



**UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE
BARCELONA**

**DEPARTAMENT D'ENGINYERIA QUÍMICA
ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA**

Fuculosa 1-fosfat aldolasa com a biocatalitzador en síntesi: model cinètic i immobilització

**Memoria per a optar al grau de doctor per
la Universitat Autònoma de Barcelona**

**Trinitat Suau Tiron
Juny, 2007**

Títol: Fuculosa 1-fosfat aldolasa com a biocatalitzador en síntesi: model cinètic i immobilització

Realizat per: Trinitat Suau Tiron

Dirigit per: Gregorio Álvaro Campos
M. Dolors Benaiges Massa

Programa de Doctorat en Biotecnologia
Departament d'Enginyeria Química
Escola Tècnica Superior d'Enginyeria
Universitat Autònoma de Barcelona

MARIA DOLORS BENAIGES MASSA, com professora titular del Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona i GREGORIO ALVARO CAMPOS com professor agregat del Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona.

CERTIFIQUEM:

Que Trinitat Suau Tiron, ha realitzat sota la nostra direcció, el treball de títol "**Fuculosa 1-fosfat aldolasa com a biocatalitzador en síntesi: model cinètic i immobilització**", presentat en aquesta memòria, i que constitueix la seva Tesis per a optar al grau de Doctor per la Universitat Autònoma de Barcelona.

I per a què consti amb els efectes oportuns, presentem a L'Escola Tècnica Superior d'Enginyeria de la Universitat Autònoma de Barcelona la mencionada Tesis, firmant el present certificat a

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), 23 d'abril de 2007

Maria Dolores Benaiges Massa

Gregorio Àlvaro Campos

Agraïments

Deia que no escriuria agraïments/penediments i ja veis, és inevitable. Inevitable perquè encara que ja sabeu el què vos he d'agrair, al manco he d'escriure quatre coses de sa part més llegida de sa memòria...

Se fa difícil anomenar a tothom, se faria etern i no puc perdre sa meva fama d'escriure telegrams. Així que començ fent un agraïment general: he disfrutat i après molt de tots es que viviu sa recerca i sa docència intensament, des que vos passau hores per entendre què passa i per trobar sa millor forma d'explicar-ho (des que aplicau noves tècniques anant o no els cursos de l'ICE), s'encomana i s'agraeix compartir es temps amb voltros. I també totes ses estones a n'es menjador, d'es concursos de fotografia i de pastissos, animau-vos a tornar-ho organitzar, que no suposa molt de temps i descobreixes molta gent que ni en sabies es nom!

A tots es d'es grup d'aldolases, especialment a n'es meus directors Goyo i Dolors, a n'en Josep (es director que no signa) per dirigir sa tesi amb tot lo que implica, a n'en Carles i na Glòria que també li han donat voltes a n'es resultats. I moltes gràcies per recordar-me que tot acabaria quadrant. A tots es que voltau pes laboratori, especialment, en Jaume, en Luis, n'Inés, en Sergio, na Lorena, per tots es moments compartits i s'ajuda que m'heu donat.

A tots es d'es CSIC, en Pere, na Laia i en Jordi per acollir-me en es seu laboratori varies vegades i ensenyar-me els 'trucs' de les síntesis.

A tots es de laboratori integrat i infiltrats, es laboratori que s'integra a sa teva vida...

I és que passa es temps i és ben ver que a n'es final recordes sa gent que coneixes i d'es moments compartits a n'es departament, a n'es bar, a n'es saf, patinant, voltant, ballant... no ho trobau? Cris, Engr, Tere, JP, Mar, Lu, Ernest, Gladys, Anna U, Anna M, Anna S, Núria, Irene, Albert, Oscar, Rosi...

A na Neus, na Núria, na Maite, n'Eli, na Paqui, en Ramon, en David, na Sara i en Chris, sort que hi sou encara que ja fa temps que voltau poc per s'autònoma..

A sa meva família i amics que m'heu aguantat hores a n'es telèfon xerrant, ara ja ens veurem més!

ÍNDEX

	Pàg.
CAPÍTOL 0: RESUM	1
CAPÍTOL 1: INTRODUCCIÓ	3
1.1. Les aldolases.....	3
1.1.1 Classificació de les aldolases.....	4
1.1.2. Aldolases depenents de DHAP.....	5
1.1.3. Fuculosa-1-fosfat aldolasa.....	7
1.2. Immobilització enzimàtica. Tipus d'immobilitzacions.....	9
1.3. Cinètica enzimàtica.....	12
1.3.1. Inhibició.....	15
1.4. Catàlisi heterogènia.....	16
1.5. Síntesi aldòlica catalitzada per FucA.....	18
CAPÍTOL 2: OBJECTIUS	21
CAPÍTOL 3: MATERIALS I MÈTODES	23
3.1. Materials.....	23
3.1.1. Llistat d'equips.....	23
3.1.2. Llistat de reactius.....	24
3.2. Mètodes.....	25
3.2.1. Síntesi de fuculosa-1-fosfat (Fuc-1-P).....	25
3.2.2. Síntesi de (S)-Cbz-alaninal.....	27
3.2.3. Producció de Fuculosa-1-fosfat aldolasa recombinant.....	28
3.2.4. Mètodes analítics.....	29
3.2.4.1. Anàlisi de fuculosa-1-fosfat.....	29
3.2.4.2. Anàlisi de L-lactaldehid.....	29
3.2.4.3. Anàlisi de fosfat inorgànic.....	30
3.2.4.4. Anàlisi de dihidroxiacetona fosfat (DHAP).....	30
3.2.4.5. Anàlisi de (S)-Cbz-alaninal i producte de síntesi per HPLC.....	31
3.2.4.6. Anàlisi de proteïna total. Mètode Bradford.....	31
3.2.4.7. Assajos enzimàtics per a la determinació de l'activitat aldolàsica.....	32
<i>Anàlisi de l'activitat fuculosa-1-fosfat aldolasa (FucA)</i>	32
<i>Anàlisi de l'activitat ramulosa-1-fosfat aldolasa (RhuA)</i>	33
<i>Anàlisi de l'activitat fructosa-1,6-difosfat aldolasa (FruA i RAMA)</i>	33
3.2.5. Immobilització de FucA.....	34
3.2.5.1. Immobilització a suports d'afinitat (Ni-NTA i Ni-IDA).....	34
3.2.5.2. Immobilització en forma de CLEA.....	35
3.2.5.3. Immobilització covalent a suport d'agarosa.....	35
<i>Activació de l'agarosa amb grups aldehid</i>	35
<i>Immobilització de FucA a suport agarosa</i>	35
3.2.5.4. Immobilització covalent a suport Eupergit C.....	35
<i>Activació de l'Eupergit C</i>	35
<i>Immobilització de FucA a suport Eupergit C</i>	36
3.2.5.5. Trencament del derivat FucA.....	36
3.2.6. Incubació del derivat FucA-agarosa en presència de Zn ²⁺	36

3.2.7. Reaccions de la DHAP.....	36
3.2.7.1. Consum de DHAP en dimetilformamida/aigua.....	36
3.2.7.2. Consum de DHAP en presència d'aldolases en dimetilformamida/aigua	36
3.2.8. Addicions aldòliques.....	37
3.2.8.1. Reaccions d'addició aldòlica en DMF/aigua.....	37
3.2.8.2. Reaccions d'addició aldòlica en gel emulsió.....	37
3.2.9. Estudi de les limitacions de transferència de matèria interna en el derivat FucA-agarosa.....	38
3.2.10. Estabilitat tèrmica de la FucA en medi de reacció.....	38
3.2.11. Model cinètic per a l'addició aldòlica entre DHAP i (S)-Cbz-alaninal catalitzada per FucA.....	39
3.2.11.1. Deducció de les equacions de les velocitats de reacció. Mètode de King-Altman.....	39
3.2.11.2. Ajust dels paràmetres cinètics amb el software gPROMS.....	39
 CAPÍTOL 4: ADDICIÓ ALDÒLICA ENTRE DIHIDROXIACETONA FOSFAT (DHAP) I (S)-CBZ-ALANINAL CATALITZADA PER FUCULOSA 1-FOSFAT ALDOLASA SOLUBLE (FucA)	 41
4.1. Addició aldòlica entre DHAP i (S)-Cbz-alaninal catalitzada per FucA soluble.....	41
4.2. Efecte de la temperatura en l'addició aldòlica.....	43
4.3. Estudi de les reaccions secundàries.....	46
4.4. Efecte de les concentracions de DHAP i (S)-Cbz-alaninal en l'addició aldòlica.....	49
4.5. Conclusions.....	50
 CAPÍTOL 5: AJUST D'UN MODEL CINÈTIC DE REACCIÓ DE SÍNTESI ALDÒLICA ENTRE DHAP I (S)-CBZ-ALANINAL CATALITZADA PER FucA.....	 51
5.1. Introducció.....	51
5.2. Deducció de les equacions de les velocitats de reacció. Mètode de King-Altman.....	52
5.3. Estudi d'inhibició de l'activitat enzimàtica de la FucA.....	57
5.4. Determinació dels paràmetres del model cinètic de reacció.....	61
5.4.1. Determinació dels paràmetres r_{ms} i K_M de la reacció secundària.....	61
5.4.2. Determinació de la constant d'inhibició per metilgloxal.....	62
5.4.3. Estimació dels paràmetres cinètics de la reacció de síntesi.....	64
5.4.4. Validació del model cinètic proposat.....	69
5.5. Conclusions.....	70
 CAPÍTOL 6: ESTUDIS D'IMMOBILITZACIÓ DE FucA.....	 71
6.1. Introducció.....	71
6.2. Adsorció. Immobilització de FucA a suports d'afinitat a metall quelat..	71
6.2.1. Estudi de la càrrega enzimàtica.....	72
6.2.2. Efecte dels diferents metalls en l'activitat catalítica.....	75
6.3. Immobilització per enllaç covalent.....	76
6.3.1. Immobilització de FucA per entrecreuament. Formació de CLEA (Cross-linked Enzyme Agregated).....	76
6.3.2. Immobilització de FucA en suport Eupergit C.....	79
6.3.3. Immobilització de FucA a agarosa.....	81

