades.



**Figura 5.26.** Rescat químic de l'activitat hidrolasa del mutant E383A de la  $\beta$ -glucosidasa d'*Streptomyces* sp. amb anió fluorur. Condicions de reacció:  $[\text{Glc}\beta\text{DNP}] = 0.5 \text{ mM}$ ,  $[\text{E383A}] = 0.1 - 10 \mu\text{M}$ ,  $[\text{F}^-] = 300 \text{ mM}$ , tampó fosfat 50 mM pH 7 a 35°C. (**Insert**) Activitat hidrolasa del mutant E383A de la  $\beta$ -glucosidasa d'*Streptomyces* sp. en absència d'anió fluorur. Condicions de reacció:  $[\text{Glc}\beta\text{DNP}] = 0.5 \text{ mM}$ ,  $[\text{E383A}] = 0.2 - 10 \mu\text{M}$ , , tampó fosfat 50 mM pH 7 a 35°C.



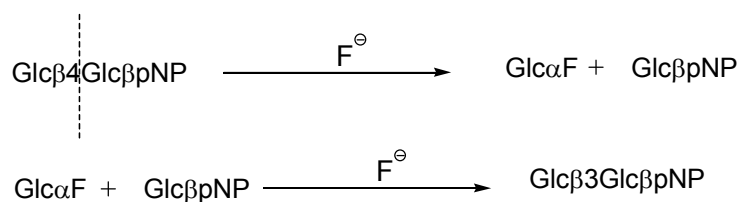
**Figura 5.27.** Hidròlisi del substrat activat Glc $\beta$ DNP en presència de concentracions creixents d'anió fluorur. Condicions de reacció: [Glc $\beta$ DNP] = 0.5 mM, [E383A] = 2  $\mu$ M, [F<sup>-</sup>] = 0 – 500 mM, tampó fosfat 50 mM pH 7 a 35°C. (Insert) Hidròlisi química del substrat activat Glc $\beta$ DNP en presència de concentracions creixents d'anió fluorur. Condicions de reacció: 0.5 mM substrat en tampó fosfat 50 mM pH 7 a 35°C.

L'addició de fluorur reactiva el mutant E383A per a la reacció d'hidròlisi emprant el substrat activat 2,4-dinitrofenil  $\beta$ -D-glucòsid. Els resultats mostren com l'ús de 300 mM de fluorur permet incrementar l'activitat específica de l'enzim 20 vegades i recuperar l'activitat hidrolítica del mutant glicosintasa.

### 3.5. Conclusions

La glicosintasa E383A de la  $\beta$ -glucosidasa d'*Streptomyces* sp. presenta activitat hidrolítica i de transglicosidació, fet que queda palès amb la formació de productes secundaris en la reacció glicosintasa entre el fluorur d' $\alpha$ -glucosil i el fluorur d' $\alpha$ -galactosil amb l'acceptor *p*-nitrofenil  $\beta$ -cel·lobiòsid.

Descartada la contaminació amb enzim wt, es proposa un mecanisme d'hidròlisi i transglicosidació assistit per anió fluorur com a nucleòfil exogen catalitzat per la glicosintasa E383A de la  $\beta$ -glucosidasa d'*Streptomyces* sp.. L'anió fluorur escindeix l'enllaç glicosídic i forma un fluorur de glucosil en  $\alpha$  (formació del donador *in situ*) que alhora pot actuar de substrat i transglicosidar amb un acceptor. Això explicaria la formació del producte Glc $\beta$ 3Glc $\beta$ pNP a partir dels substrats Gal $\alpha$ F i Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP, on és necessària la hidròlisi de l'acceptor i la posterior condensació dels productes d'aquesta hidròlisi (figura 5.28).



**Figura 5.28.** Hidròlisi enzimàtica de l'acceptor cel·lobiosid assistida per anió fluorur. Es forma el fluorur d' $\alpha$ -glucosil in situ com a producte hidrolític que pot condensar amb l'altre fragment hidrolític, el *p*-nitrofenil  $\beta$ -D-glucòsid, i rendir el disacàrid Glc $\beta$ 3Glc $\beta$ pNP.

Si bé els experiments de rescat químic amb anió fluorur, mostren una recuperació parcial de l'activitat hidrolítica de la glicosintasa E383A i recolzen la proposta mecanística plantejada, la concentració de fluorur al medi a partir de la qual s'observa aquesta hidròlisi és de 300 mM, valor que es troba molt allunyat de la concentració de fluorur alliberat en reaccions glicosintasa (que com a màxim serà igual a la del donador fluorur de glucosil emprat). Tanmateix, la concentració de fluorur en el medi no seria un factor tant determinant en el cas que la generació del fluorur es produís *in situ* en el centre actiu.

#### 4. Immobilització del mutant E383A de la $\beta$ -glucosidasa d'*Streptomyces* sp.

##### INTRODUCCIÓ

##### 4.1. Context

La síntesi orgànica ha anat incorporant al llarg dels darrers anys els enzims en diferents protocols sintètics. En els capítols anteriors s'han enumerat les avantatges que aporten aquests biocatalitzadors, tals com la seva elevada activitat, l'absència de reaccions secundàries, l'ús de condicions de reacció suaus i, sobretot, una alta estereoselectivitat i regioselectivitat. Malgrat això, l'ús d'enzims en esquemes sintètics presenta limitacions a dos nivells. En primer lloc, la producció del biocatalitzador, en funció de la quantitat i puresa requerida i del valor del producte final, pot esdevenir un reactiu molt costós a nivell econòmic. En segon lloc, la seva implementació en processos productius sovint és complexa atès els següents punts:

- ✓ Falta d'estabilitat enfront de la temperatura, el pH, la tensió de cisallament i l'autòlisi.
- ✓ Contaminació biològica del producte de reacció donant lloc a processos de *downstream* complexos.
- ✓ Formació d'emulsions durant l'aïllament de producte.
- ✓ Manca de dispersió homogènia del biocatalitzador durant la reacció.
- ✓ Activitat insuficient.
- ✓ Forma inapropiada requerida per a un procés en continu.
- ✓ Impossibilitat de reciclar el biocatalitzador.

Molts d'aquest aspectes es poden solucionar aplicant tècniques d'immobilització.

En general, la immobilització d'enzims respon a la necessitat de facilitar el *downstream* d'un procés i/o incrementar-ne la seva productivitat amb la seva reutilització.

Malgrat l'existència d'un gran nombre de bibliografia dedicada a les tècniques d'immobilització d'enzims (i cèl·lules), segueix sent necessari explorar i posar a punt un mètode adient per a una aplicació determinada.

#### **4.2. Mètodes d'immobilització**

La immobilització d'enzims respon a diferents motivacions, però els dos objectius bàsics són la fàcil separació/recuperació de l'enzim respecte del producte, proporcionant solucions per a plantejar estratègies de *downstream* més eficients, i la reutilització d'aquest, que disminueix els costos de producció.

La immobilització normalment modifica les propietats de l'enzim, i aquest canvi no només depèn del propi enzim sinó també del suport d'immobilització, així com de la metodologia emprada per a la seva unió. Per tant, per a la immobilització d'un enzim es requereix un estudi a tres nivells:

- De l'enzim, tant pel que fa a les seves propietats bioquímiques, com als seus paràmetres cinètics.
- Del suport d'immobilització, on es plantejaran les seves propietats químiques i mecàniques.
- De l'enzim immobilitzat, que dependrà del mètode emprat i en el qual s'hauran d'analitzar els efectes de transferència de massa, estabilitat i operacionalitat.

Donat que els enzims són biocatalitzadors optimitzats per a treballar en condicions sovint allunyades de les que s'empren en els bioreactors industrials, la immobilització de vegades suposa un canvi en les seves propietats que els fa més estables front a condicions de reacció dràstiques. Malgrat tot, aquesta modificació de les propietats no ha d'anar en detriment de l'activitat enzimàtica i la flexibilitat catalítica

Un punt de vital importància és l'elecció de la matriu. Els suports ideals són aquells que presenten resistència física a la compressió, resistència a l'atac microbiològic, disponibilitat i preu assequible

Els enzims s'uneixen al suport segons dues grans estratègies: mètodes irreversibles i reversibles. Aquest fet suposa un compromís entre estabilitat, normalment associada a unions irreversibles, i reversibilitat.

##### **4.2.1. Immobilització irreversible d'enzims**

La immobilització irreversible d'enzims dóna lloc a una unió que no es pot trencar sense comprometre bé l'activitat enzimàtica o bé el suport. Els mètodes d'immobilització irreversibles més comuns comprenen: *la unió covalent, el cross-linking i l'atrapament.*

La unió covalent és el mètode d'immobilització que resulta de la formació d'enllaços covalents entre l'enzim i el suport. És un dels mètodes més emprats a la indústria car permet l'ús del

biocatalitzador tant en medi aquós com orgànic i en reactors continus. El repertori de suports que es poden obtenir comercialment és molt ampli, i la tria dependrà en gran part de les propietats de l'enzim a immobilitzar i de la reacció a catalitzar.

Una alternativa a la unió covalent, és la unió de molècules d'enzim entre elles emprant un *linker* bifuncional. Aquesta tècnica va esdevenir popular amb l'aparició i desenvolupament dels CLECs (cross-linked enzyme crystals). Els CLECs es formen a partir de cristalls d'enzim pur que s'han fet reaccionar amb glutaraldehid; són bons biocatalitzadors, mostrant una elevada activitat, estabilitat i facilitat de separació. Tanmateix, la purificació i cristallització de l'enzim és un procés lent i car, comportant que els CLECs siguin biocatalitzadors molt costosos i que només es justifiqui el seu ús en processos i productes d'alt valor afegit.

Més recentment, es va introduir la tecnologia CLEAs, on es conserven moltes de les propietats positives dels CLECs, però amb una preparació més senzilla. La immobilització per CLEAs parteix d'enzims parcialment purificats. La preparació es realitza per precipitació de l'enzim i posterior reacció amb el *linker* o bé la reacció amb el *linker in situ* fins a produir precipitació (per ampliar informació veure la revisió Sheldon, 2007).

Finalment, el mètode d'atrapament està basat en l'oclusió de l'enzim en una xarxa polimèrica que permet a substrat i productes passar a través d'ella però que reté l'enzim. Es tracta d'un mètode d'immobilització molt suau, on l'enzim roman lliure, si bé confinat en un espai petit. Les diferents aproximacions passen per l'atrapament en gel, fibres o pel microencapsulament.

#### **4.2.2. Immobilització reversible d'enzims**

Les immobilitzacions reversibles d'enzims permeten la separació de l'enzim del seu suport en condicions suaus. Els exemples més comuns comprenen: l'adsorció, la quelació o unió metàl·lica i la formació d'enllaços disulfur.

L'adsorció correspon al mètode més simple d'immobilització on intervien interaccions reversibles entre l'enzim i el suport. Aquestes són majoritàriament del tipus electrostàtic tal com les forces de van der Waals, forces iòniques o del tipus pont d'hidrogen, però també poden aparèixer interaccions del tipus hidrofòbiques. Les avantatges d'aquesta metodologia són:

- ✓ Condicions suaus d'immobilització que permeten un dany mínim sobre l'enzim.
- ✓ Simple, barat i de ràpida execució
- ✓ Absència de modificacions químiques sobre el suport o l'enzim
- ✓ Reversible, de manera que permet la regeneració del suport amb enzim nou

Com a punts en contra:

- ✓ Despreniment de l'enzim del suport, produint la contaminació del producte.
- ✓ Unió no específica
- ✓ Saturació del suport



- ✓ Impediment estèric provocat pel suport

El despreniment de l'enzim del suport és la principal problemàtica d'aquesta metodologia. Aquesta desorció es pot originar en produir-se canvis en les condicions de la mostra, tals com el pH, la temperatura i la força iònica, per processos de competència amb el producte format, impureses que pugui contenir el substrat o canvis conformacionals en l'enzim després de la unió amb el substrat i per processos físics tals com el cabal, agitació/aeració, abrasió partícula-partícula, o fricció amb les parets del recipient.

En processos d'immobilització per quelació, metodologia àmpliament establerta en la purificació de proteïnes, els lligants quelants s'immobilitzen en suports sòlids mitjançant unions covalents. Aquests suports quelants se saturen d'ions metàl·lics per coordinació i els complexos estables formats s'empren per a la immobilització de proteïnes. Es tracta d'unions suaus on la desorció es realitza emprant un producte que competeix pels llocs de coordinació amb la proteïna immobilitzada.

Finalment, la immobilització per formació d'enllaços sulfur es basa en la formació d'un enllaç disulfur covalent entre les cisteïnes de la proteïna i el suport, que pot ser hidrolitzable en condicions suaus. La reactivitat del grup tiol es pot modular per pH i l'escissió de l'enllaç es pot realitzar mitjançant ditioneïtol (DTT).

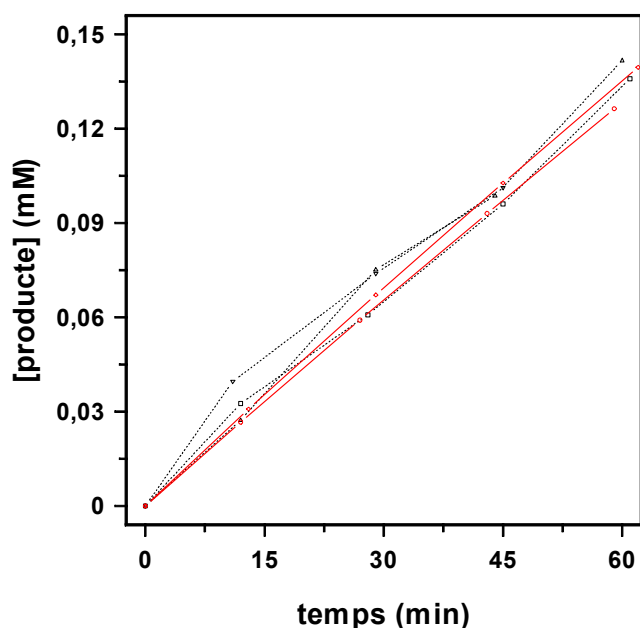
## *RESULTATS I DISCUSSIÓ*

### **4.3. Immobilització del mutant E383A de la $\beta$ -glucosidasa**

La glicosintasa E383A de la  $\beta$ -glucosidasa d'*Streptomyces* sp. presenta a l'extrem N-terminal de la seva estructura, una cua d'histidines per a la seva purificació per cromatografia d'afinitat. S'aprofita la presència d'aquesta cua i es procedeix a l'estudi de la seva immobilització reversible en una reïna *Chelating Sepharose FF* saturada de cations Níquel (II). Per a que la immobilització sigui quantitativa s'empra un excés de reïna de quatre vegades respecte la seva capacitat nominal de càrrega. Així sobre 20 mg de reïna saturada de Níquel (II) i seca s'addicionen entre 40 i 170  $\mu$ g d'enzim.

El rendiment d'immobilització es mesura quantificant l'enzim que no s'ha unit, mesurant l'absorbància a 280 nm de les aigües de rentat. Finalment, a partir d'una quantitat de proteïna addicionada de  $3.16 \cdot 10^{-3}$   $\mu$ mol, a les aigües de rentat es recuperen  $1,08 \cdot 10^{-4}$   $\mu$ mol d'enzim que corresponen al 3.5% del total. L'eficiència de la immobilització és doncs del 96.5%.

Es comprova l'activitat glicosintasa de l'enzim immobilitzat fent reaccionar el fluorur d' $\alpha$ -glucosil amb el *p*-nitrofenil galactòsid en proporció 1:5 i comparant-lo amb l'activitat de l'enzim lliure en les mateixes condicions (figura 5.29).



**Figura 5.29.** Corba de progrés en condicions de velocitat inicial (fins a un 15% de conversió) per a la reacció glicosintasa entre el fluorur d' $\alpha$ -glucosil i el *p*-nitrofenil galactòsid catalitzada pel mutant E383A de la  $\beta$ -glucosidasa d'*Streptomyces* sp. lliure (en vermell) i immobilitzat (en negre). Es monitoritza la formació del producte de transglicosidació Glc $\beta$ 3GalpNP.

No s'observa pèrdua d'activitat per a l'enzim immobilitzat en fer seguiments de reacció a temps curts (1 hora).

#### 4.3.1. Estabilitat operacional i d'emmagatzemament

Atès que el present enzim presenta certa inestabilitat com a enzim lliure a 4°C, requerint la seva congelació a -20°C amb un 45% de glicerol quan es vol conservar durant un temps perllongat (Pérez-Pons et al., 1994), la seva immobilització resulta atractiva a l'hora d'obtenir un extra d'estabilitat que faciliti la seva manipulació. La seva estabilitat s'estudia a nivell d'emmagatzemament i d'operació, després de ser emprat en múltiples cicles de conversió, per a verificar les possibilitats de reutilització d'aquest.

Pel que fa a l'estabilitat d'emmagatzemament, diverses mostres d'enzim immobilitzat (162  $\mu$ g enzim/20 mg de reïna) es conserven a 4°C durant períodes de temps diferents, després dels quals es verifica la seva activitat incubant-les amb fluorur d' $\alpha$ -glicosil i *p*-nitrofenil glucòsid a 35°C. La reacció s'atura a les 5 hores per centrifugació i el producte de condensació format es quantifica per HPLC. Les dades d'estabilitat d'emmagatzemament (taula 5.30) mostren que l'enzim immobilitzat manté el 80% de l'activitat inicial després de 54 dies de conservació.

L'estabilitat operacional s'estudia després de 9 cicles de reutilització, en la reacció abans esmentada, per a tres mostres d'enzim immobilitzat (108  $\mu$ g enzim/20 mg de reïna). Entre cada

**CAPÍTOL 5. ESTUDI DE L'ESPECIFICITAT PER SUBSTRAT I DE LA IMMOBILITZACIÓ DEL MUTANT E383A DE LA  $\beta$ -GLUCOSIDASA D'*Streptomyces* sp.**

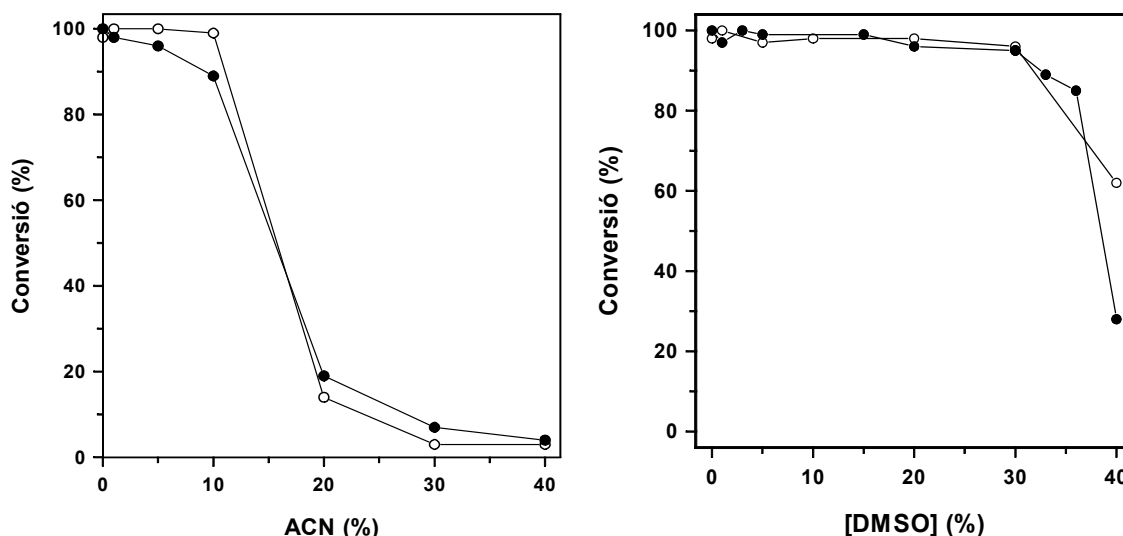
cicle l'enzim immobilitzat es conserva en tampó fosfat a 4°C durant 19 hores. Els resultats mostren que l'enzim manté l'activitat després de sotmetre'l a 9 cicles de reutilització (taula 5.30).

Estabilitat operacional				Estabilitat d'emmagatzemament	
Cicle	Activitat	Cicle	Activitat	Dia	Activitat
1	100	5	104	0	100
2	96	6	92	1	93
3	103	7	102	12	94
4	95	8	100	54	83
		9	93		

**Taula 5.30.** Activitats de transglicosidació de la glicosintasa E383A de la  $\beta$ -glucosidasa d'*Streptomyces* sp. Immobilitzada, amb el donador Glc $\alpha$ F i l'acceptor Glc $\beta$ NP després de 9 cicles de reutilització (estabilitat operacional) i 54 dies de emmagatzemament (estabilitat d'emmagatzemament). Les activitats s'expressen com a percentatge de l'activitat inicial.

**4.3.2. Estabilitat enfront de dissolvents orgànics**

Donat l'augment d'estabilitat que presenta l'enzim immobilitzat s'avalua l'efecte sobre l'activitat de l'addició de quantitats creixents de co-solvents orgànics (acetonitril i DMSO) i es compara amb el comportament de l'enzim lliure. A la figura 5.31 es mostren els perfils per ambdós dissolvents.

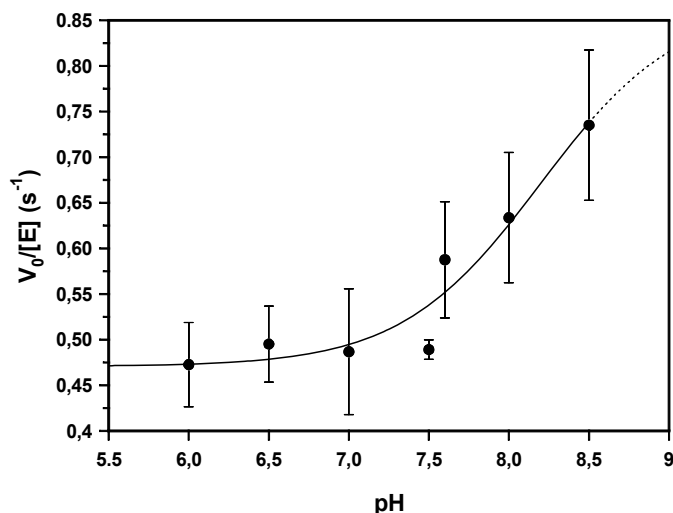


**Figura 5.31.** Rendiments per a la reacció glicosintasa amb el mutant E383A de la  $\beta$ -glucosidasa immobilitzat (●) i soluble (○). Condicions de reacció: [Glc $\alpha$ F] = 1 mM, [Glc $\beta$ NP] = 5 mM, tampó fosfat 50 mM, pH 7 i ACN o DMSO després de 20 hores de reacció.

No s'observa efecte en l'estabilitat front a dissolvents orgànics per a l'enzim immobilitzat respecte a l'enzim soluble.

#### 4.3.3. Perfil de pH

El perfil de pH de la reacció entre el fluorur d' $\alpha$ -glucosil i el *p*-nitrofenil  $\beta$ -glucòsid amb l'enzim immobilitzat, realitzat en el marge de pH entre 5.5 i 8.5 (figura 5.32), resulta comparable a l'obtingut anteriorment per a l'enzim lliure (figura 5.3), on s'obtenia un  $pK_a$  cinètic aparent per al residu base general Glu178 de 7.24 (Faijes et al., 2006). Per a l'enzim immobilitzat no es pot determinar un  $pK_a$  atès que no es pot fer extensiu l'estudi per a pHs superiors a 8.5.



**Figura 5.32.** Perfil de pH de la glicosintasa E383A d'*Streptomyces* sp. immobilitzada amb chelating sepharose – Niquel. Reacció de formació de *p*-nitrofenil laminaribiòsid. Condicions de reacció: [Glc $\alpha$ F] = 0.9 mM; [Glc $\beta$ NP] = 5 mM; [E383A] = 0.1  $\mu$ M; tampó fosfat pH 5.5 – 8.5, 35°C; temps de reacció 1 hora.

Amb tot, l'activitat glicosintasa amb l'enzim immobilitzat és òptima per a pH superior a 8, tal i com s'observava amb l'enzim soluble on s'assolia un *plateau* d'activitat a partir de pH 8.

#### 4.3.4. Especificitat de substrat de l'enzim immobilitzat

L'estudi d'especificitat per substrat donador i acceptor sobre l'enzim lliure (Faijes et al., 2006), va mostrar que el donador fluorur d' $\alpha$ -glucosil reaccionava 5 vegades més ràpid que el corresponent fluorur d' $\alpha$ -galactosil quan s'emprava Glc $\beta$ pNP com a acceptor. Pel que fa als acceptors, l'ordre de reactivitat (*p*-nitrofenilglicòsids) fou Glu > Gal ~Xyl ~ Man » Fuc.

A partir del mutant glicosintasa E383A immobilitzat sobre reïna *Chelating Sepharose* - níquel, s'assagen diferents acceptors sobre els donadors anteriors i se segueix la reacció per HPLC-UV. Els productes formats s'identifiquen per temps de retenció a partir de patrons independents.

El fluorur d' $\alpha$ -glucosil (taula 5.33) reacciona amb l'acceptor Glc $\beta$ pNP de forma quantitativa per a donar majoritàriament *p*-nitrofenil laminaribiòsid (90%), i *p*-nitrofenil cel·lobiòsid (10%). També s'observa activitat amb els acceptors galactosa, xilosa i manosa, aquest darrer amb un rendiment relativament superior als anteriors. Cal destacar que el grau de conversió observat per a l'acceptor GalpNP és inferior a l'observat amb l'enzim lliure (Faijes et al., 2006). No es detecta

**CAPÍTOL 5. ESTUDI DE L'ESPECIFICITAT PER SUBSTRAT I DE LA IMMOBILITZACIÓ DEL MUTANT E383A DE LA  $\beta$ -GLUCOSIDASA D'*Streptomyces* sp.**

producte glicosintasa amb els acceptors fucòsids ni amb l'N-acetilglucosamina. Pel que fa als acceptors disacàrids, no s'observa reacció amb el *p*-nitrofenil laminaribiòsid ni amb el Gal $\beta$ 3Glc $\beta$ pNP, on únicament s'observa producte de transglicosidació (fruit d'hidròlisi més condensació del propi acceptor). Amb el *p*-nitrofenil cel·lobiòsid, a banda dels productes d'hidròlisi i transglicosidació, es detecta formació de trisacàrid Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP amb un 25% de conversió.

ACCEPTOR	DONADOR: Glc $\alpha$ F		DONADOR: Glc $\alpha$ F	
	Producte format	<sup>a</sup> Conversió (%)	Producte format	<sup>a</sup> Conversió (%)
Glc $\beta$ pNP	Glc $\beta$ 3Glc $\beta$ pNP	89	Gal $\beta$ 3Glc $\beta$ pNP	69
	Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP	10		
Gal $\beta$ pNP	Glc $\beta$ 3Gal $\beta$ pNP	8	Gal $\beta$ 3Gal $\beta$ pNP	1
Xyl $\beta$ pNP	Glc $\beta$ 3Xyl $\beta$ pNP	3	Gal $\beta$ 3Xyl $\beta$ pNP	1
Man $\beta$ pNP	Glc $\beta$ 3Man $\beta$ pNP	18	n.d.	-
L-Fuc $\beta$ pNP	n.d.	-	n.d.	-
D-Fuc $\beta$ pNP	n.d.	-	n.d.	-
2-N-AcGlc $\beta$ pNP	n.d.	-	n.d.	-
Glc $\beta$ 3Glc $\beta$ pNP	n.d.	-	n.d.	-
Gal $\beta$ 3Glc $\beta$ pNP	Gal4Glc $\beta$ pNP	17	Gal $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP	18
Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP	Glc $\beta$ pNP	9	Glc $\beta$ pNP	12
	Glc $\beta$ 3Glc $\beta$ pNP	5	Glc $\beta$ 3Glc $\beta$ pNP	5
	Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP	25	Gal $\beta$ ?Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP	25

**Taula 5.33.** Reaccions glicosintasa del mutant E383A de la  $\beta$ -glucosidasa d'*Streptomyces* sp. Immobilitzat en Chelating Sepharose – Níquel, emprant els donadors fluorur d' $\alpha$ -glucosil i fluorur d' $\alpha$ -galactosil amb diferents acceptors *p*-nitrofenils. Condicions de reacció: [donador] = 1 mM; [acceptor] = 5 mM; [E383A] = 3  $\mu$ M; Tampó fosfat 50 mM pH 7 a 35°C; agitació orbital a 250 rpm. <sup>a</sup>Determinació de la formació de producte a 18 hores de reacció per HPLC.

Pel que fa al fluorur d' $\alpha$ -galactosil (taula 5.33), presenta en termes generals menys reactivitat que amb l'enzim soluble per als diferents acceptors assajats. Així, amb l'acceptor Glc $\beta$ pNP s'observa una conversió del 69% per a donar el producte Gal $\beta$ 3Glc $\beta$ pNP. En aquest cas no es detecta l'altre regioisòmer  $\beta$ 1,4. Amb Gal $\beta$ pNP i Xyl $\beta$ pNP es perd la poca l'activitat observada amb el donador glucosídic (conversió 1%) i no s'observa formació de producte amb Man $\beta$ pNP. Atenent als acceptors disacàrids, el comportament és idèntic a l'observat amb el donador glucosídic per als acceptors *p*-nitrofenil laminaribiòsid i Gal $\beta$ 3Glc $\beta$ pNP. Amb el *p*-nitrofenil cel·lobiòsid, a banda dels productes d'hidròlisi i transglicosidació, es detecta formació d'un trisacàrid Gal $\beta$ ?Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP amb regioselectivitat desconeguda i una conversió del 25%.

**CAPÍTOL 5. ESTUDI DE L'ESPECIFICITAT PER SUBSTRAT I DE LA IMMOBILITZACIÓ DEL MUTANT E383A DE LA  $\beta$ -GLUCOSIDASA D'*Streptomyces* sp.**

---

En resum, la immobilització de la glicosintasa E383A de la  $\beta$ -glucosidasa d'*Streptomyces* sp. no millora la seva estabilitat envers els dissolvents orgànics. Sí, en canvi, esdevé més estable que en la seva forma lliure quan s'emmagatzema a 4°C en tampó fosfat a pH 7., i permet la seva reutilització fins a 9 cicles mantenint el 90% de l'activitat inicial. Aquests dos darrers punts fan atractiu aquest enzims per a ser escalat en protocols sintètics d'oligosacàrids i glicoconjugats.







### CONCLUSIONS

- S'obtenen els dobles mutants E134A/D136E, E134A/D136N i E134A/D136A de la  $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*. La seva caracterització mostra que el seu perfil de desnaturalització és semblant a la del mutant glicosintasa E134A. L'estudi d'activitat indica que només el doble mutant E134A/D136E manté certa activitat glicosintasa, suggerint que la supressió de la càrrega negativa en el residu 136 resulta en un mutant inactiu. Només es pot determinar el perfil de pH del doble mutant E134A/D136E, observant-se un  $pK_{a1}$  semblant al del mutant E134A, i una reducció important en el  $pK_{a2}$ . La mutació D136E dóna lloc a un enzim amb un efecte estabilitzador inferior sobre el residu Glu138 i en conseqüència fa disminuir la seva activitat.
- S'obtenen els mutants E134S i E134G de la  $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*. Ambdós mutants presenten activitat glicosintasa superior a la del mutant E134A original. En termes de  $k_{cat}$ , el mutant E134S presenta una conversió inferior als mutants E134G i E134A. Malgrat això, el valor de la  $K_M$  aparent és gairebé un ordre de magnitud inferior, resultant en un increment de 5 vegades de la seva  $k_{cat}/K_M$  en comparació amb el mutant original E134A. Aquest valor de la  $K_M$  aparent suggereix la presència d'una interacció específica entre la cadena lateral de la serina i l'àtom de fluor del donador, probablement a través d'un pont d'hidrogen. El mutant glicina mostra únicament una eficiència d'1.5 vegades respecte el mutant alanina original.
- Es demostra la capacitat de la glicosintasa E134A de *Bacillus licheniformis* de sintetitzar 1,3-1,4- $\beta$ -glucans artificials per polimerització dels donadors disacàrid (**Glc $\beta$ 3Glc $\alpha$ F**), trisacàrid (**Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 3Glc $\alpha$ F**) i tetrasacàrid (**Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 3Glc $\alpha$ F**). La reacció transcorre via autocondensació dels substrats donadors, originant polisacàrids constituïts per unitats repetitives dels seus corresponents monòmers units per enllaços  $\beta$ -1,4. La morfologia del polisacàrid depèn de la unitat repetitiva que el forma; així per  $(\beta 4Glc\beta 3Glc)_n$  i  $(\beta 4Glc\beta 4Glc\beta 4Glc\beta 3Glc)_n$  s'obtenen esferulites mentre que per  $(\beta 4Glc\beta 4Glc\beta 3Glc)_n$  s'obté un precipitat amorf. Aquests polisacàrids esdevenen nous  $\beta$ -glucans amb estructures homogènies amb una proporció d'enllaços  $\beta$ -1,3 més elevada respecte els  $\beta$ -glucans existents a la natura.
- Amb el mutant glicosintasa més actiu E134S, s'observa una dependència lineal entre la concentració d'enzim i el  $M_w$  del polímer obtingut, de manera que el grau de polimerització (DP) pot ser controlable per l'activitat enzimàtica.
- Es dissenya un esquema sintètic en tàndem seqüencial de dues glicosintases per a l'obtenció d'un inhibidor hexasacàrid pel mutant E134A de la  $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*. Els intents per a l'obtenció del tetrasacàrid Gal $\beta$ 4Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 3Glc $\alpha$ F en la primera etapa del tàndem amb la glicosintasa E383A de la  $\beta$ -glucosidasa d'*Streptomyces* sp.E383A no són satisfactoris.

## CONCLUSIONS

---

- Amb la glicosintasa E134A s'obté l'octasacàrid ( $\beta$ 4Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 3Glc)<sub>2</sub> que s'empra en l'estudi d'inhibició competitiva de la reacció glicosintasa de la  $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*. A partir de l'anàlisi de Dixon, s'obté una  $K_i$  de 0.26 mM, del mateix ordre que la  $K_M$  del substrat trisacàrid Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 3Glc $\alpha$ F, indicant que l'efecte d'inhibició per producte a nivell de velocitat inicial de polimerització pot resultar molt important. Malgrat això, no afecta els rendiments a temps llargs en les reaccions de polimerització.
- La glicosintasa E383A de la  $\beta$ -glucosidasa d'*Streptomyces* sp. presenta activitat hidrolítica i de transglicosidació, fet que queda palès amb la formació de productes secundaris en la reacció glicosintasa entre el fluorur d' $\alpha$ -glucosil i el fluorur d' $\alpha$ -galactosil amb l'acceptor *p*-nitrofenil  $\beta$ -cel·lobiòsid.
- Es descarta que l'activitat hidrolítica provingui d'una contaminació de la glicosintasa E383A amb enzim wt, i es proposa que la formació d'aquests productes secundaris no esperats s'origini a través d'un mecanisme d'hidròlisi i transglicosidació assistit per anió fluorur com a nucleòfil exogen.
- Els experiments de rescat químic amb anió fluorur recolzen la hipòtesi plantejada sobre la reacció d'hidròlisi assistida per anió fluorur. Tanmateix és necessària una concentració de 300 mM en fluorur per observar-se recat; aquest valor es troba molt allunyat de la concentració de fluorur que pot estar present en les reaccions glicosintasa realitzades. Per tant, tan sols un fenomen de generació *in situ* en el centre actiu podria explicar la diferència de concentracions.
- S'immobilitza amb èxit la glicosintasa E383A de la  $\beta$ -glucosidasa d'*Streptomyces* sp. Sobre l'enzim immobilitzat no s'observa millora de la seva estabilitat envers els dissolvents orgànics. Sí, en canvi, millora en quan a estabilitat d'emmagatzemament a 4°C i pH 7 en comparació amb la seva forma lliure i permet la seva reutilització fins a 9 cicles mantenint el 90% de l'activitat inicial.

## **PART EXPERIMENTAL**



## I. Síntesi de substrats glicosídics

### 1. Mètodes generals

#### 1.1. Assecat de dissolvents i obtenció de reactius

Els dissolvents es purifiquen i conserven sota condicions recomanades (Armarego & Perrin, 1997).

- Acetona i acetat d'etil: s'assecat sobre carbonat de potassi, seguit de destil·lació fraccionada.
- Ciclohexà i cloroform: assecat sobre clorur de calci seguit de destil·lació fraccionada.
- Clorur de metilè: Assecat amb pentòxid de fòsfor, seguit de destil·lació fraccionada i recol·lecció sobre tamisos moleculars de 4 Å.
- N,N-dimetilformamida (DMF): Es deixa agitant sobre BaO durant 24 hores. Es filtra i es destil·la a pressió reduïda (~7.5 mmHg) i 70°C. Es recull sobre tamisos de 4Å prèviament activats.
- Piridina: assecat amb KOH, seguit de destil·lació fraccionada.
- Metanol anhidre: assecat amb magnesi/iodo (5/0.5 w/w), seguit de destil·lació i conservació sota atmosfera de nitrogen.
- Obtenció de metòxid de sodi en metanol: un fragment de sodi emmagatzemat en toluè s'introdueix en metanol per a netejar la seva superfície. Se'n pesa la quantitat necessària sobre toluè. A continuació, el sodi s'introdueix dins un matràs amb una quantitat coneguda de metanol anhidre sota atmosfera de nitrogen. S'utilitza immediatament.
- Reïna de bescanvi iònic Amberlyst® 15 (H<sup>+</sup>) (Fluka): es renta successives vegades amb metanol anhidre fins que el líquid de rentat és incolor transparent. Es regenera la reïna amb HCl diluït per restituir els protons cedits en la neutralització i desplaçar-hi els cations ancorats.
- Tamisos moleculars de 4Å: s'escalfen a 120°C a l'estufa durant almenys 3 hores. S'emmagatzemen en dessecador de CaCl<sub>2</sub>.

#### 1.2. Separacions cromatogràfiques

##### Cromatografia de capa fina

El seguiment de les reaccions i les separacions per cromatografia flash s'han dut a terme per cromatografia de capa fina, utilitzant plaques de gel de sílice sobre suport d'alumini (aluminum sílica gel 60 F<sub>254</sub>, Merck).

Els productes es detecten per observació amb llum UV a 254 nm o per revelat amb H<sub>2</sub>O/MeOH/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (500:450:50) i posterior calefacció a 125°C durant 5 minuts.

##### Cromatografia de columna

Cromatografia flash de fase normal: s'empra gel de sílice (SDS) de mida de partícula 35-70 µm com a adsorbent. La columna es farceix d'adsorbent sec per succió. S'utilitza una relació aproximada pes de sílice:pes de cru de 60:1 (g). Es compacta amb la mescla de dissolvents que s'empra en la separació. Aquesta mescla conté unes gotes de trietilamina per a neutralitzar l'acidesa de la sílice. S'elueix sota pressió de N<sub>2</sub> sec a un flux aproximat de 50 mL·min<sup>-1</sup>. La mostra s'introdueix dissolta en la menor quantitat possible d'eluent, en el component més apolar de l'eluent, en un altre dissolvent en el qual presenti un R<sub>F</sub> = 0, o bé per càrrega seca. Les fraccions es recullen manualment.

Cromatografia de fase normal o fase reversa amb columnes pre-empaquetades Lobar® Lichroprep RP-18 i Si-60 40 - 63 µm de diferents mides (Merck). S'empra una bomba de

pulsacions Micro g/5 (Prominent) i un col·lector de fraccions automàtic Redifrac (GE Healthcare).

### 1.3. Liofilització

Tècnica d'assecat emprada en productes sensibles a la temperatura. El producte es manté a -50°C i pressió reduïda mentre s'elimina l'aigua per sublimació. La liofilització dels substrats sintetitzats es realitza amb un liofilitzador Cryodos-45 (TELSTAR).

### 1.4. Dades espectroscòpiques

Els espectres de  $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN, COSY, HMBC y HSQC han estat enregistrats en un espectròmetre Varian-Gemini-300 i Varian-500 pel Dr. X. Batllori, del Departament de Química Orgànica de l'Institut Químic de Sarrià.

Pels oligosacàrids acetilats s'ha emprat  $\text{CDCl}_3$  com a dissolvent i pels des-O-acetilats  $\text{D}_2\text{O}$ . Els valors de  $\delta$  es presenten com a relatius al senyal de referència dels protons del tetrametilsilà ( $\delta = 0$  ppm). Quan s'ha utilitzat  $\text{D}_2\text{O}$  com a dissolvent la referència s'ha substituït pel d4TSPNa. Pel que fa als espectres de  $^{13}\text{C}$ -RMN, els valors de  $\delta$  es presenten com a relatius al senyal de referència del carboni del  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta = 77$  ppm) i quan s'empra  $\text{D}_2\text{O}$  com a dissolvent, la referència és el MeOH ( $\delta = 49.5$  ppm).

Pel que fa als polisacàrids s'ha emprat  $[\text{H}^2]\text{DMSO}$  com a dissolvent. Pels espectres de  $^1\text{H}$ -RMN s'ha utilitzat el senyal central (2.49 ppm) del multiplet de  $[\text{H}^1]\text{DMSO}$  com a referència. Pels espectres de  $^{13}\text{C}$ -RMN, s'ha emprat el senyal central (39.5 ppm) del multiplet corresponent a  $[\text{H}^2]\text{DMSO}$  com a referència.

Als espectres d' $^1\text{H}$ -RMN s'indica entre parèntesi el tipus de senyal: singlet (s), doblet (d), doblet de doblets (dd), triplet (t), quadriplet (q), multiplet o senyal complex (m). A continuació, s'indiquen el número de protons, les constants d'acoblament (J) expressades en Hz i la seva assignació.

Els sacàrids sintetitzades que tenen més d'un anell de piranosa, es nomenen emprant els subíndex I, II, III,... començant per l'extrem reductor.

## 2. Digestió enzimàtica de polisacàrids amb enllaços mixtes $\beta$ -(1,3), $\beta$ -(1,4)

### 2.1. Degradació enzimàtica del $\beta$ -glucà d'ordi

Es dissolen 20 g de  $\beta$ -glucà d'ordi de viscositat intermitja (Megazyme, 225 kDa) en 2.5 L de tampó citrat 0.65 mM-fosfat 8.72 mM (pH 7.2), afegint lentament el sòlid sobre el líquid a 55 °C i en agitació. S'escalfa progressivament des de 50°C fins a 90°C i es manté en aquesta temperatura 15 min fins que s'hagi dissolt tot el  $\beta$ -glucà. Es refreda la dissolució a 50°C i s'addicionen 400  $\mu\text{g}$  del mutant M58A de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* dissolts en 800  $\mu\text{L}$  del mateix tampó. S'agita en incubador orbital a 250 rpm a 50°C durant 7 h. La reacció se segueix per CCF (1-propanol/nitrometà/aigua 5:3:2) observant-se al final de reacció l'existència majoritària de dos compostos.