6.3.3.1. Efecte del pH en la immobilització de FucA.....	81
6.3.3.2. Efecte de l'activació de l'agarosa en la immobilització de FucA.....	83
6.3.3.3. Efecte de la temperatura en la immobilització de FucA.....	83
6.3.3.4. Estudi de la càrrega enzimàtica.....	84
6.3.3.5. Incubació del derivat en presència de Zn ²⁺	85
6.3.3.6. Estudi del progrés de l'activitat FucA immobilitzada.....	85
6.4. Conclusions.....	88
CAPÍTOL 7. REACCIONS DE SÍNTESI CATALITZADES PER FucA IMMOBILITZADA EN AGAROSA.....	89
7.1. Preparació del derivat FucA-agarosa.....	89
7.2. Avaluació de les limitacions de transferència de matèria en la utilització del derivat FucA-agarosa.....	90
7.2.1. Avaluació experimental de l'efecte de les limitacions difusionals.....	90
7.2.2. Estimació de l'efecte de les limitacions difusionals.....	91
7.3. Determinació de la càrrega enzimàtica del derivat FucA-agarosa.....	94
7.4. Reaccions de síntesi catalitzades pel derivat FucA-agarosa en discontinu.....	95
7.5. Addició aldòlica catalitzada per FucA-agarosa en discontinu alimentat.....	97
7.6. Conclusions.....	99
CAPÍTOL 8: CONCLUSIONS.....	101
CAPÍTOL 9: BIBLIOGRAFIA.....	103
APÈNDIX A1. Llistat d'abreviacions.....	111
APÈNDIX A2. Rectes de calibratge.....	113
APÈNDIX A3. Caracterització dels productes de síntesi.....	115
APÈNDIX A4. Determinació dels paràmetres cinètics del model de reacció.....	117
APÈNDIX A5. Llistat de publicacions.....	119

CAPÍTOL 0:

RESUM

Les aldolases són biocatalitzadors de gran interès en processos de síntesi quirals perquè catalitzen la formació d'enllaços C-C controlant l'estereoselectivitat de l'addició aldòlica. Les aldolases dependents de dihidroxiacetona fosfat (DHAP) catalitzen la reacció de síntesi d'aminopoliols precursors d'iminociclitols, productes d'interès terapèutic.

El present treball de tesi doctoral és una aportació a aquest camp, concretament a l'addició aldòlica catalitzada per fuculosa 1-fosfat aldolasa (FucA) a partir de la reacció model d'addició aldòlica entre DHAP i (S)-Cbz-alaninal.

S'ha estudiat la influència de les reaccions secundàries en la síntesi amb aldolases dependents de DHAP i s'han determinat les condicions de reacció òptimes per tal de minimitzar l'efecte d'aquestes reaccions secundàries.

S'ha proposat un model cinètic incloent els efectes d'inhibició determinats i s'ha validat amb èxit amb reaccions de síntesis realitzades a diferents condicions de reacció.

S'ha immobilitzat la FucA amb diferents mètodes: adsorció per afinitat, enllaç covalent (entrecreuament o CLEA, en suport Eupergit C i en agarosa) obtenint elevats rendiments d'immobilització encara que discrets percentatges de retenció de FucA en forma activa.

Finalment, s'ha pogut demostrar l'aplicació del derivat FucA-agarosa en síntesi i els avantatges que comporta en quan a productivitat i rendibilitat en un procés de síntesi.

CAPÍTOL 1:

INTRODUCCIÓ

1.1. Les aldolases

L'interès biotecnològic de les aldolases ja a la dècada dels anys 1990 ve de la seva importància en la catàlisi en les etapes principals del metabolisme de carbohidrats (Bednarski *et al*, 1989; Ozaki *et al*, 1990; Fessner *et al*, 1991).

Les aldolases són un grup de liases que catalitzen la formació d'un nou enllaç carboni-carboni conferint un nou centre asimètric a la molècula (Sukumaran i Hanefeld, 2004; Fessner i Helaine, 2001; Hamilton, 2004; Machajewski i Wong, 2000; Wymer i Toone, 2000).

La condensació aldòlica química que es du a terme químicament en medi bàsic no és estereoespecífica el que comporta que el producte obtingut és una mescla racèmica. Compren l'atac del carboni desprotonat en posició α de l'aldehid o cetona donador al carboni del grup carbonil de l'aldehid o cetona acceptor amb la conseqüent formació d'un β -hidroxialdehid o un β -cetoaldehid. Aquest producte es pot condensar per escalfament i, en molts casos, aquesta segona reacció és tan ràpida que no s'arriba a obtenir el producte d'addició (Solomons, 1982) (Fig.1.1.).

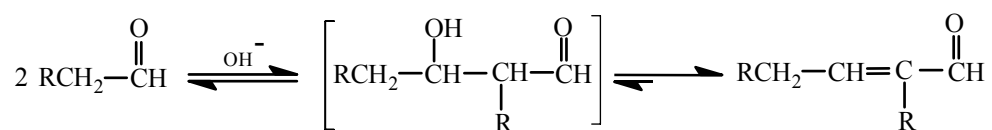


Figura1.1. Condensació aldòlica a partir del producte d'addició aldòlica.

En general, les reaccions químiques es duen a terme a condicions de reacció més dràstiques que les reaccions enzimàtiques. A més a més, en les reaccions químiques calen etapes de protecció i desprotecció de grups emprant agents químics que poden ser tòxics i perillosos per al medi ambient.

Les aldolases encara que tenen una relaxada especificitat pel substrat acceptor manifesten una elevada especificitat pel donador aldòlic. Aquest fet juntament amb

l'estereoespecificitat de l'aldolasa condueixen a que la reacció aldòlica enzimàtica sigui molt més prometedora.

A la naturalesa, les aldolases estan involucrades en la degradació o transformació de sucres, aminoàcids i compostos aromàtics.

1.1.1. Classificació de les aldolases

Les aldolases s'han subdividit en dues classes segons el seu mecanisme de reacció: aldolases de classe I i aldolases de classe II. A la Figura 1.2 es mostra un esquema general d'ambdues classes d'aldolases (Rasor *et al*, 1995). Aquests mecanismes s'han confirmat posteriorment per anàlisi estructural per cristal·lografia de raig X (Blom *et al*, 1997; Dreyer and Schulz, 1996b).

Les aldolases de classe I, solen ser enzims homotetràmers amb un residu lisina al centre actiu que forma una base de Schiff protonada amb el grup carbonil del substrat per a estabilitzar l'intermedi de la reacció (Dreyer i Schulz, 1996; von der Osten *et al*, 1989). Generalment, es troben en plantes i animals superiors.

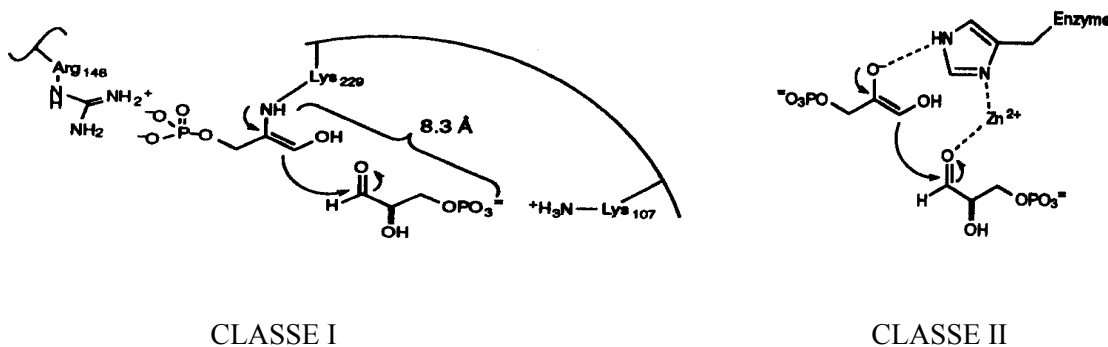


Figura 1.2. Classificació d'aldolases segons el mecanisme d'actuació: classe I i classe II.

En canvi, les aldolases de classe II contenen un catió divalent en el centre actiu, generalment Zn²⁺, per a estabilitzar l'intermedi de la reacció. Normalment, es troben en procariontes i fongs (Wehmeier, 2001). S'han trobat algunes excepcions, tant aldolases de classe II en eucariotes com aldolases de classe I en bacteris (von der Osten *et al*, 1989).