S'elimina bona part del dissolvent a pressió reduïda i es liofilitza el cru obtenint-se 30.2 g.

### 2.2. Acetilació del cru de digestió i aïllament del trisacàrid i tetrasacàrid per-O-acetilats

Sobre 19.8 g de cru de degradació de  $\beta$ -glucà d'ordi s'afegeixen 500 mL d' $\text{Ac}_2\text{O}$ /piridina (1:1 v/v), i s'agita a temperatura ambient durant 27 h en matràs tapat, protegit de la llum amb paper d'alumini i de la humitat amb un tub de  $\text{CaCl}_2$ . El cru de reacció passa d'una tonalitat groguenca a marró al llarg d'aquest temps. L'acetilació se segueix per CCF ( $\text{AcOEt}/\text{Cy}$  2:1).

S'aboca el cru de reacció sobre 500 mL d'aigua-gel i s'agita durant 1 h. El sòlid blanc precipitat es filtra i es redissol en  $\text{CHCl}_3$ , es renta amb aigua i s'asseca amb  $\text{MgSO}_4$  anhidre. D'altra banda, el filtrat obtingut també s'extreu amb  $\text{CHCl}_3$ , es renta amb aigua i s'asseca amb  $\text{MgSO}_4$  anhidre. S'ajunten les fases orgàniques obtingudes i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda. S'addiciona toluè i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda. Es repeteix aquest procés diverses vegades fins a eliminar tota la piridina que pugui contenir els extractes orgànics. Finalment, es dissol el residu amb èter diisopropílic i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda. Resta un sòlid d'aspecte esponjós.

S'obtenen 11.59 g de cru que es purifiquen per cromatografia flash de fase normal en dos lots.

#### Columna 1

Fase estacionària: 500 g de sílice (neutralitzada amb 3 mL de  $\text{Et}_3\text{N}$ )

Càrrega: 6 g de producte dissolt en el mínim volum de  $\text{CHCl}_3$ .

Eluent:  $\text{AcOEt}/\text{Cy}$  1:1  $\rightarrow$  2:1

Seguiment: per CCF (eluent  $\text{AcOEt}/\text{Cy}$  2:1).

Resultat: separació satisfactòria.

fracció	producte	quantitat (g)
1	$(\text{Glc}\beta_4\text{Glc}\beta_3\text{Glc})_{\text{Ac}}$	2.79
2	Barreja	0.72
3	$(\text{Glc}\beta_4\text{Glc}\beta_4\text{Glc}\beta_3\text{Glc})_{\text{Ac}}$	0.92
4	Sacàrids d'ordre superior	0.58

Taula I.1. Resultats de la separació cromatogràfica corresponent a la columna 1.

#### Columna 2

Fase estacionària: 500 g de sílice (neutralitzada amb 3 mL de  $\text{Et}_3\text{N}$ ).

Càrrega: 5.59 g de producte dissolt en el mínim volum de  $\text{CHCl}_3$ .

Eluent:  $\text{AcOEt}/\text{Cy}$  1:1  $\rightarrow$  2:1

Seguiment: per CCF (eluent  $\text{AcOEt}/\text{Cy}$  2:1).

Resultat: separació satisfactòria.

El seguiment de la columna i identificació de productes es realitza per CCF ( $\text{AcOEt}/\text{Cy}$  2:1) amb mostres independents.

Per la columna 2 s'obtenen quatre fraccions com s'indica a la taula I.2.

fracció	producte	quantitat (g)
1	$(\text{Glc}\beta_4\text{Glc}\beta_3\text{Glc})_{\text{Ac}}$	2.58
2	mescla	0.56
3	$(\text{Glc}\beta_4\text{Glc}\beta_4\text{Glc}\beta_3\text{Glc})_{\text{Ac}}$	0.89
4	sacàrids d'ordre superior	0.58

Taula I.2. Resultats de la separació cromatogràfica corresponent a la columna 2.

La fracció 1 d'ambdues columnes s'identifica com *O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*-(2,3,6-tri-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 3)-1,2,4,6-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-glucopiranososa (1, mescla d'anòmers  $\alpha$  i  $\beta$  en proporció 40:60) per comparació amb mostres independents (CCF mixta) i es confirma per  $^1\text{H-RMN}$  i  $^{13}\text{C-RMN}$ .

Les dades espectroscòpiques del producte (**Glcβ4Glcβ3Glc**)<sub>Ac</sub> s'indiquen a continuació:

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 1.95-2.19 (m, 33H, CH<sub>3</sub>CO), 3.57-5.16 (m, 20H, H-1<sup>II,III</sup>, H-2<sup>I,III</sup>, H-3<sup>I,III</sup>, H-4<sup>I,III</sup>, H-5<sup>I,III</sup>, H-6a<sup>I,III</sup>, H-6b<sup>I,III</sup>), 5.60 (d, *J*<sub>1,2</sub> 8.4 Hz, 0.6H, H-1<sup>β</sup>), 6.23 (d, *J*<sub>1,2</sub> 3.7 Hz, 0.4H, H-1<sup>α</sup>).

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 20.4-21.1 (CH<sub>3</sub>CO), 61.5, 62.1 (C-6<sup>I,III</sup>), 67.4-72.8 (C-2<sup>I,III</sup>, C-3<sup>II,III</sup>, C-4<sup>I,III</sup>, C-5<sup>I,III</sup>), 76.1, 76.2, 79.0 (C-3<sup>α</sup>, C-3<sup>β</sup>, C-4<sup>II</sup>), 89.1 (C-1<sup>α</sup>), 91.7 (C-1<sup>β</sup>), 100.7-100.9 (C-1<sup>II,III</sup>), 168.5-170.5 (CH<sub>3</sub>CO).

La fracció 3 d'ambdues columnes s'identifica com O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-(1→4)-O-(2,3,6-tri-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-(1→4)-O-(2,3,6-tri-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-(1→3)-1,2,4,6-tetra-O-acetil-α-D-glucopiranosil (mescla d'anòmers α i β en proporció 40:60) per comparació amb mostres independents (CCF mixta) i es confirma per <sup>1</sup>H-RMN i <sup>13</sup>C-RMN.

Les dades espectroscòpiques del producte (**Glcβ4Glcβ4Glcβ3Glc**)<sub>Ac</sub> s'indiquen a continuació:

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 1.96-2.18 (m, 42H, CH<sub>3</sub>CO), 3.55-5.16 (m, 26H, H-1<sup>II,IV</sup>, H-2<sup>I,IV</sup>, H-3<sup>I,IV</sup>, H-4<sup>I,IV</sup>, H-5<sup>I,IV</sup>, H-6a<sup>I,IV</sup>, H-6b<sup>I,IV</sup>), 5.60 (d, *J*<sub>1,2</sub> 8.4 Hz, 0.6H, H-1<sup>β</sup>), 6.23 (d, *J*<sub>1,2</sub> 3.7 Hz, 0.4H, H-1<sup>α</sup>).

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 20.4-21.0 (CH<sub>3</sub>CO), 61.5-62.1 (C-6<sup>I,IV</sup>), 67.4-72.8 (C-2<sup>I,IV</sup>, C-3<sup>II,IV</sup>, C-4<sup>I,IV</sup>, C-5<sup>I,IV</sup>), 76.0, 76.2, 76.3, 79.0 (C-3<sup>α</sup>, C-3<sup>β</sup>, C-4<sup>II,III</sup>), 89.1 (C-1<sup>α</sup>), 91.7 (C-1<sup>β</sup>), 100.6-100.9 (C-1<sup>II,IV</sup>), 168.5-170.5 (CH<sub>3</sub>CO).

S'ajunten les fraccions corresponents al mateix producte d'ambdues columnes, s'elimina el dissolvent a pressió reduïda i es conserven -20 °C.

### 3. Síntesi de donadors glicosídics: fluorurs de glicosil

#### 3.1 Síntesi de fluorur d'α-D-glucopiranosil

##### A. Síntesi de fluorur de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-α-D-glucopiranosil

Metòdica general:

Es pesen **A** g de 1,2,3,4,6-penta-O-acetil-β-D-glucopiranosid en un tub de polipropilè equipat amb una barreta agitadora i s'hi estableix atmosfera de N<sub>2</sub>. S'hi addicionen **B** mL de HF/Py (70%), en l'interior d'una atmòsfera i es deixa en agitació a temperatura ambient i sota atmosfera inert durant unes 4-5 hores.

Es dilueix el cru en CHCl<sub>3</sub> (50 mL) i es neutralitza amb una dissolució saturada de NaHCO<sub>3</sub> (5 x 10 mL) fins a neutralitat de la fase orgànica. Es renta amb H<sub>2</sub>O desionitzada (2 x 10 mL), s'ajunten les fases aquoses i es repeteix tot el procés.

Es comprova la neutralitat de les fases orgàniques, que s'ajunten i s'assequen amb MgSO<sub>4</sub>. S'elimina el dissolvent a pressió reduïda (amb addició de toluè per a arrossegar la piridina present) i s'asseca al buit.

Per CCF (AcOEt: Cy 1:1) s'observen tres senyals: el producte de partida, el producte d'interès i una impuresa més polar. El cru de reacció es purifica mitjançant cromatografia flash de fase normal, carregant-se dissolt en la mínima quantitat possible de CHCl<sub>3</sub> i utilitzant com a eluent AcOEt/Cy (1:1).



A continuació es mostren els resultats obtinguts en els experiments realitzats:

Exp.	A (g)	B (mL)	t <sub>reacció</sub> (h)	Rdt. (%)
1	4,8	5	4,5	25
2	1,43	1,5	5	45
XP007	2,00	5	4	65

Taula I.3: Resultats obtinguts en la síntesi del fluorur de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-glucopiranosil.

### B. Síntesi del fluorur d' $\alpha$ -D-glucopiranosil

Metòdica general:

Es pesen **A** mg de fluorur de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-glucopiranosil i s'hi addicionen **B** mL de MeOH anhidre sota atmosfera de N<sub>2</sub>. Es deixa en agitació fins a dissolució del producte.

Un cop dissolt, s'hiafegeixen **C** mL de MeONa/MeOH 1 M (un equivalent per equivalent d'O-acetil) i es deixa la reacció a 0°C.

Mitjançant seguiment per CCF (eluent CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 4:1) es comprova que la reacció hagi estat quantitativa.

El cru de reacció es neutralitza per filtració sobre Amberlyst® 15 (H<sup>+</sup>) rentada amb MeOH i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda. A continuació es redissol el producte en aigua MilliQ, es congela immediatament en CO<sub>2</sub> i es liofilitza.

Els resultats obtinguts en els quatre experiments realitzats es resumeixen a la taula següent:

Exp.	A (mg)	B (mL)	C (mL)	t <sub>reacció</sub> (h)	Rdt. (%)
XP019	150 (0.4275 mmol)	50	1.7 (1.7 mmol, 32 mM)	1.75	94

Taula I.4: Resultats obtinguts en desacetilació per transesterificació de Zemplen del fluorur de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-glucopiranosil.

El producte s'identifica com a fluorur d' $\alpha$ -D-glucopiranosil a partir de les seves dades espectroscòpiques:

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 5.82 (dd, 1H, J<sub>1,2</sub>=2.7 Hz, J<sub>1,F</sub>=53.3 Hz, H-1); 5.55 (dd, 1H, J<sub>4,5</sub>=1.1 Hz, J<sub>4,3</sub>=3.1 Hz, H-4); 5.39 (dd, 1H, J<sub>3,4</sub>=3.2 Hz, J<sub>3,2</sub>=10.9 Hz, H-3); 5.21 (ddd, 1H, J<sub>2,1</sub>=2.7 Hz, J<sub>2,3</sub>=10.9 Hz, J<sub>2,F</sub>=23.6 Hz, H-2); 4.43 (dt, J<sub>5,4</sub>=1 Hz, J<sub>5,6a</sub> i <sub>5,6b</sub>=76.9 Hz, H-5); 4.1-4.25 (m, 2H, H-6a i b); 2-2.3 (m, 12H, CH<sub>3</sub>CO).

### 3.2. Síntesi de fluorur d' $\alpha$ -D-galactopiranosil

#### A. Síntesi de fluorur de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-galactopiranosil

Metòdica general:

Es pesen **A** g de 1,2,3,4,6-penta-O-acetil- $\beta$ -D-galactopiranosid en un tub de polipropilè amb agitació magnètica i s'hi estableix atmosfera de nitrogen (mitjançant l'Atmosbag®). S'hi addicionen **B** mL de HF/py (70%) i es deixa en agitació a temperatura ambient i sota atmosfera inert durant unes 4-5 hores.

Es dilueix el cru en CHCl<sub>3</sub> (50 mL) i es neutralitza amb una dissolució saturada de NaHCO<sub>3</sub> (5 x 10 mL) fins a neutralitat de la fase orgànica. Es renta amb H<sub>2</sub>O desionitzada (2 x 10 mL), s'ajunten les fases aquoses i es repeteix tot el procés.

Es comprova la neutralitat de les fases orgàniques, que s'ajunten i s'assequen amb MgSO<sub>4</sub>. S'elimina el dissolvent a pressió reduïda (amb addició de toluè per a arrossegar la piridina present) i s'asseca al buit.

Per CCF (AcOEt: Cy 1:1) s'observen tres senyals: el producte de partida, el producte d'interès i una impuresa més polar. El cru de reacció es purifica mitjançant cromatografia flash de fase normal, carregant-se dissolt en la mínima quantitat possible de CHCl<sub>3</sub> i utilitzant com a eluent AcOEt/Cy (1:1).

A continuació es mostren els resultats obtinguts en els dos experiments realitzats:

Exp.	A (g)	B (mL)	t <sub>reacció</sub> (h)	Rendiment (%)
1	4	5	4	50
2	4	5	4.5	55
XP036	2,01	5	6	62

**Taula I.5:** Resultats obtinguts en la síntesi del fluorur de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-galactopiranosil (5).

El producte final (fluorur de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-galactopiranosil), s'identifica per espectroscòpia de <sup>1</sup>H-RMN:

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 5.82 (dd, 1H, J<sub>1,2</sub>=2.7 Hz, J<sub>1,F</sub>=53.3 Hz, H-1); 5.55 (dd, 1H, J<sub>4,5</sub>=1.1 Hz, J<sub>4,3</sub>=3.1 Hz, H-4); 5.39 (dd, 1H, J<sub>3,4</sub>=3.2 Hz, J<sub>3,2</sub>=10.9 Hz, H-3); 5.21 (ddd, 1H, J<sub>2,1</sub>=2.7 Hz, J<sub>2,3</sub>=10.9 Hz, J<sub>2,F</sub>=23.6 Hz, H-2); 4.43 (dt, J<sub>5,4</sub>=1 Hz, J<sub>5,6a</sub> i <sub>5,6b</sub>=76.9 Hz, H-5); 4.1-4.25 (m, 2H, H-6a i b); 2-2.3 (m, 12H, CH<sub>3</sub>CO).

## B. Síntesi de fluorur d' $\alpha$ -D-galactopiranosil

Metòdica general:

Es pesen **A** mg de fluorur de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-galactopiranosid i s'hi addicionen **B** mL de MeOH anhidre sota atmosfera de N<sub>2</sub>. Es deixa en agitació fins a dissolució del producte.

Un cop dissolt, s'hi afegeixen **C** mL de MeONa/MeOH 1 M (un equivalent per equivalent d'O-acetil) i es deixa la reacció a 0°C.

Mitjançant seguiment per CCF (eluent CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 4:1) es comprova que la reacció hagi estat quantitativa.

El cru de reacció es neutralitza per filtració sobre Amberlyst® 15 (H<sup>+</sup>) rentada amb MeOH i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda. A continuació es redissol el producte en aigua MilliQ, es congela immediatament en CO<sub>2</sub> i es liofilitza.

Els resultats obtinguts en els quatre experiments realitzats es resumeixen a la taula següent:

Exp.	A (mg)	B (mL)	C (mL)	t <sub>reacció</sub> (h)	Rdt. (%)
1	150 (0.428 mmol)	50	2.3 (2.3 mmol, 45 mM)	1	80
2	600 (1.71 mmol)	222	6.8 (6.8 mmol, 30 mM)	1.5	150*
3	600 (1.71 mmol)	222	6.8 (6.8 mmol, 30 mM)	1.5	100
4	317 (0.905 mmol)	142	3.7 (3.7 mmol, 25 mM)	1.5	98
5	317 (0.905 mmol)	142	3.7 (3.7 mmol, 25 mM)	1.5	99
7	250 (0.714 mmol)	50	2.8 (2.8 mmol, 53 mM)	1.5	42

**Taula I.6:** Resultats obtinguts en desacetilació per transesterificació de Zemplen del fluorur de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-galactopiranosil. \*En l'experiment 2 s'obté un producte de coloració groguenca indicant la presència d'impureses.

El producte s'identifica com a fluorur d' $\alpha$ -D-galactopiranosid a partir de les seves dades espectroscòpiques:

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, D<sub>2</sub>O): 5.61 (dd, 1H, J<sub>1,2</sub> = 2.7 Hz, J<sub>1,F</sub> = 53.3 Hz, H-1); 3.5-4 (m, 6H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6a i b).

<sup>13</sup>C-RMN (75.45 MHz, D<sub>2</sub>O): 108.6 (d, J<sub>1,F</sub> = 225 Hz, C-1); 75 (d, J<sub>5,F</sub> = 4.2 Hz, C-3); 69.8, 69.6 (C-4, C-5); 68.8 (d, J<sub>2,F</sub> = 25 Hz C-2); 61 (s, C-6).

### 3.3. Obtenció del fluorur d'α-laminaribiosil

#### A. Fluorur d'O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-(1→3)-2,4,6-tri-O-acetil-α-D-glucopiranosil

Sobre 708 mg (1.04 mmol) de (Glcβ3Glc)Ac<sub>8</sub>, en un tub de polipropilè on s'ha establert atmosfera de nitrogen, s'afegeixen aproximadament 10 mL de HF/Py 70% a una temperatura controlada de -55°C. Es deixa amb agitació magnètica amb bany d'èter diisopropílic i CO<sub>2</sub> i sota atmosfera de nitrogen durant 3 h, finalment es deixa una altra hora que assoleixi temperatura ambient.

El cru de reacció es dilueix amb CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 mL) i s'aboca lentament sobre 100 mL d'una dissolució de NH<sub>3(aq)</sub> 3M. Es comprova que la dissolució final tingui un pH entre 5-6. La fase orgànica es neutralitza amb una dissolució aquosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> (3x10 mL) i es renta amb H<sub>2</sub>O (1x10 mL). El residu de fase aquosa s'extreu amb CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x10 mL). S'ajunten les fases orgàniques, s'assequen amb Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidre i es filtra. S'elimina el clorur de metilè a pressió reduïda i després s'addiciona toluè diverses vegades per eliminar la piridina.

Per CCF (AcOEt/Cy 1:1) es comprova que la fluoració no ha estat completa, sinó que hi ha presència de (Glcβ3Glc)Ac<sub>8</sub> i (Glcβ3Glc)Ac<sub>7</sub>αF.

S'obtenen 550 mg que es purifiquen per cromatografia flash de fase normal:

Fase estacionària: 100 g de sílice (neutralitzada amb 3 mL de Et<sub>3</sub>N).

Càrrega: 550 mg de producte dissolt en el mínim volum de CHCl<sub>3</sub>.

Eluent: AcOEt/Cy 2:1

Seguiment: per CCF (eluent AcOEt/Cy 2:1).

Resultats: s'observa que la separació ha estat satisfactòria.

El seguiment de la columna i identificació de productes es realitza per CCF (AcOEt/Cy 2:1) amb mostres independents.

S'obtenen dues fraccions com s'indica a la **taula I.7**:

fracció	producte	quantitat (mg)
1	(Glcβ3Glc)AcαF	364
2	(Glcβ3Glc)Ac <sub>8</sub> + (Glcβ3Glc)AcαF	186

**Taula I.7:** Fraccions obtingudes en la separació cromatogràfica del cru de fluoració del producte (Glcβ3Glc)Ac<sub>8</sub>.

La fracció 1 s'identifica com a fluorur d'O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-(1→3)-2,4,6-tri-O-acetil-α-D-glucopiranosil per comparació amb mostres independents (CCF mixta) i es confirma per <sup>1</sup>H-RMN i <sup>13</sup>C-RMN. S'obtenen 364 mg (η = 55 %).

Les dades espectroscòpiques del producte **(Glcβ3Glc)AcαF** s'indiquen a continuació:

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 1.98-2.20 (m, 21H, CH<sub>3</sub>CO), 3.71 (ddd, J<sub>5,4</sub> 9.7 Hz, J<sub>5,6a</sub> 2.3 Hz, J<sub>5,6b</sub> 4.3 Hz, 1H, H-5' o H5<sup>ll</sup>), 4.04-4.21 (m, 5H, H-2<sup>ll</sup>, H-5' o H-5<sup>ll</sup>, H-6a<sup>ll</sup>, H-6b' o H-6b<sup>ll</sup>), 4.38 (dd, J<sub>5,6b</sub> 4.4 Hz, J<sub>gem</sub> 12.4 Hz, 1H, H-6b' o H-6b<sup>ll</sup>), 4.67 (d, J<sub>1,2</sub> 8.1 Hz, 1H, H-1<sup>ll</sup>), 4.88-4.18 (m, 5H, H-2<sup>l</sup>, H-3<sup>ll</sup>, H-4<sup>ll</sup>), 5.67 (dd, J<sub>1,F</sub> 53.2 Hz, J<sub>1,2</sub> 2.7 Hz, 1H, H-1<sup>l</sup>).

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 20.4-20.8 (CH<sub>3</sub>CO), 61.4, 61.7 (C-6<sup>II</sup>), 66.8, 68.0 (C-4<sup>I,II</sup>), 70.1 (d, *J*<sub>5,F</sub> 4 Hz, C-5<sup>I</sup>), 71.3, 71.8, 72.9 (C-2<sup>II</sup>, C-3<sup>II</sup>, C-5<sup>II</sup>), 72.1 (d, *J*<sub>2,F</sub> 24 Hz, C-2<sup>I</sup>), 75.6 (C-3<sup>I</sup>), 100.8 (C-1<sup>II</sup>), 104.0 (d, *J*<sub>1,F</sub> 226 Hz, C-1<sup>I</sup>), 168.9-170.5 (CH<sub>3</sub>C=O).

El producte (Glcβ3Glc)Ac<sub>7</sub>αF es conserva a -20°C i protegit de la llum. La mescla obtinguda en la fracció 2 també es guarda -20°C per ser utilitzada de nou en treballs posteriors.

### B. Fluorur d'O-β-D-glucopiranosil-(1→3)-α-D-glucopiranosil.

364 mg (0.57 mmol) de (Glcβ3Glc)Ac<sub>7</sub>αF es dissolen en 50 mL de MeOH anhidre. S'afegeixen 4 mL de NaOMe/MeOH 1 M (4 mmol) preparat al moment. Es deixa agitant a 0°C i sota atmosfera de nitrogen. La reacció es controla per CCF (CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 8:2). Al cap d'1 h la reacció és quantitativa.

El cru de reacció es neutralitza per filtració sobre una reïna de bescanvi iònic Amberlyst®-15 (H<sup>+</sup>) rentada amb MeOH anhidre. Seguidament s'elimina el MeOH a pressió reduïda, es dissol el producte en aigua MilliQ i immediatament es congela en CO<sub>2</sub> per a ser liofilitzat.

El producte obtingut s'identifica com fluorur d'O-β-D-glucopiranosil-(1→3)-α-D-glucopiranosil per comparació amb mostres independents (CCF mixta) i es confirma per <sup>1</sup>H-RMN i <sup>13</sup>C-RMN. S'obtenen 125 mg (η = 64 %) de fluorur d'O-β-D-glucopiranosil-(1→3)-α-D-glucopiranosil (Glcβ3GlcαF).

Les dades espectroscòpiques del producte **Glcβ3GlcαF** liofilitzat s'indiquen a continuació:

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, D<sub>2</sub>O): 3.33-4.00 (m, 12H, H-2<sup>I,II</sup>, H-3<sup>I,II</sup>, H-4<sup>I,II</sup>, H-5<sup>I,II</sup>, H-6a<sup>I,II</sup>, H-6b<sup>I,II</sup>), 4.73 (d, *J*<sub>1,2</sub> 7.8 Hz, 1H, H-1<sup>II</sup>), 5.70 (dd, *J*<sub>1,F</sub> 53.3 Hz, *J*<sub>1,2</sub> 2.7 Hz, 1H, H-1<sup>I</sup>).

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, D<sub>2</sub>O): 60.7(C-6<sup>I</sup>), 61.3 (C-6<sup>II</sup>), 67.7 (C-4<sup>I</sup>), 70.2 (C-4<sup>II</sup>), 71.3 (d, *J*<sub>2,F</sub> 25 Hz, C-2<sup>I</sup>), 74.0 (C-2<sup>II</sup>), 74.6 (d, *J*<sub>5,F</sub> 3.4 Hz, C-5<sup>I</sup>), 76.2, 76.6 (C-3<sup>II</sup>, C-5<sup>II</sup>), 81.7 (C-3<sup>I</sup>), 103.3 (C-1<sup>II</sup>), 107.9 (d, *J*<sub>1,F</sub> 221 Hz, C-1<sup>I</sup>).

El producte s'emmagatzema a -20°C i protegit de la llum.

### 3.4. Síntesi dels fluorurs de trisacàrid (Glcβ4Glcβ3GlcαF) i tetrtrasacàrid (Glcβ4Glcβ4Glcβ3GlcαF)

#### 3.4.1. Síntesi de fluorur d'O-β-D-glucopiranosil-(1→4)-O-β-D-glucopiranosil-(1→3)-α-D-glucopiranosid per fluoració directa.

#### A. Síntesi de fluorur d'O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-(1→4)-O-(2,3,6-tri-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-(1→3)-2,4,6-tri-O-acetil-α-D-glucopiranosid.

Metòdica general:

Es pesen **A** g d'O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-(1→4)-O-(2,3,6-tri-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-(1→3)-1,2,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosid en un tub de polipropilè amb agitació magnètica i s'hi estableix atmosfera de nitrogen (mitjançant l'Atmosbag®). S'hi addicionen **B** mL de HF/py (70%) a una temperatura controlada menor a 0°C i es deixa en agitació a temperatura ambient i sota atmosfera inert durant unes 4-5 hores.

Es dilueix el cru en CHCl<sub>3</sub> (50 mL) i es neutralitza amb una dissolució saturada de NaHCO<sub>3</sub> (5x10 mL) fins a neutralitat de la fase orgànica. Es renta amb H<sub>2</sub>O desionitzada (2x10mL), s'ajunten les fases aquoses i es repeteix tot el procés.

Es comprova la neutralitat de les fases orgàniques, que s'ajunten i s'assequen amb MgSO<sub>4</sub>. S'elimina el dissolvent a pressió reduïda (amb addició de toluè per a arrossegar la piridina present) i s'asseca al buit.

Per CCF (AcOEt:Cy 2:1) s'observen tres senyals: el producte de partida, el producte d'interès i una impuresa més polar. El cru de reacció es purifica mitjançant cromatografia flash de fase normal, carregant-se dissolt en la mínima quantitat possible de CHCl<sub>3</sub> i utilitzant com a eluent AcOEt/Cy (2:1).

A continuació es mostren els resultats obtinguts en els dos experiments realitzats:

Exp.	A (g)	B (mL)	t <sub>reacció</sub> (h)	Rdt. (%)
1	4.8	5	4.5	25
2	1.43	1.5	5	45
3	3.55	10	4	53

**Taula I.8:** Resultats obtinguts en la síntesi del fluorur d'O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-(1→4)-O-(2,3,6-tri-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-(1→3)-2,4,6-tri-O-acetil-α-D-glucopiranosid.

El producte **(Glcβ4Glcβ3Glc)<sub>10</sub>αF** s'identifica a partir de les seves dades espectroscòpiques:

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 5.67 (dd, 1H, J<sub>1,2</sub> = 2.6 Hz, J<sub>1,F</sub> = 53.3 Hz, H-1'), 3.61-5.19 (m, 20H, H-1<sup>II,III</sup>, H-2<sup>I,III</sup>, H-3<sup>I,III</sup>, H-4<sup>I,III</sup>, H-5<sup>I,III</sup>, H-6a<sup>I,III</sup>, H-6b<sup>I,III</sup>), 1.95-2.20 (m, 30H, CH<sub>3</sub>CO).

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 169.0-170.5 (CH<sub>3</sub>CO), 104.0 (d, J<sub>1,F</sub> = 227.2 Hz, C-1'), 100.7 (C-1<sup>II,III</sup>), 76.2 (C-3'), 75.8 (C-4<sup>II</sup>), 72.2 (d, J<sub>2,F</sub> = 24.3 Hz, C-2'), 71.4, 71.6, 72.0, 72.7, 72.8, 72.9 (C-2<sup>II,III</sup>, C-3<sup>II,III</sup>, C-5<sup>II,III</sup>), 70.1 (d, J<sub>5,F</sub> = 3.8 Hz, C-5'), 66.8-67.8 (C-4<sup>I,III</sup>), 61.4-62.0 (C-6<sup>I,III</sup>), 20.5-21.0 (CH<sub>3</sub>CO)

### B. Síntesi del fluorur d'O-β-D-glucopiranosil-(1→4)-O-β-D-glucopiranosil-(1→3)-α-D-glucopiranosid.

S'afegeixen **B** mL de MeOH anhidre a **A** mg de fluorur d'O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-(1→4)-O-(2,3,6-tri-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-(1→3)-2,4,6-tri-O-acetil-α-D-glucopiranosid sota atmosfera inert i s'agita magnèticament fins a dissolució del producte.

A continuació s'hi addicionen **C** mL de MeONa/MeOH 1 M (un equivalent per equivalent d'O-acetil) i es deixa reaccionant sota atmosfera de N<sub>2</sub> amb agitació i a 0°C.

Mitjançant seguiment per CCF (eluent: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 4:1) es comprova que hagi reaccionat tot el producte de partida. El cru de reacció es neutralitza filtrant-lo sobre Amberlyst® 15 (H<sup>+</sup>) rentada amb MeOH i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda. A continuació es redissol el producte en aigua MilliQ, es congela immediatament en CO<sub>2</sub> i es liofilitza.

Els resultats obtinguts en els quatre experiments realitzats es resumeixen a la taula següent:

Exp.	A (mg)	B (mL)	C (mL)	t <sub>reacció</sub> (h)	Rdt. (%)
1	150 (0.162 mmol)	50	1.7 (1.7 mmol, 32 mM)	2	90
2	344 (0.37 mmol)	184	3.7 (3.7 mmol, 20 mM)	3	98
3	210 (0.227 mmol)	73.5	2.3 (2.3 mmol, 30 mM)	2.25	99
4	562 (0.607 mmol)	50	6.5 (6.5 mmol, 115 mM)	1.5	74

**Taula I.9:** Resultats obtinguts en desacetilació per transesterificació de Zemplen del fluorur d'O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-(1→4)-O-(2,3,6-tri-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-(1→3)-2,4,6-tri-O-acetil-α-D-glucopiranosid.

El producte **Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 3Glc $\alpha$ F** s'identifica per espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear:

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, D<sub>2</sub>O): 5.65 (dd, 1H, J<sub>1,2</sub>= 2.6 Hz, J<sub>1,F</sub> = 53.3 Hz, H-1<sup>I</sup>), 4.77 (d, 1H, J<sub>1,2</sub>= 7.8 Hz, H-1<sup>II</sup>), 4.52 (d, 1H, J<sub>1,2</sub>= 7.8 Hz, H-1<sup>III</sup>), 3.59-4.02 (m, 18H, H-2<sup>I-III</sup>, H-3<sup>I-III</sup>, H-4<sup>I-III</sup>, H-5<sup>I-III</sup>, H-6a<sup>I-III</sup>, H-6b<sup>I-III</sup>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, D<sub>2</sub>O): 108.0 (d, J<sub>1,F</sub>= 223 Hz, C-1<sup>I</sup>), 103.2 (C-1<sup>II,III</sup>), 81.6 (C-3<sup>I</sup>), 79.2 (C-4<sup>II</sup>), 74.6 (d, J<sub>5,F</sub> = 4.6 Hz, C-5<sup>I</sup>), 73.3, 73.8, 74.8, 75.5, 76.1, 76.6 (C-2<sup>II,III</sup>, C-3<sup>II,III</sup>, C-5<sup>II,III</sup>), 71.4 (d, J<sub>2,F</sub> = 25 Hz, C-2<sup>I</sup>), 67.7, 70.1 (C-4<sup>I,III</sup>), 60.6-61.2 (C-6<sup>I-III</sup>)

### 3.4.2. Obtenció del fluorur d'**O- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-O- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-glucopiranosid (11) via anomerització.**

#### A. Des-**O**-acetilació anomèrica del trisacàrid per-**O**-acetilat.

Es pesen 833 mg (0,893 mmol) de (Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 3Glc)Ac i se situen en un baló equipat amb un tub de CaCl<sub>2</sub>. S'addicionen 10 mL de DMF anhidre. S'escalfa fins a 60°C i s'addicionen 103 mg (1.1 mmol) de NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>·AcOH. La reacció s'atura transcorreguts 11 minuts, en dissoldre's tot l'acetat d'hidrazina. L'estat de la reacció es comprova amb posterioritat per CCF (AcOEt/Cy 2:1) El cru es dilueix en 30 mL d'AcOEt i es renta amb una dissolució saturada de NaCl (3x20 mL). Es realitza una reextracció amb AcOEt sobre la fase aquosa. S'ajunten les fases orgàniques i s'assequen amb MgSO<sub>4</sub>. Es filtra i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda. Les restes de DMF que resten s'eliminen per codestil·lació amb toluè. S'obtenen 888 mg d'un sòlid blanc d'aspecte cristal·lí. S'empra en la següent etapa sense cap purificació posterior.

#### B. Fluoració del producte (Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 3Glc)Ac<sub>10</sub>OH.

Sobre 888 mg de (Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 3Glc)Ac<sub>10</sub>OH s'estableix atmosfera de nitrogen. S'introdueixen 20 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidre i s'agita fins a dissolució. La dissolució es refreda fins a -38°C (bany de CO<sub>2</sub>+ACN). S'addicionen 0.5  $\mu$ L (3.75 mmol) de DAST. Es deixa reaccionant 2.5 hores. El control de la reacció es realitza per CCF.

El cru de reacció es renta amb una dissolució d'NaCl (100 g/L) (3x10 mL). La fase aquosa es reextreu amb 10 mL de CHCl<sub>3</sub>. Les fases orgàniques s'ajunten, s'asseca amb MgSO<sub>4</sub>, es filtra i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda. S'obté una escuma groguenca que s'asseca a pressió reduïda i protegida de la llum.

Purificació:

El producte es purifica per cromatografia flash de fase normal. Es carreguen 889 mg de producte diluïts en el mínim volum de CHCl<sub>3</sub> i 72 g de sílice. S'utilitza com a eluent AcOEt/Cy 2:1. Es recullen 25 fraccions d'uns 50 mL. Per CCF (eluent AcOEt/Cy 2:1) s'observa que la separació ha estat satisfactòria. S'ajunten les fraccions corresponents als anòmers  $\alpha$  i  $\beta$  del producte format (5  $\rightarrow$  15); S'observa formació majoritària d'isòmer  $\beta$ . S'elimini el dissolvent a pressió reduïda. Es redissol en CHCl<sub>3</sub> i es trasvassa a un recipient de PP, per a realitzar la següent etapa sintètica. S'obtenen 772 mg amb un rendiment del 87%.

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 169.0-170.5 (CH<sub>3</sub>CO), 106.2 (d, J<sub>1,F</sub> = 218 Hz, C-1<sup>I</sup>), 100.7, 100.5 (C-1<sup>II,III</sup>), 76.2 (C-3<sup>I</sup>), 75.7 (C-4<sup>II</sup>), 72.4 (d, J<sub>2,F</sub> = 51.2 Hz, C-2<sup>I</sup>), 71.4, 71.6, 72.0, 72.7, 72.8, 72.9 (C-2<sup>II,III</sup>, C-3<sup>II,III</sup>, C-5<sup>II-III</sup>), 70.1 (d, J<sub>5,F</sub> = 4.5 Hz, C-5<sup>I</sup>), 66.8-67.8 (C-4<sup>I,III</sup>), 61.4-62.0 (C-6<sup>I-III</sup>), 20.4-20.9 (CH<sub>3</sub>CO).

**C. Anomerització del producte (Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 3Glc)Ac $_{10}$ F**

Sobre 762 mg de (Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 3Glc)Ac $_{10}$ F situats en un tub de PP equipat amb una barreta agitadora s'addicionen 5 mL d'HF·Py (70%). Es deixa 15 minuts en contacte amb CO $_{2(s)}$  i es purga amb N $_2$ . Seguidament es deixa reaccionant a 0°C durant 3.5 hores en atmosfera inert. El cru de reacció es dissol en 10 mL de CHCl $_3$  i es neutralitza amb NaHCO $_{3(sat)}$  (8x10mL). Es reextreu la fase aquosa amb 20 mL de CHCl $_3$ . Les fases orgàniques s'ajunten, es renten amb 20mL de H $_2$ O. S'asseca amb Na $_2$ SO $_4$ , es filtra i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda. La piridina restant s'elimina a pressió reduïda per codestil·lació amb toluè. El producte es deixa assecant ON a pressió reduïda. S'obtenen 586 mg de producte (Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 3Glc)Ac $_{10}\alpha$ F sense purificar.

Purificació:

El producte **10** es purifica per cromatografia flash de fase normal.

Fase estacionària: 75 g de sílice (neutralitzada amb 3 mL de Et $_3$ N).

Càrrega: 586 mg de producte dissolt en el mínim volum de CHCl $_3$ .

Eluent: AcOEt/Cy 2:3  $\rightarrow$  1:1

Fraccions: 52 x 50 mL

Seguiment: per CCF (eluent AcOEt/Cy 2:1).

Resultats: s'observa que la separació ha estat satisfactòria.

Fracció	producte	eluent
1	(Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 3Glc)Ac $_{10}\alpha$ F	1:1
2	Barreja	1:1
2	(Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 3Glc) $_{Ac}$	1:1

**Taula I.10.** Purificació del producte (Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 3Glc)Ac $_{10}\alpha$ F per cromatografia de fase normal.

S'elimina el dissolvent a pressió reduïda i s'asseca al buit. S'obtenen 390.5 mg de producte (Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 3Glc)Ac $_{10}\alpha$ F amb un rendiment total del 67%.

**D. Transesterificació de Zemplén**

Metòdica general:

Es pesen A mg de fluorur d'O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 3)-1,2,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-glucopiranosil i s'hi addicionen, sota atmosfera inert, B mL de MeOH anhidre. S'agita la mescla fins a dissolució total del producte.

S'hi afegixen C mL de MeONa/MeOH 1M (un equivalent per equivalent d'O-acetil) i es deixa agitant a 0°C. Es comprova per CCF que la reacció ha tingut lloc quantitativament.

Es filtra el cru de reacció sobre Amberlyst® 15 (H $^+$ ) rentada amb MeOH fins a neutralitat i s'elimina el MeOH a pressió reduïda. Es redissol el producte en H $_2$ O MQ, es congela amb CO $_2$ /IPA i es liofilitza.

Els resultats obtinguts en els experiments realitzats es resumeixen a la taula següent:

Exp.	A (mg)	B (mL)	C (mL)	treacció (h)	Rdt. (%)
XP228	380 ( 0.498 mmol)	29	5 (5 mmol, 172 mM)	1.75	52*
XP245	504 (0.660 mmol)	50	5.5 (5.5 mmol, 110 mM)	2	75
XP255	497 (0.651 mmol)	50	5.6 (5.6 mmol, 112 mM)	1.75	70
XP307	562 (0.736 mmol)	50	6.5 (6.5 mmol, 130 mM)	1.75	61

**Taula I.11:** Resultats obtinguts en desacetilació per transesterificació de Zemplen del fluorur d'O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-(1→4)-(2,3,6-tri-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-(1→3)-1,2,4,6-tetra-O-acetil-α-D-glucopiranosil.

El producte **Glcβ4Glcβ3GlcαF** s'identifica per RMN:

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, D<sub>2</sub>O): 5.65 (dd, 1H, J<sub>1,2</sub>= 2.6 Hz, J<sub>1,F</sub> = 53.3 Hz, H-1<sup>I</sup>), 4.77 (d, 1H, J<sub>1,2</sub>= 7.8 Hz, H-1<sup>II</sup>), 4.52 (d, 1H, J<sub>1,2</sub>= 7.8 Hz, H-1<sup>III</sup>), 3.59-4.02 (m, 18H, H-2<sup>I-III</sup>, H-3<sup>I-III</sup>, H-4<sup>I-III</sup>, H-5<sup>I-III</sup>, H-6a<sup>I-III</sup>, H-6b<sup>I-III</sup>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, D<sub>2</sub>O): 108.0 (d, J<sub>1,F</sub>= 223 Hz, C-1<sup>I</sup>), 103.2 (C-1<sup>II,III</sup>), 81.6 (C-3<sup>I</sup>), 79.2 (C-4<sup>II</sup>), 74.6 (d, J<sub>5,F</sub> = 4.6 Hz, C-5<sup>I</sup>), 73.3, 73.8, 74.8, 75.5, 76.1, 76.6 (C-2<sup>II,III</sup>, C-3<sup>II,III</sup>, C-5<sup>II,III</sup>), 71.4 (d, J<sub>2,F</sub> = 25 Hz, C-2<sup>I</sup>), 67.7, 70.1 (C-4<sup>I,III</sup>), 60.6-61.2 (C-6<sup>I-III</sup>)

### 3.4.3. Obtenció del Glcβ4Glcβ4Glcβ3GlcαF per fluoració directa

#### A. Fluorur d'O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-(1→4)-O-(2,3,6-tri-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-(1→4)-O-(2,3,6-tri-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-(1→3)-2,4,6-tri-O-acetil-α-D-glucopiranosil (12).

Sobre 1.51 g de (Glcβ4Glcβ4Glcβ3Glc)Ac<sub>14</sub>, en un tub de polipropilè on s'ha establert atmosfera de nitrogen, s'afegeixen aproximadament 5 mL de HF/Py 70% a una temperatura controlada menor a 0°C. Es deixa amb agitació magnètica amb bany d'aigua-gel i sota atmosfera de nitrogen durant 4 h.

El cru es dilueix amb CHCl<sub>3</sub> (10 mL), es neutralitza amb molta precaució amb una dissolució aquosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> (5x10 mL) i es renta amb H<sub>2</sub>O (1x10 mL). El residu de fase aquosa s'extreu amb CHCl<sub>3</sub> (3x10 mL). S'ajunten les fases orgàniques i s'assequen amb Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidre i es filtra. S'elimina el cloroform a pressió reduïda i després s'addiciona toluè diverses vegades per eliminar la piridina.