En els diversos estudis realitzats amb aldolases s'ha arribat a descriure la seva estructura. Pel que fa a aldolases de classe I s'ha descrit l'estructura de la fructosa 1,6-difosfat aldolasa de diferents fonts: múscul de conill, múscul humà, *Drosophila melanogaster* i *Plasmodium falciparum*; i també d'altres aldolases com 2-ceto-3-deoxi-6-fosfogluconat aldolasa de *Pseudomonas putida*, N-acetilneuraminat aldolasa d'*E. coli*, 7,8-dihifroneopterin aldolasa de *Staphylococcus aureus* (Joerger *et al*, 2000). En quan a les aldolases de classe II, la fuculosa 1-fosfat aldolasa va ser la

primera aldolasa de classe II descrita estructuralment (Dreyer i Schulz, 1993; Dreyer i Schulz, 1996a; Dreyer i Schulz, 1996b). Després s'han descrit les estructures de dues aldolases d'*E.coli*: fructosa 1,6-difosfat aldolasa (Blom et al, 1996; Wehmeier *et al*, 2001) i L-ramnulosa 1-fosfat aldolasa (Joerger *et al*, 2000).

Les aldolases de classe II són, en general, més estables que les de classe I. Els dos tipus es caracteritzen per una alta especificitat pel substrat donador però, en canvi, la seva especificitat pel substrat acceptor és molt més relaxada. L'estereoselectivitat de la reacció queda en general controlada per l'enzim i no per l'estereoquímica del substrat. La predictibilitat de l'estereoquímica del producte de reacció, junt amb la possibilitat d'actuar sobre un nombre considerable de substrats ha fomentat l'interès en aquests enzims pel seu ús en síntesi quiral (Takayama *et al*, 1997).

Les aldolases que han estat estudiades per al seu ús en síntesi es poden dividir en quatre grups segons la seva especificitat pel grup donador:

- les aldolases depenents de dihidroxiacetona fosfat (DHAP).
- les depenents de piruvat o fosfoenolpiruvat (PEP).
- les depenents d'acetaldehid
- les depenents de glicina.

1.1.2. Aldolases depenents de DHAP.

Les aldolases depenents de DHAP són enzims àmpliament emprats gràcies a que poden catalitzar l'addició aldòlica de la DHAP amb un rang ampli d'aldehids donant els quatre diastereòmers o formes quirals complementàries de les α,β -dihidroxicetones (Eyrisch *et al*, 1994; Fessner *et al*, 1991, Wong *et al*, 1994). Aquest fet no és general pels bioacatalitzadors, encara que hi ha alguns exemples d'estereoquímica complementària en liases (van der Werf *et al*, 1994).

Les quatre aldolases depenents de DHAP són:

D-fructosa 1,6-difosfat aldolasa (FruA, E.C. 4.1.2.13)
 D-tagatosa 1,6-difosfat aldolasa (TagA, E.C. 4.1.2.40)
 L-fuculosa 1-fosfat aldolasa (FucA, E.C. 4.1.2.17)
 L-ramnulosa 1-fosfat aldolasa (RhuA, E.C. 4.1.2.19)

In vivo, la fructosa-1,6-difosfat aldolasa (FruA) i la tagatosa-1,6-difosfat aldolasa (TagA) catalitzen l'addició asimètrica reversible de la DHAP a D-gliceraldehid-3-fosfat (G3P) per donar D-fructosa-1,6-difosfat i D-tagatosa-1,6-difosfat respectivament. La ramnulosa-1-fosfat aldolasa (RhuA) i la fuculosa-1-fosfat aldolasa (FucA) catalitzen l'addició reversible de la DHAP a l'L-lactaldehid (L-lac) per donar L-ramnulosa-1-fosfat i L-fuculosa-1-fosfat respectivament.

Com s'esquematitza a la Figura 1.3., amb cada una d'aquestes reaccions s'obté un producte d'estereoquímica complementària als altres quatre en C3 i C4. S'ha trobat que l'estereoselectivitat depèn tant de l'enzim emprat com de l'aldehid acceptor (Espelt *et al*, 2003b). Les aldolases reaccionen amb elevada estereoselectivitat a la posició C3 de la DHAP (estereocentre provinent de la DHAP), en canvi,

l'estereoselectivitat a la posició C4 (el nou centre generat amb l'addició aldòlica) depèn de l'estructura i l'estereoquímica de l'aldehid acceptor (Fessner *et al*, 1996; Schoevaart *et al*, 2001; Espelt *et al*, 2003a).

La fructosa-1,6-difosfat aldolasa (FruA) ha estat el primer enzim d'aquest grup àmpliament estudiat. Com s'ha comentat a l'apartat anterior, aquest enzim ha estat aïllat i caracteritzat partint de diferents mamífers i també de diverses fonts microbianes. Pel que fa a la seva aplicació en síntesi orgànica, la FruA aïllada de múscul de conill i coneguda per les seves sigles en llengua anglesa (RAMA, Rabbit Muscle Aldolase) ha estat la primera a comercialitzar-se, per tant, ha estat la primera a ser àmpliament utilitzada. La RAMA és una aldolasa de classe I bastant inestable sota condicions de reacció i la seva estructura correspon a un homotetràmer. La mateixa activitat catalítica aïllada d'*E. coli* és un dímer de classe II que utilitza Zn^{2+} com a cofactor i que, tot i el baix grau d'homologia entre seqüències, presenta pràcticament la mateixa selectivitat per substrat però és molt més estable (Henderson *et al*, 1994).

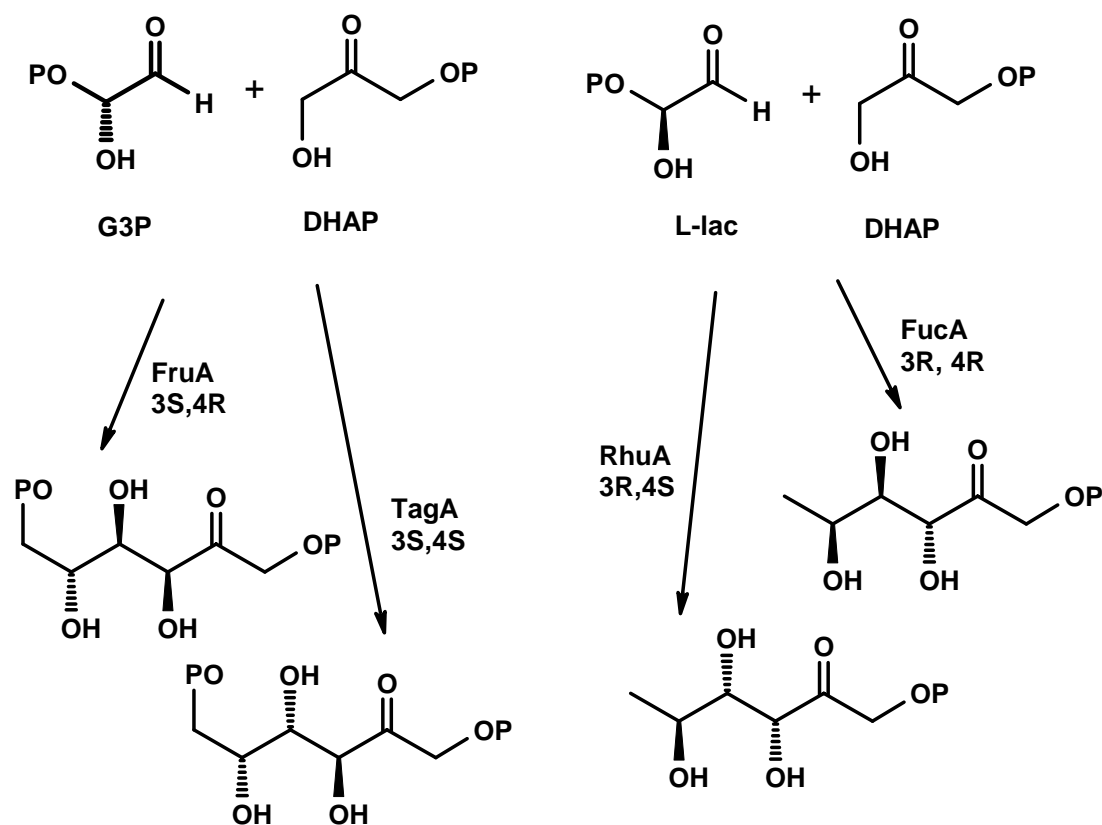


Figura 1.3. Aldolases dependents de DHAP i la seva estereoquímica complementària mostrada en base a les reaccions catalitzades *in vivo*.

Posteriorment, la FucA i la RhuA van ser identificades en diversos microorganismes sent aldolases de classe II. La TagA és una aldolasa de classe I identificada primer en *Streptococci*.

Les aldolases dependents de DHAP aïllades de diverses fonts han estat clonades en *E.coli* per la seva sobreexpressió (Ozaki *et al.*, 1990; Fessner *et al.*, 1991; Henderson *et al.*, 1994; Garcia-Junceda *et al.*, 1995). Així també s'ha aconseguit clonar aquestes aldolases dependents de DHAP en una mateixa soca amb auxotrofia per glicina fet que permet el creixement d'*E.coli* sense necessitat d'emprar antibiòtics (Vidal, 2006).

Aquestes quatre aldolases dependents de DHAP tenen una gran importància en la síntesi de sucres difícilment accessibles amb la síntesi orgànica clàssica. Tanmateix l'alta especificitat pel substrat donador, DHAP, limita substancialment el conjunt de productes quirals d'interès abordables mitjançant aquesta estratègia sintètica. S'han emprat diferents anàlegs de la DHAP però solen comportar-se com a substrats pobres encara que en alguns casos s'ha trobat que l'aldolasa presenta la mateixa afinitat per l'anàleg que per la DHAP (Gefflaut *et al.*, 1995; Page *et al.*, 1998). Recentment s'han trobat dos isòmers de la fructosa 6-fosfat aldolasa (FSA) en el genoma d'*E.coli* que empren la dihidroxiacetona (DHA) com a substrat donador (Schürman i Sprenger, 2001). La FSA s'ha clonat en *E.coli* s'ha sobreexpressat, purificat i emprat en diferents addicions aldòliques (Schürman i Sprenger, 2002; Castillo *et al.*, 2006). Per altra banda, s'ha descrit tant la isomerització com la degradació de la DHAP en medi aquós (Fessner i Walter, 1996; Phillips i Thornalley, 1993; Richard, 1984, 1993), essent la degradació irreversible seguint una cinètica de primer ordre a pH entre 7 i 9 (Phillips and Thornalley, 1993; Richard, 1984).

En quan a l'aldehid, en línees generals, són possibles acceptors de la reacció d'addició aldòlica, els aldehids alifàtics, els aldehids α -substituïts amb heteroàtoms incloent-hi monosacàrids i els seus derivats. De fet, la bibliografia sobre l'aplicació d'aquest grup d'aldolases es centra en l'estudi de les addicions aldòliques amb diferents aldehids acceptors (Samland i Sprenger, 2006; Fessner i Helaine, 2001; Machajewski i Wong, 2000; Takayama *et al.*, 1997; Wong i Whitesides, 1994).

Una de les aplicacions més interessants és la síntesi d'iminociclitolos. Aquests compostos són inhibidors de glicosidases i glicosiltransferases que tenen un gran potencial terapèutic. El pas clau és l'addició aldòlica entre DHAP i Cbz-aminoaldehids per a donar els precursors dels iminociclitolos, els aminopoliols (Espelt *et al.*, 2003; Fetcher *et al.*, 1999; Koeller i Wong, 2000, El Blidi *et al.*, 2004).

1.1.3. Fuculosa -1-fosfat aldolasa

Com s'ha esmentat en l'apartat anterior, la fuculosa 1-fosfat aldolasa (FucA) d'*E. coli* catalitza el trencament de la fuculosa 1-fosfat a dihidroxiacetona fosfat (DHAP) i L-lactaldehid, etapa essencial en el metabolisme bacterià de la fuculosa (Ghalambor i Health, 1966); i, en reaccions de síntesi, catalitza la formació d'un nou enllaç carboni-carboni amb estereoquímica 3R, 4R entre la DHAP i un aldehid o substrat acceptor.

La FucA és un homotetràmer amb un Zn^{2+} com a cofactor en cada subunitat. Cada una d'aquestes subunitats consta de 215 aminoàcids amb pes molecular 23.775 Da. Els aminoàcids, excepte l'hèlix α de l'extrem C-terminal, formen una estructura d'el·lipsoide compacta amb 9 hèlix β centrals. L'homotetràmer té una simetria C4, amb el centre actiu entre dues subunitats contigües format per residus d'ambdues subunitats essent uns d'ells l'extrem flexible C-terminal (Fessner, 1998; Dreyer i Schulz, 1993; Joerger *et al*, 2000) (veure Figura 1.4). Aquesta estructura quaternària i la presència del Zn^{2+} són essencials per a mantenir l'activitat catalítica.

Els estudis del mecanisme catalític a partir de dades de la seva estructura cristal·logràfica demostren que el residu *Glu73* de l'extrem C-terminal desprotona la DHAP pel C3 i el Zn^{2+} estabilitza l'intermedi enediolat format. Seguidament s'enllaça l'aldehid pel grup carbonil a prop del residu *Tyr113'* apuntant la cara "si" cap a la DHAP, es forma l'enllaç C-C, es torna a protonar el residu *Tyr113'* i es dissocia el producte retornant el residu *Glu73* a l'estat inicial del centre actiu (Dreyer i Schulz, 1996a; Joerger *et al*, 2000) (veure Figura 1.5.).

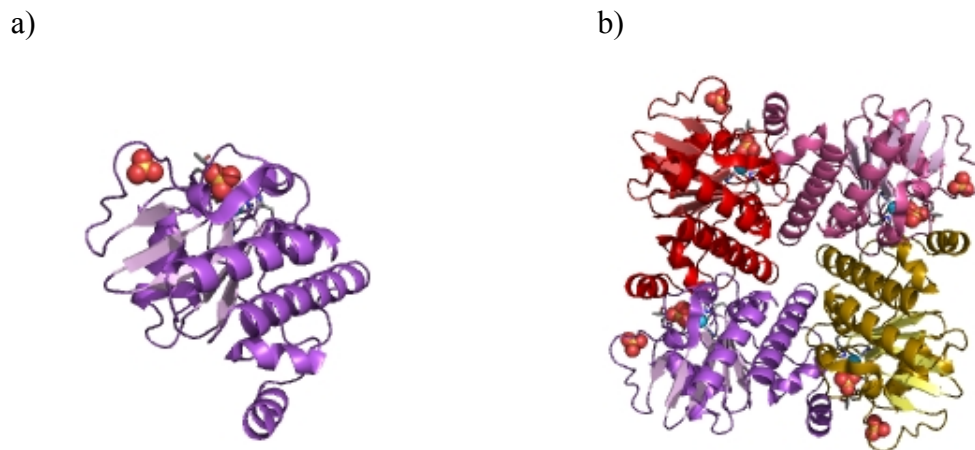


Figura 1.4. Estructura tridimensional de la fuculosa-1-fosfat aldolasa: a) subunitat de FucA, b) tetràmer de la FucA (extret de la base de dades Protein Data Bank (PDB) del European Bioinformatics del European Molecular Biology Laboratory (EMBL-EBI)

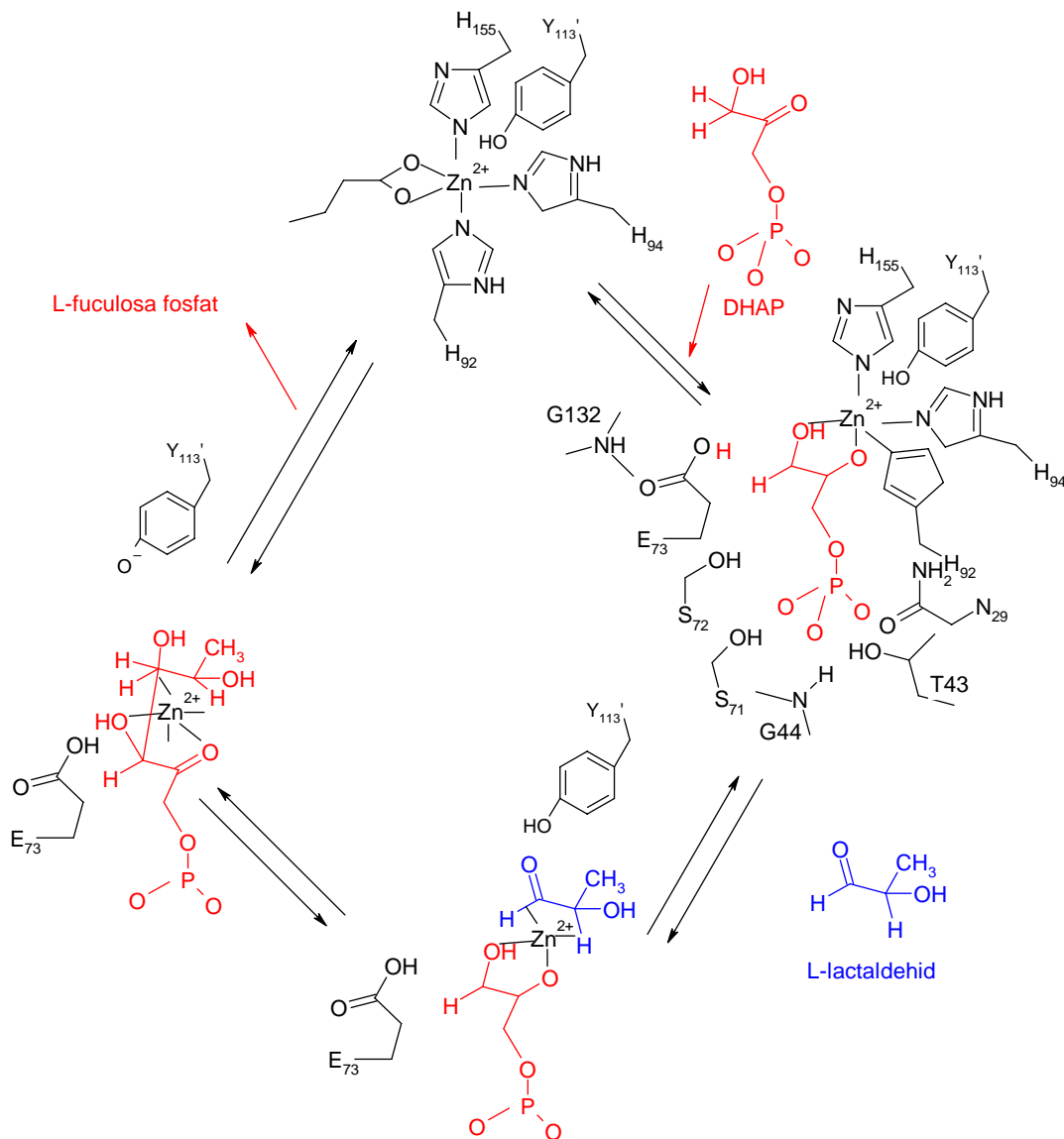


Figura 1.5. Esquema del cicle catalític de la FucA (Dreyer i Schulz, 1996a)