Per CCF (AcOEt/Cy 2:1) es comprova que la fluoració no ha estat completa, sinó que hi ha coexistència de (Glcβ4Glcβ4Glcβ3Glc)Ac<sub>14</sub> i (Glcβ4Glcβ4Glcβ3Glc)Ac<sub>13</sub>αF.

S'obtenen 1.38 g que es purifiquen per cromatografia flash:

Fase estacionària: 400g de sílice (mida de partícula 35-70 μm neutralitzada amb 3 mL de Et<sub>3</sub>N)  
Càrrega: 1.38 g del cru dissolt en el mínim volum de CHCl<sub>3</sub>.

Eluent: AcOEt/Cy 2:1

Seguiment: per CCF (eluent AcOEt/Cy 2:1) amb mostres independents.

Resultats s'obtenen dues fraccions principals, tal com s'indica a la taula I.12.



fracció	producte	quantitat (g)
1	(Glcβ4Glcβ4Glcβ3Glc)Ac <sub>13</sub> αF	0.60
2	producte partida + producte	0.59

**Taula I.12.** Fraccions obtingudes per cromatografia flash de fase normal amb un rendiment de columna del 86%.

La fracció 1 s'identifica com a fluorur d'O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-(1→4)-O-(2,3,6-tri-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-(1→4)-O-(2,3,6-tri-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-(1→3)-2,4,6-tri-O-acetil-α-D-glucopiranosil per comparació amb mostres independents (CCF mixta) i es confirma per <sup>1</sup>H-RMN i <sup>13</sup>C-RMN. S'obtenen 0.60 g amb un rendiment del 41 %.

Les dades espectroscòpiques del producte (Glcβ4Glcβ4Glcβ3Glc)Ac<sub>13</sub>αF s'indiquen a continuació:

**<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** 1.96-2.19 (m, 39H, CH<sub>3</sub>CO), 3.54-5.16 (m, 26H, H-1<sup>III-IV</sup>, H-2<sup>I-IV</sup>, H-3<sup>I-IV</sup>, H-4<sup>I-IV</sup>, H-5<sup>I-IV</sup>, H-6a<sup>I-IV</sup>, H-6b<sup>I-IV</sup>), 4.61 (d, *J*<sub>1,2</sub> 8.1 Hz, 1H, H-1<sup>II</sup>), 5.65 (dd, *J*<sub>1,F</sub> 53.2 Hz, *J*<sub>1,2</sub> 2.5 Hz, 1H, H-1<sup>I</sup>).

**<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** 20.4-20.9 (CH<sub>3</sub>CO), 61.4, 61.5, 61.9, 62.2 (C-6<sup>I-IV</sup>), 66.8, 67.7 (C-4<sup>I-IV</sup>), 70.0 (d, *J*<sub>5,F</sub> 3.2 Hz, C-5<sup>I</sup>), 71.4, 71.6, 71.7, 72.0, 72.4, 72.6, 72.7, 72.8, 72.9 (C-2<sup>I-IV</sup>, C-3<sup>II-IV</sup>, C-5<sup>II-IV</sup>), 75.7 (C-4<sup>II</sup>), 76.1, 76.2 (C-4<sup>II,III</sup>), 77.2 (C-3<sup>I</sup>), 100.6, 100.7, 100.8 (C-1<sup>II,IV</sup>), 103.9 (d, *J*<sub>1,F</sub> 225 Hz, C-1<sup>I</sup>), 168.8-170.4 (CH<sub>3</sub>CO).

El producte (Glcβ4Glcβ4Glcβ3Glc)Ac<sub>13</sub>αF es guarda a -20°C i protegit de la llum. La fracció 2 (barreja de productes) també es guarda a -20°C per ser utilitzada de nou en treballs posteriors.

### B. Fluorur d'O-β-D-glucopiranosil-(1→4)-O-β-D-glucopiranosil-(1→4)-O-β-D-glucopiranosil- (1→3)-α-D-glucopiranosil

209 mg (0.17 mmol) de (Glcβ4Glcβ4Glcβ3Glc)Ac<sub>13</sub>αF es dissolen en 50 mL de MeOH anhidre. S'afegeixen 2.3 mL de NaOMe/MeOH 1 M (2.3 mmol) recent preparat. Es deixa agitant a 0°C i sota atmosfera de nitrogen. La reacció es controla per CCF (CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 8:2). Al cap de 1.5 h la reacció és quantitativa.

El cru de reacció es neutralitza amb una reïna de bescanvi iònic Amberlyst®-15 (H<sup>+</sup>) rentada amb MeOH anhidre. Llavors, s'elimina el MeOH a pressió reduïda. Seguidament es dissol en aigua MilliQ, immediatament es congela en CO<sub>2</sub> i es liofilitza.

El producte obtingut s'identifica com fluorur d'O-β-D-glucopiranosil-(1→4)-O-β-D-glucopiranosil-(1→4)-O-β-D-glucopiranosil-(1→3)-α-D-glucopiranosil per comparació amb mostres independents (CCF mixta) i es confirma per <sup>1</sup>H-RMN i <sup>13</sup>C-RMN. S'obtenen 103 mg amb un rendiment del 90 %.

Les dades espectroscòpiques del producte **Glcβ4Glcβ4Glcβ3GlcαF** liofilitzat s'indiquen a continuació:

**<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, D<sub>2</sub>O):** 3.29-4.01 (m, 24H, H-2<sup>I-IV</sup>, H-3<sup>I-IV</sup>, H-4<sup>I-IV</sup>, H-5<sup>I-IV</sup>, H-6a<sup>I-IV</sup>, H-6b<sup>I-IV</sup>), 4.52 (d, *J*<sub>1,2</sub> 7.5 Hz, 1H, H-1<sup>IV</sup>), 4.54 (d, *J*<sub>1,2</sub> 7.5 Hz, 1H, H-1<sup>III</sup>), 4.74 (d, *J*<sub>1,2</sub> 7.7 Hz, 1H, H-1<sup>II</sup>), 5.70 (dd, *J*<sub>1,F</sub> 53.4 Hz, *J*<sub>1,2</sub> 2.7 Hz, 1H, H-1<sup>I</sup>).

**<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, D<sub>2</sub>O):** 60.5-61.2 (C-6<sup>I-IV</sup>), 67.6 -79.0 (C-4<sup>I,IV</sup>, C-2<sup>II,IV</sup>, C-3<sup>II,IV</sup>, C-5<sup>II,IV</sup>), 72.7 (d, *J*<sub>2,F</sub> 25 Hz, C-2<sup>I</sup>), 74.7 (d, *J*<sub>5,F</sub> 4.0 Hz, C-5<sup>I</sup>), 81.5 (C-3<sup>I</sup>), 102.9-103.1 (C-1<sup>II,IV</sup>), 107.9 (d, *J*<sub>1,F</sub> 221 Hz, C-1<sup>I</sup>).

El producte sintetitzat es conserva a -20°C i protegit de la llum.

3.4.4. Obtenció del Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 3Glc $\alpha$ F per anomerització

## A. Des-O-acetilació anòmerica del tetrasacàrid per-O-acetilat

Es pesen **A** mg de (Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 3Glc)Ac, se situen en un baló equipat amb un tub de CaCl<sub>2</sub>. S'addicionen **B** mL de DMF anhidre i s'escalfa fins a 50°C. S'addicionen **C** mg de NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>·AcOH a la dissolució. Es deixa reaccionant a 50°C fins a la dissolució total de l'acetat d'hidrazina (aproximadament 10 min). L'estat de la reacció es comprova amb posterioritat per CCF (AcOEt/Cy 2:1)

El cru es dilueix en 30 mL d'AcOEt i es renta amb una dissolució saturada de NaCl (3x20 mL). Es realitza una reextracció amb AcOEt sobre la fase acuosa. S'ajunten les fases orgàniques i s'assequen amb MgSO<sub>4</sub>. Es filtra i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda. Les restes de DMF que resten s'eliminen per codestil·lació amb toluè. S'obtenen 814 mg d'un sòlid blanc. S'empra en la següent etapa sense cap purificació posterior.

Els resultats obtinguts en els experiments realitzats es resumeixen a la taula següent:

Exp.	A (mg)	B (mL)	C (mg)	T (°C)	t <sub>reacció</sub> (min)	recuperació (mg)
XP203b	589 (0.468 mmol)	15	53 (0.59 mmol)	50	13	650
XP208	835 (0.663 mmol)	10	72 (0.80 mmol)	50	10	814

Taula I.13. Des-O-acetilació anòmerica de (Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 3Glc)Ac

B. Fluoració del producte (Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 3Glc)Ac<sub>13</sub>OH

Sobre A mg de (Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 3Glc)Ac<sub>13</sub>OH s'estableix atmosfera de N<sub>2</sub>. S'introdueixen 5 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidre i s'agita fins a dissolució. La dissolució es refreda fins a -38°C (bany de CO<sub>2</sub>+ACN). S'addicionen B mL de DAST. Es deixa reaccionant 2.5 hores. El control de la reacció es realitza per CCF.

El cru de reacció es renta amb una dissolució d'NaCl (100g·L<sup>-1</sup>) (2x10 mL), NaHCO<sub>3(sat)</sub> (1x10 ml) i finalment NaCl (100g·L<sup>-1</sup>) (1x10 mL). La fase aquosa es reextreu amb 10 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Les fases orgàniques s'ajunten, s'asseca amb MgSO<sub>4</sub>, es filtra i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda. S'obté una escuma groguenca que s'asseca a pressió reduïda i protegida de la llum.

Purificació:

El producte assecat es purifica per cromatografia flash. Es carrega dissolt en un volum mínim de CHCl<sub>3</sub> i 70 g de sílice. S'utilitza com a eluent AcOEt/Cy 2:1. Es recullen 42 fraccions d'uns 50 mL. Per CCF (eluent AcOEt/Cy 2:1) s'observa que la separació ha estat satisfactòria. S'ajunten les fraccions corresponents als anòmers  $\alpha$  i  $\beta$  del producte format. S'elimini el dissolvent a pressió reduïda. Es redissol en CHCl<sub>3</sub> i es trasvassa a un recipient de PP, per a realitzar la següent etapa sintètica. S'obtenen 250 mg de (Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 3Glc)Ac<sub>13</sub>F amb un rendiment del 40%.

Exp.	A (mg)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (mL)	B (ml)	T (°C)	t <sub>reacció</sub> (h)	producte (mg)	aïllament (mg)
XP204	643 (0.530 mmol)	5	0.2 (1.5 mmol)	-40°C	2.5	436	250 ( $\eta$ = 40%)
XP209	803 (0.662 mmol)	20	0.3 (mmol)	-40°C	2.5	800	761 ( $\eta$ = 95%)

Taula I.14. Resultats de la fluoració del producte (Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 3Glc)Ac<sub>13</sub>OH.

Les dades espectroscòpiques del producte **(Glcβ4Glcβ4Glcβ3Glc)Ac<sub>13</sub>F** s'indiquen a continuació:

**<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** 1.96-2.19 (m, 39H, CH<sub>3</sub>CO), 3.54-5.16 (m, 26H, H-1<sup>III-IV</sup>, H-2<sup>I-IV</sup>, H-3<sup>I-IV</sup>, H-4<sup>I-IV</sup>, H-5<sup>I-IV</sup>, H-6a<sup>I-IV</sup>, H-6b<sup>I-IV</sup>), 4.61 (d, *J*<sub>1,2</sub> 8.1 Hz, 1H, H-1<sup>II</sup>), 5.23 (dd, *J*<sub>1,F</sub> 53 Hz, *J*<sub>1,2</sub> 6.2 Hz, 0.7H, H-1<sup>α</sup>), 5.65 (dd, *J*<sub>1,F</sub> 53.2 Hz, *J*<sub>1,2</sub> 2.5 Hz, 0.3H, H-1<sup>β</sup>).

### C. Anomerització

Sobre **A** mg de (Glcβ4Glcβ4Glcβ3Glc)Ac<sub>13</sub>F situats en un tub de PP equipat amb una barreta agitadora s'addicionen **B** mL d'HF·Py (70%). Es deixa 15 minuts a -70°C i es purga amb N<sub>2</sub>. Seguidament es deixa reaccionant a T °C durant 2.5 hores en atmosfera inert.

El cru de reacció es dilueix amb 20 mL de CHCl<sub>3</sub>, es neutralitza amb NaHCO<sub>3(sat)</sub> (7x10mL) i es renta amb H<sub>2</sub>O (2x10 mL). Es reextreu la fase aquosa amb 20 mL de CHCl<sub>3</sub>. Les fases orgàniques s'ajunten, es renten amb (2x10)mL de H<sub>2</sub>O. S'asseca amb MgSO<sub>4</sub>, es filtra i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda. La piridina restant s'elimina a pressió reduïda per codestil·lació amb toluè. El producte es deixa assecant *ON* a pressió reduïda. S'obtenen **C** mg de producte sense purificar.

Exp.	<b>A</b> (mg)	<b>B</b> (ml)	T (°C)	t <sub>reacció</sub> (h)	<b>C</b> (mg)	aïllament (mg)
XP206	236 (0.194 mmol)	2	-10°C	2.5	201	130 (η 65%)
XP214	761 (0.626 mmol)	4	0°C	2.5	451	761 (η 59%)

**Taula I.15.** Obtenció del producte (Glcβ4Glcβ4Glcβ3Glc)Ac<sub>13</sub>dF

Purificació:

El producte es purifica per cromatografia flash.

Fase estacionària: gel de sílice neutralitzada amb Et<sub>3</sub>N.

Càrrega: producte dissolt en el mínim volum de CHCl<sub>3</sub>.

Eluent: AcOEt/Cy 2:1

Fraccions: 50 mL

Seguiment: per CCF (eluent AcOEt/Cy 2:1).

Resultats: la separació ha estat satisfactòria.

### D. Transesterificació de Zemplén

Metòdica general:

Es pesen **A** mg de fluorur d'O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-(1→4)-(2,3,6-tri-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-(1→3)-1,2,4,6-tetra-O-acetil-α-D-glucopiranosil i s'hi addicionen, sota atmosfera inert, **B** mL de MeOH anhidre. S'agita la mescla fins a dissolució total del producte.

S'hi afegixen **C** mL de MeONa/MeOH 1M (un equivalent per equivalent d'O-acetil) i es deixa agitant a 0°C. Es comprova per CCF que la reacció ha tingut lloc quantitativament.

Es filtra el cru de reacció sobre Amberlyst® 15 (H<sup>+</sup>) rentada amb MeOH fins a neutralitat i s'elimina el MeOH a pressió reduïda. Es redissol el producte en H<sub>2</sub>O MQ, es congela amb CO<sub>2</sub>/iPA i es liofilitza.

Els resultats obtinguts en els experiments realitzats es resumeixen a la taula següent:

Exp.	A (mg)	B (mL)	C (mL)	treacció (h)	Rdt. (%)
XP230	380 ( 0.498 mmol)	29	5 (5 mmol, 172 mM)	1.75	52
XP245	504 (0.660 mmol)	50	5.5 (5.5 mmol, 110 mM)	2	75
XP255	497 (0.651 mmol)	50	5.6 (5.6 mmol, 112 mM)	1.75	70
XP307	562 (0.736 mmol)	50	6.5 (6.5 mmol, 130 mM)	1.75	61

**Taula I.16.** Resultats obtinguts en desacetilació per transesterificació de Zemplén del fluorur d'O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-(1→4)-(2,3,6-tri-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-(1→3)-1,2,4,6-tetra-O-acetil-α-D-glucopiranosil.

El producte **Glcβ4Glcβ4Glcβ3GlcαF** s'identifica per RMN:

**<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, D<sub>2</sub>O):** 3.29-4.01 (m, 24H, H-2<sup>I-IV</sup>, H-3<sup>I-IV</sup>, H-4<sup>I-IV</sup>, H-5<sup>I-IV</sup>, H-6a<sup>I-IV</sup>, H-6b<sup>I-IV</sup>), 4.52 (d, *J*<sub>1,2</sub> 7.5 Hz, 1H, H-1<sup>IV</sup>), 4.54 (d, *J*<sub>1,2</sub> 7.5 Hz, 1H, H-1<sup>III</sup>), 4.74 (d, *J*<sub>1,2</sub> 7.7 Hz, 1H, H-1<sup>II</sup>), 5.70 (dd, *J*<sub>1,F</sub> 53.4 Hz, *J*<sub>1,2</sub> 2.7 Hz, 1H, H-1<sup>I</sup>).

**<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, D<sub>2</sub>O):** 60.5-61.2 (C-6<sup>I-IV</sup>), 67.6 -79.0 (C-4<sup>I,IV</sup>, C-2<sup>II,IV</sup>, C-3<sup>II,IV</sup>, C-5<sup>II,IV</sup>), 72.7 (d, *J*<sub>2,F</sub> 25 Hz, C-2<sup>I</sup>), 74.7 (d, *J*<sub>5,F</sub> 4.0 Hz, C-5<sup>I</sup>), 81.5 (C-3<sup>I</sup>), 102.9-103.1 (C-1<sup>II,IV</sup>), 107.9 (d, *J*<sub>1,F</sub> 221 Hz, C-1<sup>I</sup>).

#### 4. Síntesi d'acceptors glicosídic

##### 4.1. Síntesi del Glcβ4GlcβpNP

###### A. Bromur d'O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-(1→4)-2,3,6-tri-O-acetil-α-D-glucopiranosil

Sobre 6.018 g (8.9 mmol) de cel·lobiosa octaacetat, s'afegeixen 30 mL d'una dissolució d'HBr/AcOH al 33% (4.1 M) a temperatura ambient. Es deixa en agitació magnètica a temperatura ambient, protegit de la llum i de la humitat amb un tub de clorur de calci.

S'atura la reacció als 30 minuts. S'observa per CCF (AcOEt/Cy 1:1) que encara hi ha presència de reactiu inicial. Així s'addicionen 25 mL més de HBr/AcOH al 33% i es deixa agitant uns 30 minuts més. S'observa per CCF (AcOEt/Cy 1:1) que la reacció ha estat quantitativa.

El cru de reacció s'aboca sobre 350 mL d'aigua-gel i s'extreu amb CHCl<sub>3</sub> (4x40 mL). Es neutralitza la fase orgànica amb una dissolució aquosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> (2x40 mL) i es renta amb H<sub>2</sub>O (2x50 mL). La fase orgànica s'asseca amb MgSO<sub>4</sub> anhidre, es filtra i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda.

S'obtenen 5.72 g d'una mescla de (Glcβ4Glc)Ac<sub>8</sub> i (Glcβ4Glc)Ac<sub>7</sub>αBr, però el producte no es purifica sinó que s'utilitza immediatament en el següent pas de síntesi.

###### B. 4-Nitrofenil O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-(1→4)-2,3,6-tri-O-acetil-α-D-glucopiranosid.

Sobre una dissolució de 1.675 g (12.04 mmol) de p-nitrofenol i 2.102 g (7.72 mmol) de bromur de trietilbenzilamoni en 20 mL de NaOH 1.25 N, s'addicionen 5.72 g de la mescla preparada en l'anterior pas de síntesi, majoritàriament (Glcβ4Glc)Ac<sub>7</sub>αBr, dissolts en uns 50 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. S'escalfa vigorosament a reflux, amb agitació magnètica i protegit de la llum durant tota la nit. S'observa per CCF (AcOEt/Cy 1:1) que la reacció ha finalitzat.

S'addicionen 25 mL d'H<sub>2</sub>O sobre el cru de reacció d'un color groguenc. Es decanta la fase orgànica i la fase aquosa restant es renta amb CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x45 mL) i s'ajunten totes les fraccions orgàniques. Aquesta fase orgànica es renta amb NaOH al 5% (4x40 mL), es neutralitza amb HCl aquós i diluït (2x40 mL) i amb H<sub>2</sub>O (2x40 mL). S'asseca la solució incolora amb Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, es filtra i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda.

Purificació:

El producte es purifica per cromatografia flash.

Fase estacionària: 250 g de sílice (neutralitzada amb 3 mL de Et<sub>3</sub>N).

Càrrega: 4.82 g de producte dissolt en el mínim volum de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

Eluent: AcOEt/Cy 1:1

Seguiment: per CCF (eluent AcOEt/Cy 2:1). Atès que no es disposa de mostres independents, s'aprofita el fet que el (Glcβ4Glc)Ac<sub>7</sub>βpNP presenta absorbència a la llum UV, mentre que el (Glcβ4Glc)Ac<sub>7</sub>αBr i el (Glcβ4Glc)Ac<sub>8</sub> no.

Resultats: s'observa que la separació ha estat satisfactòria (**taula I.17**):

fracció	producte	quantitat (g)
1	(Glcβ4Glc)Ac <sub>7</sub> βpNP	1.96
2	(Glcβ4GlcαBr)Ac + IMP	2.48

**Taula I.17.** Fraccions obtingudes per cromatografia flash.

La fracció 1 s'identifica com a 4-nitrofenil O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-(1→4)-2,3,6-tri-O-acetil-α-D-glucopiranosid. S'obtenen 1.96 g (η = 29 %).

Les dades espectroscòpiques del producte **(Glcβ4Glc)Ac<sub>7</sub>βpNP** s'indiquen a continuació:

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 1.99-2.10 (m, 21H, CH<sub>3</sub>CO), 3.66-5.32 (m, 14H, H-1<sup>II</sup>, H-2<sup>II</sup>, H-3<sup>II</sup>, H-4<sup>II</sup>, H-5<sup>II</sup>, H-6a<sup>II</sup>, H-6b<sup>II</sup>), 7.05 (d, J<sub>2,3</sub> 9.2 Hz, 2H, H-2'), 8.21 (d, J<sub>3,2'</sub> 9.2 Hz, 2H, H-3').

<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 20.6-20.8 (CH<sub>3</sub>CO), 61.5, 61.7 (C-6<sup>II</sup>), 67.7-73.2 (C-2<sup>II</sup>, C-3<sup>II</sup>, C-4<sup>II</sup>, C-5<sup>II</sup>), 76.1 (C-4'), 97.8 (C-1'), 100.8 (C-1<sup>II</sup>), 116.5 (C-2'), 125.7 (C-3'), 143.1 (C-4'), 170.0 (C-1'), 168.8-170.3 (CH<sub>3</sub>CO)

### C. 4-Nitrofenil β-D-glucopiranosil-(1→4)-β-D-glucopiranosid

1.96 g (2.59 mmol) de (Glcβ4Glc)Ac<sub>7</sub>βpNP es dissolen en 130 mL de MeOH anhidre. S'afegeixen 18 mL de NaOMe/MeOH 1 M (18.20 mmol) recent preparada. Es deixa agitant a 0°C i sota atmosfera de nitrogen. La reacció es controla per CCF (CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 8:2). Al cap d'1 h la reacció és quantitativa.

El cru de reacció es neutralitza amb reïna de bescanvi iònic Amberlyst®-15 (H<sup>+</sup>) rentada amb MeOH anhidre. Llavors, s'elimina el MeOH a pressió reduïda. Seguidament es dilueix en aigua MilliQ, immediatament es congela en CO<sub>2</sub> i es liofililitza.

El producte obtingut s'identifica com 4-nitrofenil β-cel·lobiosid per comparació amb mostres independents (CCF mixta) i es confirma per <sup>1</sup>H-RMN i <sup>13</sup>C-RMN. S'obtenen 860 mg (η = 72 %).

Les dades espectroscòpiques del producte **Glcβ4GlcβpNP** s'indiquen a continuació:

**<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** 3.32-4.04 (m, 12H, H-2<sup>II</sup>, H-3<sup>II</sup>, H-4<sup>II</sup>, H-5<sup>II</sup>, H-6a<sup>II</sup>, H-6b<sup>II</sup>), 4.56 (d, *J*<sub>1,2</sub> 7.9 Hz, 1H, H-1<sup>II</sup>), 5.31 (d, *J*<sub>1,2</sub> 7.7 Hz, 1H, H-1<sup>I</sup>), 7.26 (d, *J*<sub>2,3'</sub> 9.3 Hz, 2H, H-2'), 8.28 (d, *J*<sub>3',2'</sub> 9.3 Hz, 2H, H-3').

**<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, D<sub>2</sub>O):** 60.4, 61.2 (C-6<sup>II</sup>), 70.1 (C-4<sup>II</sup>), 73.1-76.6 (C-2<sup>II</sup>, C-3<sup>II</sup>, C-5<sup>II</sup>), 78.8 (C-4<sup>I</sup>), 97.8 (C-1<sup>I</sup>), 100.8 (C-1<sup>II</sup>), 116.5 (C-2'), 125.7 (C-3'), 143.1 (C-4'), 170.0 (C-1'), 168.8-170.3 (CH<sub>3</sub>C=O).

### 4.2. Síntesi de l'acceptor glicosídic: metil O-β-D-glucopiranosil-(1→4)-β-D-glucopiranosid

La síntesi de l'acceptor glicosídic es realitza partint de l'octaacetat d'α-cel·lobiosa i en tres etapes: una primera etapa de bromació per a activar el producte com a bromur d'α-glicosil, una β-glicosidació (reacció de Königs-Knorr) i, finalment, el producte es desprotegeix mitjançant la transesterificació de Zemplén.

#### A. Bromur d'O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-(1→4)-2,3,6-tri-O-acetil-α-D-glucopiranosid

Sobre 3.35 g d'octaacetat d'α-cel·lobiosa s'addicionen 30 mL de HBr/AcOH 33% i es deixa agitant en un matràs protegit amb un tub de CaCl<sub>2</sub> a temperatura ambient i amb protecció de la llum. La reacció té lloc quantitativament al cap de dues hores i mitja (seguiment per CCF, utilitzant com a eluent AcOEt/Cy 3:2).

S'aboca el cru de reacció sobre 240 mL d'una mescla d'aigua-gel i s'extreu amb CHCl<sub>3</sub> (4 x 90 mL). La fase orgànica es renta amb 2 x 90 mL NaHCO<sub>3</sub> (aq, sat) i aigua (2 x 90 mL).

S'asseca sobre MgSO<sub>4</sub>, s'elimina el dissolvent a pressió reduïda i s'asseca al buit.

S'utilitza directament com a producte de partida per la síntesi de metil O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-(1→4)-2,3,6-tri-O-acetil-β-D-glucopiranosid, sense prèvia purificació.

#### B. Metil O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-(1→4)-2,3,6-tri-O-acetil-β-D-glucopiranosid

Es mesclen 5 mL de MeOH anhidre (gran excés), 2.73 g de Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 9.15 g de tamisos moleculars de 3 Å i 7.32 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidre i s'agita a temperatura ambient durant uns 40 minuts sota atmosfera de N<sub>2</sub> per tal d'eliminar qualsevol possible traça d'aigua.

Passat aquest temps se li addiciona el bromur d'O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-(1→4)-2,3,6-tri-O-acetil-α-D-glucopiranosid provinent de l'etapa de síntesi anterior (3.46 g, 4.94 mmol) en 18.3 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidre i es deixa reaccionant durant 12 hores.

Es comprova que la reacció ha estat quantitativa mitjançant CCF (eluent:AcOEt/Cy 2:1). Es filtra el cru de reacció sobre sílice i sorra. Es renta amb acetona diverses vegades fins que el producte s'ha eluït (comprovació per CCF amb el mateix eluent).

S'asseca sobre MgSO<sub>4</sub> i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda.

S'obtenen 2.54 g de producte sec, el que suposa un rendiment de les dues etapes de síntesi abans de la purificació del 80%.

Purificació 1:

La purificació del producte es duu a terme mitjançant cromatografia Flash. Es carreguen els 2.54 g de producte diluïts en el mínim volum de CHCl<sub>3</sub> i 150 g de sílice. S'utilitza com a eluent AcOEt/Cy 2:1 (R<sub>f</sub> de 0.32 per CCF).

Es recullen 62 fraccions d'uns 50 mL. Per CCF (eluent AcOEt/Cy 2:1) s'observa que la separació no ha estat satisfactòria.

Després d'eliminar el dissolvent a pressió reduïda s'obtenen 1.89 g de producte no separat. El rendiment de columna ha estat del 75%.

Purificació 2:

Es repeteix la purificació mitjançant cromatografia Flash i utilitzant una columna de dimensions més petites.

Es carreguen 1.89 g de producte diluïts en el mínim volum de CHCl<sub>3</sub> i 95 g de sílice. S'utilitza com a eluent AcOEt/Cy 2:1 (R<sub>f</sub> de 0.32 per CCF).

Es recullen 43 fraccions d'uns 30 mL. Per CCF (eluent AcEt/Cy 2:1) s'observa una bona separació del producte, que es troba pur a les fraccions 13-19.

S'elimina el dissolvent a pressió reduïda i s'asseca al buit.

S'obtenen 740 mg de producte pur, el que suposa un rendiment de les dues etapes de síntesi del 25%.

El producte (**Glcβ4Glc**)**Ac****7βOMe** s'identifica a partir de les seves dades espectroscòpiques:

**<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** 5.19 (dd, 1H, J = 9 Hz), 5.16 (dd, 1H, J = 9 Hz), 5.08 (dd, 1H, J = 9 Hz), 4.9 (dd, 1H, J = 9Hz), 4.85 (dd, 1H, J = 9Hz), H-2<sup>l,II</sup>, H-3<sup>l,II</sup>, H-4<sup>l,II</sup>], 4.52 (dd, 1H, J<sub>5,6a</sub>= 2.1 Hz, J<sub>gem</sub> = 12.6 Hz, H-6a<sup>l</sup> ò H-6a<sup>l</sup>), 4.50 (dd, 1H, J<sub>1,2</sub> = 8.1 Hz, H-1<sup>l,II</sup>), 4.38 (dd, 1H, J<sub>1,2</sub> = 8.1 Hz, H-1<sup>l</sup>), 4.32 (dd, 1H, J<sub>5,6b</sub>= 4.8 Hz, J<sub>gem</sub>= 12 Hz, H-6b<sup>l,II</sup> ò H-6b<sup>l</sup>), 4.11 (dd, 1H, J<sub>5,6b</sub>= 4.8 Hz, J<sub>gem</sub>= 12 Hz, H-6b<sup>l</sup> ò H-6b<sup>l,II</sup>), 4.04 (dd, 1H, J<sub>5,6a</sub>=2.1 Hz, J<sub>gem</sub>= 12.5 Hz, H-6a<sup>l</sup> ò H-6a<sup>l,II</sup>), 3.75 (dd, J<sub>3,4</sub>=J<sub>4,5</sub>= 9.5 Hz, H-4<sup>l</sup>), 3.57-3.70 (m, 2H, H-5<sup>l,II</sup>), 3.48 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 1.99-2.13 (m, 21H, CH<sub>3</sub>CO).

**<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** 169.0-170.5 (CH<sub>3</sub>CO), 101.4 (C-1<sup>l,II</sup>), 100.8 (C-1<sup>l</sup>), 76.5 (C-4<sup>l</sup>), 67.7, 71.5, 71.6, 71.9, 72.5, 72.6, 72.9 (C-2<sup>l,II</sup>, C-3<sup>l,II</sup>, C-4<sup>l,II</sup>, C-5<sup>l,II</sup>), 61.5, 61.8 (C-6<sup>l,II</sup>), 57.0 (OCH<sub>3</sub>), 20.5- 20.8 (CH<sub>3</sub>CO)

### C. Metil d'O-β-D-glucopiranosil-(1→4)-β-D-glucopiranosid

Metòdica general:

Es pesen **A** mg de metil O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-(1→4)-2,3,6-tri-O-acetil-β-D-glucopiranosid i s'hi addicionen, sota atmosfera inert, **B** mL de MeOH anhidre. S'agita la mescla fins a dissolució total del producte.

S'hi afegeixen **C** mL de MeONa/MeOH 1M (un equivalent per equivalent d'O-acetil) i es deixa agitant durant 12 hores a 4°C. Es comprova per CCF que la reacció ha tingut lloc quantitativament.

Es filtra el cru de reacció sobre Amberlyst® 15 (H<sup>+</sup>) rentada amb MeOH fins a neutralitat i s'elimina el MeOH a pressió reduïda.

Els resultats obtinguts en els experiments realitzats es resumeixen a la taula següent:

Exp.	A (mg)	B (mL)	C (mL)	t <sub>reacció</sub> (h)	Rdt. (%)
1	620 (0.954 mmol)	216	6.7 (6.7 mmol, 30mM)	3	115
2	620 (0.954 mmol)	216	6.7 (6.7 mmol, 30mM)	3	125
3	620 (0.954 mmol)	127	6.7 (6.7 mmol, 50mM)	12	97
4	605 (0.931 mmol)	124	6.5 (6.5 mmol, 50mM)	12	98

**Taula I.18:** Resultats obtinguts en desacetilació per transesterificació de Zemplén del metil d'O-β-D-glucopiranosil-(1→4)-β-D-glucopiranosid. En els experiments 1 i 2 el rendiment obtingut (>100%) és degut a la desacetilació només parcial del producte, evidenciant que 3 hores de reacció no són suficients.

Es confirma la formació del producte **Glcβ4GlcβOMe** mitjançant espectròscopia de ressonància magnètica nuclear:

**<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, D<sub>2</sub>O):** 4.51 (d, 1H, J<sub>1,2</sub>= 8.1 Hz, H-1<sup>II</sup>), 4.41 (d, 1H, J<sub>1,2</sub>= 8.1 Hz, H-1<sup>I</sup>), 3.48 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.28 - 4.02 (m, 12H, H-2<sup>I,II</sup>, H-3<sup>I,II</sup>, H-4<sup>I,II</sup>, H-5<sup>I,II</sup>, H-6a<sup>I,II</sup>, H-6b<sup>I,II</sup>).

**<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, D<sub>2</sub>O):** 105.9 (C-1<sup>I</sup>), 105.4 (C-1<sup>II</sup>), 81.5 (C-4<sup>I</sup>), 75.7, 76.0, 77.1, 77.6, 78.3, 78.8 (C-2<sup>I,II</sup>, C-3<sup>I,II</sup>, C-5<sup>I,II</sup>), 72.3 (C-4<sup>II</sup>), 62.8, 63.4 (C-6<sup>I,II</sup>), 60.0 (OCH<sub>3</sub>).



## II. Biologia Molecular

S'assumeixen els protocols habituals que es descriuen en els manuals de biologia molecular (Sambrook i Russel, 2001) o bé els procediments descrits als catàlegs dels productes i Kits emprats.

### 1. Consideracions prèvies

#### 1.1. Instrumentació

- Cabina de flux laminar vertical Telsar AV100
- Termociclador MJ Research PTC-200
- Estufa de cultius a 37°C
- Bany termoestatat

#### 1.2. Soques, Vectors i reactius per biologia molecular

- Soques

Soca de clonació:

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  [F'/endA1 hsdR17 (rk- mk+) supE44 thi- 1 reacA1 gyrA (Nal)r relA1

Soques d'expressió:

*Escherichia coli* BL21 DE3 (Novagen) genotip: F<sup>-</sup> ompT hsdS<sub>B</sub> gal dcm (DE3).

*Escherichia coli* BL21 SI (Novagen) genotip: F<sup>-</sup>, ompT, hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub>m<sub>B</sub>-), gal, dcm, endA1, proUp::T7RNAP::malQ-lacZ, Tet<sup>S</sup>.

- ADN polimerasa: Pfu Turbo (2.5 U/ $\mu$ L) de Stratagene<sup>®</sup> amb el seu tampó de reacció 10x
- Enzims de restricció de New England Biolabs:
  - HindIII (20 U/ $\mu$ L)
  - NruI (10 U/ $\mu$ L)
  - EcoRI (20 U/ $\mu$ L)
  - DpnI (20 U/ $\mu$ L)
- Tampons de reacció de New England Biolabs:
  - NE 2 10x (10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 7.9)
  - NE 3 10x (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 7.9)
- dNTPs de Roche (10 mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP, 10 mM dTTP)
- Encebadors subministrats per Thermo (5  $\mu$ M)
- ADN motlle pD6-2-E134A-bgl (100 ng)

#### 1.3. Medis de cultiu

Medi líquid 2xYT: 16 g de Bactotripton, 10 g d'Extracte de llevat, 5 g d'NaCl i aigua fins a 1 litre.

Medi sòlid LB: 10g de Bactotripton, 5 g d'Extracte de llevat, 5 g d'NaCl, 15 g d'agar i aigua fins a 1 litre.

### 1.4. Condicions d'esterilitat

El treball amb microorganismes requereix condicions d'esterilitat, ja que la contaminació comporta interferències en el creixement del microorganisme d'interès o fins i tot la seva mort. Per a garantir les condicions d'esterilitat es treballa en una cabina de flux laminar horitzontal que aïlla l'interior de l'exterior, prèviament esterilitzada amb etanol i radiació UV, i sempre en els contorns d'una flama de Bunsen.

Totes les dissolucions es preparen amb aigua qualitat MilliQ. Els medis de cultiu i reactius, els recipients i les puntes de micropipeta són esterilitzats en autoclau. Els reactius inestables a l'autoclau s'esterilitzen a través d'un filtre de 0.22 µm.

## 2. Tècniques de Biologia Molecular

### 2.1. Preparació de cèl·lules competents pel mètode del CaCl<sub>2</sub>

Es preparen cèl·lules competents DH5α, BL21-SI i BL21-DE3 assumint el protocol descrit per Sambrook et al (1989):

A partir de la placa màster corresponent, es fa un passada de placa per esgotament. S'incuba invertida a 37°C durant 10 hores. S'inocula una colònia aïllada en 3 mL de medi de cultiu líquid 2xYT i s'incuba 10 hores a 37°C i 300 rpm. S'inocula 300 µl del cultiu de 3 mL a 30 ml de medi líquid 2xYT continguts en un matràs de 100 ml. S'incuba a 37°C i 300 rpm fins que  $A_{600} \approx 0.3$  (aproximadament 2 hores per cèl·lules DH5α i 1 hora i trenta minuts per cèl·lules BL21-SI/DE3). Es transfereix asèpticament a un tub de centrifuga estèril i es manté 20 minuts a 0°C. Se centrifuga a 3000 rpm i a 4°C durant 10 minuts. Es decanta asèpticament el sobrenedant i es resuspèn suaument per pipeteig el *pellet* de cèl·lules en 15 ml de CaCl<sub>2</sub> 50 mM estèril i fred (4°C). Es manté 15 minuts a 0°C. Se centrifuga a 300 rpm i a 4°C durant 10 minuts. Es decanta asèpticament el sobrenedant i es resuspèn suaument per pipeteig el botó cel·lular en 3 ml de CaCl<sub>2</sub> 50 mM estèril i fred (4°C). Es reparteix el volum resultant en alíquotes de 100 µl en tubs Eppendorf, s'afegeixen 15 µl de glicerina a cada tub i es congelen directament a -80°C.

### 2.2. Transformació de les cèl·lules competents

A diferents tubs Eppendorf que contenen 100 µl de cèl·lules competents s'hi afegeixen 1, 2 i 4 µl d'DNA i es barreja suaument. Es transforma amb diferents dilucions de la dissolució d'DNA per assegurar-se que en algun cas s'obtindrà una placa de transformació amb colònies aïllades. S'incuben a 0°C durant 30 minuts i seguidament a 42°C exactament 2 minuts. Es transfereixen ràpidament a un bany de gel i s'hi mantenen 5 minuts.

S'hi addicionen 300 µl de medi líquid 2xYT i s'homogeneïtzen per inversió del tub. S'incuben a 37°C i 250 rpm durant 45 minuts, per tal que es doni l'expressió del fenotip (resistència a l'ampicil·lina). Mentrestant s'afegeix ampicil·lina a les plaques de medi LB (fins 200 µg/ml en placa) i es deixa absorbir durant uns 10 minuts.

Se sembren, per extensió amb l'espàtula de Digralsky, alíquotes de 100 µl i 300 µl en plaques de medi LB suplementades amb ampicil·lina. S'espera uns 10 minuts per a garantir l'absorció i s'incuben les plaques invertides a 37°C durant unes 8-10 hores fins a l'aparició de colònies puntuals.

### 2.3. Obtenció del DNA plasmídic

S'empren Kits comercials Wizard plus miniprep DNA purification system i Wizard plus midiprep DNA purification system (Promega).

### 2.4. Electroforesi de DNA en gel d'agarosa

L'electroforesi en gel d'agarosa permet la separació de fragments de DNA en funció de la seva mobilitat en un suport electroforètic sotmés a un camp elèctric. La resolució depèn de la concentració d'agarosa emprada. La mobilitat d'un fragment de DNA en el gel és proporcional al logaritme del seu pes molecular, de manera que se'n pot determinar la seva mida per comparació amb patrons comercials de pesos moleculars coneguts.

Per a realitzar l'electroforesi s'empra el tampó TAE, al qual s'afegeix  $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de bromur d'etidi, molècula fluorescent que s'intercala entre les bases de DNA i permet la seva visualització en llum UV ( $\lambda = 312 \text{ nm}$ ). A continuació es descriuen els diferents tampons emprats

- Tampó TAE 50x: 242 g Tris-base, 57.1 mL AcOH gacial, 10 mL EDTA 0.5 M (pH 8) o 18.5 g EDTA sòlid, s'enrasa a un volum d'1L amb aigua destil·lada. La dissolució de treball es 1x (40 mM en Tris-base i 1 mM en EDTA).
- Tampó de càrrega 10x: 500 mg de glicerina, 200  $\mu\text{L}$  EDTA 0.5 M (pH 8), 100  $\mu\text{L}$ .

### 2.5. Determinació de la concentració de DNA

Es determina la concentració de DNA de forma espectroscòpica (mesura d'absorbància a 260 nm) a partir del mètode de les addicions.

### 2.6. Seqüenciació

La seqüenciació permet comprovar que el gen mutant presenta la seqüència correcta de bases. S'empra el *kit* ABI Primis BigDye™ Terminator (Perkin-Elmer Applied Biosystems):

Reacció de PCR: En un tub d'Eppendorf estèril de 500  $\mu\text{L}$  se situa la següent mescla (conservada en bany de gel): una solució de DMSO al 50% (1  $\mu\text{L}$ ), solució estoc d'ADN motlle (150-200 ng), solució  $5 \text{ pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  de *FUP* o *RUP*, un per a cada reacció de PCR (1.5  $\mu\text{L}$ ), i aigua estèril fins a un volum total de 16  $\mu\text{L}$ . Es preescalfa a  $98^\circ\text{C}$  durant 5 minuts. Es deixa en gel 2 minuts i se centrifuga uns segons a 13500 rpm. Es torna a posar en gel i s'afegeix solució de *Premix1* (4  $\mu\text{L}$ ) i oli mineral per tal de cobrir totalment la solució (15  $\mu\text{L}$ ).

S'introdueix el tub d'Eppendorf en el termociclador i s'inicia el programa indicat a continuació:

-Desnaturalització inicial 3 min  $94^\circ\text{C}$

-30 cicles amb les següents etapes: desnaturalització 30 s  $96^\circ\text{C}$ , hibridació 15 s  $50^\circ\text{C}$ , elongació 4 min  $60^\circ\text{C}$ .