1.2. Immobilització enzimàtica. Tipus d'immobilitzacions.

La immobilització d'un enzim es defineix com la seva localització en una regió definida de l'espai mantenint una determinada activitat catalítica. Així, les principals avantatges que confereix la immobilització són la possibilitat de la seva utilització en reactors continus o reutilització en reactors discontinus gràcies a que se simplifica la recuperació del biocatalitzador i el downstream del producte, l'elevada activitat específica i la possibilitat d'augment de la seva estabilitat respecte l'enzim lliure. Aquests factors solen anar lligats a un augment de la productivitat volumètrica i en conseqüència de l'obtenció d'un sistema rendible.

En quan a les desavantatges de la immobilització, les principals són l'addició d'una etapa de preparació del derivat enzimàtic que pot conduir a una disminució de

l'activitat catalítica i que la difusió de substrats i productes pot limitar la velocitat de reacció i l'eficàcia del procés.

L'elecció de la utilització de l'enzim lliure o immobilitzat depèn de cada aplicació. En principi si el biocatalitzador és molt econòmic, soluble i actiu, la seva immobilització és poc útil. Tampoc s'immobilitzarà si el substrat natural és insoluble (p.ex., pells, carn). Un cop obtingut l'enzim immobilitzat, aquest s'emprarà si les seves propietats han millorat respecte l'enzim lliure o si el procés esdevé més rendible. Generalment, s'avaluarà en termes de l'activitat específica assolida (activitat enzimàtica per gram de derivat enzimàtic). Aquest paràmetre se sol emprar en el càlcul de la massa de biocatalitzador necessària en el disseny del bioreactor (Illanes i Wilson, 2003).

Les tècniques d'immobilització es poden classificar segons el tipus de retenció física de l'enzim:

a) Atrapament

Inclusió: El biocatalitzador queda confinat en una determinada regió de l'espai ja sigui per encapsulament per una matriu (boles, fibres), emprant reactors de membranes, etc.

b) Enllaç

Entrecreuant: Es produeix la immobilització de l'enzim a partir de l'addició d'un agent entrecreuant que forma enllaços a la superfície de l'enzim obtenint un agregat insoluble.

Enllaç covalent a un suport: La unió enzim-suport és mitjançant un enllaç de naturalesa covalent. Existeixen diferents mètodes segons el suport, el seu grup funcional i el de l'enzim i els agents enllaçants utilitzats. La principal desavantatge és la possibilitat de la modificació química d'algun aminoàcid de l'enzim del centre actiu o involucrat en la conformació adequada per a la seva activitat catalítica.

Adsorció: Tècnica senzilla i comuna que consisteix en la interacció de tipus iònic o forces d'atracció dèbils entre l'enzim i el suport. S'ha de tenir en compte que l'adsorció és reversible, de forma que les condicions del medi poden provocar la desorció de l'enzim.

Un dels principals factors a considerar en l'elecció d'un sistema d'immobilització per enllaç és el tipus d'enllaç. Mentre en el cas de l'adsorció, la interacció enzim-suport és feble; en el cas de l'enllaç covalent és de tipus fort. Així, una de les avantatges de la unió per un enllaç covalent entre l'enzim i el suport és el caràcter irreversible de la formació del mateix enllaç, en canvi, en el cas de l'adsorció caldrà controlar la desorció en les condicions de reacció.

En l'elecció del tipus d'enllaç covalent a formar cal tenir en compte que prèviament s'haurà d'activar el suport i/o l'enzim i que convé dur a terme l'enllaç en condicions suaus en les que els grups actius siguin estables químicament. A més a més, quan s'empli suport també serà important la morfologia interna del suport.

Les diverses tècniques d'immobilització per enllaç covalent es basen en els aminoàcids superficials. Aquests són hidrofílics i els que són susceptibles a reaccionar són els aminoàcids bàsics (lisina, arginina, histidina) i els àcids (glutàmic, aspàrtic), és a dir, els que contenen els residus amino ($R-NH_2$) i àcid ($R-COOH$). El grup funcional de l'enzim més àmpliament utilitzat és l'amino, això és degut a dues raons: és un grup abundant a la superfície enzimàtica i és reactiu.

Així, un dels mètodes més utilitzats és la formació d'un enllaç covalent entre els residus amino de l'enzim i residus aldehyd del suport o bé l'agent entrecruant. A més de les raons de la utilització d'aquest tipus d'enllaç comentades anteriorment, és important tenir present el fet de que molts enzims no tenen lisines involucrades en el centre actiu. Aquest és el cas de la FucA que en canvi en el seu centre actiu sí que té un àcid glutàmic, de forma que la utilització dels grups àcids de l'enzim es descarta per a dur a terme la seva immobilització. A més a més aquesta tècnica implica una etapa prèvia d'activació de l'enzim que pot implicar la disminució de l'activitat catalítica.

Així s'immobilitzarà FucA a partir dels seus residus amino de tres formes diferents: per entrecruament emprant glutaraldehyd i per immobilització sobre suport activat amb grups aldehyds (agarosa, Eupergit C) o grups epòxid (Eupergit C). Aquests suports tenen diferent morfologia: l'agarosa és com una superfície plana respecte l'enzim, en canvi l'Eupergit C una cadena molecular. Les principals avantatges d'aquests suports d'immobilització són: la seva manipulació i activació senzilla, la possibilitat d'assajos i estudis espectrofotomètrics i la possibilitat d'utilitzar-se en reactors discontinus perquè són compressibles, és a dir resistents a mecanismes d'agitació suaus.

Per tal d'activar el suport amb grups aldehyd calen diferents etapes: primer s'activa el suport amb glicidol i després s'oxida amb periodat sòdic segons l'activació o quantitat de grups aldehyd per mil·lilitre de suport que es vulgui assolir (Guisán, 1988). L'activació del suport, juntament amb la temperatura i el pH d'immobilització són les principals variables que controlen la cinètica d'immobilització i el número d'enllaços formats. Aquesta formació d'enllaços múltiples confereix estabilitat a l'enzim però com a contrapartida sol disminuir l'activitat enzimàtica. La immobilització es du a terme entre els grups aldehyds del suport que reaccionen amb els grup amino superficials de l'enzim donant una base de Schiff, posteriorment l'enllaç es fa irreversible per reducció amb borhidruir sòdic. La immobilització de diferents aldolases, dimèriques i sense cofactor metàl·lic, com la 2-deoxiribosa 5-fosfat aldolasa (DERA) i la serina hidroximetil transferasa (SHMT) a suports d'agarosa i Eupergit C s'ha realitzat amb bons resultats (Pla, 2007; Rios, 2007).

Pel que fa a la immobilització per entrecruament de la FucA emprant glutaraldehyd com a agent entrecruant, l'enllaç es forma entre el grup aldehyd del glutaraldehyd i els grups amino de l'enzim. En aquest mètode no cal una etapa de reducció de l'enllaç ja que el glutaraldehyd polimeritza donant cadenes ramificades llargues que reaccionen amb els grups amino de l'enzim.

Es parla de CLE (Cross-Linked Enzyme) quan es parteix d'enzim soluble, CLECs (Cross-Linked Enzyme Crystals) d'enzim cristal·litzat i CLEA (Cross-Linked Enzyme Aggregates) d'enzim agregat o insoluble. Una de les avantatges d'aquest

mètode d'immobilització és l'obtenció d'un biocatalitzador amb una activitat específica elevada ja que no conté suport. Normalment és d'un ordre o dos superior a les immobilitzacions amb suport (Cao *et al*, 2001). El procés d'obtenció dels CLEA és més eficient que els CLE o CLECs ja que s'aconsegueixen rendiments globals d'immobilització majors degut a que l'entrecreuament es forma entre residus dels agregats enzimàtics. S'ha referenciat que en la formació de CLEA sembla que els agregats enzimàtics adopten una estructura ordenada de conformació fixada i una superestructura rígida essencial per a l'estabilitat i el manteniment de l'activitat després de l'entrecreuament (Cao *et al*, 2000). Gràcies a això i l'elevada activitat específica són bones preparacions enzimàtiques per reaccions en medi orgànic tot i que per contra comporta una difícil manipulació.