-Conservació fins a 24 h  $4^\circ\text{C}$

Eliminació dels ddNTPs no incorporats per precipitació amb EtOH: s'extreuen en fred 18 µL del cru de reacció sense agafar oli i es transfereix a un tub d'Eppendorf estèril. S'afegeix aigua MilliQ estèril (19 µL) i EtOH absolut fred (61 µL). Es deixa en gel durant 10 minuts. Se centrifuga a 13500 rpm durant 24 minuts. S'elimina la solució d'etanol per aspiració i es renta el botó d'ADN amb EtOH al 70% (200 µL). Se centrifuga a 13500 rpm durant 3 minuts i s'elimina el sobrenedant per aspiració. Es deixa assecar el botó d'ADN a temperatura ambient durant 15-20 minuts.

Un cop sec s'envia al servei de seqüenciació d'ADN del Servei Científic-Tècnic de la Universitat de Barcelona.

### 4. Obtenció dels dobles mutants E134A/D136A i E134A/D136N

#### 4.1. Mutagènesi dirigida per QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit

Els dobles mutants mutants pD6-2-E134A/D136A-bgl i pD6-2-E134A/D136N-bgl s'obtenen mitjançant el QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene®).

Se segueix el següent protocol:

#### Selecció de codons

Aminoàcid	Codó	Freqüència d'expressió en <i>E. Coli</i>	Nº de bases alterades	Noves dianes de restricció
Asp	GAC	0.68		
Ala	GTC	0.17	2	Cap
	GCC	0.27	1	Cap
	GCA	0.22	2	Cap
	<b>GCG</b>	<b>0.34</b>	2	5
Asn	ATT	0.46	2	Cap
	<b>AAC</b>	<b>0.54</b>	1	Cap

**Taula II.1.** Codons mutagènics per D136A i D136N. Destacat es troben els codons seleccionats.

Pel cas de la mutació d'Asp per Ala, se selecciona el codó GCG que, malgrat dóna lloc a l'alteració de dues bases i presenta una freqüència d'expressió baixa, dóna lloc a 5 noves dianes de restricció. Per a la mutació d'Asp per Asn, en canvi, s'opta pel codó AAC amb alta freqüència d'expressió i una única base modificada.

#### Disseny d'encebadors

Atenent als criteris de disseny per al seu ús en mutagènesi dirigida mitjançant *QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit*™ (Stratagene) els encebadors emprats per a l'obtenció dels dobles mutants E134A/D136A i E134A/D136N són (taula II.2):

## II. BIOLOGIA MOLECULAR – PART EXPERIMENTAL

E134A/D136A	
<b>Seqüència original</b>	5'- A CGC CTT GGG ATG CAA TCG <b>ACA</b> TCG AAT TTC TAG GAA AAG ATA CGA -3'
<b>Encebador directe</b>	5'- CGC CTT GGG ATG CAA TCG <b>CGA</b> TCG AAT TTC TAG GAA AAG ATA CG -3'
<b>Longitud (bp)</b>	44
<b>T<sub>fus</sub> (°C)</b>	78.9
<b>Contingut G+C (%)</b>	47.7

E134A/D136N	
<b>Seqüència original</b>	5'- A CGC CTT GGG ATG CAA TCG <b>ACA</b> TCG AAT TTC TAG GAA AAG ATA CGA -3'
<b>Encebador directe</b>	5'- CGC CTT GGG ATG CAA TCA <b>AGA</b> TCG AAT TTC TAG GAA AAG ATA CG -3'
<b>Longitud (bp)</b>	44
<b>T<sub>fus</sub> (°C)</b>	76.2
<b>Contingut G+C (%)</b>	43.2

**Taula II.2.** Oligonucleòtids emprats per a l'obtenció dels dobles mutants E134A/D136A i E134A/D136N.

### Protocol

- Es barregen els reactius indicats a la taula II.3. en un tub Eppendorf de 200 µL, s'addiciona aigua MilliQ autoclavada fins a obtenir un volum final de 50 µL. La reacció es realitza per duplicat utilitzant 10 i 20 ng d'ADN motlle.

Reactiu	Quantitat final
Encebadors (cadascun)	125 ng
pD6-2-E134A-bgl	10 i 20 ng
dNTPs	200 µM
<i>PfuTurbo</i>	2.5 U
Tampó de reacció	1x

**Taula II.3.** Quantitats de reactius emprats en la PCR.

- Es programen 25 cicles d'amplificació, segons esquema següent:

Etapa	Nº cicles	temps	Temperatura
<b>Desnaturalització inicial</b>	1	30 s	95°C
<b>Desnaturalització</b>	30	30 s	95°C
<b>Hibridació</b>		1 min	68°C
<b>Elongació</b>		10 min	68°C
<b>Conservació</b>	1	∞	4°C

**Taula II.4.** Condicions de temperatura emprades en les diferents etapes de la PCR total per a l'obtenció dels dobles mutants E134A/D136A i D134A/D136E.

- Finalitzada la reacció de PCR, se separen alíquotes de 10 µL de cadascuna de les mostres. S'addiciona 1 µL de *DpnI* als 40 µL de mescla de reacció restants i s'incuba a 37°C durant 24 hores.
- El resultat de la PCR total s'analitza per gel d'agarosa. Es compara l'alíquota de 10 µL de la reacció de PCR i la mostra digerida amb *DpnI*.



Producte de PCR no digerit amb *DpnI*:

- 1- Mutant E134A/D136A utilitzant 10 ng de pD6-2-E134A-bgl
- 2- Mutant E134A/D136A utilitzant 20 ng de pD6-2-E134A-bgl
- 3- Mutant E134A/D136N utilitzant 10 ng de pD6-2-E134A-bgl
- 4- Mutant E134A/D136N utilitzant 20 ng de pD6-2-E134A-bgl
- 5- DNA Marker III

Producte de PCR digerit amb *DpnI*:

- 6- Mutant E134A/D136A utilitzant 10 ng de pD6-2-E134A-bgl
- 7- Mutant E134A/D136A utilitzant 20 ng de pD6-2-E134A-bgl
- 8- Mutant E134A/D136N utilitzant 10 ng de pD6-2-E134A-bgl
- 9- Mutant E134A/D136N utilitzant 20 ng de pD6-2-E134A-bgl

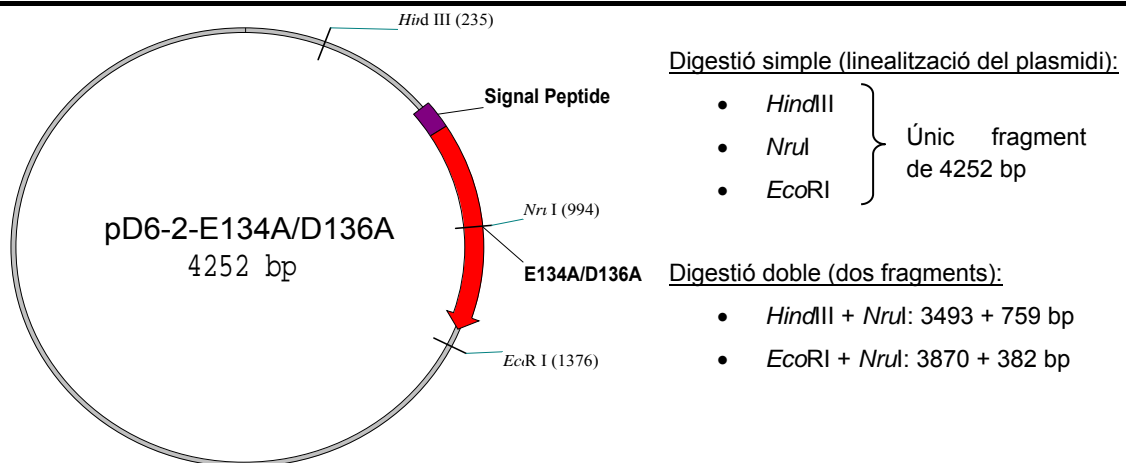
**Figura II.5.** Gel d'agarosa corresponent als productes de les PCR per a l'obtenció dels mutants E134A/D136A i D134A/D136E.

Per les mostres que contenien 10 ng de DNA motlle la PCR no ha estat satisfactòria (no s'obté plasmidi de nova síntesi en les mostres digerides amb *DpnI*). En canvi, les mostres amb 20 ng d'ADN motlle han donat lloc a un plasmidi de nova síntesi, com demostra el fet que no es digerible per *DpnI* (Figura II.5, carrils 7 i 9).

5. Per la mostra positiva del mutant pD6-2-E134A/D136N-bgl. es procedeix a realitzar una transformació per xoc tèrmic (cèl·lules DH5 $\alpha$ ), seguit de la creació d'un estoc d'ADN d'algunes colònies transformants i posterior seqüenciació d'algunes d'elles.
6. Pel mutant pD6-2-E134A/D136N-bgl es procedeix a realitzar un anàlisi de restricció abans de la seqüenciació.

**4.2. Anàlisi de restricció de pD6-2-E134A/D136A-bgl.**

La introducció de la mutació D136A es comprova per anàlisi de restricció, atès que la mutació genera una nova diana per l'enzim *NruI*. Es realitza una digestió simple amb *NruI* i dues digestions dobles amb *NruI* + *HindIII* i *NruI*+*EcoRI*. A l'esquema següent (figura II.6) es mostren els resultats que s'obtidrien per a les diferents digestions realitzades.



**Figura II.6.** Esquema del plasmidi PD6-2E134A/D136A amb la situació de les dianes de restricció *HindIII*, *NruI* i *EcoRI*. A la part dreta s'indica els resultats de sotmetre el plasmidi a digestions simples i dobles amb els diferents enzims de restricció.

Protocol

Per la digestió amb *EcoRI* i *NruI* es preparen, en Eppendorfs de 0.2 mL per cada estoc d'ADN mutant i pel pD6-2-E134A-bgl, tres mostres amb les quantitats finals que es mostren a continuació fins a un volum total de 10 µL.

Reactiu	Mostra 1	Mostra 2	Mostra 3
ADN	100 ng	100 ng	100 ng
Tampó NE 3	1 µL	1 µL	1 µL
<i>NruI</i>	-	1 µL	1 µL
<i>EcoRI</i>	-	-	1 µL

Taula II.7. Reactius emprats en l'anàlisi de restricció.

Les mostres s'incuben 2 hores a 37°C. Llavors s'inactiven els enzims de restricció incubant 20 minuts més a 65°C. Finalment es guarden a -20°C.

La digestió amb *HindIII* i *NruI* es duu a terme de la mateixa manera que s'ha exposat anteriorment. Ara bé, les mostres s'incuben O.N. a 37°C. Després s'inactiven els enzims incubant 20 minuts més a 65°C. Finalment es guarden al congelador.

Un cop es tenen totes les mostres s'analitza el resultat de la digestió mitjançant un gel d'agarosa.

La digestió simple amb *HindIII*, *NruI* o *EcoRI* linealitzava el plasmidi, on s'obté un únic fragment de 4252 bases. Pel que fa a la digestió doble, s'obtenen dos fragments de mida molt diferent. Les mostres corresponents a totes les digestions realitzades amb dos estocs de pD6-2-E134A/D136A-bgl s'analitzen per electroforesi en gel d'agarosa (figura II.8).

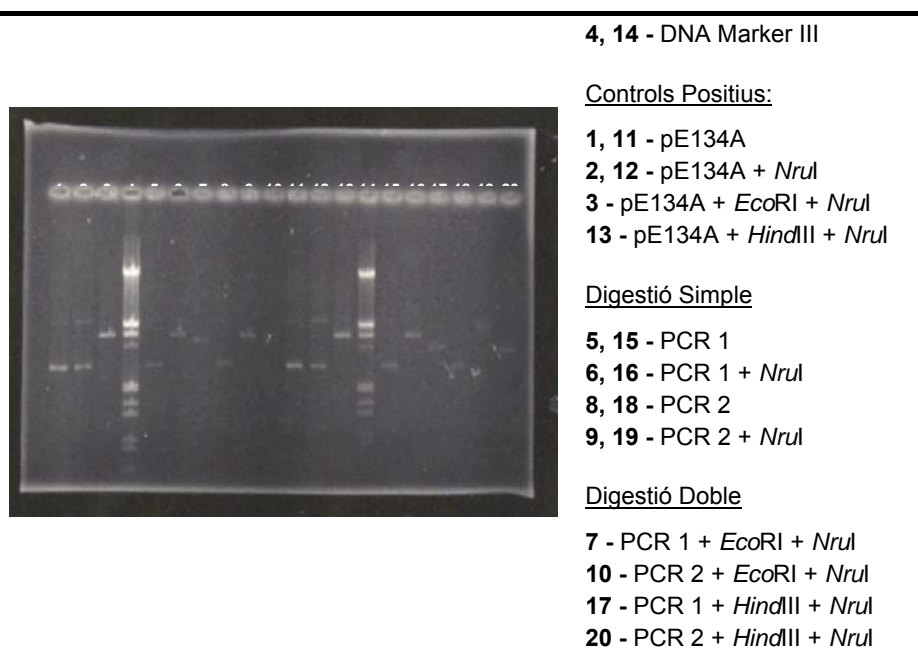


Figura II.8. Gel d'agarosa de diferents estocs de pD6-2-E134A/D136A-bgl sotmesos a digestions simples i dobles amb els enzims *HindIII*, *NruI* i *EcoRI*.

S'observa com la digestió del plasmidi original pD6-2-E134A-bgl amb *NruI* no dona lloc a una linealització, sí en canvi la digestió amb *HindIII* i *EcoRI* (control positiu). Els estocs del doble mutant són linealitzats per tractament amb *NruI* (carrils 5, 8, 16 i 19); La digestió doble genera dos fragments de diferent mida, el més petit d'ells difícil de detectar.

Els resultats anteriors indiquen que la introducció de la mutació D136A sobre el mutant E134A de la  $\beta$ -glucanasa s'ha realitzat satisfactòriament.

## 5. Obtenció dels mutants E134G i E134S

L'obtenció dels mutants E134G i E134S de la  $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* es realitza pel mètode del *MegaPrimer*. Tanmateix, en primera instància els mutants s'intenten assolir sense èxit mitjançant la metodologia QuickChange. Els oligonucleòtids sintètics dissenyats en primer lloc s'empren a posteriori en la metodologia del *MegaPrimer*.

### 5.1. Disseny d'encebadors per a mutagènesi dirigida mitjançant QuickChange

En una primera aproximació, es pretén introduir les mutacions desitjades per la metodologia QuickChange (Stratagene). Per això, es dissenyen oligonucleòtids mutagènics seguint els requeriments de la metodologia QuickChange. A la taula II.9 es mostren els codons que codifiquen per Glicina i Serina, la seva freqüència d'expressió en *E. coli* i la generació de noves dianes de restricció.

Aminoàcid	Codó	Freqüència d'expressió en <i>E. Coli</i>	Noves dianes de restricció
Glu	GAA	0.68	
Gly	GGT	0.34	
	<b>GGC</b>	<b>0.39</b>	
	GGA	0.12	
	GGG	0.15	MamI, BsaB I
Ser	<b>TCG</b>	0.15	MamI, BsaB I
	TCA	0.13	
	TCT	0.16	
	TCC	0.15	
	AGT	0.15	
	<b>AGC</b>	<b>0.26</b>	

**Taula II.9.** Possibles codons per a la substitució de glutamat per glicina i serina, així com les seves freqüències d'expressió en *E. Coli*. Destacat es troben els codons seleccionats

Se seleccionen els codons **GCC** per a realitzar la mutació per glicina i **AGC** per a realitzar la mutació per serina. En aquest cas, es prioritza la freqüència d'expressió d'aquests codons en l'organisme hoste, malgrat s'hagin d'alterar 2 i 3 bases respectivament.



## II. BIOLOGIA MOLECULAR – PART EXPERIMENTAL

Els encebadors mutagènics emprats i les seves característiques es descriuen a la taula II.10:

E134G	
<b>Seqüència original</b>	5'- T <u>ACG CCT TGG GAT GAA</u> ATC GAC ATT CG A -3'
<b>Encebador directe</b>	5'- ACG CCT TGG GAT <b>GGC</b> ATC GAC ATT CG -3'
<b>Longitud (bp)</b>	25
<b>T<sub>fus</sub> (°C)</b>	77.6
<b>Contingut G+C (%)</b>	48.8

E134S	
<b>Seqüència original</b>	5'- T <u>ACG CCT TGG GAT GAA</u> ATC GAC ATT CG A -3'
<b>Encebador directe</b>	5'- ACG CCT TGG GAT <b>AGC</b> ATC GAC ATT CG -3'
<b>Longitud (bp)</b>	25
<b>T<sub>fus</sub> (°C)</b>	75
<b>Contingut G+C (%)</b>	46.3

**Taula II.10.** Oligonucleòtids mutagènics dissenyats pels dos mutants *sense* (5'→3').

Les condicions de temperatura emprades en cada etapa es mostren a continuació (taula II.11):

Etapa	Nº cicles	Temps	Temperatura
<b>Desnaturalització inicial</b>	1	30 s	95°C
<b>Desnaturalització</b>	30	30 s	95°C
<b>Hibridació</b>		1 min	68°C
<b>Elongació</b>		10 min	68°C
<b>Conservació</b>	1	∞	4°C

**Taula II.11.** Condicions de temperatura emprades en les diferents etapes de la PCR total per a l'obtenció dels mutants E134G i E134S.

Les mostres resultants de la PCR es digereixen amb *DpnI* i s'analitzen en gel d'agarosa. S'observa que els productes de PCR presenten la mateixa longitud que el vector de l'enzim wt linealitzat (pD62 w).



**Figura II.12.** Productes de la PCR després de ser digerits amb *DpnI*. Presenten la mateixa mida que el plasmidi pD62 de l'enzim w linealitzat amb *EcoRI*.

El producte de la PCR digerit amb *DpnI* es transforma en cèl·lules competents XL 10-gold i se sembra en plaques de medi LB suplementades amb ampicil·lina. Les colònies seleccionades per enviar a seqüenciació revelen que s'han introduït repeticions de l'encebador en el punt de mutació.

Per tal de reduir l'aparició de repeticions de l'encebador al punt de mutació es varien tres punts en les condicions reacció:

- 1) addició d'un 50% de DMSO per tal de disminuir les possibles estructures secundàries que es puguin formar.
- 2) concentració d'encebadors emprada durant les reaccions era de 0.25  $\mu\text{M}$ , aquesta es disminueix a 0.15  $\mu\text{M}$ , 0.1  $\mu\text{M}$  i 0.05  $\mu\text{M}$ .
- 3) S'empra un temps d'elongació inferior a 6 minuts.

Amb tot, s'obtenen diversos clons que a l'hora de ser seqüenciats, mostren novament l'aparició de repeticions de l'encebador en el punt de mutació. Es decideix abordar l'obtenció dels mutants d'interès per la metodologia de *Megaprimer*.

## 5.2. Mutagènesi dirigida pel mètode del *Megaprimer*

La metodologia del *Megaprimer* (Kammann et al., 1989) es basa en el disseny d'un insert, que basat en la seqüència del gen i que conté la mutació desitjada. L'insert es genera a partir de dues PCRs i es lliga al vector. La primera PCR es duu a terme a partir d'un encebador mutagènic i un altre complementari. El fragment obtingut, anomenat *Megaprimer*, conté la mutació desitjada i una única diana de restricció. El *Megaprimer* s'empra en la segona reacció de PCR, on es polimeritza la totalitat del gen generant-se una segona diana de restricció. El producte de PCR pot ser digerit per les dues dianes de restricció i lligat a una altre vector.

Per a la primera PCR, s'empra el plasmidi pD6-2 com a DNA motlle. Per tal d'introduir les mutacions E134G i E134S, s'utilitzen els oligonucleòtids dissenyats per a ser emprats en la metodologia QuickChange i l'encebador FUP, que uneix a unes 400 bp de distància de l'oligonucleòtid directe (taula II.14).

### Reactius primera reacció

Motlle	vector pD6-2
Encebadors universals	FUP (Forward Universal Primer) i RUP (Reverse Universal Primer)
Oligonucleòtids	E134G, T ACGCCTTGGGATGGCATCGACATTCG A E134S, T ACGCCTTGGGATAGCATCGACATTCG A
Polimerasa	DeepVent® de <i>Pyrococcus furiosus</i> sp. GB-D (New England Biolabs, Inc.)
Condicions	30 s per cicle, T = 72°C, [Mg <sup>2+</sup> ] = 0 – 8 mM

Taula II.14. Reactius emprats en la primera reacció de la metodologia del *Megaprimer*.

### Protocol primera reacció

Etapa	Nº cicles	Temps	Temperatura
Desnaturalització inicial	1	1 min	94°C
Desnaturalització	29	1 min 15 s	94°C
Hibridació		1 min 30 s	43°C
Elongació		30 s	72°C
Elongació final	1	5 min	72°C
Conservació	1	∞	4°C

Taula II.16. Condicions de reacció per a la primera etapa de PCR emprant la polimerasa DeepVent® (1kb/min). El temps d'elongació es fixa a 30 s.

Per a la segona reacció de PCR s'empra el *Megaprimer* obtingut anteriorment i l'encebador universal RUP. Les condicions de reacció són les següents (taula II.17):

Protocol segona reacció

Etapa	Nº cicles	Temps	Temperatura
Desnaturalització inicial	1	1 min	94°C
Desnaturalització	29	1 min 15 s	94°C
Hibridació		1 min 30 s	45°C
Elongació		1 min 15 s	72°C
Elongació final	1	10 min	72°C
Conservació	1	∞	4°C

Taula II.17. Condicions de reacció per a la segona etapa de PCR, emprant el *Megaprimer* i el RUP com a encebadors.

L'insert es purifica per extracció en gel i es re-amplifica amb una tercera PCR, emprant les mateixes condicions que per a la segona reacció.

Després de purificar novament l'insert, es lliga amb èxit al vector pD6-2 digerit prèviament amb *EcoRI* i *HindIII*. Es transforma el producte de lligació en cèl·lules competents TOP 10.

**5.2.2. Mutant E134G de la  $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis***

De les colònies de cèl·lules transformades amb el producte de lligació, es realitzen minipreparacions per a aïllar el DNA plasmídic i realitzar un anàlisi de restricció en gel d'agarosa (figura II.18). Els clons positius se seleccionen per a seqüenciació amb l'encebador FUP.

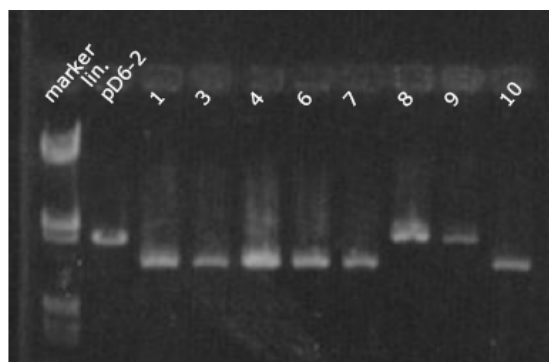
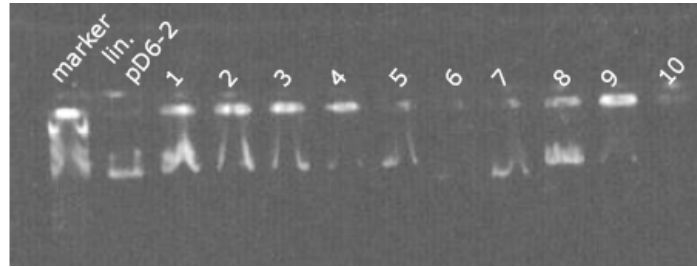


Figura II.18. Cribratge de les colònies transformades amb el producte de lligació per al gen que conté la mutació E134G. Es linealitzava i es compara amb el plasmídic pD6-2. S'observa com només les colònies 8 i 9 presenten al mateixa mida que el plasmídic original.

La seqüenciació d'ambdós clons confirma que el clon 9 presenta el codó mutagènic **GCC** a la posició 374 i la seqüència és correcta des de les posicions 150 a 500.

**5.2.2. Mutant E134S de la  $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis***

De la mateixa manera que amb els productes de lligació del mutant E134G, es realitzen minipreparacions per a aïllar el DNA plasmídic i realitzar un anàlisi de restricció en gel d'agarosa (figura II.19). Els clons positius se seleccionen per a seqüenciació amb l'encebador FUP.



**Figura II.19.** Cribatge de les colònies transformades amb el plasmidi que conté la mutació E134S. Es linealitzava i es compara amb el plasmidi pD6-2. S'observa com les colònies 6 i 7 no presenten la mateixa mida que el plasmidi original.

La seqüenciació confirma que el clon 9 conté la mutació esperada **GCT** a la posició 376.

## III. Expressió i purificació de proteïnes

### 1. Consideracions prèvies

#### 1.1. Instrumentació

- Incubador orbital Innova 400.
- Centrífuga Sorvall RC50.
- Cabina de flux laminar vertical Telsar AV100.
- Equip d'ultrafiltració tangencial:
  - Cartutx Prep-Scale™ TTF (Millipore) amb membrana de poliètersulfona de 0,09 m<sup>2</sup>.
  - Bomba peristàltica d'ultrafiltració tangencial i manòmetre (Millipore).
- Equip de cromatografia:
  - Columna empaquetada HiLoad™ 16 SP Sepharose® Fast Flow (Pharmacia LKB biotechnologies).
  - Columna empaquetada XK-26, reïna Superdex 75 (Pharmacia LKB biotechnologies).
  - Columna empaquetada d'afinitat Hitrap™ Chelating (Pharmacia Biotech)
  - Bomba peristàltica Miniplus 3 Gilson.
  - Detector Wilson UV/Vis 112.
  - Enregistrador Kipps & Zonen.
  - Col·lector de fraccions Wilson FC 203.
- Equip per a electroforesi desnaturalitzant en gel d'acrilamida (SDS-PAGE).

#### 1.2. Medis de cultiu

S'empren els medis de cultiu descrits a l'apartat 1.3 del capítol II. Biologia Molecular de la part experimental.

## 2. Expressió i purificació del wt i dels mutants E134A, E134S, E134G, E134A/D136A, E134A/D136N, E134A/D136E de la 1,3-1,4-β-glucanasa de *Bacillus licheniformis*.

### 2.1. Expressió

Es transformen cèl·lules competents BL21-SI amb el vector corresponent (pD6-2-E134A-bgl; pD6-2-E134S-bgl; pD6-2-E134G-bgl; pD6-2-E134A/D136A-bgl; pD6-2-E134A/D136N-bgl; pD6-2-E134A/D136E-bgl). Es fan créixer selectivament en medi de cultiu líquid 2xYT suplementat amb ampicil·lina durant 20 hores, a 300 rpm i 37°C.

### 2.2. Purificació

#### 2.2.1. Preparació de tampons

- CaCl<sub>2</sub> 2 M: 29.4 g CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, s'enrasa a 100 ml amb aigua MilliQ.
- Tampó de sonicació (AcONa 20 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, pH 5): 1.36 g AcONa·3H<sub>2</sub>O, 1.25 ml CaCl<sub>2</sub> 2 M, s'ajusta a pH = 5 i s'enrasa a 500 ml amb aigua MilliQ.

- Tampó C (AcONa 0.5 M, pH 5.5): 68 g AcONa·3H<sub>2</sub>O, s'ajusta a pH 5.5, s'enrasa 1 L amb aigua MilliQ i es filtra a través d'un filtre de 45 µm.
- Tampó A (AcONa 5 mM, pH 5.5): 10 ml tampó C s'enrasen a 1 L amb aigua MilliQ
- Tampó B (AcONa 5 mM, NaCl 0.6 mM, pH 5.5): 10 ml tampó C, 35 g NaCl, s'enrasa a 1 L amb aigua MilliQ i es filtra a través d'un filtre de 45 µm.
- Tampó H (AcONa 0.5 M, pH 6): 68 g AcONa·3H<sub>2</sub>O, s'ajusta a pH 6, s'enrasa a 1 L amb aigua MilliQ i es filtra a través d'un filtre de 45 µm.
- Tampó G (AcONa 20 mM, CaCl<sub>2</sub> 20 mM, NaCl 100 mM, pH 6): 5.84 g NaCl, 40 mL de tampó H, 10 mL de CaCl<sub>2</sub> 2 M, s'enrasa a 1 L amb aigua MilliQ i es filtra a través d'un filtre de 45 µm.
- Tampó de diàlisi (AcONa 5 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, pH 6): 20 mL de tampó H, 1 mL de CaCl<sub>2</sub> 2 M, s'enrasa a 2 L amb aigua MilliQ i es filtra a través d'un filtre de 45 µm.
- Tampó MOPS (Sigma) 2 mM

#### 2.2.2. Centrifugació (separació medis intracel·lular i extracel·lular)

Se centrifuga el 2.25 L de cultiu a 8000 rpm i 4°C durant 10 minuts. El *pellet* (proteïnes intracel·lulars) es guarda resuspès en tampó de sonicació a 4°C fins a sonicació. El sobrenedant (proteïna extracel·lular) s'acidula a pH 5 i es conserva a 4°C fins a ultracentrifugació tangencial.

#### 2.2.3. Lisi cel·lular (tractament medi intracel·lular)

La lisi cel·lular es duu a terme per sonicació seguint la metodologia descrita a les consideracions prèvies del present capítol i amb la proteïna dissolta en tampó de sonicació.

Un cop finalitzada la lisi, la dissolució de proteïna se centrifuga a 8000 rpm durant 15 minuts i a 4°C i es guarda el sobrenedant a 4°C fins a la seva purificació.

#### 2.2.4. Ultracentrifugació tangencial (tractament medi extracel·lular)

Es neteja l'equip (que conté NaOH 0.1 M per a la seva conservació) passant 3 L d'aigua desionitzada sense recircular i 3 L amb recirculació a un flux de 3 ml·min<sup>-1</sup> (1-6 ml·min<sup>-1</sup>) i a una pressió màxima de 150 kPa.

Es fa circular la dissolució de proteïna extracel·lular fent recircular la dissolució que conté les molècules retingudes fins a un volum de 400 ml. Es passen 200 ml d'aigua desionitzada per a recollir la dissolució de proteïna que ha quedat al sistema.

Finalment, es neteja el sistema passant 2 L d'aigua desionitzada sense recircular i 2 L més d'aigua desionitzada recirculant. A continuació es passa 1 L de NaOH 0.1 M sense recircular i 3 L de NaOH 0.1 M recirculant. Es guarda el sistema en NaOH 0.1 M i a 4°C. Es dialitzen tant la porció de proteïna intracel·lular com l'extracel·lular, diverses vegades front a tampó A.

#### 2.2.5. Columna de bescanvi catiònic

Es neteja la columna de bescanvi catiònic HiLoad™ 16 SP Sepharose® Fast Flow (Pharmacia LKB biotechnologies) passant-hi 50 mL d'aigua MilliQ (la columna conté EtOH al 20% per a la seva conservació). S'equilibra amb 150 mL de tampó A i es comprova que l'eluent de sortida de

columna té el pH i conductivitat corresponents al tampó A. S'ajusta el cabal a  $4 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ . Aquestes condicions corresponen al zero d'absorbància a 280 nm.

Es carrega la mostra de proteïna extracel·lular i es renta amb tampó A fins que el detector indica línia de base. S'elueix la proteïna amb gradient lineal de 0 a 100% amb tampó B a un flux de  $2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  i es recullen les mostres al col·lector. Se seleccionen els tubs corresponents a la proteïna d'interès, analitzant-los per gel d'electroforesi, es dialitzen diverses vegades front a tampó F i finalment es liofilitzen per a concentrar la proteïna.

Per a la neteja de la columna, s'hi fan circular a través 500 mL de NaCl 2 M, 200 mL d'aigua MilliQ, 300 mL de NaOH 1 M, 200 mL més d'aigua MilliQ i finalment 50 mL de tampó C.

Se segueix el mateix procediment per a la proteïna intracel·lular.

#### 2.2.6. Columna de gel-filtració

Es neteja la columna de gel filtració XK-26, reïna Superdex 75 (Pharmacia LKB Biotechnologies) fent circular a través de la columna 100 ml d'aigua MilliQ. S'equilibra amb 100 ml de tampó G i es comprova que l'eluent de sortida de columna té pH 6. S'ajusta el cabal a  $0.8 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ . Aquestes condicions corresponen al zero d'absorbància a 280 nm.

Es dissol la proteïna liofilitzada en el mínim volum possible de tampó F (com a màxim 4 ml). Es carrega la dissolució de proteïna i s'elueix amb tampó G a un flux de  $0.4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . Es recullen els primers 40 ml en un matràs Erlenmeyer i després en tubs Eppendorf (3 min/tub). Se seleccionen els tubs que contenen la proteïna d'interès analitzant-los per gel d'acrilamida (SDS-PAGE), es dialitzen front a tampó MOPS 2 mM i diverses vegades front a aigua MilliQ. La columna es neteja passant-hi 250 mL de NaOH 1 M, 200 mL d'aigua MilliQ, 100 mL de tampó H i finalment 150 ml de tampó G.

Es determina la concentració de proteïna total per absorbància i es liofilitza en Eppendorfs que contenen alíquotes de 0.4 mg de proteïna.

### 3. Expressió i purificació del wt i del mutant E383A de la $\beta$ -glucosidasa d'*Streptomyces* sp.

#### 3.1. Expressió

Es transformen cèl·lules competents BL21-DE3 amb el vector pET21-HBG3 pel que fa a l'enzim wt i el vector pET-E383A-bgl pel que fa al mutant E383A. Es fan créixer selectivament en medi de cultiu líquid 2xYT suplementat amb ampicil·lina durant 12 hores, a 300 rpm i  $37^\circ\text{C}$ .

#### 3.2. Purificació

##### 3.2.1. Preparació de tampons

- Tampó d'unió (8x) (4 M NaCl, 160 mM Tris-HCl): 118.9 g NaCl, 9.69 g Tris-HCl, s'ajusta a pH 7.9, s'enrasa a 500 ml i es filtra a través d'un filtre de  $45 \mu\text{m}$ .
- Tampó de càrrega (8x) (400 mM NiSO<sub>4</sub>): 5.25 g NiSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, s'enrasa a 500 ml i es filtra a través d'un filtre de  $45 \mu\text{m}$ .

- Tampó de rentat (8x) (320 mM imidazol, 4 M NaCl, 160 mM Tris-HCl): 10.9 g imidazol, 118.9 g NaCl, 9.69 g Tris-HCl, s'ajusta a pH 7.9, s'enrasa a 500 ml i es filtra a través d'un filtre de 45 µm.
- Tampó d'elució (4x) (1 M imidazol, 2 M NaCl, 80 mM Tris-HCl): 6.8 g imidazol, 11.89 g NaCl, 0.97 g Tris-HCl, s'ajusta a pH 7.9, s'enrasa a 100 ml i es filtra a través d'un filtre de 45 µm.
- Tampó fosfat 50 mM (pH 7): 1.5 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6.29 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, s'ajusta a pH 7, s'enrasa a 500 ml i es filtra sobre un filtre de 45 µm.

#### 3.2.2. Lisi cel·lular

Se centrifuguen els cultius a 3000 rpm durant 15 minuts i a 4°C, es decanten i es resuspèn el *pellet* en 130 ml de tampó d'unió (1x).

La lisi cel·lular es duu a terme per sonicació seguint la metòdica descrita a les consideracions prèvies d'aquest capítol i amb la proteïna dissolta en tampó d'unió (1x).

Un cop finalitzada la lisi, la dissolució de proteïna se centrifuga a 8000 rpm durant 15 minuts i a 4°C i es conserva el sobrenedant a 4°C fins a la seva purificació.

#### 3.2.3. Columna d'afinitat

Es fan circular per la columna d'afinitat Hitrap™ Chelating (Pharmacia Biotech), prèviament rentada amb H<sub>2</sub>O MilliQ, 40 mL de tampó de càrrega (1x). Es passen per la columna 40 mL de tampó d'unió (1x) i es carrega la proteïna.

Seguidament, es realitzen els diferents rentats per a separar la proteïna d'interès de les altres proteïnes intracel·lulars del bacteri. En primer lloc, es fan circular 50 mL de tampó d'unió (1x), per tal de separar les proteïnes que no tenen afinitat pels cations níquel. En segon lloc, se separen les proteïnes que presenten certa afinitat pels cations níquel fent passar 30 mL de tampó de rentat (1x) per la columna. Finalment, s'elueix el mutant E383A de la β-glucosidasa passant 50 mL de tampó d'elució (1x). Es recullen les mostres al col·lector i se seleccionen els tubs corresponents a la proteïna d'interès, analitzant-los per SDS-PAGE. Es dialitza diverses vegades la fracció eluïda front a tampó fosfat 50 mM.

### 4. Anàlisi i paràmetres físics dels enzims

#### 4.1. Determinació de la concentració de proteïna

##### 4.1.1. Instrumentació

Espectrofotòmetre UV-VIS Helios α UNICAM

Cubetes de quars Hellman

HPLC: Agilent 1100 Series System controller

Agilent 1100 Series Multisolvent delivery system

Agilent 1100 Series Tunable absorbance detector

Agilent 1100 Series Data module

Columna: Nova-Pak® C-18, 4µm (Waters)



#### 4.1.2. Determinació de concentració de proteïna total

Es determina la concentració de proteïna total per espectroscòpia UV/VIS, mesurant-ne l'absorbància a  $\lambda=280$  nm.

Es prepara una dissolució estoc que asseguri una absorbància dins els marges de linealitat de la llei de Lambert i Beer (0.1 - 0.9 uA). Es disposa d'una cubeta de 300  $\mu$ L amb 200  $\mu$ l d'aigua MilliQ, (com a referència s'utilitza una d'1 mL que contingui més de 800  $\mu$ L d'aigua MilliQ) a la qual s'hi addicionen al·lquotes de 5  $\mu$ l de la dissolució de proteïna. S'enregistren els valors d'absorbància després de cada addició enfront de la referència.

Es representa l'absorbància vs. el factor de dilució i les dades s'ajusten a una recta, el pendent de la qual determina la concentració de proteïna total a la dissolució, segons les següents equacions:

$$Abs = C \cdot \varepsilon \cdot l$$

**Equació A:** Equació de Lambert i Beer que relaciona l'absorbància en funció de la concentració, el coeficient d'extinció i la longitud del camí òptic.

$$Abs = C_{Estoc} \cdot \varepsilon \cdot l \cdot \frac{V_{ad}}{V_{ad} + 200}$$

**Equació B:** Equació de Lambert i Beer modificada que relaciona l'absorbància amb la concentració de l'estoc del qual es realitzen les addicions, el coeficient d'extinció, el camí òptic i el volum addicionat en cada mesura.

Les concentracions obtingudes per a cada proteïna són les següents:

Proteïna	$\varepsilon_{280}$ ( $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ )	proteïna (mg)	Volum cultiu (L)	Rendiment expressió (mg/L)	
wt 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa	353365	14.23	5.7	2.5	
E134A 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa		25.09	2.25	7.7	
$\beta$ -glucosidasa wt	107000	87.2	0.8	109	
E383A $\beta$ -glucosidasa		XP008	19.25	3	6.42
		XP212	93.44	1.6	58.4
		XPj324	56	2	112
		MP123	96.75	2.25	43

**Taula III.1:** Quantitat de proteïna total obtinguda i rendiments d'expressió per a diferents lots d'expressió d'enzims.

#### 4.1.3. Determinació de la concentració de proteïna activa

##### A. Determinació de proteïna activa en proteïnes d'activitat sintasa

###### Procediment:

Es col·loquen en tub Eppendorf les quantitats suficients de dissolucions estoc de donador, acceptor i tampó per tal d'obtenir les concentracions desitjades i aigua MilliQ fins a un volum tal que amb l'addició d'enzim s'obtingui un volum total de 300  $\mu$ l.

S'incuba a 35°C durant 5 minuts i s'hi addiciona l'enzim. Es considera aquest instant com a temps inicial. Es pren una al·lquota de 20  $\mu$ l del cru de reacció, es dilueix 10 vegades amb aigua MilliQ,

s'agita amb el vòrtex i s'analitza per HPLC, amb una columna de fase reversa i detecció a l'UV al màxim d'absorbància del cromòfor emprat.

Es repeteix la mateixa operació amb al·lotes preses a intervals de 15 minuts durant 1.25 hores. Es calcula la concentració de producte en cada moment per normalització interna, segons:

$$[\text{Producte}] = \frac{\text{Àrea producte}}{\text{Àrea acceptor} + \text{Àrea producte}} \cdot [\text{acceptor}]_0$$

**Equació C.** Concentració del producte de transglicosidació en funció de l'àrea del producte, l'àrea de l'acceptor i la concentració inicial d'acceptor.

Es representa la concentració de producte enfront el temps i les dades s'ajusten a una recta, la pendent de la qual determina la velocitat inicial de transglicosidació. Es repeteix la cinètica per triplicat. Les velocitats inicials ( $V_0$ ) obtingudes s'interpolen a la recta patró d'activitat per a determinar la concentració de proteïna activa.

#### **A.1. Determinació de la concentració activa del mutant E134A de la $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*.**

##### *Disacàrid com a donador*

Es resuspenen 0.4 mg de proteïna en 328  $\mu$ l d'aigua MilliQ, per tal d'obtenir una dissolució estoc d'aproximadament 50  $\mu$ M en proteïna total. S'agita suaument i se centrifuga. El sobrenedant es transvasa a un tub Eppendorf i es torna a centrifugar. Es recull de nou el sobrenedant i se'n determina la concentració de proteïna total per absorbància a 280 nm.

La mesura de l'activitat del mutant E134A de la 1,3-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* es duu a terme en tampó maleat 50 mM, a pH 7, emprant Glc $\beta$ 3Glc $\alpha$ F com a donador (3 mM), Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ -MU com a acceptor (6 mM), i en presència de CaCl<sub>2</sub> (0.1 mM). La concentració d'enzim al cru de reacció és de 0.5  $\mu$ M, determinada per absorbància.

Les condicions cromatogràfiques són: MeOH:H<sub>2</sub>O (16:84) com a eluent, cabal d'1 ml·min<sup>-1</sup>, 35°C i detector UV a  $\lambda$  = 316 nm.

Les velocitats inicials obtingudes en els dos experiments realitzats s'interpolen a la recta patró de referència (Faijes i Planas, 2001):

$$V_0 \text{ (mM}\cdot\text{s}^{-1}\text{)} = 41.5797 \cdot 10^{-6} \cdot [\text{E134A}] \text{ (}\mu\text{M)}$$

**Equació D:** Equació de la recta patró de referència per a calcular la concentració d'enzim actiu a partir de la velocitat inicial de transglicosidació entre Glc $\beta$ 3Glc $\alpha$ F (3 mM) i Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ MU (6 mM), en presència de CaCl<sub>2</sub> (0.1 mM), en tampó maleat 50 mM a pH 7 i a 35°C.