Els CLEA es poden formar en una o dos etapes, és a dir, entrecreuament i agregació alhora o entrecreuament posterior a l'agregació d'aquest. Així, els tipus de CLEA obtinguts dependran de l'agent agregant i l'agent entrecreuant emprat. Els agents precipitants més emprats són el sulfat amònic, un solvent orgànic (acetona, acetonitril, alcohol tert-butílic), un polímer no-iònic (polietilenglicol (PEG)). El glutaraldehyd és l'agent entrecreuant més conegut tot i que el mecanisme de reacció encara no està establert (Gerrard *et al*, 2002). La immobilització en CLEA mitjançant glutaraldehyd és un mètode que s'emprarà amb la FucA purificada. Degut a que l'últim pas de purificació consta d'una precipitació en sulfat amònic, la formació de CLEA es durà a terme en dues etapes consecutives d'agregació i d'entrecreuament.

Una altra immobilització interessant per a FucA és l'adsorció. L'aldolasa recombinant FucA d'*E. Coli* conté una cua de sis histidines que permet la purificació de l'enzim en una etapa d'afinitat. És a dir, es pot aprofitar l'afinitat de la cua d'histidines al metall divalent del suport per a immobilitzar la FucA. Així, aquest procés es pot emprar tant en la purificació com en la immobilització de l'aldolasa recombinant, aconseguint un derivat de FucA immobilitzat en una sola etapa apte per a emprar-lo com a biocatalitzador (Ardao, 2006).

S'empren dos reïnes d'afinitat que bàsicament són sefarosa amb un braç espaiador que forma un quelat amb un metall divalent. Concretament, s'han emprat dues reïnes carregades amb Ni^{2+} amb diferent braç espaiador: Ni-àcid nitrilotriacètic, Ni-NTA (Qiagen) i Ni-àcid iminodiacètic, Ni-IDA (Amersham Biosciences).

1.3. Cinètica enzimàtica.

La modelització del comportament de reactors enzimàtics implica el coneixement de la cinètica de reacció enzimàtica és important.

Partint de la primera equació de la velocitat de reacció enzimàtica descrita per Henri, Michaelis-Menten van proposar la coneguda equació de Michaelis-Menten (eq. 1.1) Es basa en què l'enzim (E) i el substrat (S) reaccionen ràpidament per a formar un complex enzim-substrat (ES) que després es trenca en enzim lliure i producte (P) (veure Figura 1.6). Es considera que l'enzim, el substrat i el complex ES estan en equilibri, que la concentració de substrat no s'altera per la formació del complex ES i la velocitat de reacció global està limitada pel trencament del complex ES a enzim lliure i producte.

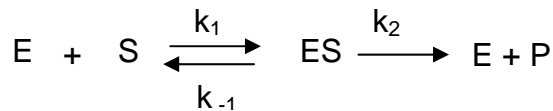


Figura 1.6. Esquema d'una reacció enzimàtica senzilla.

$$r = \frac{r_m [S]}{K_M + [S]} \quad (1.1)$$

On,

[S], concentració de substrat

r, velocitat de reacció

r_m , velocitat màxima de reacció ($r_m = k_2[E]_0$)

k_2 , constant cinètica per al trencament del complex ES a enzim lliure i producte

K_M , constant de Michaelis-Menten (k_{-1}/k_1)

La constant k_2 , en aquest exemple, s'anomena “*turnover number*” o k_{cat} i representa la màxima velocitat per mol d'enzim o per mol de centre actiu si la concentració enzimàtica s'expressa en concentració de centres actius.

Al 1925 Briggs i Haldane van proposar una equació de la velocitat de reacció que no requereix la restricció d'equilibri dels mètodes de Henri i Michaelis i Menten. Briggs i Haldane apuntaven que no cal que el complex enzim-substrat estigui en equilibri amb l'enzim lliure i el substrat però que, en un temps curt de reacció s'assoleix un estat quasi estacionari, de forma que la velocitat en què es forma el complex ES és la mateixa en la que es trenca, essent la concentració de complex ES pràcticament constant amb el temps. Llavors,

$$\frac{d[ES]}{dt} = (\text{velocitat de formació de ES}) - (\text{velocitat de descomposició de ES}) \approx 0 \quad (1.2)$$

Per a que aquesta hipòtesi es compleixi cal que la concentració de substrat sigui molt major a la d'enzim, essent de l'ordre de $[S]/[E]_0 \geq 10^3$

L'equació de la velocitat de reacció obtinguda és la mateixa que la de Michaelis-Menten però varia la definició de K_M , essent en aquest cas

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (1.3)$$

Es pot observar que l'equació de Michaelis-Menten és un cas especial on $k_2 \ll k_{-1}$

La majoria d'enzims involucren més d'un substrat, generalment dos, essent en molts casos aquest segon substrat un cofactor (Blanch, 1997). Llavors, quan la reacció involucra dos substrats les expressions de les reaccions de velocitat esdevenen més

complicades. En els possibles mecanismes de reacció cal tenir en compte la formació de complexos binaris enzim substrat (EA, EB) i un complex ternari entre l'enzim i els dos substrats (EAB), essent la concentració total d'enzim ($[E]_0$) igual a la suma de les concentracions d'enzim lliure i les concentracions dels tres complexos EA, EB i EAB.

La majoria de tipus de reaccions amb múltiples substrats es poden incloure en dues classes segons l'ordre d'enllaç del substrat i l'alliberament del producte, segons si es forma el complex ternari. A vegades aquest complex ternari només es forma a partir d'un dels dos complexos binaris i no de l'altre, en aquest cas el mecanisme s'anomena ordenat. Alternativament, si el complex EAB es pot formar a partir de qualsevol dels complexos binaris, el mecanisme s'anomena *random*. En altres mecanismes, el complex binari EA dona un producte X i es forma el complex binari EA' que després reacciona amb el substrat B per donar un segon producte Y. Aquest és el mecanisme ping-pong.

S'han descrit molts mecanismes de reacció però és comú que diferents mecanismes es puguin descriure amb la mateixa expressió de la velocitat de reacció (Wong i Hanes, 1962). Per discernir entre els diferents mecanismes és important basar-se en les evidències experimentals. Es poden extreure algunes conclusions a partir de la influència de les concentracions dels substrats A i B en la velocitat de reacció.

En general, s'obtenen expressions del següent tipus:

$$r = \frac{r_m [A][B]}{K_A' K_B + K_B [A] + K_A [B] + [A][B]} \quad (1.4)$$

L'equació 1.4 involucra quatre paràmetres mentre l'equació per a un sistema amb un substrat només en contenia dos. Ara bé, es pot simplificar quan es treballa a concentracions molt elevades d'un substrat respecte de l'altre obtenint una equació similar a la de Michaelis-Menten.

Quan la concentració del substrat B és molt elevada llavors:

$$r = \frac{r_m [A]}{K_A + [A]} \quad (1.5)$$

En canvi, quan l'excés és del reactiu A s'obté la següent equació:

$$r = \frac{r_m [B]}{K_B + [B]} \quad (1.6)$$

Llavors, linealitzant les expressions anteriors (1.5 i 1.6) es poden obtenir els paràmetres cinètics r_m , K_A i K_B . Després amb l'equació 1.4 es podrà obtenir el valor de K_A' .

Les expressions de la velocitat de reacció com l'equació 1.4 no contemplen cap efecte inhibitori, tanmateix permeten introduir-lo, com un factor multiplicatiu, segons el tipus d'inhibició que es pugui observar.

1.3.1 Inhibició

Algunes substàncies modifiquen la velocitat de reacció, mentre els activadors l'augmenten, els inhibidors la disminueixen i els moderadors poden actuar tant com a activadors com inhibidors.

Els casos més senzills d'inhibició són els anomenats inhibició competitiva, inhibició anticompetitiva i inhibició no competitiva. Aquesta classificació es pot discernir a partir del grau d'inhibició (i) definit com la relació entre la velocitat de reacció inhibida (r_i) i la velocitat de reacció sense inhibició (r) segons l'equació 1.7.

$$i = \frac{r - r_i}{r} \tag{1.7}$$

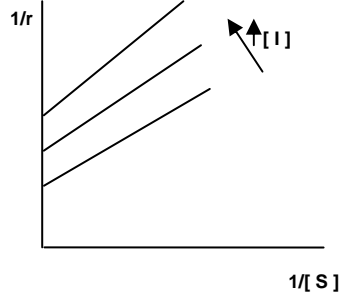
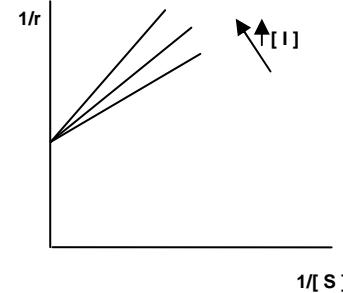
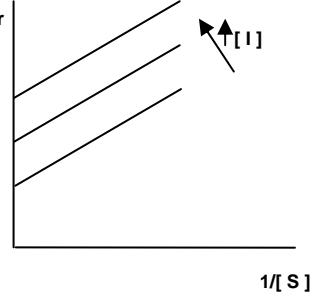
Llavors, es pot resumir en que:

- la inhibició no competitiva, el grau d'inhibició no varia amb la concentració de substrat
- la inhibició competitiva, el grau d'inhibició depèn de la concentració de substrat, són inversament proporcionals
- la inhibició anticompetitiva, el grau d'inhibició depèn de la concentració de substrat, són directament proporcionals

A la Taula 1.1. es recullen les expressions matemàtiques de la velocitat de reacció i les linealitzacions per a determinar els paràmetres cinètics, així com un esquema gràfic de la influència de la variació de concentració d'inhibidor.

En aquests tres tipus simples d'inhibició, s'arriba a un complex EI o ESI no productiu. En altres tipus d'inhibicions aquest complex pot donar també el producte de reacció, essent la inhibició de tipus parcial. La inhibició també pot ser mixta, cooperativa o sinèrgica quan els inhibidors esdevenen no exclusius, és a dir, hi ha més d'un lloc d'unió de l'inhibidor a l'enzim (Segel, 1993).

Taula 1.1. Taula resum dels diferents tipus d'inhibició.

no competitiva	competitiva	anticonpetitiva
$r = \frac{r_m [S]}{(K_M + [S]) \cdot \left(1 + \frac{1}{k_i} [I]\right)}$	$r = \frac{r_m [S]}{\left(K_M \cdot \left(1 + \frac{1}{k_i} [I]\right) + [S]\right)}$	$r = \frac{r_m [S]}{(K_M + [S]) \cdot \left(1 + \frac{1}{k_i} [I]\right)}$
$i = \frac{[I]}{K_M + [I]}$	$i = \frac{K_M \frac{[I]}{k_i}}{K_M \left(1 + \frac{[I]}{k_i}\right) + [S]}$	$i = \frac{[S] \frac{[I]}{k_i}}{K_M + \left(1 + \frac{[I]}{k_i}\right) [S]}$
$\frac{1}{r} = \frac{1}{r_m} \left(1 + \frac{[I]}{k_i}\right) + \frac{K_M}{r_m} \left(1 + \frac{[I]}{k_i}\right) \frac{1}{[S]}$	$\frac{1}{r} = \frac{1}{r_m} + \frac{K_M}{r_m} \left(1 + \frac{[I]}{k_i}\right) \frac{1}{[S]}$	$\frac{1}{r} = \frac{1}{r_m} \left(1 + \frac{[I]}{k_i}\right) + K_M \frac{1}{[S]}$
		

1.4. Catàlisi heterogènia

La catàlisi heterogènia que comporta la utilització d'enzims immobilitzats és un procés complex. Així, el procés general, esquematitzat en la Figura 1.7, considera primer la difusió dels substrats fins a la superfície del suport, la difusió d'aquests fins al centre actiu, la reacció, la difusió dels productes a la superfície del suport i la difusió al si del fluid. És a dir, en la catàlisi heterogènia s'addicionen dues etapes: la transferència de matèria externa i la transferència de matèria interna, que poden reduir la velocitat efectiva de reacció comparant-la amb el cas que no hi hagi limitacions difusionals.

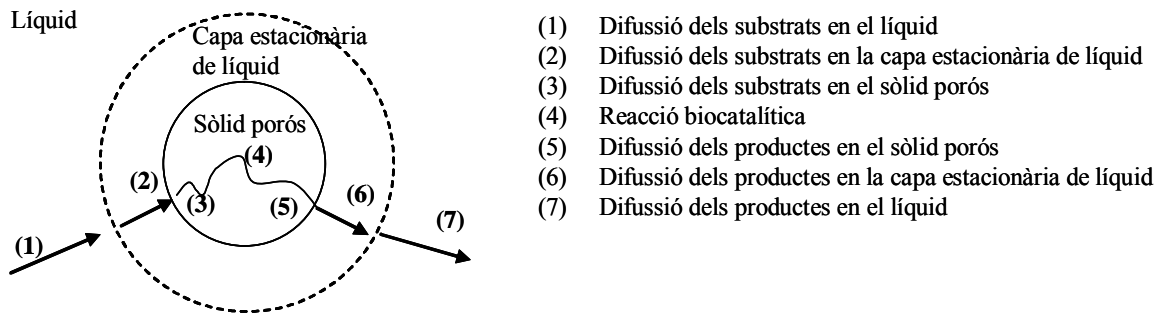


Figura 1.7. Esquema de les etapes de transferència de matèria i reacció en catàlisi heterogènia.

En quant a la transferència de matèria externa, se sol aplicar la teoria de la pel·lícula que considera que a la superfície de la partícula es forma una zona o pel·lícula que constitueix una resistència externa a la transferència de matèria. Llavors, el flux de substrat (N_s) serà proporcional a la diferència de concentracions de substrat entre el si del fluid (S_f) i la superfície de la partícula (S_p) (veure Equació 1.8). De la mateixa manera es pot definir el flux de producte (N_p) (Equació 1.9). Els coeficients de transferència de matèria k_s i k_p depenen de les propietats del fluid, el diàmetre de les partícules i les condicions hidrodinàmiques en la interfase sòlid-fluid.

$$N_s = k_s (S_f - S_p) \quad (1.8)$$

$$N_p = k_p (P_p - P_f) \quad (1.9)$$

En quan a la transferència de matèria interna, el flux de substrat es descriu amb la llei de Fick, on D_s és la difusivitat efectiva del substrat (Eq. 1.10).

$$N_s = -D_s \frac{dS}{dr} \quad (1.10)$$

Com a resultat de la reacció i difusió simultànies es produeix un gradient de concentració de substrats i productes dins de la partícula del suport. La resolució del sistema se simplifica treballant amb variables adimensionals i és freqüent determinar el factor d'eficàcia (η) com a relació entre la velocitat observada i la velocitat de reacció en absència de limitacions de transferència de matèria, és a dir, la relació entre la velocitat de reacció observada quan s'empra el biocatalitzador immobilitzat respecte la velocitat de reacció amb el biocatalitzador lliure o soluble (Eq. 1.11).

$$\eta = \frac{r_{\text{observada}}}{r_{\text{sense limitacions difusionals}}} = \frac{r_{\text{enzim immobilitzat}}}{r_{\text{enzim lliure}}} \quad (1.11)$$

El factor d'eficàcia se sol determinar també a partir de mòduls adimensionals (mòdul de Thiele (ϕ) o el mòdul de Weisz-Prater (ϕ_{wp}) segons la cinètica de reacció. Aquests mòduls relacionen la velocitat de reacció i la velocitat de difusió i tenen en compte la geometria de la partícula. El mòdul de Thiele es determina a partir dels paràmetres cinètics intrínsecs, en canvi, el mòdul de Weisz-Prater considera la velocitat de reacció observada.

Per a reaccions de tipus Michaelis-Menten, el factor d'eficàcia és la unitat per a mòduls de Weisz-Prater menors a 0.3 i per a valors majors a 0.3 la difusió interna esdevé l'etapa limitant (Asenjo i Merchuck, 1995; veure Fig. 1.8).

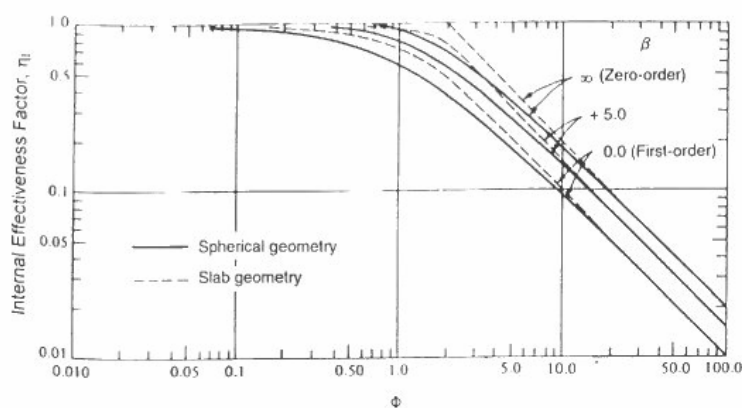


Figura 1.8. Relació entre el factor d'eficàcia i el mòdul de Weisz-Prater (Asenjo i Merchuck, 1995).

1.5. Addició aldòlica catalitzada per FuCA

Les reaccions d'addició aldòlica impliquen un repte en quant a l'enginyeria de la reacció ja que la solubilitat dels substrats difereix substancialment: la DHAP és hidrofílica, en canvi, generalment els aldehids N-protegits són hidrofòbics.

Les tècniques enzimàtiques de protecció de grups són un complement i/o alternativa als mètodes químics clàssics, especialment en la construcció de molècules sintètiques complexes o polifuncionals (Shelhass i Waldmann, 1996). Dos grups protectors àmpliament utilitzats són el grup benziloxycarbonil (Cbz) i el grup tert-butiloxycarbonil (Boc). Ambdós constitueixen un complement excel·lent per a la protecció ortogonal, en particular quan els productes d'addició aldòlica obtinguts s'empren com a blocs de construcció quiral, i perquè els grups protectors de tipus uretà no solen conduir a la racemització (Espelt *et al.*, 2003a). En canvi, la utilització de grups com la fenilacetamida (PhAc) comporta racemització, p.ex. en síntesi de pèptids s'ha observat un 5% de racemització (Álvaro *et al.*, 2000). Un cop s'ha obtingut el producte desitjat, el grup protector s'elimina enzimàticament (Álvaro *et al.*, 2000).