##### *Trisacàrid com a donador*

En el present treball es realitza una nova recta patró de  $V_0$  de transglicosidació vs. [E134A] per a la reacció de formació del pentasacàrid Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 3Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP.

Les condicions de reacció són: tampó citrat/fosfat 50 mM, pH 7 a 35°C, força iònica constant a I = 0.5 M, [CaCl<sub>2</sub>] = 0.1 mM, [E134A] = 0.1 - 0.7  $\mu$ M (determinada a partir de l'equació D), [Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 3Glc $\alpha$ F] = 1 mM, [Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP] = 5 mM.

Es representen les dades de concentració de producte format en funció del temps. El pendent de la zona lineal inicial correspon a la velocitat inicial ( $V_0$ ) del procés de formació del pentasacàrid. Els resultats s'indiquen a la taula III.2:

[E134A] ( $\mu\text{M}$ )	$t_0-t_f$ (min)	$V_0$ ( $\text{mM}\cdot\text{min}^{-1}$ )
*0.094	0 – 74	$2.826 \cdot 10^{-3}$
0.100	0 – 67	$1.912 \cdot 10^{-3}$
0.200	0 – 66	$3.113 \cdot 10^{-3}$
0.300	0 – 67	$4.234 \cdot 10^{-3}$
0.400	0 – 66	$4.734 \cdot 10^{-3}$
*0.500	0 – 68	$4.853 \cdot 10^{-3}$
0.500	0 – 62	$6.128 \cdot 10^{-3}$
0.600	0 – 74	$7.088 \cdot 10^{-3}$
0.700	0 – 69	$8.834 \cdot 10^{-3}$

**Taula III.2.** Velocitat inicial de formació del pentasacàrid en funció de la concentració total de glicosintasa E134A. \*Valors no emprats en el ajust.

Amb les dades de la taula anterior es representa la  $V_0$  en funció de la concentració d'enzim. S'ajusta la recta següent:

$$V_0 \text{ (mM}\cdot\text{s}^{-1}) = 1.16 \cdot 10^{-2} \cdot [\text{E134A}] \text{ (}\mu\text{M}) + 4 \cdot 10^{-3}$$

#### A.2. Determinació de la concentració activa del mutant E383A de la $\beta$ -glucosidasa *Streptomyces* sp.

La mesura de l'activitat del mutant E383A de la  $\beta$ -glucosidasa d'*Streptomyces* sp. es duu a terme en tampó fosfat 50 mM, a pH 7, emprant Glc $\alpha$ F com a donador (1 mM) i Gal $\beta$ pNP com a acceptor (5 mM). La concentració d'enzim és de 3  $\mu\text{M}$  per absorbància.

Condicions cromatogràfiques: MeOH:H<sub>2</sub>O (6:94) com a eluent, cabal d'1 ml·min<sup>-1</sup>, 35°C i detector UV a  $\lambda = 301$  nm.

Les velocitats inicials obtingudes en els tres experiments realitzats s'interpolen a la recta patró de referència:

$$V_0 \text{ (M}\cdot\text{min}^{-1}) = 1.504 \cdot [\text{E383A}] \text{ (M)} - 2.655 \cdot 10^{-8}$$

**Equació E:** equació de la recta patró de referència per a calcular la concentració d'enzim actiu a partir de la velocitat inicial de transglicosidació entre Glc $\alpha$ F (1 mM) i Gal $\beta$ pNP (5 mM) en tampó fosfat 50 mM a pH 7 i a 35°C.

## B. Determinació de proteïna activa en proteïnes d'activitat hidrolítica

### Procediment:

La determinació de l'activitat hidrolítica de les glicosidases emprades en el present treball es realitza per espectrofotometria monitoritzant la hidròlisi d'un substrat glicosídic amb aglicona cromofòrica.

La reacció d'hidròlisi es duu a terme en una cubeta de quars, on es situen les quantitats suficients del substrat i tampó per a obtenir les concentracions desitjades i aigua MilliQ fins a un volum tal que en addicionar l'enzim s'obtingui un volum total de 700-800  $\mu\text{L}$ . En una altra cubeta (que s'utilitzarà com a referència) es col·loquen tampó i substrat en les mateixes concentracions que a la reacció i amb el mateix volum total.

S'incuben a 30°C durant 5 minuts i s'hi addiciona l'enzim. Es considera aquest instant com a temps inicial. Es llegeix l'absorbància a la  $\lambda$  on l'aglicona hidrolitzada presenta la màxima absorció respecte la referència cada 30 segons durant una hora i es representa l'absorbància vs. el temps. Les dades s'ajusten una recta, la pendent de la qual correspon a la velocitat d'hidròlisi.

### B.1. Determinació de la concentració activa de $\beta$ -glucosidasa wt d'*Streptomyces sp.*

Pel cas de la  $\beta$ -glucosidasa wt, no es disposa d'una recta patró de referència d'activitat hidrolítica al grup. Tanmateix, es determina la concentració de proteïna activa d'un lot  $\beta$ -glucosidasa wt per tal de poder comparar-la amb l'activitat hidrolítica d'altres enzims. La mesura de l'activitat hidrolítica es duu a terme en tampó fosfat 50 mM, a pH 7, 30°C i emprant el Glc $\beta$ pNP ( $\lambda$  de mesura 400 nm). La concentració inicial de Glc $\beta$ pNP és de 0.5 mM, i la d'enzim és de 5.55 nM per absorbància.

Es representa la lectura d'absorbància a 400 nm vs. el temps i les dades s'ajusten a una recta. A continuació es presenten els resultats obtinguts en els experiments realitzats (taula III.3):

Experiment	$V_o$ ( $\mu\text{A}\cdot\text{s}^{-1}$ )	$V_o$ ( $\text{mM}\cdot\text{s}^{-1}$ )
1	$4 \cdot 10^{-4}$	$4.05 \cdot 10^{-5}$
2	$4 \cdot 10^{-4}$	$4.05 \cdot 10^{-5}$
3	$4 \cdot 10^{-4}$	$4.05 \cdot 10^{-5}$
<b>Mitjana</b>	<b><math>4 \cdot 10^{-4}</math></b>	<b><math>4.05 \cdot 10^{-5}</math></b>

Taula III.3: Velocitats inicials obtingudes en les cinètiques d'hidròlisi d'un lot de  $\beta$ -glucosidasa wt.

La conversió de uA a concentració de p-nitrofenol alliberat es realitza a partir de la diferència de coeficients d'absortivitat molar del p-nitrofenol alliberat i el p-nitrofenil  $\beta$ -glicòsid a 30°C i 400 nm,  $\Delta\epsilon = \epsilon_{400}(\text{pNP}) - \epsilon_{400}(\text{Glc}\beta\text{-pNP}) = 9867 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ , calculat prèviament al grup (Palasí i Planas, 2000).

Finalment es determina una activitat de  $V_o/[E] = 7.3 \text{ s}^{-1}$

### 4.2. Corbes de desnaturalització amb urea dels dobles mutants de la $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*.

#### 4.2.1. Material i reactius

- Fluorímetre (FluoroMax-2, ISA).
- Bany termostatat.
- Cubetes de fluorescència de quars de 3 mL.
- Tampó HEPES 1x (0.1 M) a pH 7; 30 °C.
- Tampó HEPES 1x (0.1 M) + urea (8 M) a pH 7; 30 °C.
- Enzim wt ( $[E] = 41.54 \mu\text{M}$ , en tampó HEPES 0.1 M).

- Enzim E134A ([E] = 26.20  $\mu\text{M}$ , en tampó HEPES 0.1 M).
- Enzim E134A/D136A ([E] = 18.21  $\mu\text{M}$ , en tampó HEPES 0.1 M).
- Enzim E134A/D136N ([E] = 20.86  $\mu\text{M}$ , en tampó HEPES 0.1 M).
- Enzim E134A/D136E ([E] = 22.49  $\mu\text{M}$ , en tampó HEPES 0.1 M).

#### 4.2.2. Protocol

Se segueix el mateix procediment experimental per a tots els enzims.

##### Procediment:

Les cinètiques de desnaturalització es realitzen en tampó HEPES/urea (0.1 M/8 M urea), i en paral·lel, en tampó HEPES (0.1 M) sense urea. Abans de l'addició de proteïna es realitza el blanc de cada tampó.

##### Experiment 1:

- En una cubeta de 3 mL addicionar el volum necessari de tampó HEPES 0.1M + urea 8M en funció de la concentració de cada proteïna.
- Realitzar el blanc per fluorescència.
- Addicionar els  $\mu\text{L}$  de l'estoc de proteïna per tal que la concentració final en la cubeta sigui de 1.64  $\mu\text{M}$  (40  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).
- Enregistrar la fluorescència a diferents temps.

##### Experiment 2:

- En una cubeta de 3 mL addicionar el volum necessari de tampó HEPES 0.1M en funció de la concentració de cada proteïna.
- Realitzar el blanc per fluorescència.
- Addicionar els  $\mu\text{L}$  de l'estoc de proteïna per tal que la concentració final en la cubeta sigui de 1.64  $\mu\text{M}$  (40  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).
- Enregistrar la fluorescència a diferents temps.

Les condicions instrumentals del fluorímetre són  $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$  (2 nm slit),  $\Delta\lambda_{\text{em}} = 290 - 500 \text{ nm}$  (4 nm slit). El bany termostatat del fluorímetre es manté al llarg de tot l'experiment a 30°C. Entre mesura i mesura les mostres es mantenen a 30°C.

En les següents taules es mostren els resultats obtinguts pels diferents enzims:

<b>wt</b>			
<b>t (h)</b>	<b><math>\lambda_{\text{màx}}</math> (nm)</b>	<b>I a <math>\lambda_{\text{màx}}</math> (c.p.s.)</b>	<b>I a <math>\lambda = 341 \text{ nm}</math> (c.p.s.)</b>
0	341	4086364	4086364
1	354	2726974	2556053
2	352	2564326	2322224
3	354	2452000	2196274
4	355	2427440	2174074
5	354	2426934	2173410
6	355	2414500	2164710

**Taula III.4.**  $\lambda_{\text{màx}}$  de fluorescència, fluorescència a  $\lambda_{\text{màx}}$  i a 341 nm a diferents temps pel wt.

**E134A**

<b>t (h)</b>	<b><math>\lambda_{\text{màx}}</math> (nm)</b>	<b>I a <math>\lambda_{\text{màx}}</math> (c.p.s.)</b>	<b>I a <math>\lambda = 341</math> nm (c.p.s.)</b>
0	341	4180603	4180603
1	341	3760760	3760760
2	346	3460363	3433856
3	348	3173027	3106309
4	349	2910446	2805036
5	350	2772376	2628383
6	351	2662240	2481970

**Taula III.5.**  $\lambda_{\text{màx}}$  de fluorescència, fluorescència a  $\lambda_{\text{màx}}$  i a 341 nm a diferents temps per l'E134A.

**E134A/D136A**

<b>t (h)</b>	<b><math>\lambda_{\text{màx}}</math> (nm)</b>	<b>I a <math>\lambda_{\text{màx}}</math> (c.p.s.)</b>	<b>I a <math>\lambda = 341</math> nm (c.p.s.)</b>
0	342	4011800	4011700
1	343	3711853	3708124
2	345	3455800	3447930
3	347	3221883	3187860
4	347	3021430	2964677
5	349	2882473	2792587
6	349	2777640	2666397

**Taula III.6.**  $\lambda_{\text{màx}}$  de fluorescència, fluorescència a  $\lambda_{\text{màx}}$  i a 341 nm a diferents temps per l'E134A/D136A.

**E134A/D136N**

<b>t (h)</b>	<b><math>\lambda_{\text{màx}}</math> (nm)</b>	<b>I a <math>\lambda_{\text{màx}}</math> (c.p.s.)</b>	<b>I a <math>\lambda = 341</math> nm (c.p.s.)</b>
0	341	4067199	4061209
1	342	3762166	3749213
2	344	3466730	3450043
3	347	3247714	3211723
4	346	3008846	2942103
5	350	2851793	2747490
6	351	2733976	2606546

**Taula III.7.**  $\lambda_{\text{màx}}$  de fluorescència, fluorescència a  $\lambda_{\text{màx}}$  i a 341 nm a diferents temps per l'E134A/D136N.

**E134A/D136E**

<b>t</b> (h)	$\lambda_{\text{m}\ddot{a}\text{x}}$ (nm)	<b>I a <math>\lambda_{\text{m}\ddot{a}\text{x}}</math></b> (c.p.s.)	<b>I a <math>\lambda = 341</math> nm</b> (c.p.s.)
0	341	3461854	3461854
1	346	2853040	2822337
2	349	2474144	2401707
3	353	2242377	2110917
4	353	2131223	1954755
5	353	2079142	1888692
6	353	2034835	1835538

**Taula III.8.**  $\lambda_{\text{m}\ddot{a}\text{x}}$  de fluorescència, fluorescència a  $\lambda_{\text{m}\ddot{a}\text{x}}$  i a 341 nm a diferents temps per l'E134A/D136E.

**4.3. Determinació del pes molecular de les proteïnes.**

La determinació de la massa molecular de la proteïnes es realitza a partir de mostres liofilitzades per MALDI-TOF MS al Laboratori de Proteòmica de l'Institut d'Oncologia de la Vall d'Hebron sota la supervisió del Dr. Francesc Canals.





## IV. ENZIMOLOGIA

### 1. Instrumentació

- HPLC: Agilent 1100 Series equipat amb bomba quaternària, injector manual, detector UV (VWD) i detector d'índex de refracció (RID)
- Espectrofotometria
- Fluorímetre
- HPCE: Hewlett-Packard HP3D CE G1600 AX equipat amb detector DAD.
- Elèctrode selectiu de Fluorur, Fluoride combination ISE/BNC (Sentek) acoblat al pHmetre CyberScan 2500.

### 2. Determinació de la concentració de substrats

#### 2.1. Determinació de la concentració de donadors glicosídics per elèctrode selectiu de fluorur (FSE)

Es preparen les dissolucions estoc següents:

- NaF 100 ppm: dilució 1:10 a partir d'una dissolució estàndard certificada de 1000 ppm en fluorur de sodi (Reagecon).
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 40 mM: s'enrasen 221 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 96% a 100 mL amb aigua MilliQ.
- NaOH 80 mM: s'enrasen 320 mg de NaOH a 100 mL amb aigua MilliQ.
- Dissolucions de fluorur de glicosil: es dissol una certa quantitat de producte en aigua MilliQ, se centrifuga, s'aliquota i es congela.

#### Recta patró per l'anàlisi de fluorur lliure

S'obté una recta patró a partir de dilucions de la dissolució de NaF estàndard en el marge de concentració de fluorur de 0.2 a 40 ppm. La mesura es realitza de forma immediata a la preparació de la mostra.

#### **Procediment:**

S'afegeix a la quantitat necessària de dissolució estoc de 100 ppm en NaF, aigua MilliQ fins a un volum total de 500 µL. Se situa la mostra en un tub de polipropilè i es posa en contacte amb l'elèctrode. S'enregistra el voltatge, prenent com a valor el màxim voltatge assolit abans que es produeixi una disminució progressiva d'aquest.

#### Recta patró per l'anàlisi de fluorur total

Es prepara una recta patró a partir de dilucions de la dissolució de NaF estàndard en el marge de concentració de fluorur de 1 a 50 ppm, aplicant el mateix procediment emprat en les mostres de fluorur de glicosil (hidròlisi àcida amb H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 40 mM a 100°C durant 20 minuts i posterior neutralització amb NaOH).

#### **Procediment:**

S'afegeixen a la quantitat necessària de dissolució estoc de 100 ppm en NaF, 25 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 40 mM i aigua MilliQ fins a un volum total de 275 µL en un tub Eppendorf. Se segella el tub amb

parafilm® i es manté a 100°C durant 20 minuts. Es deixa refredar i s'hi addicionen 25 µL de NaOH 80 mM per a neutralitzar i 200 µL més d'aigua MilliQ.

Se situa la mostra en un tub de polipropilè i es posa en contacte amb l'elèctrode. S'enregistra el voltatge, prenent com a valor el màxim voltatge assolit abans que es produeixi una disminució progressiva d'aquest.

#### Determinació de la concentració de fluorur de glicosil (donador)

1- Determinació del fluorur lliure.

##### **Procediment:**

Es prenen 25 µL de la dissolució estoc de fluorur de glicosil i s'addicionen 475 µL d'aigua MilliQ. Immediatament es realitza la mesura per triplicat.

La mitjana de les lectures enregistrades s'interpol·la a la recta patró obtinguda per a l'anàlisi de fluorur lliure.

2- Determinació del fluorur total.

##### **Procediment:**

Es prenen 25 µL de la dissolució estoc de fluorur de glicosil en un tub Eppendorf i s'hi addicionen 25 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 40 mM i 225 µL d'aigua MilliQ. Se segella el tub amb parafilm i es manté durant 20 minuts a 100°C. Es deixa refredar i s'hi afegeixen 25 µL de NaOH 80 mM i 200 µL d'aigua MilliQ. Seguidament es realitza la mesura per triplicat.

La mitjana de les lectures enregistrades s'interpol·la a la recta patró obtinguda per l'anàlisi del fluorur total.

## 2.2. Determinació de la concentració acceptors glicosídics

La concentració dels acceptors glicosídics (p-nitrofenil glicòsids i metilumbel·liferil glicòsids) es determina per espectroscòpia UV/VIS. A la taula III.2 es mostren els valors de la longitud d'ona corresponent al màxim d'absorció i els coeficients d'absortivitat molar d'un acceptor de cadascuna de les famílies emprades en aquest treball.

Acceptor	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\epsilon$ (M <sup>-1</sup> ·cm <sup>-1</sup> )
Glcβ4GlcβpNP	301	9776,5
Glcβ4GlcβMU	316	13600

**Taula IV.1.** Paràmetres espectroscòpics dels substrats acceptors Glcβ4GlcβpNP i Glcβ4GlcβMU.

La concentració dels acceptors es determina a partir d'una dilució estoc, la qual asseguri que la seva mesura d'absorbància es trobi dins l'interval lineal de la llei de Lambert i Beer (0.1 – 0.9) (equació 1).

En una cubeta amb 1 mL d'aigua MilliQ se li afegeixen alíquotes de 5 o 10 µL de la dissolució d'acceptor. Es llegeixen els valors d'absorbància a la  $\lambda_{\max}$ , segons l'acceptor emprat enfront d'una referència d'aigua MilliQ sense acceptor. Es representa l'absorbància enfront el volum d'acceptor

corregit segons  $(V_{acc} / (1000 + V_{acc}))$  i les dades s'ajusten a una recta (equació 2). La concentració de la dilució s'obté del pendent de la regressió lineal.

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c \quad (1)$$

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c \cdot \frac{V_{acc}}{1000 + V_{acc}} \quad (2)$$

on  $\varepsilon$  és el coeficient d'absortivitat molar en  $M^{-1} \cdot s^{-1}$ ;  $b$  és el camí òptic en cm;  $c$  és la concentració en  $M^{-1}$ ;  $V_{acc}$  és el volum d'acceptor afegit.

### 2.3. Determinació de la concentració de proteïna activa

Veure apartat 4.1.3 del capítol III. Expressió i Purificació d'enzims a la Part Experimental.

## 3. Protocols de la $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*.

### 3.1. Metodica general per a la determinació de l'activitat sintasa

El seguiment de l'activitat glicosintasa de la  $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis* es realitza per assaig discontinu mitjançant HPLC. El procediment general es descriu a l'apartat 4.1.3 del capítol III. Expressió i Purificació d'enzims de la Part Experimental.

### 3.3. Determinació de l'activitat especifica dels dobles mutants E134A/D136X

Se segueix el protocol general de cinètica per activitat sintasa pels diferents mutants estudiats en el present treball a les condicions de reacció següents.

*Condicions de reacció:* pH 7, 35°C, tampó C/F 50 mM,  $[CaCl_2] = 0.1$  mM,  $I = 0.5$ ,  $[Enzim] = 8 \mu M$  (mesurat per espectroscòpia d'absorbància com a proteïna total),  $[Glc\beta 4Glc\beta 3Glc\alpha F] = 1$  mM,  $[Glc\beta 4Glc\beta pNP] = 5$  mM.

Es realitzen diverses proves d'activitat variant el pH i la concentració d'enzim. L'activitat especifica de l'enzim E134A s'obté directament del valor obtingut en la recta patró d'activitat. La taula IV.2. mostra els resultats obtinguts pels diferents dobles mutants.

Mutant	pH	[Enzim] ( $\mu M$ )	$t_0-t_f$ (min)	$v_0$ ( $mM \cdot min^{-1}$ )	REF#
E134A/D136E	7	8	0 – 48	$3.548 \cdot 10^{-3}$	DRM046*
			0 – 49	$5.009 \cdot 10^{-3}$	DRM049
			0 – 47	$4.345 \cdot 10^{-3}$	DRM050
E134A/D136A	7	8	0 – 36	n.a.	DRM047
	9	10	0 – 34	n.a.	DRM052
E134AD136N	7	8	0 – 57	n.a.	DRM048
	9	10	0 – 50	n.a.	DRM051
	10	10	0 – 45	n.a.	DRM052

**Taula IV.2.** Activitats especificques dels dobles mutants.\*no s'empra pels càlculs d'activitat especifica, n.a.: no s'observa activitat.

## 3.4. Perfil de pH del mutant E134A/D136E

Es duen a terme les reaccions cinètiques seguint el protocol de cinètica per activitat sintasa amb les condicions de reacció especificades a continuació.

*Condicions de reacció:* 35°C, tampó C/F 50 mM, [CaCl<sub>2</sub>] = 0.1 mM, I = 0.5, donador Glcβ3GlcαF, [Glcβ4GlcβpNP] = 24 mM.

En paral·lel a la determinació del perfil de pH del doble mutant E134A/D136E també es determina el perfil del mutant E134A. A continuació es mostren els resultats obtinguts per ambdós mutants a diferents pH, utilitzant diverses concentracions de donador i enzim segons el cas.

## pH 4.89

Mutant	[Glcβ3GlcαF] (μM)	[Enzim] (μM)	t <sub>o</sub> -t <sub>f</sub> (min)	v <sub>o</sub> (mM·min <sup>-1</sup> )	REF#
E134A	0.75	8	0 – 163	1.03 · 10 <sup>-4</sup>	DRM171
	1.00	8	0 – 202	1.54 · 10 <sup>-4</sup>	DRM172
E134A/D136E	0.75	25	0 – 528	7.00 · 10 <sup>-6</sup>	DRM173
	1.00	25	0 – 544	1.30 · 10 <sup>-5</sup>	DRM174

## pH 5.29

Mutant	[Glcβ3GlcαF] (μM)	[Enzim] (μM)	t <sub>o</sub> -t <sub>f</sub> (min)	v <sub>o</sub> (mM·min <sup>-1</sup> )	REF#
E134A	0.75	8	0 – 206	1.81 · 10 <sup>-4</sup>	DRM180
	1.00	8	0 – 216	2.49 · 10 <sup>-4</sup>	DRM181
E134A/D136E	0.75	25	0 – 503	1.80 · 10 <sup>-5</sup>	DRM182
	1.00	25	0 – 517	2.80 · 10 <sup>-5</sup>	DRM183

## pH 6.04

Mutant	[Glcβ3GlcαF] (μM)	[Enzim] (μM)	t <sub>o</sub> -t <sub>f</sub> (min)	v <sub>o</sub> (mM·min <sup>-1</sup> )	REF#
E134A	0.50	7.5	0 – 55	2.33 · 10 <sup>-4</sup>	DRM151
	0.75	7.5	0 – 50	4.42 · 10 <sup>-4</sup>	DRM152*
	0.75	7.5	0 – 73	4.24 · 10 <sup>-4</sup>	DRM175
	1.00	7.5	0 – 50	5.16 · 10 <sup>-4</sup>	DRM153
E134A/D136E	0.50	25	0 – 285	4.00 · 10 <sup>-5</sup>	DRM154
	0.75	25	0 – 283	5.90 · 10 <sup>-5</sup>	DRM155
	1.00	25	0 – 285	7.90 · 10 <sup>-5</sup>	DRM156

\*no s'empra en l'ajust

pH 6.45

Mutant	[Glc $\beta$ 3Glc $\alpha$ F] ( $\mu$ M)	[Enzim] ( $\mu$ M)	t <sub>o</sub> -t <sub>r</sub> (min)	V <sub>o</sub> (mM·min <sup>-1</sup> )	REF#
E134A	0.50	7	0 – 60	3.56 · 10 <sup>-4</sup>	DRM133
	0.75	7	0 – 60	6.15 · 10 <sup>-4</sup>	DRM134*
	0.75	7	0 – 62	4.92 · 10 <sup>-4</sup>	DRM158
	1.00	7	0 – 60	5.77 · 10 <sup>-4</sup>	DRM135
	1.00	7	0 – 60	6.17 · 10 <sup>-4</sup>	DRM178
	1.00	7	0 – 48	10.25 · 10 <sup>-4</sup>	DRM195*
	1.00	6	0 – 79	4.97 · 10 <sup>-4</sup>	DRM198
E134A/D136E	0.50	25	0 – 225	5.40 · 10 <sup>-5</sup>	DRM136
	0.50	25	0 – 267	5.10 · 10 <sup>-5</sup>	DRM200
	0.75	25	0 – 225	7.10 · 10 <sup>-5</sup>	DRM137
	0.75	25	0 – 401	1.15 · 10 <sup>-4</sup>	DRM184
	1.00	25	0 – 225	1.40 · 10 <sup>-4</sup>	DRM138

\*no s'empren en l'ajust

pH 6.92

Mutant	[Glc $\beta$ 3Glc $\alpha$ F] ( $\mu$ M)	[Enzim] ( $\mu$ M)	t <sub>o</sub> -t <sub>r</sub> (min)	V <sub>o</sub> (mM·min <sup>-1</sup> )	REF#
E134A	0.50	6	0 – 55	4.05 · 10 <sup>-4</sup>	DRM142*
	0.50	6	0 – 43	3.00 · 10 <sup>-4</sup>	DRM196
	0.75	6	0 – 55	5.16 · 10 <sup>-4</sup>	DRM143
	0.75	6	0 – 60	5.23 · 10 <sup>-4</sup>	DRM157
	1.00	6	0 – 55	8.07 · 10 <sup>-4</sup>	DRM144*
	1.00	6	0 – 63	6.61 · 10 <sup>-4</sup>	DRM186
E134A/D136E	0.50	20	0 – 240	8.40 · 10 <sup>-5</sup>	DRM139*
	0.75	20	0 – 240	1.00 · 10 <sup>-4</sup>	DRM140
	1.00	20	0 – 240	1.34 · 10 <sup>-4</sup>	DRM141

\*no s'empren en l'ajust

## pH 7.28

Mutant	[Glc $\beta$ 3Glc $\alpha$ F] ( $\mu$ M)	[Enzim] ( $\mu$ M)	$t_o-t_f$ (min)	$v_o$ (mM $\cdot$ min $^{-1}$ )	REF#
E134A	0.50	6	0 – 69	$3.28 \cdot 10^{-4}$	DRM193
	0.75	6	0 – 62	$5.21 \cdot 10^{-4}$	DRM194
	0.80	6	0 – 89	$6.83 \cdot 10^{-4}$	DRM121*
	1.00	6	0 – 60	$7.93 \cdot 10^{-4}$	DRM122
	1.00	6	0 – 72	$6.93 \cdot 10^{-4}$	DRM187
	1.50	6	0 – 60	$11.24 \cdot 10^{-4}$	DRM123
E134A/D136E	0.50	25	0 – 127	$7.10 \cdot 10^{-5}$	DRM201
	0.75	20	0 – 75	$9.50 \cdot 10^{-5}$	DRM125
	1.00	20	0 – 120	$1.21 \cdot 10^{-4}$	DRM127

\*no s'empra en l'ajust

## pH 7.75

Mutant	[Glc $\beta$ 3Glc $\alpha$ F] ( $\mu$ M)	[Enzim] ( $\mu$ M)	$t_o-t_f$ (min)	$v_o$ (mM $\cdot$ min $^{-1}$ )	REF#
E134A	0.50	6	0 – 40	$2.57 \cdot 10^{-4}$	DRM145*
	0.50	6	0 – 74	$3.33 \cdot 10^{-4}$	DRM190
	0.75	6	0 – 40	$4.78 \cdot 10^{-4}$	DRM146
	0.75	6	0 – 73	$5.17 \cdot 10^{-4}$	DRM191
	1.00	6	0 – 40	$5.26 \cdot 10^{-4}$	DRM147*
	1.00	6	0 – 68	$5.74 \cdot 10^{-4}$	DRM179*
	1.00	6	0 – 48	$6.99 \cdot 10^{-4}$	DRM197
E134A/D136E	0.50	20	0 – 150	$5.10 \cdot 10^{-5}$	DRM148
	0.75	20	0 – 150	$7.60 \cdot 10^{-5}$	DRM149
	1.00	20	0 – 150	$1.13 \cdot 10^{-4}$	DRM150

\*no s'empren en l'ajust

## pH 8.02

Mutant	[Glc $\beta$ 3Glc $\alpha$ F] ( $\mu$ M)	[Enzim] ( $\mu$ M)	$t_o$ - $t_f$ (min)	$V_o$ (mM $\cdot$ min $^{-1}$ )	REF#
E134A	0.50	6	0 – 62	$1.97 \cdot 10^{-4}$	DRM130*
	0.50	6	0 – 77	$3.33 \cdot 10^{-4}$	DRM188
	0.75	6	0 – 48	$3.90 \cdot 10^{-4}$	DRM131*
	0.75	6	0 – 77	$4.42 \cdot 10^{-4}$	DRM176
	1.00	6	0 – 60	$4.54 \cdot 10^{-4}$	DRM132*
	1.00	6	0 – 68	$6.41 \cdot 10^{-4}$	DRM177
	1.00	6	0 – 75	$7.65 \cdot 10^{-4}$	DRM189
E134A/D136E	0.50	29	0 – 165	$5.30 \cdot 10^{-5}$	DRM128*
	0.75	29	0 – 120	$1.14 \cdot 10^{-4}$	DRM126
	0.75	25	0 – 209	$1.07 \cdot 10^{-4}$	DRM202
	1.00	29	0 – 170	$6.70 \cdot 10^{-5}$	DRM129*
	1.00	25	0 – 386	$1.54 \cdot 10^{-4}$	DRM185
	1.00	25	0 – 227	$1.17 \cdot 10^{-4}$	DRM203

\*no s'empren en l'ajust

## pH 8.34

Mutant	[Glc $\beta$ 3Glc $\alpha$ F] ( $\mu$ M)	[Enzim] ( $\mu$ M)	$t_o$ - $t_f$ (min)	$V_o$ (mM $\cdot$ min $^{-1}$ )	REF#
E134A	0.75	6.5	0 – 74	$4.63 \cdot 10^{-4}$	DRM160
	1.00	6.5	0 – 58	$6.28 \cdot 10^{-4}$	DRM161
E134A/D136E	0.75	25	0 – 321	$1.03 \cdot 10^{-4}$	DRM163
	0.75	25	0 – 356	$1.02 \cdot 10^{-4}$	DRM199
	1.00	25	0 – 249	$1.15 \cdot 10^{-4}$	DRM162*

\*no s'empra en l'ajust

## pH 9.10

Mutant	[Glc $\beta$ 3Glc $\alpha$ F] ( $\mu$ M)	[Enzim] ( $\mu$ M)	$t_o$ - $t_f$ (min)	$V_o$ (mM $\cdot$ min $^{-1}$ )	REF#
E134A	0.75	6.0	0 – 107	$3.71 \cdot 10^{-4}$	DRM168*
	0.75	6.0	0 – 99	$4.13 \cdot 10^{-4}$	DRM170
	1.00	6.0	0 – 120	$5.62 \cdot 10^{-4}$	DRM169

\*no s'empra en l'ajust

## pH 9.84

Mutant	[Glc $\beta$ 3Glc $\alpha$ F] ( $\mu$ M)	[Enzim] ( $\mu$ M)	$t_o$ - $t_f$ (min)	$V_o$ (mM $\cdot$ min $^{-1}$ )	REF#
E134A	0.75	6.5	0 – 57	$4.06 \cdot 10^{-4}$	DRM164
	1.00	6.5	0 – 57	$5.46 \cdot 10^{-4}$	DRM165
E134A/D136E	0.75	25	0 – 353	$1.00 \cdot 10^{-4}$	DRM166
	1.00	25	0 – 366	$1.19 \cdot 10^{-4}$	DRM167

#### IV. ENZIMOLOGIA - PART EXPERIMENTAL

Per a cada pH es representa el valor de  $V_0$  front a concentració de donador. El pendent de la regressió lineal correspon al valor de  $k_{cat}^{app} / K_M^{app}$ . En les següents taules es mostren els valors d'aquest paràmetre per a cada pH i mutant. També es mostra l'error de l'ajust i la normalització de l'activitat en tant per cent respecte el màxim d'activitat per a cada mutant.

##### E134A

pH	$k_{cat}^{app} / K_M^{app}$ ( $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )	Error ( $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )	$k_{cat}^{app} / K_M^{app}$ (%)	Error (%)
4.89	$3.13 \cdot 10^{-4}$	$2.74 \cdot 10^{-5}$	14.85	8.77
5.29	$5.14 \cdot 10^{-4}$	$1.23 \cdot 10^{-5}$	24.40	2.38
6.04	$11.81 \cdot 10^{-4}$	$9.03 \cdot 10^{-5}$	56.02	7.65
6.45	$13.76 \cdot 10^{-4}$	$9.27 \cdot 10^{-5}$	65.28	6.73
6.92	$18.85 \cdot 10^{-4}$	$9.07 \cdot 10^{-5}$	89.42	4.81
7.28	$21.08 \cdot 10^{-4}$	$1.03 \cdot 10^{-4}$	100.00	4.88
7.75	$19.10 \cdot 10^{-4}$	$7.97 \cdot 10^{-5}$	90.61	4.17
8.02	$17.40 \cdot 10^{-5}$	$9.74 \cdot 10^{-5}$	82.54	5.60
8.34	$16.03 \cdot 10^{-4}$	$2.11 \cdot 10^{-5}$	76.04	1.31
9.10	$15.55 \cdot 10^{-4}$	$1.49 \cdot 10^{-4}$	73.77	9.56
9.84	$13.98 \cdot 10^{-4}$	$8.53 \cdot 10^{-6}$	66.32	0.61

##### E134A/D136E

pH	$k_{cat}^{app} / K_M^{app}$ ( $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )	Error ( $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )	$k_{cat}^{app} / K_M^{app}$ (%)	Error (%)
4.89	$0.74 \cdot 10^{-5}$	$7.19 \cdot 10^{-6}$	6.62	97.43
5.29	$1.75 \cdot 10^{-5}$	$1.60 \cdot 10^{-6}$	15.71	9.12
6.04	$5.30 \cdot 10^{-5}$	$3.96 \cdot 10^{-7}$	47.51	0.75
6.45	$8.39 \cdot 10^{-5}$	$7.60 \cdot 10^{-6}$	75.18	0.05
6.92	$11.16 \cdot 10^{-5}$	$1.07 \cdot 10^{-5}$	100.00	9.54
7.28	$10.13 \cdot 10^{-5}$	$2.49 \cdot 10^{-6}$	90.77	2.46
7.75	$9.19 \cdot 10^{-5}$	$5.80 \cdot 10^{-6}$	82.33	6.31
8.02	$9.08 \cdot 10^{-5}$	$5.89 \cdot 10^{-6}$	81.36	6.49
8.34	$9.13 \cdot 10^{-5}$	$6.67 \cdot 10^{-7}$	81.84	0.73
9.84	$8.11 \cdot 10^{-5}$	$7.19 \cdot 10^{-6}$	72.64	8.87



### 3.5. Activitat específica dels mutants E134S y E134G

Se segueix el protocol general de cinètica per activitat sintasa (punt 3.1.) per determinar l'activitat específica dels mutants E134S i E134AG.

*Condicions de reacció:* pH 7, 35°C, tampó C/F 50 mM, [CaCl<sub>2</sub>] = 0.1 mM, [Enzim] = 0.25 – 0.65 μM (mesurat per espectroscòpia d'absorbància com a proteïna total), [Glcβ4Glcβ3GlcαF] = 1 mM, [Glcβ4GlcβpNP] = 5 mM.

[E134G] (μM)	V <sub>o</sub> (mM min <sup>-1</sup> )
0,25	5.3·10 <sup>-3</sup>
0,35	7.3·10 <sup>-3</sup>
0,5	9.1·10 <sup>-3</sup>
0,65	12.1·10 <sup>-3</sup>

**Tabla IV.3.** Determinació de l'activitat específica del mutant E134G.

[E134S] (μM)	V <sub>o</sub> (mM min <sup>-1</sup> )
0,3	6.6·10 <sup>-3</sup>
0,35	7.8·10 <sup>-3</sup>
0,5	10.4·10 <sup>-3</sup>
0,65	13.5·10 <sup>-3</sup>

**Tabla IV.4.** Determinació de l'activitat específica del mutant E134S.

### 3.6. Cinètiques de la reacció de condensació pels mutant E134G y E134S

Es determinen els paràmetres cinètics pels mutants E134G i E134S

*Condicions de reacció:* pH 7, 35°C, tampó fosfat 50 mM, [CaCl<sub>2</sub>] = 0.1 mM, [Enzim] = 0.1 μM, [Glcβ4Glcβ3GlcαF] = 0.15 – 1.75 mM, [Glcβ4GlcβpNP] = 7.8 mM.

[Glcβ3GlcαF] (mM)	t <sub>o-tr</sub> (min)	V <sub>o</sub> (mM·min <sup>-1</sup> )	V <sub>o</sub> /[E] (s <sup>-1</sup> )	REF#
0,15	0 – 42	1,30·10 <sup>-3</sup>	0,22	JMB086
0,25	0 – 39	2,00·10 <sup>-3</sup>	0,33	JMB081
0,5	0 – 47	2,70·10 <sup>-3</sup>	0,45	JMB079
0,75	0 – 50	3,60·10 <sup>-3</sup>	0,60	JMB080
1	0 – 45	4,30·10 <sup>-3</sup>	0,72	JMB078
1,25	0 – 45	4,00·10 <sup>-3</sup>	0,67	JMB085
1,75	0 – 41	4,30·10 <sup>-3</sup>	0,72	JMB083

**Taula IV.5.** Michaelis-Mentes pel mutant E134G

[Glc $\beta$ 3Glc $\alpha$ F] (mM)	t <sub>0</sub> -t <sub>r</sub> (min)	V <sub>0</sub> (mM·min <sup>-1</sup> )	V <sub>0</sub> /[E] (s <sup>-1</sup> )	REF#
0,15	0 – 40	2,4·10 <sup>-3</sup>	0,40	JMB031
0,25	0 – 41	3,1·10 <sup>-3</sup>	0,52	JMB030
0,5	0 – 55	3,6·10 <sup>-3</sup>	0,60	JMB024
0,75	0 – 52	3,7·10 <sup>-3</sup>	0,62	JMB025
1	0 – 56	3,7·10 <sup>-3</sup>	0,62	JMB026
1,25	0 – 58	3,8·10 <sup>-3</sup>	0,63	JMB027
1,75	0 – 57	3,8·10 <sup>-3</sup>	0,63	JMB029

Taula IV.6. Michaelis-Mentes pel mutant E134S

### 3.7. Anàlisi de Dixon

#### 3.7.1. Síntesi enzimàtica de l'inhibidor competitiu G4G4G3G4G4G4G3G

Sobre 104 mg (0.156 mmol) d'acceptor G4G4G3G, dissolts en 7.5 ml de tampó fosfat pH 7.2 a 35°C que contenen 1 mg d'E134A, s'addicionen de forma progressiva 42 mg (0.063 mmol) de donador G4G4G3G $\alpha$ F. Es deixa reaccionant a 35°C i amb agitació orbital (150 rpm). El seguiment de la reacció es realitza per CCF (1-prop/CH<sub>3</sub>NO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O 5:2:3). S'atura la reacció a les 23 hores quan s'ha consumit tot el donador. El cru es congela amb isopropanol/CO<sub>2</sub> i es liofilitza.

El cru es purifica per cromatografia flash:

SiO<sub>2</sub>: 100 g

Càrrega seca: 3 g de SiO<sub>2</sub> + cru dissolt en 20 ml H<sub>2</sub>O.

Eluent: ACN/H<sub>2</sub>O 8:2 → ACN/H<sub>2</sub>O 7:3 → ACN/H<sub>2</sub>O 1:1

El seguiment de la columna i identificació de productes es realitza per CCF (1-prop/CH<sub>3</sub>NO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O 5:2:3) amb mostres independents.

Els resultats es troben a la taula IV.7:

fracció	Producte	quantitat obtinguda
4 - 6	Glc4Glc4Glc3Glc $\alpha$ F	traces
8 -16	Glc4Glc4Glc3Glc	traces
> 80	G4G4G3G4G4G4G3G	35 mg

Taula IV.7. Purificació per cromatografia flash de l'inhibidor octasacàrid.

S'obtenen 35 mg de producte impurificat de SiO<sub>2</sub>, que es dissolen en H<sub>2</sub>O, es filtren (0.45  $\mu$ m) i es liofilitzen.

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, D<sub>2</sub>O, 295 K, 30 mg·ml<sup>-1</sup>)  $\delta$  (ppm): 3.29 – 4.01 (sc, 48H, H-2<sup>II-VIII</sup>, H-3<sup>II-VIII</sup>, H-4<sup>II-VIII</sup>, H-5<sup>II-VIII</sup>, H-6a<sup>II-VIII</sup>, H-6b<sup>II-VIII</sup>), 4.50 – 4.55 (sc, 5H, H-1<sup>III, V, V, VII, VIII</sup>), 4.68 (d, J<sub>1,2</sub> 8Hz,  $\frac{2}{3}$ H, H-1 $\beta$ ), 4.74 – 4.78 (sc, 2H, H-1<sup>II, VI</sup>), 5.24 (d, J<sub>1,2</sub> 3.8 Hz,  $\frac{1}{3}$ H, H-1 $\alpha$ ).

<sup>13</sup>C-RMN (75.5 MHz, D<sub>2</sub>O, 295 K, 30 mg·ml<sup>-1</sup>)  $\delta$  (ppm): 103.5, 103.1, 102.7 (C-1<sup>I-IV</sup>)(C-1<sup>lliure</sup>), 87.4 (C-3'), 80.4 (C-4<sup>II-IV</sup>), 76.7 - 72.1 (C-2<sup>I-IV</sup>, C-3<sup>II-IV</sup>, C-5<sup>I-IV</sup>), 69.9, 68.2 (C-4<sup>I, IV</sup>extrem no reductor), 60.9, 60.3 (C-6<sup>I-V</sup>).

HR- MS (MALDI-TOF):  $m/z$ : calculat per 1338,145  $C_{48}O_{41}H_{82}$   $[M+Na]^+$ , observat 1339,05.

### 3.7.2. Cinètiques d'inhibició

L'estudi d'inhibició es porta a terme en la reacció glicosintasa entre el donador Glc4Glc3Glc $\alpha$ F i l'acceptor Glc4Glc $\beta$ pNP catalitzada pel mutant E134A de la  $\beta$ -glucanasa. Es realitzen cinètiques a tres nivells de concentració de donador i en presència de quantitats creixents d'inhibidor octasacàrid. Es determina la velocitat inicial de formació de producte pentasacàrid.

Condicions de mesura: tampó fosfat sòdic 50 mM, pH 7 a 35°C; 0.1 mM  $CaCl_2$ ,  $[Glc4Glc3Glc\alpha F]$  = 0.25, 0.5, 1.5 mM;  $[Glc4Glc\beta pNP]$  = 5 mM;  $[OCTA]$  = 0 – 3 mM;  $[E134A]$  = 0.5  $\mu$ M. HPLC (Agilent 1100 series): columna Novapack 4  $\mu$ m (Waters); MeOH 13 -14%; 1 ml·min<sup>-1</sup>; Detecció absorbància UV ( $\lambda$  = 301 nm).

Els resultats s'indiquen a la taula IV.8:

[S] (mM)	[I] (mM)	$V_o$ (mM·min <sup>-1</sup> )	[S] (mM)	[I] (mM)	$V_o$ (mM·min <sup>-1</sup> )
0,5	0	4,07E-03	0,25	0	2,55E-03
0,5	0,1	3,00E-03	0,25	0,3	1,37E-03
0,5	0,2	2,31E-03	0,25	0,7	8,19E-04
0,5	0,5	1,36E-03	0,25	1	5,96E-04
0,5	1	1,14E-03	0,25	1,5	4,56E-04
0,5	1,1	8,96E-04	0,25	3	2,64E-04
0,5	2	7,07E-04			
0,5	3	4,62E-04			
[S] (mM)	[I] (mM)	$V_o$ (mM·min <sup>-1</sup> )			
1,5	0	6,61E-03			
1,5	0,3	4,86E-03			
1,5	0,5	4,26E-03			
1,5	0,7	3,37E-03			
1,5	1	3,00E-03			
1,5	1,5	2,20E-03			
1,5	3	1,31E-03			

Taula IV.8. Resultats de l'estudi d'inhibició.

### 3.7.3. Anàlisi dels cru de reacció a punt final per HPCE.

#### A. Reactius i tampons

- D(+)-manosa (99%), barreja d'anòmers (Sigma Aldrich).
- NaOH 0.1 N (per a HPCE) (Fluka)
- Àcid 8-aminonaftalè-1,3,6-trisulfònic, (ANTS), (Fluka) 0.15M en àcid acètic:H<sub>2</sub>O (3:17 v/v): es dissolen 61 mg d'ANTS en 1 ml de d'àcid acètic:aigua. La dissolució s'agita en un vòrtex i s'escalfa a 60°C. Se centrifuga i es conserva a -20°C.
- Tetrahidrofurà (per a síntesi, SDS): s'asseca amb pols de LiAlH<sub>4</sub> (95%, Aldrich) i es destil·la en atmosfera de nitrogen. Es conserva amb tamisos moleculars de 4Å (Aldrich) protegit de la llum.
- Cianoborohidrur de sodi (~95%, Merck) 1M en THF: es dissolen 63 mg de NaCNBH<sub>3</sub> en 1 ml de THF. La dissolució s'agita i se centrifuga. Es prepara just abans d'emprar-la.

- Tampó de fosfat de trietilamina a pH 2.5 (tampó d'electroforesi): sobre una dissolució d'àcid fosfòric al 85% (Panreac) s'ajusta el pH a 2.5 amb TEA (99.5%, Panreac). La dissolució resultant es filtra (0.45 µm) i es conserva a 4°C.
- Dissolució patró de manosa: 20 µl de manosa 100 mM es derivatitzen i es ressuspèn en 6 ml d'aigua MQ.

#### B. Materials i equips

- Agitador vòrtex Heidolph REAX 2000
- Sistema d'electroforesi capil·lar Hewlett-Packard HP<sup>3D</sup> CE G1600 AX
- Capil·lar Agilent, Ext. Light path cap. 50 mm, 72 cm
- Centrifuga 5415 D, Eppendorf
- Filtres Durapore Membrane 0.45 µm

#### C. Reacció de derivatització

Les mostres provinents de cursos de reacció així com els diferents patrons emprats se sotmeten a un procediment de derivatització abans de ser analitzats per electroforesi capil·lar.

El procés de derivatització constata de les següents etapes:

20 µl de dissolució aquosa de producte a estudiar o 20 µl d'un curs de reacció s'introdueixen dins d'un Eppendorf i es tapen amb una punta invertida. Es congelen en CO<sub>2</sub>-acetona i es liofilitzen durant 4 hores. Sobre el producte liofilitzat s'addicionen 20 ml de reactiu derivatitzant ANTS (0.15 M) i 20 ml d'NaCNBH<sub>3</sub> (1M), s'agita el vòrtex i se sotmet a un pols de centrifuga. La mescla s'incuba durant 7 hores a 55°C en un termociclador programable, que permet conservar els tubs Eppendorf a 4°C una vegada finalitzada la reacció. Es liofilitza durant 6 hores i es conserva el producte sec a -20°C.

#### D. Preparació de mostres

Les mostres provinents de la derivatització es redissolen en 200 µl d'aigua o dissolució de manosa derivatitzada, en el cas de voler introduir un hidrat de carboni de referència, i s'agita. Es prenen 50 ml de mescla de reacció i es dipositen en un vial d'injecció evitant la formació de bombolles.

#### 3.7.4. Anàlisi i condicions

L'anàlisi per electroforesi capil·lar es realitza en un Sistema Hewlett-Packard HP<sup>3D</sup> CE G1600 AX equipat amb un detector DAD UV-VIS. El capil·lar (sílice fosa, 72 cm longitud, 50 µm de diàmetre intern, extensió 150 µm en la finestra de detecció) es tracta o regenera amb 0.1 M NaOH, H<sub>2</sub>O MilliQ, i finalment tampó d'elució (durant 30, 10, i 10 min respectivament).

Les mostres (patrons sacarídics i crús de reaccions enzimàtiques derivatitzades amb ANTS) s'introdueixen al capil·lar per injecció hidrodinàmica a 40 mbar durant 6 segons.

L'acondicionament entre injeccions es realitza fent circular tampó d'elució durant 5 minuts.

El tampó d'elució consisteix en 50 mM d'àcid fosfòric ajustat a pH 2.5 amb trimetilamina (TEA) (flux electroosmòtic invers). L'electroforesi es realitza a -30 kV i una temperatura constant de 30°C. El detector DAD enregistra els electroferogrames a 214 nm

### 3.7.5. Resultats

# ref	[D] (mM)	[A] (mM)	[Octa] (mM)	[E134A] ( $\mu$ M)	$t_m$ Man (min)	A Man	$t_m$ OCTA (min)	A OCTA	Àrea rel	Àrea corr	$t_m$ UND (min)	A UND	Àrea rel	Àrea corr	[UND] (mM)
56	0,25	5	0	0,5	7,5	215		0	0,00	0		0,0	0,000	0	
59	0,25	5	0,3	0,5	7,5	213	11,8	99	0,47	104	13,4	5	0,026	6	0,016
58	0,25	5	0,5	0,5	7,5	215	11,8	172	0,80	178	13,4	8	0,037	8	0,022
57	0,25	5	1	0,5	7,5	254	11,8	316	1,24	277	13,4	16	0,062	14	0,048
62	0,25	5	1,5	0,5	7,5	218	11,7	456	2,09	466	13,4	24	0,109	24	0,075
63	0,25	5	3	0,5	7,5	222	11,7	839	3,79	843	13,4	61	0,275	61	0,203

Taula IV.9. Resultats HPCE pels crús corresponent a les cinètiques amb 0.25 mM donador. UND: undecasacàrid

# ref	[D] (mM)	[A] (mM)	[Octa] (mM)	[E134A] ( $\mu$ M)	$t_m$ Man (min)	A Man	$t_m$ OCTA (min)	A OCTA	Àrea rel	Àrea corr	$t_m$ UND (min)	A UND	Àrea rel	Àrea corr	[UND] (mM)
40	0,5	5	0	0,5	7,6	227		0	0,000	0		0	0,000	0	0
45	0,5	5	0,1	0,5	7,6	222	12,0	99	0,444	100	13,7	9	0,040	9	0,008
41	0,5	5	0,2	0,5	7,6	226	12,1	50	0,223	50	13,9	12	0,054	12	0,039
42	0,5	5	0,5	0,5	7,6	229	12,1	153	0,668	151	13,8	49	0,215	49	0,122
65	0,5	5	1	0,5	7,5	213	11,7	432	2,028	450	13,6	76	0,357	80	0,152
44	0,5	5	1,5	0,5	7,6	231	12,0	586	2,537	572	13,7	99	0,428	97	0,217
48	0,5	5	3	0,5	7,5	231	11,9	1148	4,959	1119	13,6	216	0,934	211	0,475

Taula IV.10. Resultats HPCE pels crús corresponent a les cinètiques amb 0.5 mM donador. UND: undecasacàrid

# ref	[D] (mM)	[A] (mM)	[Octa] (mM)	[E134A] ( $\mu$ M)	$t_m$ Man (min)	A Man	$t_m$ OCTA (min)	A OCTA	Àrea rel	Àrea corr	$t_m$ UND (min)	A UND	Àrea rel	Àrea corr	[UND] (mM)
49	1,5	5	0	0,5	7,5	217		0	0,00	0		0,0	0	0	
53	1,5	5	0,3	0,5	7,5	217	12	76	0,35	77	13,5	5	0,02	5	0,018
50	1,5	5	0,5	0,5	7,5	221	12	149	0,67	148	13,5	12	0,06	12	0,038
54	1,5	5	0,7	0,5	7,5	222	12	253	1,14	251	13,5	13	0,06	13	0,035
51	1,5	5	1	0,5	7,5	222	12	320	1,44	317	13,5	22	0,10	22	0,064
52	1,5	5	1,5	0,5	7,5	222	12	460	2,07	455	13,5	52	0,24	52	0,153
55	1,5	5	3	0,5	7,5	219	12	740	3,38	744	13,5	81	0,37	81	0,295

Taula IV.11. Resultats HPCE pels crús corresponent a les cinètiques amb 1.5 mM donador. UND: undecasacàrid.

## 4. Protocols de la $\beta$ -glucosidasa de *Streptomyces* sp.

### 4.1. Seguiment dels cursos de reacció amb el mutant E383A de la $\beta$ -glucosidasa d'*Streptomyces* sp.

Per l'estudi de la influència dels donador Glc $\alpha$ F i Gal $\alpha$ F i dels acceptors Glc $\beta$ pNP i Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP a dos del pH (7, 8.5) en la reacció sintasa amb l'E383A  $\beta$ -glucosidasa.

**Procediment:**

Es col·loquen en un tub Eppendorf les quantitats necessàries de dissolucions estoc de donador, acceptor i tampó fosfat x2 per tal d'obtenir les concentracions desitjades i aigua MilliQ fins a un volum tal que amb l'addició d'enzim s'obtingui un volum final de 800 µL.

S'incuba a 35°C durant 5 minuts i s'hi addiciona l'E383A β-glucosidasa. Es considera aquest instant com a temps inicial. Es pren una alíquota de 20 µL del cru de reacció, es dilueix 10 vegades amb aigua MilliQ, s'agita amb el vòrtex i s'analitza per HPLC. Es repeteix la mateixa operació amb alíquotes preses a intervals regulars de temps.

Es calcula la concentració de producte en cada moment per normalització interna, segons l'equació:

$$[Pr\ oducte] = \frac{\text{\u00c0rea producte}}{\sum \text{\u00c0rees acceptor i productes}} \cdot [acceptor]_o$$

**Equació 3.** Concentraci\u00f3 de producte en funci\u00f3 de la concentraci\u00f3 inicial d'acceptor i de la relaci\u00f3 d'\u00e0rees entre el producte i la suma d'\u00e0rees dels productes i l'acceptor.

Es representa la concentraci\u00f3 de producte enfront el temps de reacci\u00f3.

Totes les reaccions es duen a terme a concentraci\u00f3 de donador 1 mM, concentraci\u00f3 d'acceptor 5 mM, en tamp\u00f3 fosfat 50 mM i a 35°C. Les reaccions amb acceptor monosac\u00e0rid es realitzen a concentraci\u00f3 d'enzim 3 µM, i en les que s'empra un disac\u00e0rid com a acceptor, la concentraci\u00f3 d'enzim \u00e9s de 10 µM.

Els productes formats s'identifiquen per coinjecci\u00f3 amb patrons independents pr\u00e8viament caracteritzats per RMN (excepte Galβ4Glcβ4GlcβpNP, pel qual no es disposa de cap patr\u00f3).

**Resultats:**

**Glc\u03b1F + Glc\u03b2pNP (pH 7)**

temps (h)	[Glc\u03b23Glc\u03b2pNP] (mM)	\u00c0rea Glc\u03b23Glc\u03b2pNP	\u00c0rea Glc\u03b2pNP	Rendiment (%)
0.014	0.052	81.75	5679	5.25
0.385	0.722	1136	4695	72.2
0.752	0.880	1368	4387	88.0
1.12	0.940	1457	4281	94.0
1.56	0.971	1509	4247	97.1
3.92	0.989	1564	4295	98.9
7.39	0.989	1546	4241	98.9
9.44	0.986	1561	4300	98.7
23.1	0.980	1677	4664	97.9
26.9	0.989	1440	3951	98.9
31.4	0.978	1455	4056	97.8
34.7	0.998	1594	4325	99.8
49.5	0.977	1382	3858	97.7
53.0	0.972	1369	3847	97.2
58.1	0.998	1294	3508	99.8
71.0	0.997	1191	3234	99.7
75.9	0.974	1179	3303	97.4

**Taula IV.12.** Cru de dades del seguiment de la reacci\u00f3 amb Glc\u03b1F (1 mM) com a donador i Glc\u03b2pNP (5 mM) com a acceptor catalitzada pel mutant E383A \u03b2-glucosidasa a pH 7.

**Glc $\alpha$ F + Glc $\beta$ pNP (pH 8.5)**

temps (h)	[Glc $\beta$ 3Glc $\beta$ pNP] (mM)	A G3GpNP	A Glc $\beta$ pNP	Rendiment (%)
0.015	0.067	106.4	5744	5.94
0.365	0.720	1134	4700	72.0
0.736	0.881	1382	4429	88.1
1.10	0.938	1485	4377	93.8
1.47	0.964	1523	4325	96.4
2.47	0.982	1548	4291	98.2
5.87	0.985	1582	4366	98.5
7.49	0.984	1540	4257	98.4
21.2	0.981	1782	4945	98.1
24.9	0.981	1536	4266	98.1
29.4	0.988	1638	4500	98.8
32.7	0.989	1649	4529	98.9
47.6	0.975	1501	4201	97.5
51.1	0.976	1572	4390	97.7
56.1	0.967	1451	4103	96.7
69.0	0.947	1366	3974	94.7
73.9	0.946	1447	4217	94.6

**Taula IV.13.** Cru de dades del seguiment de la reacció amb Glc $\alpha$ F com a donador i Glc $\beta$ pNP com a acceptor catalitzada pel mutant E383A  $\beta$ -glucosidasa a pH 8.5.

**Gal $\alpha$ F + Glc $\beta$ pNP (pH 7)**

temps (h)	[Gal3Glc $\beta$ pNP] (mM)	A Gal3Glc $\beta$ pNP	A Glc $\beta$ pNP	Rendiment (%)
0,01	0.007	11.11	5822	0.70
0,38	0.109	173.0	5720	10.9
0,70	0.155	241.9	5552	15.5
0,99	0.192	299.7	5472	19.2
1,34	0.232	360.7	5401	23.2
4,70	0.339	536.7	5324	33.92
6,87	0.350	545.6	5232	35.0
10,2	0.353	603.1	5716	35.3
25,0	0.339	460.2	4569	33.9
28,5	0.324	474.7	4939	32.5
33,6	0.326	464.0	4806	32.6
46,5	0.298	395.7	4519	29.8
51,4	0.293	382.9	4459	29.3
56,9	0.275	368.9	4962	27.5
73,2	0.239	309.4	4800	23.9

**Taula IV.14.** Cru de dades del seguiment de la reacció amb Gal $\alpha$ F com a donador i Glc $\beta$ pNP com a acceptor catalitzada pel mutant E383A  $\beta$ -glucosidasa a pH 7.

**Glc $\alpha$ F + Glc $\beta$ pNP (pH 8.5)**

temps (h)	[Gal3Glc $\beta$ pNP] (mM)	A Gal3Glc $\beta$ pNP	A Glc $\beta$ pNP	Rendiment (%)
0.01	0.003	4.61	5755	0.30
0.32	0.088	138.3	5669	8.82
0.62	0.146	227.4	5543	14.6
0.94	0.197	310.2	5523	19.7
1.32	0.241	378.5	5439	24.1
2.98	0.332	527.2	5346	33.2
4.74	0.356	554.7	5220	35.6
8.08	0.359	574.2	5342	35.9
22.9	0.348	542.7	5225	34.8
26.4	0.348	556.5	5370	34.8
31.5	0.345	541.1	5268	34.5
44.4	0.337	517.5	5169	33.7
49.21	0.334	510.7	5159	33.4
54.81	0.330	511.4	5220	33.0
71.1	0.330	485.0	4959	33.0

**Taula IV.15** Cru de dades del seguiment de la reacció amb Gal $\alpha$ F com a donador i Glc $\beta$ pNP com a acceptor catalitzada pel mutant E383A  $\beta$ -glucosidasa a pH 8.5.

**Glc $\alpha$ F + Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP (pH 7)**
**Formació Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP**

temps(h)	[G4G4GpNP] (mM)	A G4G4GpNP	A G4GpNP (+ altres)	Rendiment (%)
0.01	0	0	55407	0
0.47	0.020	30.38	55207	2.04
1.06	0.061	90.19	54737	6.10
2.17	0.084	123.7	5445	8.41
5.23	0.160	247.3	5726	16.0
7.72	0.197	304.4	5734	19.7
18.7	0.228	324.4	5265	22.8
26.6	0.227	354.8	5790	22.7
41.5	0.228	358.3	5818	22.8
44.9	0.230	336.3	5414	23.0
50.9	0.233	351.2	5572	23.3
68.5	0.251	307.9	4549	25.1

**Taula IV.16** Cru de dades del seguiment de la formació de Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP en la reacció amb Glc $\alpha$ F com a donador i Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP com a acceptor catalitzada pel mutant E383A  $\beta$ -glucosidasa a pH 7.



**Formació Glc $\beta$ 3Glc $\beta$ pNP**

temps(h)	[G3GpNP] (mM)	A G3GpNP	A G4GpNP (+ altres)	Rendiment (%)
0.01	0	0	5540	0
0.47	0.008	11.27	5521	0.76
1.01	0.011	15.84	5473	1.07
1.57	0.014	19.71	5317	1.37
2.17	0.017	25.36	5445	1.72
5.23	0.034	52.76	5726	3.41
7.72	0.047	72.21	5734	4.66
18.7	0.080	114.3	5265	8.04
26.6	0.081	126.7	5790	8.11
41.5	0.073	114.4	5818	7.28
44.9	0.071	103.2	5413	7.06
50.9	0.067	101.5	5572	6.75
68.5	0.060	73.23	4548	5.96

**Taula IV.17.** Cru de dades del seguiment de la formació de Glc $\beta$ 3Glc $\beta$ pNP en la reacció amb Glc $\alpha$ F com a donador i Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP com a acceptor catalitzada pel mutant E383A  $\beta$ -glucosidasa a pH 7.

**Formació Glc $\beta$ pNP**

temps (h)	[Glc $\beta$ pNP] (mM)	A Glc $\beta$ pNP	A G4GpNP (+ altres)	Rendiment (%)
0.01	0.005	7.149	5540	0.48
0.47	0.001	1.582	5520	0.11
1.01	0.001	1.808	5473	0.12
1.57	0.001	1.735	5317	0.12
2.17	0.001	1.655	5444	0.11
5.23	0.002	2.435	5726	0.16
7.72	0.002	3.417	5734	0.22
18.7	0.022	30.92	5264	2.17
26.6	0.055	85.41	5790	5.46
41.5	0.076	120.0	5818	7.64
44.9	0.071	103.9	5413	7.11
50.9	0.076	113.6	5572	7.55
68.5	0.144	177.5	4548	14.4

**Taula IV.18.** Cru de dades del seguiment de la formació de Glc $\beta$ pNP en la reacció amb Glc $\alpha$ F com a donador i Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP com a acceptor catalitzada pel mutant E383A  $\beta$ -glucosidasa a pH 7.

**Glc $\alpha$ F + Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP (pH 8.5)****Formació Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP**

temps (h)	[G4G4GpNP] (mM)	A G4G4GpNP	A G4GpNP (+ altres)	Rendiment (%)
0.01	0	0	5566	0
0.44	0.021	31.51	5548	2.10
0.88	0.042	62.12	5510	4.17
1.37	0.061	93.23	5655	6.11
1.89	0.085	126.42	5512	8.49
3.38	0.139	216.1	5736	13.9
5.59	0.201	312.9	5753	20.1
25.0	0.316	487.2	5716	31.6
38.7	0.311	490.2	5829	31.1
43.0	0.315	506.7	5965	31.5
48.1	0.316	468.9	5488	31.6
65.7	0.337	461.8	5082	33.7

**Taula IV.19.** Cru de dades del seguiment de la formació de Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP en la reacció amb Glc $\alpha$ F com a donador i Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP com a acceptor catalitzada pel mutant E383A  $\beta$ -glucosidasa a pH 8.5.

**Formació Glc $\beta$ 3Glc $\beta$ pNP**

temps (h)	[G3GpNP] (mM)	A G3GpNP	A G4GpNP (+ altres)	Rendiment (%)
0.01	0	0	5566	0
0.45	0.01	10.70	5548	0.71
0.88	0.01	13.58	5510	0.91
1.37	0.01	16.10	5655	1.05
1.89	0.01	20.26	5513	1.36
3.38	0.02	31.90	5737	2.06
5.59	0.03	47.33	5753	3.05
25.0	0.09	133.2	5717	8.63
38.7	0.08	133.0	5830	8.45
43.0	0.08	133.1	5965	8.27
48.1	0.08	119.3	5489	8.05
65.7	0.075	103.5	5082	7.54

**Taula IV.20.** Cru de dades del seguiment de la formació de Glc $\beta$ 3Glc $\beta$ pNP en la reacció amb Glc $\alpha$ F com a donador i Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP com a acceptor catalitzada pel mutant E383A  $\beta$ -glucosidasa a pH 8.5.

**Formació Glc $\beta$ pNP**

temps (h)	[Glc $\beta$ pNP](mM)	A Glc $\beta$ pNP	A G4GpNP (+ altres)	Rendiment (%)
0.01	0	7.355	5566	0
0.44	0	0.963	5548	0
0.88	0	0.982	5511	0
1.37	0	9.366	5655	0
1.89	0	0.821	5513	0
3.38	0	1.187	5737	0
5.59	0	1.212	5753	0
25.0	0.02	35.08	5717	2.27
38.7	0.07	114.1	5829	7.25
43.0	0.09	138.9	5965	8.62
48.1	0.11	160.5	5489	10.8
65.7	0.11	145.3	5082	10.6

**Taula IV.21.** Cru de dades del seguiment de la formació de Glc $\beta$ pNP en la reacció amb Glc $\alpha$ F com a donador i Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP com a acceptor catalitzada pel mutant E383A  $\beta$ -glucosidasa a pH 8.5.

**Gal $\alpha$ F + Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP (pH 7)****Formació Gal $\beta$ 4Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP**

temps (h)	[Gal4Glc4Glc $\beta$ pNP] (mM)	A Gal4Glc4Glc $\beta$ pNP	A G4GpNP (+ altres)	Rendiment (%)
0.02	0	0	5691	0
0.23	0	0	5791	0
0.52	0.001	1.07	5685	0.07
0.80	0.001	1.83	5540	0.12
1.04	0.001	2.32	5866	0.15
1.52	0.003	4.50	5732	0.29
4.44	0.014	22.2	5773	1.43
7.67	0.025	23.7	3456	2.54
22.6	0.064	99.5	5718	6.44
26.5	0.068	108.0	5832	6.79
30.9	0.064	94.1	5410	6.44
48.8	0.030	48.9	5945	3.04
55.4	0.021	30.7	5533	2.05
70.3	0.008	11.2	5237	0.79

**Taula IV.22.** Cru de dades del seguiment de la formació de Gal $\beta$ 4Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP en la reacció amb Gal $\alpha$ F com a donador i Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ -pNP com a acceptor catalitzada pel mutant E383A  $\beta$ -glucosidasa a pH 7.

**Formació Glc $\beta$ 3Glc $\beta$ pNP**

temps (h)	[Glc3Glc $\beta$ pNP] (mM)	A Glc3Glc $\beta$ pNP	A G4GpNP (+ altres)	Rendiment (%)
0.02	0	0	5691	0
0.23	0	0	5791	0
0.52	0	0	5685	0
0.80	0	0	5540	0
1.04	0	0	5866	0
1.52	0	0	5732	0
4.44	0.015	22.70	5773	1.46
7.67	0.023	21.71	3456	2.33
22.6	0.023	35.07	5718	2.27
26.5	0.022	34.53	5832	2.19
30.9	0.027	40.06	5410	2.74
48.8	0.036	57.09	5945	3.56
55.4	0.042	62.17	5533	4.16
70.3	0.050	71.18	5237	5.03

**Taula IV.23.** Cru de dades del seguiment de la formació de Glc $\beta$ 3Glc $\beta$ pNP en la reacció amb Gal $\alpha$ F com a donador i Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP com a acceptor catalitzada pel mutant E383A  $\beta$ -glucosidasa a pH 7.

**Formació Gal $\beta$ 3Glc $\beta$ pNP**

temps (h)	[Gal3Glc $\beta$ pNP] (mM)	A Gal3Glc $\beta$ pNP	A G4GpNP (+ altres)	Rendiment (%)
0.02	0	0	5691	0
0.23	0.001	1.89	5791	0.12
0.52	0.003	4.19	5685	0.27
0.80	0.004	6.30	5540	0.42
1.04	0.005	8.24	5866	0.52
1.52	0.008	12.1	5732	0.78
4.44	0.020	31.4	5773	2.01
7.67	0.029	27.0	3456	2.89
22.6	0.040	62.0	5718	4.01
26.5	0.038	60.4	5832	3.84
30.9	0.036	51.9	5410	3.55
48.8	0.022	35.4	5945	2.21
55.4	0.017	25.7	5533	1.72
70.3	0.010	13.9	5237	0.99

**Taula IV.24.** Cru de dades del seguiment de la formació de Gal $\beta$ 3Glc $\beta$ pNP en la reacció amb Gal $\alpha$ F com a donador i Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP com a acceptor catalitzada pel mutant E383A  $\beta$ -glucosidasa a pH 7.

**Formació Glc $\beta$ pNP**

temps (h)	[Glc $\beta$ pNP] (mM)	A Glc $\beta$ pNP	A G4GpNP (+ altres)	Rendiment (%)
0.02	0.004	6.13	5691	0.40
0.23	0.004	6.74	5791	0.43
0.52	0.006	9.90	5685	0.64
0.80	0.010	15.3	5540	1.02
1.04	0.007	11.4	5866	0.72
1.52	0.009	14.1	5732	0.92
4.44	0.014	21.5	5773	1.38
7.67	0.018	16.9	3456	1.81
22.6	0.056	87.2	5718	5.65
26.5	0.105	165	5832	10.5
30.9	0.168	246	5410	16.8
48.8	0.439	705	5945	43.9
55.4	0.498	744	5533	49.8
70.3	0.569	804	5237	56.9

**Taula IV.25.** Cru de dades del seguiment de la formació de Glc $\beta$ pNP en la reacció amb Gal $\alpha$ F com a donador i Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP com a acceptor catalitzada pel mutant E383A  $\beta$ -glucosidasa a pH 7.

**Gal $\alpha$ F + Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP (pH 8.5)****Formació Gal $\beta$ 4Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP**

temps (h)	[Gal4Glc4Glc $\beta$ pNP] (mM)	A Gal4Glc4Glc $\beta$ pNP	A G4GpNP (+ altres)	Rendiment (%)
0.01	0	0	4558	0
0.31	0.0004	0.55	5828	0.04
0.65	0.001	1.25	5759	0.08
1.04	0.002	2.39	5402	0.16
1.63	0.003	4.75	5861	0.30
4.15	0.011	17.7	5771	1.14
6.15	0.018	28.4	5753	1.83
21.0	0.056	90.5	5995	5.59
25.0	0.063	97.9	5791	6.26
29.4	0.066	104	5840	6.60
47.3	0.060	86.0	5331	5.97
53.8	0.054	76.9	5297	5.38
68.8	0.046	72.6	5788	4.64

**Taula IV.26.** Cru de dades del seguiment de la formació de Gal $\beta$ 4Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP en la reacció amb Gal $\alpha$ F com a donador i Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP com a acceptor catalitzada pel mutant E383A  $\beta$ -glucosidasa a pH 8.5.

**Formació Glc $\beta$ 3Glc $\beta$ pNP**

temps (h)	Glc3Glc $\beta$ pNP] (mM)	A Glc3Glc $\beta$ pNP	A G4GpNP (+ altres)	Rendiment (%)
0.01	0	0	4558	0
0.31	0	0	5828	0
0.65	0	0	5759	0
1.04	0	0	5402	0
1.63	0	0	5861	0
4.15	0.017	26.00	5771	1.67
6.15	0.016	24.29	5753	1.56
21.0	0.019	30.61	5995	1.89
25.0	0.024	36.82	5791	2.35
29.4	0.023	36.78	5840	2.33
47.3	0.030	43.56	5331	3.03
53.8	0.032	45.76	5297	3.20
68.8	0.034	53.49	5788	3.42

**Taula IV.27.** Cru de dades del seguiment de la formació de Glc $\beta$ 3Glc $\beta$ pNP en la reacció amb Gal $\alpha$ F com a donador i Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP com a acceptor catalitzada pel mutant E383A  $\beta$ -glucosidasa a pH 8.5.

**Formació Gal $\beta$ 3Glc $\beta$ pNP**

temps (h)	[Gal3glcpNP] (mM)	A Gal3Glc $\beta$ pNP	A G4GpNP (+ altres)	Rendiment (%)
0.01	0	0	4558	0
0.31	0.002	2.48	5828	0.16
0.65	0.003	5.11	5759	0.33
1.04	0.005	7.57	5402	0.52
1.63	0.008	12.51	5861	0.79
4.15	0.018	28.51	5771	1.83
6.15	0.025	39.14	5753	2.52
21.0	0.042	68.04	5995	4.20
25.0	0.042	65.58	5791	4.19
29.4	0.041	64.39	5840	4.08
47.3	0.034	48.31	5331	3.36
53.8	0.030	43.29	5297	3.03
68.8	0.027	42.69	5788	2.73

**Taula IV.28.** Cru de dades del seguiment de la formació de Gal $\beta$ 3Glc $\beta$ pNP en la reacció amb Gal $\alpha$ F com a donador i Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP com a acceptor catalitzada pel mutant E383A  $\beta$ -glucosidasa a pH 8.5.

**Formació Glc $\beta$ pNP**

temps (h)	[Glc $\beta$ pNP] (mM)	A Glc $\beta$ pNP	A G4GpNP (+ altres)	Rendiment (%)
0.01	0.004	5.14	4558	0.42
0.31	0.004	7.04	5828	0.45
0.65	0.005	8.57	5759	0.55
1.04	0.006	8.85	5402	0.61
1.63	0.007	10.57	5861	0.67
4.15	0.010	15.31	5771	0.98
6.15	0.012	18.51	5753	1.19
21.0	0.034	54.87	5995	3.39
25.0	0.044	68.34	5791	4.37
29.4	0.057	89.11	5840	5.65
47.3	0.120	172.4	5331	11.9
53.8	0.14156862	202.5	5297	14.2
68.8	0.20483008	320.1	5788	20.5

**Taula IV.29.** Cru de dades del seguiment de la formació de Glc $\beta$ pNP en la reacció amb Gal $\alpha$ F com a donador i Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP com a acceptor catalitzada pel mutant E383A  $\beta$ -glucosidasa a pH 8.5.

**4.5. Inactivació de possible contaminació de  $\beta$ -glucosidasa wt****4.5.1. Comprovació de la inactivació del wt amb salicortin**

Es realitza una prova d'inactivació de la  $\beta$ -glucosidasa wt amb salicortin i es determinen les condicions d'incubació per a que l'enzim esdevingui totalment inactiu.

**Procediment:**

Es preparen dues incubacions de  $\beta$ -glucosidasa wt, una amb salicortin i l'altra sense (com a control, per a descartar inactivació tèrmica). En ambdós casos, se situen en un tub Eppendorf 18  $\mu$ L de  $\beta$ -glucosidasa wt (3.34  $\mu$ M), 141  $\mu$ L de tampó fosfat 50 mM (x2) i 141  $\mu$ L d'aigua MilliQ, fins a una concentració final d'enzim de 0.2  $\mu$ M. Al tub Eppendorf on es durà a terme la inactivació s'hi addicionen 2.5 mg de salicortin (corresponent a una concentració en el cru de reacció de 20 mM).

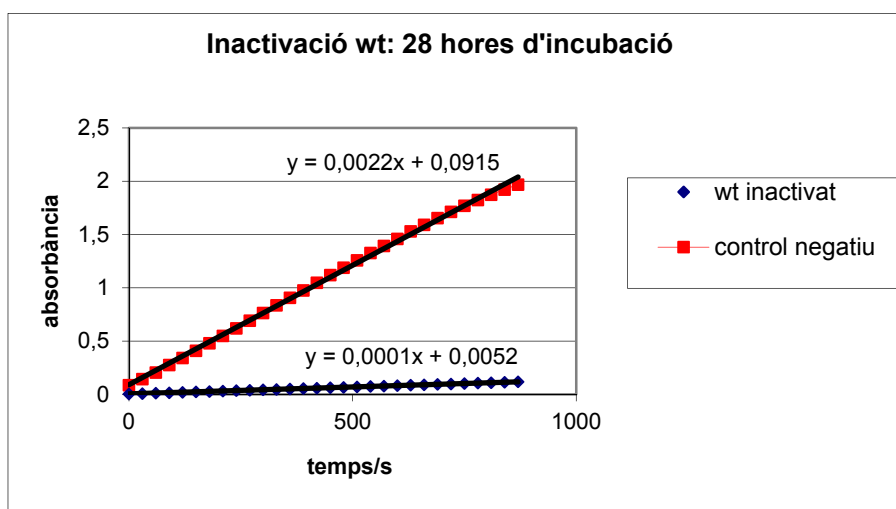
Els dos tubs Eppendorf s'incuben en un bany a 37°C. A intervals regulars de temps, es prenen alíquotes de 20 µL de cada un dels tubs incubats i es determina l'activitat hidrolítica de les dues mostres (salicortin i control negatiu).

Les cinètiques d'hidròlisi es realitzen a concentració 5.5 nM de β-glucosidasa wt, 0.5 mM de GlcβpNP, en tampó fosfat 50 mM i a 30°C. S'enregistra la lectura d'absorbància a 400 nm cada 30 segons durant 15 minuts respecte a una dissolució de tampó fosfat 50 mM que conté GlcβpNP a concentració 0.5 mM.

**Resultats:**

Es representa l'absorbància enfront el temps. El pendent de la recta obtinguda correspon a la velocitat d'hidròlisi.

A tall d'exemple es mostra el gràfic obtingut a les 28 hores d'incubació:



**Figura IV.30.** Velocitats d'hidròlisi de l'acceptor GlcβpNP amb β-glucosidasa wt incubada en presència de salicortin i sense (control negatiu) a les 28 hores d'incubació.

S'observa que l'enzim incubat amb salicortin té una activitat hidrolítica del 4.3% respecte el control negatiu.

La inactivació es dona en relació exponencial amb el temps. Es pot descartar que la inactivació sigui deguda a la incubació a 37°C, ja que l'activitat residual del control negatiu és en tot moment major al 98%.

**4.5.2. Inactivació de possible contaminació wt en el mutant E383A**

**Procediment:**

S'incuben a 37°C dos tubs Eppendorf que contenen 300 µL de mutant E383A 50 µM en tampó fosfat 50 mM, un amb salicortin 25 mM (3 mg) i l'altra sense, com a control negatiu. Passades 30 hores d'incubació es conserven a 4°C fins a la determinació d'activitat sintasa.

#### IV. ENZIMOLOGIA - PART EXPERIMENTAL

Per a comprovar si el comportament que presenta l'E383A és degut a contaminació de wt, es realitza el seguiment de la reacció Glc $\alpha$ F + Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ -pNP a pH 7 a les mateixes condicions que es va dur a terme, aquesta vegada amb el mutant inactivat.

Es col·loquen en un tub Eppendorf les quantitats suficients de dissolucions estoc de donador, acceptor i tampó fosfat (x2) per tal d'obtenir les concentracions desitjades i aigua MilliQ fins a un volum tal que amb l'addició d'enzim s'obtingui un volum total de 800  $\mu$ L.

S'incuba a 35°C durant 5 minuts i s'hi addiciona l'E383A  $\beta$ -glucosidasa. Es considera aquest instant com a temps inicial. Es pren una alíquota de 20  $\mu$ L del cru de reacció, es dilueix 10 vegades amb aigua MilliQ, s'agita amb el vòrtex i s'analitza per HPLC.

Es repeteix la mateixa operació amb alíquotes preses a intervals regulars de temps. Es calcula la concentració de producte en cada moment considerant constant la concentració d'acceptor, segons l'equació I i es representa la concentració de producte enfront el temps de reacció.

Paral·lelament, es realitza la mateixa operació amb el mutant incubat sense salicortin per tal de comprovar que si es dona inactivació no és degut a la incubació.

Ambdues reaccions es duen a terme a concentració de donador 1 mM, concentració d'acceptor 5 mM, concentració d'enzim 9.2  $\mu$ M, en tampó fosfat 50 mM i a 35°C.

#### Resultats:

El seguiment de la reacció amb el mutant inactivat es compararà amb l'obtingut anteriorment, utilitzant el mutant no inactivat:

La mateixa reacció catalitzada pel mutant incubat amb salicortin, presenta el següent comportament:

#### Formació Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP

temps (h)	[G4G4GpNP] (mM)	A G4G4GpNP	A G4GpNP (+ altres)	Rendiment (%)
0.01	0.011	19.6	9123	1.07
0.33	0.022	38.1	8848	2.15
0.62	0.026	48.6	9342	2.56
0.95	0.039	72.1	9161	3.94
3.08	0.080	150	9404	7.98
6.32	0.127	250	9856	12.7
16.7	0.187	364	9714	18.7
20.0	0.198	380	9601	19.8
22.1	0.211	405	9603	21.1

**Taula IV.31.** Cru de dades del seguiment de la formació de Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ -pNP en la reacció amb Glc $\alpha$ F com a donador i Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ -pNP com a acceptor catalitzada pel mutant E383A  $\beta$ -glucosidasa incubat amb salicortin a pH 7.



**Formació Glc $\beta$ 3Glc $\beta$ pNP**

temps (h)	[G3GpNP] (mM)	A G3GpNP	A G4GpNP (+ altres)	Rendiment (%)
0.01	0	0	9123	0
0.33	0	0	8848	0
0.62	0	0	9342	0
0.95	0	0	9161	0
3.08	0.005	10	9404	0.53
6.32	0.009	18	9856	0.91
16.7	0.026	51	9714	2.63
20.0	0.031	60	9601	3.12
22.1	0.038	72	9603	3.76

**Taula IV.32.** Cru de dades del seguiment de la formació de Glc $\beta$ 3Glc $\beta$ pNP en la reacció amb Glc $\alpha$ F com a donador i Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP com a acceptor catalitzada pel mutant E383A  $\beta$ -glucosidasa incubat amb salicortin a pH 7.

**Formació Glc $\beta$ pNP**

temps (h)	[Glc $\beta$ pNP] (mM)	A Glc $\beta$ pNP	A G4GpNP (+ altres)	Rendiment (%)
0.01	0.001	2.35	9123	0.12
0.33	0.002	3.56	8848	0.18
0.62	0.003	5.36	9342	0.28
0.95	0.005	9.34	9161	0.50
3.08	0.006	10.5	9404	0.56
6.32	0.006	11.0	9856	0.56
16.7	0.008	14.7	9714	0.77
20.0	0.010	20.0	9601	1.04
22.1	0.020	37.8	9603	1.97

**Taula IV.33.** Cru de dades del seguiment de la formació de Glc $\beta$ pNP en la reacció amb Glc $\alpha$ F com a donador i Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP com a acceptor catalitzada pel mutant E383A  $\beta$ -glucosidasa incubat amb salicortin a pH 7.

Reaccions sintasa amb el control negatiu:

**Formació Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP**

temps (h)	[Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP] (mM)	A Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP	A G4GpNP (+ altres)	Rendiment (%)
0.01	0.011	20.8	9122	1.14
0.35	0.063	111	8848	6.28
0.72	0.093	174	9342	9.30
1.25	0.126	230	9160	12.6
3.43	0.148	275	9271	14.8
6.44	0.168	321	9574	16.8
18.0	0.202	393	9714	20.2
21.4	0.185	340	9181	18.5
23.7	0.186	346	9297	18.6

**Taula IV.34.** Cru de dades del seguiment de la formació de Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP en la reacció amb Glc $\alpha$ F com a donador i Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP com a acceptor catalitzada pel mutant E383A  $\beta$ -glucosidasa incubat (control negatiu) a pH 7.

**Formació Glc $\beta$ 3Glc $\beta$ pNP**

temps (h)	[Glc3Glc $\beta$ pNP] (mM)	A Glc3Glc $\beta$ pNP	A G4GpNP (+ altres)	Rendiment (%)
0.01	0	0	9122	0
0.35	0	0	8848	0
0.72	0.025	46.20	9342	2.47
1.25	0.030	55.10	9160	3.01
3.43	0.033	60.75	9271	3.28
6.44	0.033	63.14	9574	3.30
18.0	0.053	102.7	9714	5.29
21.4	0.052	95.88	9181	5.22
23.7	0.051	94.97	9297	5.11

**Taula IV.35.** Cru de dades del seguiment de la formació de Glc $\beta$ 3Glc $\beta$ pNP en la reacció amb Glc $\alpha$ F com a donador i Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP com a acceptor catalitzada pel mutant E383A  $\beta$ -glucosidasa incubat (control negatiu) a pH 7.

**Formació Glc $\beta$ pNP**

temps (h)	[Glc $\beta$ pNP] (mM)	A Glc $\beta$ pNP	A G4GpNP (+ altres)	Rendiment (%)
0.01	0.004	6.68	9122	0.37
0.35	0.001	1.35	8848	0.08
0.72	0.001	1.43	9342	0.08
1.25	0.001	1.89	9160	0.10
3.43	0.001	2.59	9271	0.14
6.44	0.002	4.02	9574	0.21
18.0	0.066	128	9714	6.61
21.4	0.079	145	9181	7.88
23.7	0.087	162	9297	8.72

**Taula IV.36.** Cru de dades del seguiment de la formació de Glc $\beta$ pNP en la reacció amb Glc $\alpha$ F com a donador i Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ pNP com a acceptor catalitzada pel mutant E383A  $\beta$ -glucosidasa incubat (control negatiu) a pH 7.

**4.6. Rescat químic de l'activitat hidrolasa amb anió fluorur**

Procediment:

Es preparen dissolucions amb el substrat activat GlcDNP (0.5 mM) i KF (0 – 600 mM) en tampó fosfat 50 mM pH 7 a 35°C. Es pre-escalfa la mostra durant 5 minuts. S'addiciona el mutant E383A de la  $\beta$ -glucosidasa d'*Streptomyces* sp. (0.2 - 10  $\mu$ M) Es mesura en continu l'alliberament de l'aglicona cromofòrica 2,4-dinitrofenol per espectrofotometria UV-VIS a 400 nm.

## V. Síntesi *in vitro* d'1,3-1,4- $\beta$ -glucà

### 1. Comentaris previs

#### 1.1. Instrumental

- Incubador orbital Innova 400
- Centrifuga Sorvall RC5C
- Liofilitzador Cryodos de Telstar
- Microscopi electrònic JEOL JSM-5310
- Espectròmetre de masses MALDI-TOF Biflex (Bruker).
- Sistema de difracció de raigs-X: detector MarResearch 345; generador Rigaku MicroMax 007.
- Sistema DLS: Saturn DigiSizer 5200 (Micromeritics)
- Microscopi òptic Reichert Polyvar 2 (Leica)
- Espectròmetre de Ressonància Magnètica Nuclear Varian-Gemini-500.
- Equip de cromatografia líquida d'alta eficàcia Agilent 1100 series, equipat amb una bomba quaternària i detectors UV (VWD) i índex de refracció (RID).
- Espectrofotòmetre UV-VIS Helios  $\alpha$  UNICAM.

#### 1.2. Enzims i substrats

Mutant E134A i E134S de la  $\beta$ -glucanasa de *Bacillus licheniformis*: l'enzim es conserva liofilitzat fins a ser emprat. Es ressupèn en el volum de tampó emprat en la reacció.

Substrats: els fluorurs de glicosil emprats en les diferents reaccions s'han conservat liofilitzats fins al seu ús.

Tampó fosfat 100 mM pH 7.2, CaCl<sub>2</sub> 0.1 mM

## 2. Obtenció de Polímers

### 2.1. Autocondensació del fluorur d' $\alpha$ -laminaribiosa.

Es prepara una mescla de reacció amb el substrat Glc $\beta$ 3Glc $\alpha$ F (233 mM) en tampó fosfat 100 mM (pH 7.2 -8 a 35°C i 0.1 mM en CaCl<sub>2</sub>). Es pre-escalfa la mostra 5 minuts a 35°C. S'addiciona l'enzim E134A (41  $\mu$ M) i es deixa reaccionant durant 12 hores a 35°C, amb agitació orbital i protegit de la llum. S'obté un precipitat blanc, se centrifuga 3 minuts a 15000 rpm i es renta amb aigua MilliQ freda (3x1 ml). La mostra s'asseca i es conserva a temperatura ambient fins a anàlisi.

### 2.2. Autocondensació del fluorur de 3-O- $\beta$ -cel-lobiosil- $\alpha$ -D-glucopiranosil

Es prepara una mescla de reacció amb el substrat Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 3Glc $\alpha$ F (47 – 160 mM) en tampó fosfat 100 mM (pH 7.2 a 35°C i 0.1 mM en CaCl<sub>2</sub>). Es pre-escalfa la mostra 5 minuts a 35°C. S'addiciona l'enzim E134A (8.2 – 41  $\mu$ M) i es deixa reaccionant durant 12 hores a 35°C, amb agitació orbital i protegit de la llum. En el cas d'obtenir un precipitat blanc, se centrifuga 3 minuts a 15000 rpm i es renta amb aigua MilliQ freda (3x1 ml). La mostra s'asseca i es conserva a temperatura ambient fins a anàlisi. Si no s'obté precipitat el cru es liofilitza directament.

### 2.3. Autocondensació del fluorur de 4-O-β-glucopiranosil-4-O-β-glucopiranosil-3-O-β-glucopiranosil -α-D-glucopiranosil

Es prepara una mescla de reacció amb el substrat Glcβ4Glcβ4Glcβ3GlcαF (13 – 120 mM) en tampó fosfat 100 mM (pH 7.2 a 35°C i 0.1 mM en CaCl<sub>2</sub>). Es pre-escalfa la mostra 5 minuts a 35°C. S'addiciona l'enzim E134A (8.2 – 41 μM) i es deixa reaccionant durant 12 hores a 35°C, amb agitació orbital i protegit de la llum. En el cas d'obtenir un precipitat blanc, se centrifuga 3 minuts a 15000 rpm i es renta amb aigua MilliQ freda (3x1 ml). La mostra s'asseca i es conserva a temperatura ambient fins a anàlisi. Si no s'obté precipitat el cru es liofilitza directament.

### 2.4. Condensació creuada de trisacàrid i tetrasacàrid

Es pesen **B** mg de Glcβ4Glcβ4Glcβ3GlcαF i es dissolen en **C** mL de tampó fosfat 100 mM (pH 7.2 a 35°C i 0.1 mM en CaCl<sub>2</sub>). Es pre-escalfa la mostra 5 minuts a 35°C. S'addicionen **E** mg d'E134A i es deixa reaccionant **D** dies a 35°C, amb agitació orbital i protegit de la llum. En el cas d'obtenir un precipitat blanc, se centrifuga 3 minuts a 15000 rpm i es renta amb aigua MilliQ freda (3x1 ml). La mostra s'asseca i es conserva a temperatura ambient fins a anàlisi. Si no s'obté precipitat el cru es liofilitza directament. A la taula següent es mostren els experiments realitzats:

MOSTRA	A (mg)	B (mg)	C (ml)	E (mg)	D (dies)	AGITACIÓ	ASSECAT	RESULTAT
xpj308	23	3	2	0,5	1	orbital (150 rpm)	liofilització	no precipitat
xpj309	18	10	2	0,5	1	orbital (150 rpm)	liofilització	no precipitat
xpj310	13	17	2	0,5	1	orbital (150 rpm)	liofilització	no precipitat
xpj258	44	15	2	0,4	2	orbital (150rpm)	liofilització	22 mg
xpj367	21	25	0,5	0,5	0,5	orbital (250 rpm)	liofilització	43 mg

**Taula V.1.** Resum dels experiments de polimerització de copolimerització entre el trisacàrid Glcβ4Glcβ3GlcαF i el tetrasacàrid Glcβ4Glcβ4Glcβ3GlcαF.

### 2.5. Assecat

- Liofilització: el producte es ressuspend en 2 ml d'aigua MilliQ. Es congela amb CO<sub>2</sub>/acetona i es liofilitza.
- Pentòxid de Fòsfor / Buit: El producte humit separat per centrifugació, es diposita en un dessecador amb P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> i s'estableix buit.
- Etanol / Corrent de N<sub>2</sub>: El producte es renta amb EtOH (2x1 mL) i s'asseca sobre una corrent contínua de Nitrogen.

## 3. Caracterització estructural

### 3.1. Espectroscòpia

Els espectres de <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, COSY, HMBC i HSQC s'enregistren en un espectròmetre Varian Gemini 500 MHz a 298K.

El producte obtingut *in vitro* es liofilitza i es dissol en [<sup>2</sup>H]DMSO a una concentració aproximada de 10 mg·ml<sup>-1</sup>. Pel <sup>1</sup>H-NMR, el multiplet central (2.49 ppm) corresponent a [<sup>1</sup>H]DMSO s'utilitza com a referència. Pel <sup>13</sup>C-NMR, el multiplet central (39.5 ppm) corresponent a [<sup>2</sup>H]DMSO s'utilitza com a referència.

**Dades espectroscòpiques del producte d'autocondensació del Glc $\beta$ 3Glc $\alpha$ F**

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO, 30°C, 500 Hz): 3.12 (H-2<sup>II</sup>), 3.21 (H-2<sup>I</sup>), 3.21 (H-4<sup>I</sup>), 3.3 (H-3<sup>II</sup>, H-4<sup>II</sup>, H-5<sup>I-II</sup>), 3.4 (H-3<sup>I</sup>), 3.5, 3.55-3.79 (H-6<sup>I-II</sup>), 4.36 (H-1<sup>I</sup>, J = 6.5), 4.42 (H-1<sup>II</sup>, J=7), 4.31 (H-1 $\beta$  reducing end, J= 7.5)

**<sup>13</sup>C-NMR** (DMSO, 30°C, 500 Hz):  $\delta$  = 60.3 (C-6<sup>I</sup>), 60.8 (C-6<sup>II</sup>), 68.3 (C-4<sup>I</sup>), 72.2 (C-2<sup>I</sup>), 73.5 (C-2<sup>II</sup>), 74.4, 74.9, 76.3 (C-3<sup>II</sup>, C-5<sup>I-II</sup>), 80.7 (C-4<sup>II</sup>), 87.4 (C-3<sup>I</sup>), 102.6 (C-1<sup>I</sup>), 103.6 (C-1<sup>II</sup>), and 70.1 (C-4<sup>II</sup> non-reducing end), 104.0 (C-1 $\beta$  -reducing end), 96.3 (C-1 $\alpha$  reducing end)

**HSQC** (DMSO, 30°C): 3.3, 80.7 (H-4<sup>II</sup>, C-4<sup>II</sup>); 3.4, 87.4 (H-3<sup>I</sup>, C-3<sup>I</sup>); 3.21, 68.3 (H-4<sup>I</sup>, C-4<sup>I</sup>); 3.5, 3.60, 3.69, 3.79, 60.3, 60.8 (H-6<sup>I-II</sup>, C-6<sup>I-II</sup>); 4.42, 103.6 (H-1<sup>II</sup>, C-1<sup>II</sup>); 4.36, 102.6, (H-1<sup>I</sup>, C-1<sup>I</sup>), 4.31, 104.0 (H-1, C-1 reducing end); 3.21, 72.2 (H-2<sup>I</sup>, C-2<sup>I</sup>), 3.12, 73.5 (H-2<sup>II</sup>, C-2<sup>II</sup>)

**HMBC** (DMSO, 30°C): 3.12, 103.6 (H-2<sup>II</sup>, C-1<sup>II</sup>), 3.21, 87.4 ((H-2<sup>I</sup>, C-3<sup>I</sup>), 3.21, 102.6 (H-2<sup>I</sup>, C-1<sup>I</sup>), 3.3, 80.7 (H-3<sup>II</sup>, C-4<sup>II</sup>), 3.4, 103.6 (H-3<sup>I</sup>, C-1<sup>II</sup>), 4.36, 80.7 (H-1<sup>I</sup>, C-4<sup>II</sup>), 4.42, 87.4 (H-1<sup>II</sup>, C-3<sup>I</sup>)

**COSY** (DMSO, 30°C): 4.42, 3.12 (H-1<sup>II</sup>, H-2<sup>II</sup>); 4.36, 3.21 (H-1<sup>I</sup>, H-2<sup>I</sup>); 3.12, 3.21, 3.3, 3.4 (H-2<sup>I-II</sup>, H-3<sup>I-II</sup>); 3.5-3.79, 3.4 (H-6<sup>I-II</sup>, H-5<sup>I-II</sup>)

**Dades espectroscòpiques del producte d'autocondensació del Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 3Glc $\alpha$ F**

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO, 30°C, 500 Hz): 3.05 (H-2<sup>III</sup>), 3.11 (H-2<sup>II</sup>), 3.20 (H-2<sup>I</sup>), 3.20 (H-4<sup>I</sup>), 3.3 (H-3<sup>II-III</sup>, H-4<sup>II-III</sup>, H-5<sup>I-III</sup>), 3.4 (H-3<sup>I</sup>), 3.4, 3.55-3.78 (H-6<sup>I-III</sup>), 4.31 (H-1<sup>III</sup>, J = 5.5), 4.35 (H-1<sup>I</sup>, J = 6), 4.41 (H-1<sup>II</sup>, J=7), and 4.22 (H-1 $\beta$  reducing end, J = 8)

**<sup>13</sup>C-NMR** (DMSO, 30°C, 500 Hz):  $\delta$  = 60.3 (C-6<sup>I</sup>), 60.8 (C-6<sup>II-III</sup>), 68.3 (C-4<sup>I</sup>), 72.2 (C-2<sup>I</sup>), 72.9 (C-2<sup>III</sup>), 73.6 (C-2<sup>II</sup>), 74.4, 74.8, 74.8, 74.9, 76.3 (C-3<sup>II-III</sup>, C-5<sup>I-III</sup>), 80.4 (C-4<sup>III</sup>), 80.6 (C-4<sup>II</sup>), 87.4 (C-3<sup>I</sup>), 102.6 (C-1<sup>I</sup>), 102.8 (C-1<sup>III</sup>), 103.7 (C-1<sup>II</sup>), and 70.0 (C-4<sup>III</sup> non-reducing end), 103.2 (C-1 $\beta$  reducing end), 96.3 (C-1 $\alpha$  reducing end)

**HSQC** (DMSO, 30°C): 3.3, 80.4, 80.6 (H-4<sup>II-III</sup>, C-4<sup>II-III</sup>); 3.4, 87.4 (H-3<sup>I</sup>, C-3<sup>I</sup>); 3.2, 68.3 (H-4<sup>I</sup>, C-4<sup>I</sup>); 3.4, 3.5, 3.7, 3.8, 60.3, 60.3, 60.8 (H-6<sup>I-III</sup>, C-6<sup>I-III</sup>); 4.4, 103.7 (H-1<sup>II</sup>, C-1<sup>II</sup>); 4.35, 4.3, 102.6, 102.8 (H-1<sup>I-III</sup>, C-1<sup>I-III</sup>); 4.2, 103.2 (H-1, C-1 reducing end); 3.05, 72.9 (H-2<sup>III</sup>, C-2<sup>III</sup>); 3.20, 72.2 (H-2<sup>I</sup>, C-2<sup>I</sup>), 3.11, 73.6 (H-2<sup>II</sup>, C-2<sup>II</sup>)

**HMBC** (DMSO, 30°C): 3.4, 103.6 (H-3<sup>I</sup>, C-1<sup>II</sup>), 4.4, 87.4 (H-1<sup>II</sup>, C-3<sup>I</sup>)

**COSY** (DMSO, 30°C): 4.4, 3.20 (H-1<sup>II</sup>, H-2<sup>II</sup>); 4.31, 3.05 (H-1<sup>III</sup>, H-2<sup>III</sup>); 4.35, 3.11 (H-1<sup>I</sup>, H-2<sup>I</sup>); 3.05-3.20, 3.3-3.4 (H-2<sup>I-III</sup>, H-3<sup>I-III</sup>); 3.4-3.78, 3.4 (H-6<sup>I-III</sup> a b, H-5<sup>I-III</sup>)

**Dades espectroscòpiques del producte d'autocondensació del Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 3Glc $\alpha$ F**

**$^1\text{H-NMR}$**  (DMSO, 30°C, 500 Hz): 3.04 (H-2<sup>III,IV</sup>), 3.11, (H-2<sup>II</sup>), 3.20, (H-2<sup>I</sup>), 3.20 (H-4<sup>I</sup>), 3.3 (H-3<sup>III,III</sup>, H-4<sup>II,III</sup>, H-5<sup>I,III</sup>), 3.4 (H-3<sup>I</sup>), 3.4, 3.55-3.78 (H-6<sup>I,III</sup>), 4.31 (H-1<sup>III,IV</sup>, J=7), 4.35 (H-1<sup>I</sup>, J=7.5), 4.41 (H-1<sup>II</sup>, J=8), and 4.22 (H-1 $\beta$ <sup>I</sup> reducing end, J= 8)

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (DMSO, 30°C, 500 Hz):  $\delta$  = 60.3 (C-6<sup>I</sup>), 60.8 (C-6<sup>II,IV</sup>), 68.3 (C-4<sup>I</sup>), 72.2 (C-2<sup>I</sup>), 73.0 (C-2<sup>III,IV</sup>), 73.2 (C-2<sup>II</sup>), 74.4, 74.9, 74.9, 74.9, 74.9, 74.9, 76.3 ( C-3<sup>II,IV</sup>, C-5<sup>I,IV</sup>), 80.5 (C-4<sup>III,IV</sup>), 80.7 (C-4<sup>II</sup>), 87.4 (C-3<sup>I</sup>), 102.6(C-1<sup>I</sup>), 102.8 (C-1<sup>III,IV</sup>), 103.6 (C-1<sup>II</sup>), and 70.0 (C-4<sup>IV</sup> non-reducing end), 103.2 (C-1 $\beta$ -reducing end), 96.3 (C-1 $\alpha$  reducing end)

**HSQC** (DMSO, 30°C): 3.3, 80.4, 80.6 (H-4<sup>II,IV</sup>, C-4<sup>II,IV</sup>); 3.4, 87.4 (H-3<sup>I</sup>, C-3<sup>I</sup>); 3.24, 68.3 (H-4<sup>I</sup>, C-4<sup>I</sup>); 3.4, 3.55, 3.69, 3.78, 60.3, 60.3, 60.3, 60.8 (H-6<sup>I,IV</sup>, C-6<sup>I,IV</sup>); 4.41, 103.6(H-1<sup>II</sup>, C-1<sup>II</sup>); 4.35, 4.31, 4.31, 102.6, 102.8 (H-1<sup>III,IV</sup>, C-1<sup>III,IV</sup>); 4.22, 103.2 (H-1, C-1 reducing end); 3.04, 73.0 (H-2<sup>III,IV</sup>, C-2<sup>III,IV</sup>); 3.11, 73.2 (H-2<sup>II</sup>, C-2<sup>II</sup>); 3.20, 72.2 (H-2<sup>I</sup>, C-2<sup>I</sup>); 3.3-3.4, 74.4-76.3 (H-3<sup>II,IV</sup>, H-5<sup>I,IV</sup>, C-3<sup>II,IV</sup>, C-5<sup>I,IV</sup>)

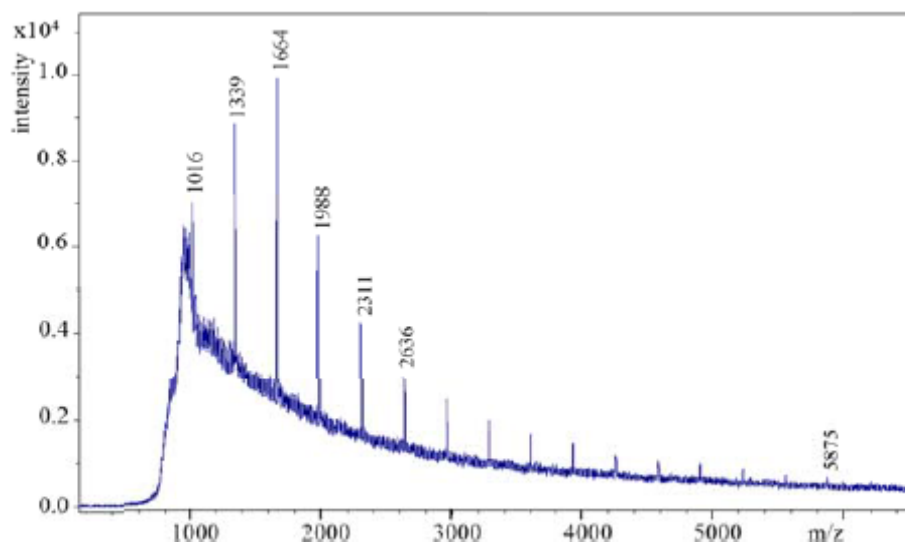
**HMBC** (DMSO, 30°C): 4.31, 4.31, 80.5, 80.7 (H-4<sup>III,IV</sup>, C-4<sup>III,IV</sup>)

**COSY** (DMSO, 30°C): 4.35, 3.20, 4.41, 3.11 (H-1<sup>I</sup>, H-2<sup>I</sup>, H-1<sup>II</sup>, H-2<sup>II</sup>) 4.31, 3.04 (H-1<sup>III,IV</sup>, H-2<sup>III,IV</sup>), 3.04-3.20, 3.3-3.4 (H-2<sup>I,IV</sup>, H-3<sup>I,IV</sup>); 3.4-3.78, 3.3-3.4(H-6<sup>I,IV</sup>, H-5<sup>I,IV</sup>)

**3.2. Espectrometria de Masses per MALDI-TOF**

Els espectres de MALDI-TOF s'enregistren en un espectròmetre Bruker Biflex emprant l'àcid 2,5-dihidroxibenzoic com a matriu. Els paràmetres d'anàlisi són: Reflectron, mode ió positiu, voltatge d'acceleració de 19 kV i 20 kV de voltatge de reflector.

El producte dissolt en DMSO (10 mg·ml<sup>-1</sup>) es dilueix en matriu d'àcid dihidroxibenzoic (10 mg·ml<sup>-1</sup> en H<sub>2</sub>O) en una proporció 1:10 (v/v). La irradiació és dóna sobre 0.5  $\mu$ l de mostra dispersada en la placa, acumulant 30 trets en diferents posicions fins a un total d'entre 300-500 trets.



**Figura V.2.** Espectre MALDI-TOF corresponent al producte d'autocondensació del Glc $\beta$ 3Glc $\alpha$ F

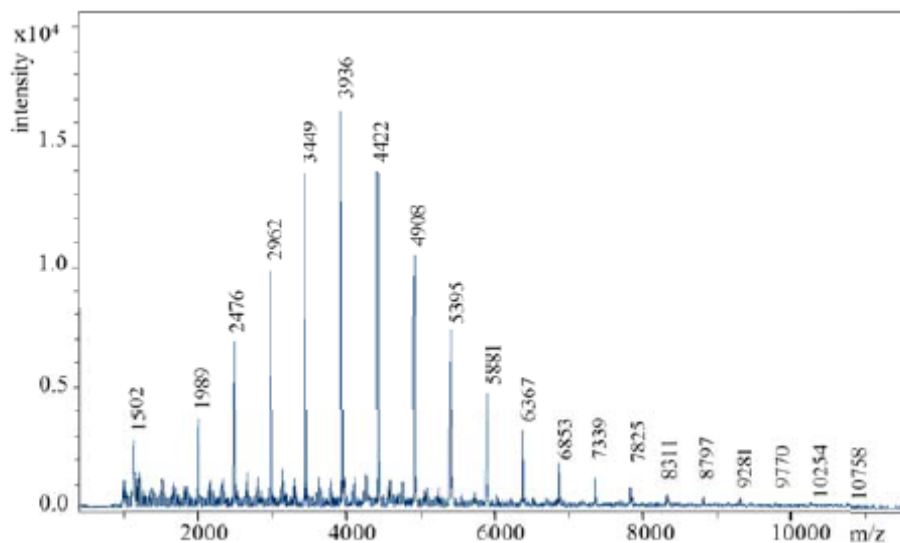


Figura V.3. Espectre MALDI-TOF corresponent al producte d'autocondensació del Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 3Glc $\alpha$ F

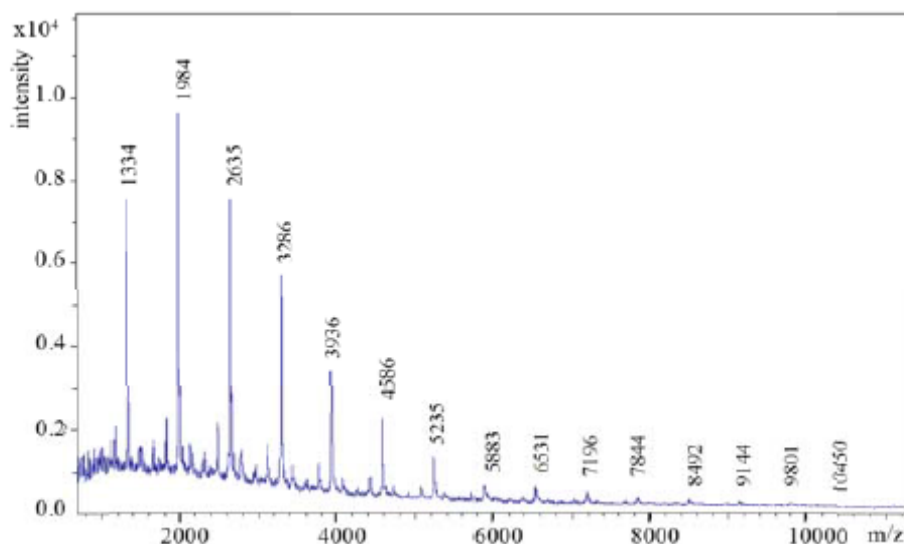


Figura V.4. Espectre MALDI-TOF corresponent al producte d'autocondensació del Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 4Glc $\beta$ 3Glc $\alpha$ F

### 3.3. HPSEC

#### 3.3.1. Introducció a la metodologia

Els sistemes polimèrics obtinguts per creixement aleatori de la seva cadena, normalment presenten un interval de pesos moleculars de difícil caracterització. En el fons, la complexitat radica en el fet de voler assignar un pes molecular, tal i com succeeix amb una molècula petita, a una distribució de molècules de diferent mida. Això fa que el pes molecular d'un polímer no vingui representat per un únic valor i que de fet no es pugui parlar de pes molecular del polímer; sí de la seva distribució de pesos moleculars  $P(M)$  o més comunament de la mitjana d'aquests  $\bar{M}_N$ . Hi ha dos tipus de mitjanes àmpliament emprades en ciència dels materials: en nombre ( $M_N$ ) i en pes ( $M_W$ ).

El pes molecular representat com a mitjana en nombre és defineix com el sumatori de productes del pes molecular de cada fracció multiplicats per la seva fracció molar (figura V.5):

$$\bar{M}_N = \frac{\sum_{i=1}^{\infty} M_i n_i}{\sum_{i=1}^{\infty} n_i}$$

**Figura V.5.** Fórmula per al càlcul del pes molecular definit com a mitjana en número.

És per tant, un paràmetre que només té en compte el número de molècules presents sense estar influenciat per la mida de les partícules que el conformen. Aquest tipus de pes molecular pot ser determinat a partir de mètodes que només contin molècules. Aquests estan basats bé en valoracions de grups funcionals lliures, normalment situats als extrems de les cadenes, o bé en les seves propietats col·ligatives del polímer: augment del punt d'ebullició, disminució del punt de congelació, disminució de la pressió de vapor o la pressió osmòtica.

D'altra banda, el pes molecular representat com a mitjana de pesos es defineix com el sumatori dels productes del pes molecular de cada fracció multiplicat per la seva fracció màssica (figura V.6)

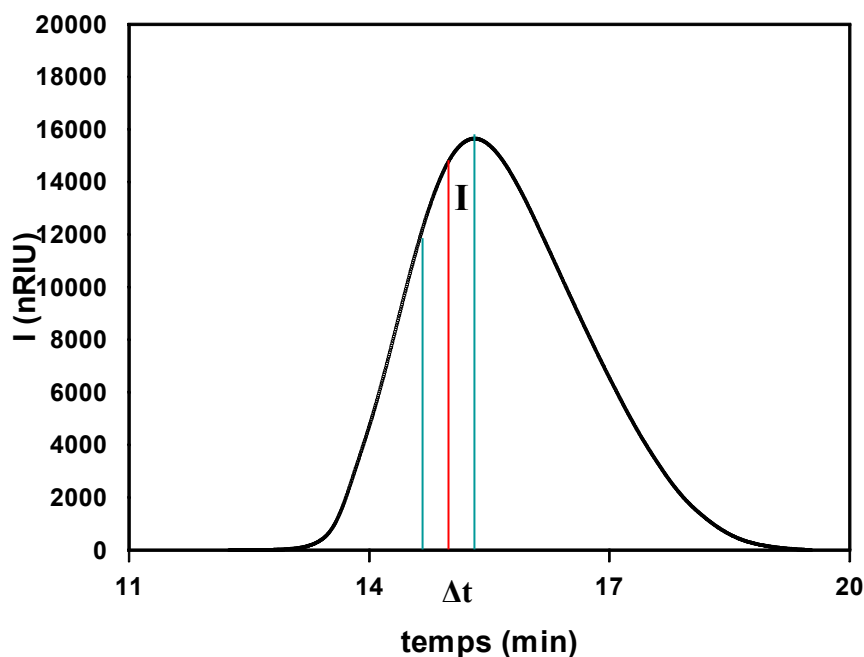
$$\bar{M}_W = \frac{\sum_{i=1}^{\infty} M_i^2 n_i}{\sum_{i=1}^{\infty} M_i n_i}$$

**Figura V.6.** Fórmula per al càlcul del pes molecular definit com a mitjana en pes.

En aquest cas, el valor del pes molecular no només depèn del nombre de molècules sinó també de la mida o massa de cadascuna d'elles.

A més de la mitjana de pesos moleculars (numero i pes) hi ha un altre paràmetre important per a caracteritzar la distribució de pesos moleculars d'un polímer, l'índex de polidispersió (PDI). És la relació entre  $\bar{M}_W$  i  $\bar{M}_N$  i s'empra com a estimació de l'amplitud de la distribució de pesos moleculars: com més gran és el seu valor més ample és la corba de distribució de pesos moleculars; els polímers monodispersos tenen un PDI = 1.





**Figura V.7.** Exemple de corba d'elució per HPSEC.

Per a cada temps d'elució, es pot calcular el corresponent pes molecular del polímer eluït a partir de la recta de calibració obtinguda amb patrons de pes molecular conegut. La resposta del detector d'índex de refracció, és proporcional a la massa del polímer analitzat i independent del seu pes molecular. Per tant, l'àrea definida per a cada increment de temps d'elució ( $\Delta t$ ) correspon a la massa detectada d'aquell polímer ( $\Delta t \cdot I$ ). Finalment, la relació entre aquesta massa i el pes molecular indica el nombre de molècules d'aquesta mida presents a la fracció i permet el càlcul de  $\bar{M}_W$  i  $\bar{M}_N$  i el PDI.

Els polímers polidispersos en dissolució es fraccionen atenent a la seva mida o volum hidrodinàmic quan se sotmeten a cromatografia d'exclusió molecular. I aquest volum hidrodinàmic es troba relacionat amb el pes molecular. El sistema cromatogràfic presenta una fase estacionària constituïda per partícules poroses, la mida de les quals varia en funció de l'eluent emprat. Durant l'elució del polímer dissolt, les molècules petites que el conformen tendeixen a penetrar els porus de la reïna mentre que les grans en són excloses. D'aquesta manera, el fraccionament de la mostra depèn de la mida dels seus components, eluint-se més ràpidament les molècules més grans. El pes molecular d'una molècula de polímer varia exponencialment amb el volum d'elució, essent aquest últim proporcional al temps per a unes condicions constants de l'elució. Per tant, per obtenir dades de pes molecular i convertir el cromatograma obtingut en una distribució de pesos moleculars, s'injecten un seguit de patrons de pes molecular conegut. La recta patró s'obté de la representació del logaritme dels seus pesos moleculars del polímer més abundant ( $M_P$ ) enfront del temps d'elució. Donat que les determinacions de pesos moleculars depenen del volum hidrodinàmic, aquestes dependran dels patrons emprats per a la calibració i seran necessàries recalibracions per a cada conjunt de mostres a analitzar.

Per a l'anàlisi dels nous polisacàrids mitjançant cromatografia d'exclusió molecular (HPSEC) s'empra un sistema d'HPLC (Agilent 1100 series) amb injector manual i detector per índex de refracció. Les condicions cromatogràfiques són: columna: PSS GRAM (8 x 300 mm, 100 Å, 10  $\mu$ m); precolumna: PSS GRAM (8 x 50 mm, 100 Å, 10  $\mu$ m); fase mòbil: LiBr/DMSO (5 g·l<sup>-1</sup>), isocràtic; cabal 0.5 ml·min<sup>-1</sup>; temps d'anàlisi 29 minuts; volum d'injecció 50  $\mu$ l; temperatura

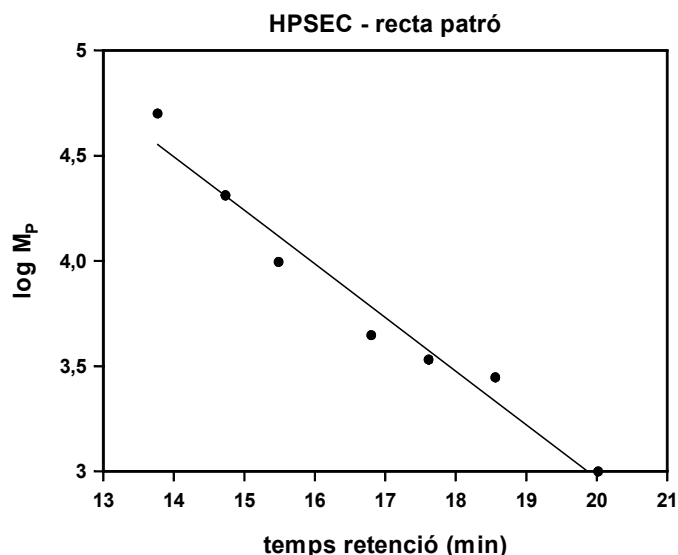
columna i detector 50°C. Per a la validació del mètode analític s'utilitzen patrons de dextrà amb pesos moleculars ( $M_w$ ) compresos entre 1200 i 54600 Da:

Patrons	$M_w$ (Da)	$M_N$ (Da)	$M_P$ (Da)	PDI
DXT 1k	1200	900	1000	1,333
DXT 3k	3650	2750	2800	1,327
DXT 4k	4300	3250	3400	1,323
DXT 6k	5700	3325	4440	1,714
DXT 11k	11700	8000	9900	1,463
DXT 25k	25500	17900	20500	1,425
DXT 55k	54600	41100	50200	1,328

**Taula V.8.** Patrons emprats per a la validació del mètode d'anàlisi de polisacàrids per HPSEC i les seves especificacions segons el proveïdor.

Els resultats de la validació mostren que el factor de resposta determinat a partir de la relació entre alçada de pic i concentració presenta una distribució més significativa que la relació àrea/concentració.

Per a cada grup de mostres a analitzar es determina una recta patró pel marge de pesos moleculars abans esmentats. A la figura V.9 se'n mostra un exemple:



**Figura V.9.** recta patró pel marge de pesos moleculars 1200 Da – 55000 Da en funció del temps de retenció. Patrons injectats de dextrà 2 mg/ml.

Es realitza una regressió lineal i s'obté la següent recta:

$$\log M_P = - 0.255 \cdot tr + 8.064$$

que s'utilitzarà per a interpol·lar els valors de pes molecular a partir dels temps de retenció recuperats del cromatograma.

A partir de la metodologia anterior s'analitza la distribució de pesos moleculars dels polisacàrids obtinguts per policondensació del di, tri i tetrasacàrid. Els resultats es troben a la taula V.10.

substrat	mostra	temps de retenció		Interval $M_w$				$M_w$	$M_n$	$M_p$		PDI
		inici (min)	final (min)	màxim		mínim		Da	Da	Da	#Glc	$M_w/M_n$
				Da	#Glc	Da	#Glc					
di	AP1	12,00	19,88	101168	628	991	6	9536	5053	9140	51	1,887
tri	XP241	12,92	19,89	58875	363	991	6	15464	10117	17522	108	1,528
	XP247	12,41	19,89	79853	492	991	6	12459	8458	11954	75	1,468
	XP248	12,47	19,20	76873	474	1479	9	14492	9329	14642	90	1,553
	XP249	12,89	19,20	59913	369	1479	9	12590	8479	13046	72	1,485
	XP250	12,71	19,20	68586	423	1482	9	13914	9695	14488	90	1,435
	AP9	12,25	19,89	87631	540	991	6	14622	6919	17301	108	2,113
	AP7	12,25	19,89	87631	540	991	6	13891	6724	16238	99	2,066
tetra	AP15	13,05	19,89	54826	335	991	6	12016	6341	16102	99	1,895
	XP252	12,87	19,40	60934	376	1317	8	8352	5287	7655	48	1,580
	XP253	12,49	19,40	75905	468	1317	8	9266	5806	9258	56	1,596
tri+tetra	AP3	13,06	19,40	54365	336	1314	8	12856	7479	16170	100	1,719
	XP312	11,90	21,21	129553	805	504	3	12010	4031	13497	84	2,98

**Taula V.10.** resultat de l'anàlisi de les mostres de policondensació per HPSEC. Es determina l'interval de pesos moleculars que constitueix el polímer, el polímer principal i el càlcul de la polidispersió.

## 3.2. Caracterització Morfològica

### 3.2.1. Microscopia Electrònica d'Escombrat (SEM)

Per als experiments de SEM, el producte liofilitzat es fixa sobre el suport de grafit adhesiu. Es metal·litza amb or/pal·ladi per *ion sputtering* i s'observa a un voltatge acceleratiu de 10 kV i una distància de treball de 16 mm, emprant un microscopi JEOL JSM-5310.

### 3.2.2. Dynamic Light Scattering (DLS)

El perfil de distribució de la mida de partícula es va avaluar per DLS emprant un sistema Saturn DigiSizer 5200 (Micromeritics). Es va utilitzar una dissolució de hexametfosfat de sodi 0.01 g/L com a dispersant i Material de Referència Garnet de mida de partícula 5.30  $\mu\text{m}$  com a patró.

### 3.2.3. Difracció de Raigs X

L'anàlisi per difracció de raig-X es dugué a terme en un detector MarResearch 345 i un generador de raigs-X Rigaku MicroMax 007 operat a 40kV i 20 mA amb radiació Cu K $\alpha$ . El sistema es calibrà amb pols de calcita com a referència (d-spacing 0.306 nm). Les mostres liofilitzades s'introdueixen dins de capil·lars fins (0.5 mm de diàmetre extern) per a la seva anàlisi.

### 3.2.4. Microscopia de Llum Polaritzada

El producte obtingut després de centrifugació s'observa emprant un microscopi òptic Reichert Polyvar 2 (Leica) emprant filtres de polarització. Les imatges es capturen amb una càmera CCD.

## 4. Monitorització de la corba de progrés de la precipitació

Es preparen reaccions de polimerització en les mateixes condicions descrites a l'apartat 2 emprant donador trisacàridic (160 mM) i tetrasacàridic (120 mM) en presència de glicosintasa E134A 18  $\mu\text{M}$ . S'extreuen alíquotes de crus de reacció i es dilueixen 1:50 en tampó de reacció per a la mesura de:

-l'absorbància a 550 nm, on l'increment d'absorbància reflecteix la quantitat de precipitat present.

-l'alliberament de fluorur mitjançant un elèctrode selectiu de fluorur (Sentek) acoblat a pH/iometre CiberScan (Eutech Instruments) per a quantificar la taxa de polimerització. Les concentracions de fluorur es van determinar per interpolació a una corba de referència obtinguda a partir de patrons de KF en el mateix tampó de reacció.

**VI. Immobilització del mutant E383A de la  $\beta$ -glucosidasa d'*Streptomyces* sp.****1. Procediment d'immobilització**

500  $\mu$ L de reïna Chelating Sepharose (Amersham Biosciences 17-0575-01) es renten amb aigua MilliQ (2x5 mL) i se saturen amb una dissolució de NiSO<sub>4</sub> 0.8 M (2x5 mL); entre cada addició es deixa equilibrar 5 minuts. La reïna es renta amb aigua MilliQ (5x5 mL) per eliminar el l'excés Ni<sup>2+</sup> i s'asseca a pressió reduïda durant 5 minuts. Es conserva a 4°C fins a la seva utilització.

Es prenen 20 mg de reïna seca i es ressuspenen en tampó fosfat (50 mM, pH 7); s'addiciona un volum de dissolució d'enzim E383A (40 – 170  $\mu$ g). Es deixa reposar 15 minuts i la suspensió se centrifuga. El rendiment d'immobilització es quantifica determinant per espectroscòpia d'absorbància l'enzim lliure contingut en el sobrenedant (absorbància a  $\lambda$  = 280nm; T = 30°C;  $\epsilon$  = 107000 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>).

**2. Reacció glicosintasa amb l'enzim immobilitzat.**

S'empra com a donador el fluorur d' $\alpha$ -glucosil i com a acceptor el p-nitrofenil glucòsid en una proporció 1 – 5 M. Els substrats s'addicionen a una suspensió de tampó fosfat (50 mM, pH 7, volum final 300  $\mu$ L) que conté E383A immobilitzat (40 – 200  $\mu$ g). La reacció es manté a 35°C i s'atura per filtració o centrifugació. La mostra es dilueix 1:10 amb aigua MilliQ i s'analitza per HPLC

**3. Estabilitat d'emmagatzemament**

Es preparen 6 mostres de mutant E383A immobilitzat (162  $\mu$ g/20 mg de reïna) seguint el procediment descrit amb anterioritat. Les mostres es conserven a 4°C per a temps diferents i es mesura la seva activitat glicosintasa romanent.

Condicions de reacció: [Glc $\alpha$ F] = 1 mM; [Glc $\beta$ pNP] = 5 mM; [E383A] = 10  $\mu$ M; Tampó fosfat pH 7 a 35°C; V<sub>total</sub> = 300  $\mu$ L; T<sub>reacció</sub>: 35 – 37°C; 5 hores de reacció amb agitació orbital a 200-300 rpm.

Anàlisi per HPLC: Columna Novapack C-18 (Waters); eluent: (H<sub>2</sub>O:MeOH) (88:12); Cabal 1 mL·min<sup>-1</sup>; 35°C; detecció per absorbància a  $\lambda$  = 301 nm .

Resultats:

Dies	activitat
0	100
1	93
12	94
54	83

**Taula VI.1.** L'activitat s'expressa com a percentatge de l'activitat inicial

#### 4. Estabilitat operacional

Es preparen 3 mostres d'E383A immobilitzat (108  $\mu$ g/20 mg reïna). Es mesura l'activitat glicosintasa per a sengles mostres després de 9 cicles de reacció. Entre cada cicle de reacció (19 hores) l'enzim immobilitzat es conserva en suspensió en tampó fosfat 50 mM, pH 7 a 4°C.

Condicions de reacció: [Glc $\alpha$ F] = 1 mM; [Glc $\beta$ pNP] = 5 mM; [E383A] = 10  $\mu$ M; Tampó fosfat pH 7 a 35°C;  $V_{total}$  = 300  $\mu$ L;  $T_{reacció}$ : 35 – 37°C; 5 hores de reacció amb agitació orbital a 200-300 rpm.

Anàlisi mitjançant HPLC (Agilent 1100 series): Columna Novapack C-18 (Waters); eluent: 10% MeOH; Cabal 1 mL·min<sup>-1</sup>; 35°C; detecció per absorbància a  $\lambda$  = 301 nm.

Resultats:

cicle	activitat	cicle	activitat
1	100	6	92
2	96	7	102
3	103	8	100
4	95	9	93
5	104		

**Taula VI.2.** Estabilitat operacional. Les activitats es representen com a tant per cent de l'activitat inicial.

#### 5. Efecte dels dissolvents orgànics: DMSO i CH<sub>3</sub>CN

S'estudia l'efecte que produeix l'addició de concentracions creixents de dissolvents orgànics (DMSO i acetonitril) en l'activitat de l'enzim. Es comparen els resultats per a l'enzim lliure i immobilitzat.

Condicions d'immobilització: 20 mg de reïna saturada de Ni<sup>2+</sup> i assecada s'equilibren amb tampó fosfat 50 mM, pH 8.5. Seguidament s'addiciona la quantitat d'enzim corresponent. Es deixa reposar a 4°C. Abans d'iniciar la reacció s'afegeixen la resta de reactius per aquest ordre: Acceptor, dissolvent i donador.

Condicions de reacció: [Glc $\alpha$ F] = 1 mM; [Glc $\beta$ pNP] = 5 mM; [E383A] = 10  $\mu$ M; Tampó fosfat pH 8.5 a 35°C,  $V_{final}$  = 300  $\mu$ L; T = 35 – 37°C; 18 - 20 hores de reacció amb agitació orbital a 200 - 300 rpm.

Anàlisi mitjançant HPLC (Agilent 1100 series): Columna Novapack C-18 (Waters); eluent: 11% MeOH; Cabal 1 mL·min<sup>-1</sup>; 35°C; detecció per absorbància a  $\lambda$  = 301 nm .

Resultats pel DMSO:

E383A immobilitzat tampó fosfat pH 8.5				E383A lliure tampó citrat/fosfat pH 8.5			
DMSO (%)	$\eta_{\text{Glc3Glc}}$ (%)	$\eta_{\text{Glc4Glc}}$ (%)	$\eta_{\text{sintasa}}$ (%)	DMSO (%)	$\eta_{\text{Glc3Glc}}$ (%)	$\eta_{\text{Glc4Glc}}$ (%)	$\eta_{\text{sintasa}}$ (%)
0	98	1	99	0	97	0	98
0	97	1	98	1	99	0	100
5	98	2	100	5	96	0	97
10	93	7	100	10	97	1	98
20	86	9	96	20	96	1	98
25	88	7	95	30	92	3	96
30	28	26	54	40	56	5	62
35	76	11	87				
40	15	17	32				
43	20	13	33				
57	0	0	0				

Taula VI.3. Activitat glicosintasa en presència de quantitats creixents de DMSO.

Resultats per l'acetonitril:

	E383A immobilitzat tampó fosfat pH 8.5	E383A lliure tampó fosfat pH 8.5
CH <sub>3</sub> CN (%)	$\eta_{\text{sintasa}}$ (%)	$\eta_{\text{sintasa}}$ (%)
0	100	98
1	98	100
5	96	100
10	89	99
20	19	14
30	7	3
40	4	3

Taula VI.4. Activitat glicosintasa en presència de quantitats creixents d'acetonitril.

## 6. Perfil de pH amb l'E383A immobilitzat

Es realitza un perfil de pH pel mutant E383A de la  $\beta$ -glucosidasa immobilitzat en Chelating FF Sepharosa, mesurant l'activitat glicosintasa per a un interval de pH comprès entre 5.5 i 8.5. L'enzim s'immobilitza sobre 20 mg de reïna seca saturada de Ni<sup>2+</sup>. S'afegeix aigua MilliQ i la quantitat d'enzim corresponent. Es deixa reposar a 4°C. Seguidament s'afegeixen la resta de reactius per aquest ordre: tampó, acceptor i donador. Es preparen 3 mostres per a cada pH.

Condicions de reacció: [Glc $\alpha$ F] = 0.9 mM; [Glc $\beta$ pNP] = 5 mM; [E383A] = 0.1  $\mu$ M; Tampó fosfat 5.5 – 8.5 a 35°C; V<sub>final</sub> = 300  $\mu$ L; T = 35°C; 1 hora de reacció.

La reacció s'atura per centrifugació a 13000 rpm durant 5 minuts, s'extreuen per pipeteig 200  $\mu$ l de sobrenedant i es conserven a -20°C fins l'anàlisi per HPLC.

HPLC (Agilent 1100 series): Columna Novapack C-18 (Waters); eluent: 10% MeOH; Cabal 1 mL·min<sup>-1</sup>; 35°C; detecció per absorbància a  $\lambda$  = 301 nm .

Temps de retenció (10% MeOH): GlcpNP (7.3 min); Glc3Glc $\beta$ pNP (13.7 min).

Resultats:

pH	$V_o/[E]$ ( $s^{-1}$ ) relativa	DESVEST ( $s^{-1}$ )
6	0,47	0,046
6,5	0,50	0,042
7	0,49	0,069
7,5	0,49	0,011
7,6	0,59	0,064
8	0,63	0,071
8,5	0,74	0,082

**Taula VI.5.** Velocitats inicials relatives de formació del disacàrid Glc3Glc $\beta$ pNP  $V_o/[E]$  a diferents pH.

## 7. Estudi de l'especificitat de l'E383A immobilitzat

Condicions d'immobilització: sobre 20 mg de reïna saturada de  $Ni^{2+}$  i assecada s'afegeix aigua MilliQ i la quantitat d'enzim corresponent. Es deixa reposar a 4°C. Abans d'iniciar la reacció s'afegeixen la resta de reactius per aquest ordre: tampó, acceptor i donador.

Condicions de reacció:  $[D\alpha F] = 1$  mM;  $[A\beta pNP] = 5$  mM;  $[E383A] = 3$   $\mu$ M; Tampó fosfat pH 7 a 35°C;  $V_{total} = 300$   $\mu$ L;  $T_{reacció} = 35$  °C; 18.5 hores de reacció; agitació orbital a 250 rpm.

La reacció s'atura per centrifugació el cru de reacció a 13000 rpm durant 5 minuts i s'extreuen 200  $\mu$ l de sobrenedant, evitant emportar-se reïna. Es conserven a -20°C fins l'anàlisi. Abans de la injecció les mostres es filtren a través de filtres PTFE 0.45 micres (Teknokroma).

Anàlisi mitjançant HPLC (Agilent 1100 series): Columna Zorbax Eclipse XDB C-18 1.8  $\mu$ m (Agilent); eluent: 10% MeOH; Cabal 1.2 mL $\cdot$ min $^{-1}$ ; 35°C; detecció per absorbància a  $\lambda = 301$  nm. Injecció 1 $\mu$ L.







**Bibliografia**

- Abel, M. et al., 2003. Pre-steady-state kinetics of *Bacillus licheniformis* 1,3-1,4- $\beta$ -glucanase: evidence for a regulatory binding site. *Biochem. J.*, 371, pp.997–1003.
- Abel, M., Planas, A. & Christensen, U., 2001. Presteady-state kinetics of *Bacillus* 1,3-1,4- $\beta$ -glucanase: binding and hydrolysis of a 4-methylumbelliferyl trisaccharide substrate. *Biochem. J.*, 357, pp.195–202.
- Abel, M., Segade, A. & Planas, A., 2009. Synthesis of an aryl 2-deoxy- $\beta$ -glycosyl tetrasaccharide to probe retaining endo-glycosidase mechanism. *Tetrahedron: Asymmetry*, 20(6), pp.847–850.
- Abel, M., 2009. Tesi Doctoral.
- Aragunde, H. et al., 2014. A transitional hydrolase to glycosynthase mutant by Glu to Asp substitution at the catalytic nucleophile in a retaining glycosidase. *Carbohydrate research*, 389, pp.85–92.
- Armarego, W.L.F. & Perrin, D.D., 1997. Purification of Laboratory Chemicals. 4th.
- Armstrong, Z. et al., 2010. Enzymatic Thioxyloside Synthesis: Characterization of Thioglycoligase Variants Identified from A Site-Saturation Mutagenesis Library of *Bacillus Circulans* Xylanase. *ChemBioChem*, 11(4), pp.533–538.
- Aÿ, J. et al., 1998. Structure and function of the *Bacillus* hybrid enzyme GluXyn-1: native-like jellyroll fold preserved after insertion of autonomous globular domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(12), pp.6613–6618.
- Ben-David, A. et al., 2007. Glycosynthase Activity of *Geobacillus stearothermophilus* GH52  $\beta$ -Xylosidase: Efficient Synthesis of Xylooligosaccharides from  $\alpha$ -D-Xylopyranosyl Fluoride through a Conjugated Reaction. *ChemBioChem*, 8(17), pp.2145–2151.
- Bernabé, M., Jimenez-Barbero, J. & Planas, A., 1994. The conformation of the tri- and tetrasaccharide produced in the hydrolysis of barley glucan with the enzyme endo-1, 3-1, 4- $\beta$ -glucan 4-glucanohydrolase from *Bacillus licheniformis*. *Journal of carbohydrate chemistry*, 13(5), pp.799–817.
- Biarnés, X. et al., 2009. Substrate conformational changes in glycoside hydrolase catalysis. A first-principles molecular dynamics study. *Biocatalysis and Biotransformation*, 28(1), pp.33–40.
- Blanchard, S. et al., 2007. Mutation of fungal endoglucanases into glycosynthases and characterization of their acceptor substrate specificity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 44(3), pp.106–116.
- Caron, G. & Withers, S.G., 1989. Conduritol aziridine: a new mechanism-based glucosidase inactivator. *Biochemical and biophysical research communications*, 163(1), pp.495–499.
- Chan, V.W.F., Jorgensen, A.M. & Borders, C.L., 1988. Inactivation of bovine thrombin by water-soluble carbodiimides: The essential carboxyl group has a pK a of 5.51. *Biochemical and biophysical research communications*, 151(2), pp.709–716.
- Cobucci-Ponzano, B. et al., 2011. A novel  $\alpha$ -D-galactosynthase from *Thermotoga maritima* converts  $\beta$ -D-galactopyranosyl azide to  $\alpha$ -galacto-oligosaccharides. *Glycobiology*, 21(4), pp.448–456.
- Cobucci-Ponzano, B. et al., 2009.  $\beta$ -Glycosyl azides as substrates for  $\alpha$ -glycosynthases: preparation of efficient  $\alpha$ -L-fucosynthases. *Chemistry & biology*, 16(10), pp.1097–1108.
- Davies, G. & Henrissat, B., 1995. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 3(9), pp.853–859.
- Descroix, K. et al., 2006. Recent progress in the field of-(1, 3)-glucans and new applications. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 6(12), pp.1341–1349.
- Drone, J. et al., 2005. *Thermus thermophilus* Glycosynthases for the Efficient Synthesis of Galactosyl and Glucosyl  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-Glycosides. *European journal of organic chemistry*, 2005(10), pp.1977–1983.

- Eduardo, A., Hugo, A. & Antoni, P., 2014. Screening glycosynthase libraries with a fluoride chemosensor assay independently of enzyme specificity: identification of a transitional hydrolase to synthase mutant. *Biochemical Journal*, 458(2), pp.355–363.
- Faijes, M. et al., 2006. Acceptor-dependent regioselectivity of glycosynthase reactions by *Streptomyces* E383A  $\beta$ -glucosidase. *Carbohydrate research*, 341(12), pp.2055–2065.
- Faijes, M. et al., 2003. Glycosynthase activity of *Bacillus licheniformis* 1,3-1,4- $\beta$ -glucanase mutants: specificity, kinetics, and mechanism. *Biochemistry*, 42, pp.13304–13318.
- Faijes, M. et al., 2004. In vitro synthesis of a crystalline (1 3, 1 4)-beta-d-glucan by a mutated (1 3, 1 4)- $\beta$ -D-glucanase from *Bacillus*. *Biochem. J*, 380, pp.635–641.
- Faijes, M. et al., 2001. Oligosaccharide Synthesis by Coupled endo-Glycosynthases of Different Specificity: A Straightforward Preparation of Two Mixed-Linkage Hexasaccharide Substrates of 1, 3/1, 4- $\beta$ -Glucanases. *Chemistry-A European Journal*, 7(21), pp.4651–4655.
- Fairweather, J.K. et al., 2002. Specificity Studies of *Bacillus* 1, 3-1, 4- $\beta$ -Glucanases and Application to Glycosynthase-Catalyzed Transglycosylation. *ChemBioChem*, 3(9), pp.866–873.
- Fairweather, J.K. et al., 2003. Synthesis of Complex Oligosaccharides by Using a Mutated (1,3)- $\beta$ -D-Glucan Endohydrolase from Barley. *Chemistry-A European Journal*, 9(11), pp.2603–2610.
- Fan, S.-Q., Huang, W. & Wang, L.-X., 2012. Remarkable transglycosylation activity of glycosynthase mutants of endo-D, an endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase from *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Biological Chemistry*, 287(14), pp.11272–11281.
- Fauré, R. et al., 2006. Synthesis of a library of xylogluco-oligosaccharides for active-site mapping of xyloglucan endo-transglycosylase. *The Journal of organic chemistry*, 71(14), pp.5151–5161.
- Finch, P. & Yoon, J.H., 1997. The effects of organic solvents on the synthesis of galactose disaccharides using  $\beta$ -galactosidases. *Carbohydrate research*, 303(3), pp.339–345.
- Fort, S. et al., 2000. Highly efficient synthesis of  $\beta$  (1  $\rightarrow$  4)-oligo-and-polysaccharides using a mutant cellulase. *Journal of the American Chemical Society*, 122(23), pp.5429–5437.
- Fort, S. et al., 2000. Stepwise synthesis of cellodextrins assisted by a mutant cellulase. *Israel Journal of Chemistry*, 40(3-4), pp.217–221.
- Fujita, M., Shoda, S. & Kobayashi, S., 1998. Xylanase-catalyzed synthesis of a novel polysaccharide having a glucose-xylose repeating unit, a cellulose-xylan hybrid polymer. *Journal of the American Chemical Society*, 120(25), pp.6411–6412.
- Gaiser, O.J. et al., 2006. Structural basis for the substrate specificity of a *Bacillus* 1, 3-1, 4- $\beta$ -glucanase. *Journal of molecular biology*, 357(4), pp.1211–1225.
- Giordano, A. et al., 2006. Marine glycosyl hydrolases in the hydrolysis and synthesis of oligosaccharides. *Biotechnology journal*, 1(5), pp.511–530.
- Guasch, A. et al., 1999. Cloning, overexpression, crystallization and preliminary X-ray analysis of a family 1  $\beta$ -glucosidase from *Streptomyces*. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 55(3), pp.679–682.
- Gullföt, F. et al., 2009. Functional characterization of xyloglucan glycosynthases from GH7, GH12, and GH16 scaffolds. *Biomacromolecules*, 10(7), pp.1782–1788.
- Hahn, M., Olsen, O., et al., 1995. Crystal Structure and Site-directed Mutagenesis of *Bacillus macerans* endo-1,3-1,4- $\beta$ -glucanase. *Journal of Biological Chemistry*, 270(7), pp.3081–3088.

- Hahn, M., Pons, J., et al., 1995. Crystal structure of *Bacillus licheniformis* 1, 3-1, 4- $\beta$ -D-glucan 4-glucanohydrolase at 1.8 Å resolution. *FEBS letters*, 374(2), pp.221–224.
- Hahn, M. et al., 1994. Native-like in vivo folding of a circularly permuted jellyroll protein shown by crystal structure analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(22), pp.10417–10421.
- Heinemann, U. & Hahn, M., 1995. Circular permutation of polypeptide chains: implications for protein folding and stability. *Progress in biophysics and molecular biology*, 64(2), pp.121–143.
- Henrissat, B., 1991. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J*, 280, pp.309–316.
- Van Hijum, S.A.F.T. et al., 2006. Structure-function relationships of glucansucrase and fructansucrase enzymes from lactic acid bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(1), pp.157–176.
- Hoare, D.G. t & Koshland, D.E., 1967. A method for the quantitative modification and estimation of carboxylic acid groups in proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 242(10), pp.2447–2453.
- Høj, P.B. et al., 1992. Identification of glutamic acid 105 at the active site of *Bacillus amyloliquefaciens* 1,3-1,4- $\beta$ -D-glucan 4-glucanohydrolase using epoxide-based inhibitors. *Journal of Biological Chemistry*, 267(35), pp.25059–25066.
- Hommalai, G. et al., 2007. Enzymatic synthesis of cello-oligosaccharides by rice BGlu1  $\beta$ -glucosidase glycosynthase mutants. *Glycobiology*, 17(7), pp.744–753.
- Honda, Y. et al., 2008. Alternative strategy for converting an inverting glycoside hydrolase into a glycosynthase. *Glycobiology*, 18(4), pp.325–330.
- Honda, Y. & Kitaoka, M., 2006. The first glycosynthase derived from an inverting glycoside hydrolase. *Journal of Biological Chemistry*, 281(3), pp.1426–1431.
- Houliston, R.S. et al., 2009. Complete chemoenzymatic synthesis of the Forssman antigen using novel glycosyltransferases identified in *Campylobacter jejuni* and *Pasteurella multocida*. *Glycobiology*, 19(2), pp.153–159.
- Hrmova, M. et al., 1998. Chemoenzymatic synthesis of (1,3-1,4)- $\beta$ -D-glucooligosaccharides for subsite mapping of (1,3-1,4)- $\beta$ -D -glucan endohydrolases.
- Hrmova, M. et al., 2002. Mutated barley (1, 3)- $\beta$ -D-glucan endohydrolases synthesize crystalline (1, 3)- $\beta$ -D-glucans. *Journal of Biological Chemistry*, 277(33), pp.30102–30111.
- Hrmova, M. et al., 1997. Polysaccharide hydrolases in germinated barley and their role in the depolymerization of plant and fungal cell walls. *International journal of biological macromolecules*, 21(1), pp.67–72.
- Huang, W. et al., 2009. Glycosynthases enable a highly efficient chemoenzymatic synthesis of N-glycoproteins carrying intact natural N-glycans. *Journal of the American Chemical Society*, 131(6), pp.2214–2223.
- Isella, F. et al., 2013. Migration of non intentionally added substances from adhesives by UPLC–Q-TOF/MS and the role of EVOH to avoid migration in multilayer packaging materials. *Journal of Mass Spectrometry*, 48(4), pp.430–437.
- Itoh, M. et al., 2001. Specificity of carbohydrate structures of gangliosides in the activity to regenerate the rat axotomized hypoglossal nerve. *Glycobiology*, 11(2), pp.125–130.
- Jahn, M. et al., 2003. Expansion of the glycosynthase repertoire to produce defined manno-oligosaccharides. *Chemical Communications*, (12), pp.1327–1329.
- Jakeman, D.L. & Withers, S.G., 2002. On expanding the repertoire of glycosynthases: mutant  $\beta$ -galactosidases forming  $\beta$ -(1, 6)-linkages. *Canadian journal of chemistry*, 80(8), pp.866–870.

- Juncosa, M. et al., 1994. Identification of active site carboxylic residues in *Bacillus licheniformis* 1,3-1,4- $\beta$ -D-glucan 4-glucanohydrolase by site-directed mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 269(20), pp.14530–14535.
- Juncosa-Ginestà, M. et al., 1994. Improved efficiency in site-directed mutagenesis by PCR using a *Pyrococcus* sp. GB-D polymerase. *Biotechniques*, 16(5), pp.820–823.
- Keitel, T. et al., 1993. Molecular and active-site structure of a *Bacillus* 1,3-1,4- $\beta$ -glucanase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(11), pp.5287–5291.
- Keitel, T., Meldgaard, M. & Heinemann, U., 1994. Cation binding to a *Bacillus* (1,3–1,4)- $\beta$ -glucanase Geometry, affinity and effect on protein stability. *European Journal of Biochemistry*, 222(1), pp.203–214.
- Kim, Y.-W. et al., 2006. Glycosynthase-based synthesis of xylo-oligosaccharides using an engineered retaining xylanase from *Cellulomonas fimi*. *Organic & biomolecular chemistry*, 4(10), pp.2025–2032.
- Kobayashi, S. et al., 2006. A hyaluronidase supercatalyst for the enzymatic polymerization to synthesize glycosaminoglycans. *Chemistry-A European Journal*, 12(23), pp.5962–5971.
- Kobayashi, S., 2005. Challenge of synthetic cellulose. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, 43, pp.693–710.
- Kobayashi, S., Morii, H., et al., 2001. Enzymatic polymerization to artificial hyaluronan: a novel method to synthesize a glycosaminoglycan using a transition state analogue monomer. *Journal of the American Chemical Society*, 123(47), pp.11825–11826.
- Kobayashi, S. et al., 1992. Enzymatic polymerization: The first in vitro synthesis of cellulose via nonbiosynthetic path catalyzed by cellulase. In *Makromolekulare Chemie. Macromolecular Symposia*. pp. 509–518.
- Kobayashi, S. et al., 2005. Enzymatic precision polymerization for synthesis of glycosaminoglycans and their derivatives. In *Macromolecular Symposia*, pp. 147–156.
- Kobayashi, S. et al., 1991. Novel Method for Polysaccharide Synthesis Using an Enzyme - the 1<sup>st</sup> Invitro Synthesis of Cellulose Via a Nonbiosynthetic Path Utilizing Cellulase as Catalyst. *Journal of the American Chemical Society*, 113, pp.3079–3084.
- Kobayashi, S., Fujikawa, S. & Ohmae, M., 2003. Enzymatic synthesis of chondroitin and its derivatives catalyzed by hyaluronidase. *Journal of the American Chemical Society*, 125(47), pp.14357–14369.
- Kobayashi, S., Sakamoto, J. & Kimura, S., 2001. In vitro synthesis of cellulose and related polysaccharides. *Progress in polymer science*, 26(9), pp.1525–1560.
- Kobayashi, S. & Shoda, S. ichiro, 1995. Chemical synthesis of cellulose and cello-oligomers using a hydrolysis enzyme as a catalyst. *International Journal of Biological Macromolecules*, 17, pp.373–379.
- Kobayashi, S., Wen, X. & Shoda, S., 1996. Specific preparation of artificial xylan: a new approach to polysaccharide synthesis by using cellulase as catalyst. *Macromolecules*, 29(7), pp.2698–2700.
- Koshland, D.E., 1953. Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions. *Biological Reviews*, 28(4), pp.416–436.
- Lee, J.H. et al., 1994. Assembly of synthetic cellulose I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, pp.7425–7429.
- Legler, G., 1977. [40] Glucosidases. *Methods in enzymology*, 46, pp.368–381.
- Li, C. & Kim, Y., 2014. Characterization of a Galactosynthase Derived from *Bacillus circulans*  $\beta$ -Galactosidase: Facile Synthesis of D-Lacto-and D-Galacto-N-bioside. *ChemBioChem*, 15(4), pp.522–526.
- Van Lieshout, J. et al., 2004. Hydrolase and glycosynthase activity of endo-1, 3- $\beta$ -glucanase from the thermophile *Pyrococcus furiosus*. *Archaea*, 1(4), pp.285–292.

- Lloberas, J., Querol, E. & Bernués, J., 1988. Purification and characterization of endo- $\beta$ -1, 3-1, 4-D-glucanase activity from *Bacillus licheniformis*. *Applied microbiology and biotechnology*, 29(1), pp.32–38.
- De Luca, C. et al., 1995a. Enzymic synthesis of hyaluronic acid with regeneration of sugar nucleotides. *Journal of the American Chemical Society*, 117(21), pp.5869–5870.
- Mackenzie, L.F. et al., 1998a. Glycosynthases: Mutant Glycosidases for Oligosaccharide Synthesis. *Journal of the American Chemical Society*, 120, pp.5583–5584.
- Makino, A. et al., 2007. Chitinase-catalyzed synthesis of an alternatingly N-sulfonated chitin derivative. *Biomacromolecules*, 8(1), pp.188–195.
- Makino, A., Ohmae, M. & Kobayashi, S., 2006a. Chitinase-catalyzed copolymerization to a chitin derivative having glucosamine unit in controlled proportion. *Polymer journal*, 38(11), pp.1182–1188.
- Malet, C. et al., 1996. A specific chromophoric substrate for activity assays of 1,3-1,4- $\beta$ -D-glucan 4-glucanohydrolases. *Journal of biotechnology*, 48(3), pp.209–219.
- Malet, C. et al., 1993. Stereochemical course and structure of the products of the enzymic action of endo-1,3-1,4- $\beta$ -D-glucan 4-glucanohydrolase from *Bacillus licheniformis*. *Biochem. J*, 296, pp.753–758.
- Malet, C. et al., 1995. Synthesis of 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucan oligosaccharides as specific chromophoric substrates of (1 $\rightarrow$  3),(1 $\rightarrow$  4)- $\beta$ -D-glucan 4-glucanohydrolases. *Carbohydrate research*, 274, pp.285–301.
- Malet, C. & Planas, A., 1998. From  $\beta$ -glucanase to  $\beta$ -glucansynthase: glycosyl transfer to  $\alpha$ -glycosyl fluorides catalyzed by a mutant endoglucanase lacking its catalytic nucleophile. *FEBS letters*, 440(1), pp.208–212.
- Marshall, P.J. et al., 1981. Active-site-directed irreversible inhibition of glycosidases by the corresponding glycosylmethyl-(p-nitrophenyl) triazenes. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, pp.366–376.
- Mayer, C. et al., 2000. The E358S mutant of *Agrobacterium* sp.  $\beta$ -glucosidase is a greatly improved glycosynthase. *FEBS letters*, 466(1), pp.40–44.
- McCarter, J.D. & Stephen Withers, G., 1994. Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Current opinion in structural biology*, 4(6), pp.885–892.
- Monegal, A., Pinyol, R. & Planas, A., 2005. Capillary electrophoresis method for the enzymatic assay of galactosyltransferases with postreaction derivatization. *Analytical Biochemistry*, 346(1), pp.115–123.
- Montero, E. et al., 1998. NMR studies of the conformation of thiocellobiose bound to a  $\beta$ -glucosidase from *Streptomyces* sp. *FEBS letters*, 421(3), pp.243–248.
- Moracci, M. et al., 1998. Restoration of the activity of active-site mutants of the hyperthermophilic  $\beta$ -glycosidase from *Sulfolobus solfataricus*: dependence of the mechanism on the action of external nucleophiles. *Biochemistry*, 37(49), pp.17262–17270.
- Moreau, V. et al., 1996. Design and chemoenzymatic synthesis of thiooligosaccharide inhibitors of 1,3-1,4- $\beta$ -D-glucanases. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 4(11), pp.1849–1855.
- Müllegger, J. et al., 2005. Engineering of a thioglycoligase: randomized mutagenesis of the acid–base residue leads to the identification of improved catalysts. *Protein Engineering Design and Selection*, 18(1), pp.33–40.
- Müllegger, J. et al., 2006. Thermostable Glycosynthases and Thioglycoligases Derived from *Thermotoga maritima*  $\beta$ -Glucuronidase. *ChemBioChem*, 7(7), pp.1028–1030.
- Murata, T. et al., 2005. Enzymatic synthesis of poly-N-acetyllactosamines as potential substrates for endo- $\beta$ -galactosidase-catalyzed hydrolytic and transglycosylation reactions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1722(1), pp.60–68.

- Murata, T. et al., 2003. Kinetic studies on endo- $\beta$ -galactosidase by a novel colorimetric assay and synthesis of N-acetyllactosamine-repeating oligosaccharide  $\beta$ -glycosides using its transglycosylation activity. *European Journal of Biochemistry*, 270(18), pp.3709–3719.
- Nakamura, I. et al., 2005. Enzymatic polymerization behavior using cellulose-binding domain deficient endoglucanase II. *Macromolecular Bioscience*, 5, pp.623–628.
- Nakatani, Y. et al., 2014. Major Change in Regiospecificity for the Exo-1, 3- $\beta$ -glucanase from *Candida albicans* following Its Conversion to a Glycosynthase. *Biochemistry*, 53(20), pp.3318–3326.
- Nashiru, O. et al., 2001.  $\beta$ -Mannosynthase: Synthesis of  $\beta$ -Mannosides with a Mutant  $\beta$ -Mannosidase. *Angewandte Chemie*, 113(2), pp.431–434.
- Nojiri, H. et al., 2002. Glycotherapy for cancer: remodeling of ganglioside pattern as an effective approach for cancer therapy. *Cancer detection and prevention*, 26(2), pp.114–120.
- Ochiai, H., Ohmae, M. & Kobayashi, S., 2004. Enzymatic synthesis of alternately 6-O-carboxymethylated chitotetraose by selective glycosidation with chitinase catalysis. *Chemistry Letters*, 33(6), pp.694–695.
- Okamoto, E. et al., 1997. Synthesis of alternately 6-O-methylated cellulose via enzymatic polymerization of a substituted cellobiosyl fluoride monomer catalyzed by cellulase. *Cellulose*, 4(2), pp.161–172.
- Okuyama, M. et al., 2002.  $\alpha$ -Glucosidase mutant catalyzes “ $\alpha$ -glycosynthase”-type reaction. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 66(4), pp.928–933.
- Park, I., Lee, H. & Cha, J., 2014. Glycoconjugates synthesized via transglycosylation by a thermostable  $\alpha$ -glucosidase from *Thermoplasma acidophilum* and its glycosynthase mutant. *Biotechnology letters*, 36(4), pp.789–796.
- Pérez, X., Fajjes, M. & Planas, A., 2011. Artificial Mixed-Linked  $\beta$ -Glucans Produced by Glycosynthase-Catalyzed Polymerization: Tuning Morphology and Degree of Polymerization. *Biomacromolecules*, 12(2), pp.494–501.
- Pérez-Pons, J.A. et al., 1994. A  $\beta$ -glucosidase gene (bgl3) from *Streptomyces* sp. strain QM-B814. *European Journal of Biochemistry*, 223(2), pp.557–565.
- Pérez-Pons, J.A., Padros, E. & Querol, E., 1995. Prediction and Fourier-transform infrared-spectroscopy estimation of the secondary structure of a recombinant beta-glucosidase from *Streptomyces* sp. (ATCC 11238). *Biochem. J*, 308, pp.791–794.
- Pérez-pons, J.A., Rebordosa, X. & Querol, E., 1995. Induction and preliminary characterization of intracellular  $\beta$ -glucosidases from a cellulolytic *Streptomyces* strain. *FEMS microbiology letters*, 128(3), pp.235–239.
- Pérez-Pons, J.A., Rebordosa, X. & Querol, E., 1994. Induction of glycanolytic activities by *Streptomyces* sp. QM-B814 growing on different glucopolymers. *Biotechnology letters*, 16(9), pp.959–964.
- Pérez-Pons, J.A., Rebordosa, X. & Querol, E., 1995. Properties of a novel glucose-enhanced  $\beta$ -glucosidase purified from *Streptomyces* sp. (ATCC 11238). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1251(2), pp.145–153.
- Perugino, G., Trincone, A., Giordano, A., van der Oost, J., Kaper, T., Rossi, M. & Moracci, M., 2003. Activity of hyperthermophilic glycosynthases is significantly enhanced at acidic pH. *Biochemistry*, 42(28), pp.8484–8493.
- Piens, K. et al., 2007. Glycosynthase activity of hybrid aspen xyloglucan endo-transglycosylase Ptt XET16-34 nucleophile mutants. *Organic & biomolecular chemistry*, 5(24), pp.3971–3978.
- Piotukh, K. et al., 1999. Protein-carbohydrate interactions defining substrate specificity in *Bacillus* 1, 3-1, 4- $\beta$ -D-glucan 4-glucanohydrolases as dissected by mutational analysis. *Biochemistry*, 38(49), pp.16092–16104.
- Planas, A., 2000. Bacterial 1, 3-1, 4- $\beta$ -glucanases: structure, function and protein engineering. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1543(2), pp.361–382.



- Planas, A., Juncosa, M., Lloberas, J., et al., 1992. Essential catalytic role of Glu 134 in endo- $\beta$ -1,3-1,4-D-glucan 4-glucanohydrolase from *B. licheniformis* as determined by site-directed mutagenesis. *FEBS letters*, 308(2), pp.141–145.
- Planas, A., Juncosa, M., Cayetano, A., et al., 1992. Studies on *Bacillus licheniformis* endo- $\beta$ -1,3-1,4-D-glucanase: characterization and kinetic analysis. *Applied microbiology and biotechnology*, 37(5), pp.583–589.
- Planas, A. et al., 2010. Unusual Role of the 3-OH Group of Oligosaccharide Substrates in the Mechanism of *Bacillus* 1, 3-1, 4- $\beta$ -glucanase. *Biocatalysis and Biotransformation*, 21(4-5), pp.223–231.
- Planas, A. & Faijes, M., 2002. Glycosidases and Glycosynthases in enzymatic synthesis of oligosaccharides. An overview. *Afinidad*, 59, pp.295–313.
- Planas, A., Faijes, M. & Abel, M., 2003. Mechanism and Engineering of Bacterial 1, 3-1, 4- $\beta$ -Glucanases: From Glucan Hydrolase to Glycosynthases in Enzymatic Oligosaccharide Synthesis. *Journal of applied glycoscience*, 50(2), pp.245–251.
- Planas, A. & Malet, C., 1995. Contribution of subsites to catalysis and specificity in the extended binding cleft of *Bacillus* 1, 3-1, 4- $\beta$ -D-glucan 4-glucanohydrolases. *Progress in Biotechnology*, 10, pp.85–95.
- Pons, J., Planas, A. & Querol, E., 1995. Contribution of a disulfide bridge to the stability of 1,3-1,4- $\beta$ -glucan 4-glucanohydrolase from *Bacillus licheniformis*. *Protein engineering*, 8(9), pp.939–945.
- Pons, J., Querol, E. & Planas, A., 1997. Mutational Analysis of the Major Loop of *Bacillus* 1,3-1,4- $\beta$ -D-glucan 4-Glucanohydrolases: effects on protein stability and substrate binding. *Journal of Biological Chemistry*, 272(20), pp.13006–13012.
- Pozzo, T. et al., 2014. Glycosynthases from *Thermotoga neapolitana*  $\beta$ -glucosidase 1A: A comparison of  $\alpha$ -glucosyl fluoride and in situ-generated  $\alpha$ -glucosyl formate donors. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 107, pp.132–139.
- Roda R & Planas A., 2003. Comunicació personal.
- Sakamoto, J. & Kobayashi, S., 2004. Enzymatic synthesis of 3-O-methylated chitin oligomers from new derivatives of a chitobiose oxazoline. *Chemistry Letters*, 33(6), pp.698–699.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T., 1989. *Molecular cloning*, Cold spring harbor laboratory press New York.
- Sambrook, J. & Russell, D.W., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2001.
- Scheckermann, C., Wagner, F. & Fischer, L., 1997. Galactosylation of antibiotics using the  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Enzyme and Microbial Technology*, 20(8), pp.629–634.
- Seeberger, P.H. & Werz, D.B., 2005. Automated synthesis of oligosaccharides as a basis for drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(9), pp.751–763.
- Sheldon, R.A., 2007. Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 349(8-9), pp.1289–1307.
- Shulman, M.L., Shiyan, S.D. & Khorlin, A.Y., 1976. Specific irreversible inhibition of sweet-almond  $\beta$ -glucosidase by some  $\beta$ -glycopyranosylepoxyalkanes and  $\beta$ -D-glucopyranosyl isothiocyanate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, 445(1), pp.169–181.
- Spadiut, O. et al., 2011. Building custom polysaccharides in vitro with an efficient, broad-specificity xyloglucan glycosynthase and a fucosyltransferase. *Journal of the American Chemical Society*, 133(28), pp.10892–10900.
- Stern, R., Asari, A.A. & Sugahara, K.N., 2006. Hyaluronan fragments: An information-rich system. *European Journal of Cell Biology*, 85(8), pp.699–715.

- Stick, R. V, Stubbs, K.A. & Watts, A.G., 2004. Modifying the regioselectivity of glycosynthase reactions through changes in the acceptor. *Australian journal of chemistry*, 57(8), pp.779–786.
- Sugimura, M., Nishimoto, M. & Kitaoka, M., 2006. Characterization of glycosynthase mutants derived from glycoside hydrolase family 10 xylanases. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 70(5), pp.1210–1217.
- SUNGMIN, H. et al., 2012. Improvement of transglycosylation efficiency using a glycosynthase mutant derived from *Thermoplasma acidophilum*  $\alpha$ -glucosidase. *Han'gug mi'saengmul saengmyeong gong haghoeji*, 40(2), pp.104–110.
- Tao, H. et al., 2008. Characterization of a new glycosynthase cloned by using chemical complementation. *ChemBioChem*, 9(5), pp.681–684.
- Taylor, K.R. & Gallo, R.L., 2006. Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20(1), pp.9–22.
- Terwisscha van Scheltinga, A.C. et al., 1995. Stereochemistry of chitin hydrolysis by a plant chitinase/lysozyme and x-ray structure of a complex with allosamidin evidence for substrate assisted catalysis. *Biochemistry*, 34(48), pp.15619–15623.
- Timkovich, R., 1977. Polymerization side reactions during protein modifications with carbodiimide. *Biochemical and biophysical research communications*, 74(4), pp.1463–1468.
- Tolborg, J.F. et al., 2002. Solid-phase oligosaccharide and glycopeptide synthesis using glycosynthases. *The Journal of organic chemistry*, 67(12), pp.4143–4149.
- Tong, M.K. & Ganem, B., 1988. A potent new class of active-site-directed glycosidase inactivators. *Journal of the American Chemical Society*, 110(1), pp.312–313.
- Trincone, A. et al., 2000. A novel thermophilic glycosynthase that effects branching glycosylation. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 10(4), pp.365–368.
- Umekawa, M. et al., 2008. Mutants of *Mucor hiemalis* endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase show enhanced transglycosylation and glycosynthase-like activities. *Journal of Biological Chemistry*, 283(8), pp.4469–4479.
- Vallmitjana, M. et al., 2001. Mechanism of the family 1  $\beta$ -glucosidase from *Streptomyces* sp: catalytic residues and kinetic studies. *Biochemistry*, 40(20), pp.5975–5982.
- Vasiliu, D. et al., 2006. Large-scale chemoenzymatic synthesis of blood group and tumor-associated poly-N-acetyllactosamine antigens. *Carbohydrate research*, 341(10), pp.1447–1457.
- Vasur, J. et al., 2010. Synthesis of cyclic  $\beta$ -glucan using laminarinase 16A glycosynthase mutant from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of the American Chemical Society*, 132(5), pp.1724–1730.
- Vaughan, M.D. et al., 2006. Glycosynthase-mediated synthesis of glycosphingolipids. *Journal of the American Chemical Society*, 128(19), pp.6300–6301.
- Vic, G. & Crout, D.H.G., 1994. Synthesis of glucosidic derivatives with a spacer arm by reverse hydrolysis using almond  $\beta$ -D-glucosidase. *Tetrahedron: Asymmetry*, 5(12), pp.2513–2516.
- Viladot, J.L. et al., 1998. Probing the mechanism of *Bacillus* 1,3-1,4- $\beta$ -D-glucan 4- glucanohydrolases by chemical rescue of inactive mutants at catalytically essential residues. *Biochemistry*, 37, pp.11332–11342.
- Viladot, J.-L. et al., 1998. Expedient synthesis of a new hexasaccharide using transglycosylation reaction catalyzed by *Bacillus* (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -d-glucan 4-glucanohydrolase. *Carbohydrate research*, 311(1), pp.95–99.
- Viladot, J.-L. et al., 1997b. Transglycosylation activity of *Bacillus* 1, 3-1, 4- $\beta$ -D-glucan 4-glucanohydrolases. Enzymic synthesis of alternate 1,3-1,4- $\beta$ -D-glucooligosaccharides. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, (16), pp.2383–2388.

- Wada, J. et al., 2008. 1, 2- $\alpha$ -L-Fucosynthase: a glycosynthase derived from an inverting  $\alpha$ -glycosidase with an unusual reaction mechanism. *FEBS letters*, 582(27), pp.3739–3743.
- Wei, J. et al., 2013. Glycosynthase with Broad Substrate Specificity—an Efficient Biocatalyst for the Construction of Oligosaccharide Library. *European Journal of Organic Chemistry*, 2013(12), pp.2414–2419.
- Whitelock, J.M. & Iozzo, R. V., 2005. Heparan sulfate: a complex polymer charged with biological activity. *Chemical reviews*, 105(7), pp.2745–2764.
- Wilkinson, S.M. et al., 2008. E scherichia coli Glucuronylsynthase: An Engineered Enzyme for the Synthesis of  $\beta$ -Glucuronides. *Organic letters*, 10(8), pp.1585–1588.
- Williams, S.J. et al., 2002. Aspartate 313 in the *Streptomyces plicatus* Hexosaminidase Plays a Critical Role in Substrate-assisted Catalysis by Orienting the 2-Acetamido Group and Stabilizing the Transition State. *Journal of Biological Chemistry*, 277(42), pp.40055–40065.
- Williams, S.J. & Withers, S.G., 2000. Glycosyl fluorides in enzymatic reactions. *Carbohydrate research*, 327(1), pp.27–46.
- Withers, S.G. & Aebersold, R., 1995. Approaches to labeling and identification of active site residues in glycosidases. *Protein Science*, 4(3), pp.361–372.
- Withers, S.G., Rupitz, K. & Street, I.P., 1988. 2-Deoxy-2-fluoro-D-glycosyl fluorides. A new class of specific mechanism-based glycosidase inhibitors. *Journal of Biological Chemistry*, 263(17), pp.7929–7932.
- Withers, S.G. & Umezawa, K., 1991. Cyclophellitol: a naturally occurring mechanism-based inactivator of  $\beta$ -glucosidases. *Biochemical and biophysical research communications*, 177(1), pp.532–537.
- Wong, C.-H. & Whitesides, G.M., 1994. *Enzymes in synthetic organic chemistry*, book.
- Yang, M., Davies, G.J. & Davis, B.G., 2007. A glycosynthase catalyst for the synthesis of flavonoid glycosides. *Angewandte Chemie*, 119(21), pp.3959–3962.
- Zechel, D.L. & Withers, S.G., 2001. Dissection of nucleophilic and acid–base catalysis in glycosidases. *Current opinion in chemical biology*, 5(6), pp.643–649.
- Zheng, P. et al., 2006. Production of galacto-oligosaccharides by immobilized recombinant  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus candidus*. *Biotechnology Journal*, 1(12), pp.1464–1470.
- Zhu, J. et al., 1998. Salicortin: a repeat-attack new-mechanism-based *Agrobacterium faecalis*  $\beta$ -glucosidase inhibitor. *Biochem. J*, 332, pp.367–371.