Així, degut a la diferent solubilitat dels substrats caldrà treballar amb medis no-convencionals, p.ex. medis aquosos amb cosolvents, gel emulsió. Normalment,

s'utilitzen medis aquosos amb cosolvent per a solucionar aquest problema, sovint un 10 o 20% de cosolvent és suficient per a la solubilitat del substrat, d'altra banda un percentatge superior és perjudicial per l'activitat aldolàsica (Bednarski 1991; Sobolov *et al*, 1994; Budde i Khmelnsky, 1999; Espelt *et al*, 2005). Una altra alternativa és l'emulsió concentrada d'aigua en oli o gel emulsió.

Ambdós medis ja s'han emprat prèviament en reaccions aldòliques catalitzades per aldolases en forma soluble: fructosa-1,6-difosfat aldolasa de múscul de conill (RAMA) (Espelt *et al*, 2003a) i amb FucA soluble (Espelt *et al*, 2005). En els següents apartats s'estudiarà l'addició aldòlica de DHAP i (S)-Cbz-alaninal en medi aquós amb 20% de dimetilformamida (DMF) amb el biocatalitzador en forma soluble i immobilitzat. Així mateix també s'estudiaran tres addicions aldòliques de DHAP amb diferents aldehids realitzades en medi gel emulsió amb FucA immobilitzada.

La immobilització enzimàtica sol conferir estabilitat (Álvaro, 1990), de fet, s'ha comprovat que l'aldolasa immobilitzada és estable en ambdós medis en el temps de reacció mentre que l'enzim lliure es desactiva. Normalment, a mesura que augmenta el número d'enllaços entre l'enzim i el suport augmenta l'estabilitat de l'enzim. Ara bé, l'estructura rígida que s'assoleix amb l'enllaç multipuntual pot afectar negativament a l'activitat enzimàtica. Així, caldrà realitzar un estudi de la influència de les principals paràmetres que controlen el procés d'immobilització: la temperatura i el pH del medi, el temps d'immobilització, el tipus d'enllaç format, l'activació del suport o la concentració de grups actius que conté el suport.

CAPÍTOL 2:

OBJECTIUS

2.1. Objectiu general

Estudiar l'addició aldòlica catalitzada per FucA amb una reacció model, obtenir un derivat immobilitzat de FucA i emprar-lo en l'esmentada reacció de síntesi.

2.2. Objectius específics

- Estudiar el mecanisme de reacció de l'addició aldòlica entre la dihidroxiacetona fosfat (DHAP) i el (S)-Cbz-alaninal catalitzada per fuculosa 1-fosfat aldolasa (FucA) soluble en medi dimetilformamida-aigua (1/4 v/v).
- Augmentar el rendiment de síntesi a partir de l'estudi de la influència de la temperatura de treball i de l'estudi de l'efecte de les concentracions inicials de substrats.
- Obtenir un derivat de FucA immobilitzada apte per al seu ús en síntesi emprant l'adsorció a reïnes d'afinitat i la immobilització covalent per entrecreuament i a suport d'agarosa i eupergit C.
- Estudiar l'aplicació del derivat de FucA immobilitzada en síntesi.
- Ajustar i validar un model cinètic a l'addició aldòlica entre DHAP i (S)-Cbz-alaninal catalitzada per FucA soluble i per FucA immobilitzada.

CAPÍTOL 3:

MATERIALS I MÈTODES

3.1. Materials

3.1.1. Llistat d'equips

Agitador magnètic Snijders

Agitador vòrtex Velp Scientifica 2x³

Armari Sanyo Medicoool

Autoclau Selecta AUTESTER-E

Balança analítica Scaltec SBC22

Balança granetaria Mettler PJ 6000

Bany termostatat P-Selecta Tectron Bio

Bomba peristàltica EYELA MP-3

Centrífuga Centrikon H – 401 ZK401. Kontron HermLe

Equip cromatogràfic FPLC[®] System Pharmacia

Programari FPLC Director Version 1.03

Col·lector de fraccions Pharmacia LKB · FRAC – 200

pHmetre Pharmacia LKB · pH Monitor

Detector d'ultraviolat Pharmacia Monitor UV

Bombes peristàltiques Pharmacia LKB · Pump P – 500

Col·lector de fraccions Pharmacia LKB · Collector LCC – 500 CI

Columna XK 50/20 (Amersham Pharmacia Biotech)

Equip d'electroforesi capil·lar (Quanta 4000E CE de WATERS)

Espectrofotòmetre d'ultraviolat - visible CARY 3. Varian

Espectrofotòmetre d'ultraviolat - visible CARY 50. Varian

HPLC WatersTM LC Module I plus amb columna RP-HPLC cartridge, 250×4 mm
empacada amb Lichrosphere[®] 100, RP-18, 5µm (Merck)

HPLC WatersTM LC Module I plus amb columna aminex HPX-87H (Biorad)

Incubador orbital de cultius Gallenkamp

Incubador orbital de cultius HT

Liofilitzador Virtis Sentry, model Benchtop 5 L

Liofilitzador- concentrador HETO HS-1-110

Microcentrífuga Mikro 12 –24. Hettich Zentrifugen

Micropipetes de volum variable Nichiryo Nichipet

Micropipetes de volum variable Gilson

Roller (Selecta, Movi-Rod)

Sonicador LABSONIC 200 B. Braun S.A.

Sonicador Vibracell Sonics & Materials

3.1.2. Llistat de reactius

Acetat d'etil anhidre 99.9% (Aldrich, 27.098-9)
 Acetona (Panreac, ref. QP211007)
 Acetonitril CH_3CN (SDS, 0063721)
 Àcid acètic glacial (Panreac, ref., QP 211008)
 Àcid cítric anhidre (Panreac, ref. 131808)
 Àcid clorhídric 37% (PA-ACS-ISO, Panreac, ref. 131020)
 Àcid etilendiaminotetraacètic, EDTA (ref., PA 131669 Panreac)
 Àcid 2-iodobenzoic (Sigma, ref. I7675)
 Àcid trifluoroacètic (SDS 0080203)
 Àcid sulfúric (Sigma, 435589)
 Agarosa 10BCI (Hispanagar)
 (S)-Alaninol
 N-(benziloxycarboniloxi)succinimida (Aldrich, ref. 22,803-6) (Cbz-O-Su)
 Blau de bromofenol, $\text{C}_{19}\text{H}_{10}\text{Br}_4\text{O}_5\text{S}$ (Merck, ref. 8122.0005)
 Borhidrur de sodi, NaBH_4 (Sigma, ref. S-9125)
 Borhidrur de potassi, KBH_4 (Sigma, ref. P-4129)
 Carboni actiu en pols (Panreac, ref. 121237)
 Citrat dihidratat de trisodi (Panreac, ref.:131655)
 Ciclohexilamina (Fluka, Ref. 29300)
 Clorur de potassi, KCl (Panreac, ref. PRS 141494)
 Clorur de sodi, NaCl (Panreac, ref. PRS 141509)
 Coomasie[®] Protein Assay Reagent (PIERCE, ref. 1856209)
 Dihidrogenofosfat de sodi, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Panreac, ref. PRS 141677.1210)
 Dihidrogenofosfat de potassi, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Panreac, ref. PRS 141509)
 Dihidroxiacetona fosfat de diliti (Fluka, ref. 37442)
 Dihidroxiacetona fosfat dímer etilhemiacetal sal de sodi
 Dimetilformamida (Panreac, ref. PA 131785)
 Dimetilsulfòxid anhidre 99.9%, DMSO (Aldrich, ref. 27685-5)
 1,4-dioxà (Panreac, ref. PRS 1412196)
 Electròlit Ionselect High Mobility Anion Electrolite (Waters)
 Etanol absolut (Panreac, ref. PRS 141086)
 Etanolamina (Aldrich, ref 39,813-6)
 Etilacetat anhidre 99.8% (Sigma, ref. 270989)
 Eupergit C (Fluka, ref. 46115)
 Fuculosa-1-fosfat
 Glicerol-3-fosfat deshidrogenasa, α -GDH (Fluka, ref. 5001.5)
 Glicerol-3-fosfat deshidrogenasa / Triosa fosfat isomerasa (α -GDH/TPI) (Roche, ref. 127787)
 Glicerol (Panreac, ref. QP 2113391214).
 Glicidol (Sigma, G-0887)
 Glicina (Panreac, ref. PA 131340.1211)
 Glutaraldehyd 50% solució en aigua (Aldrich, ref. 34085-5)
 Guanidina (Sigma, ref. G-4505)
 Hidrogenocarbonat de sodi, NaHCO_3 (Panreac, ref.141638.1211)
 Hidrogenofosfat de sodi, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Panreac, ref. PRS 141678.1214)
 Hidrogenofosfat de potassi, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Panreac, ref. PRS 141512)
 Hidròxid de sodi, NaOH (Panreac, ref. 141686)
 Hidròxid de tetrabutylamoni (Sigma, T-2761)
 Imidazole (Panreac, ref. PS 162536)

1,2- isopropanodiol (Sigma, ref. P1009)
 L-lactaldehid
 Molibdat de sodi, Na_2MoO_4 (Merck, ref. 1.00403.0100)
 Molibdat d'amoni tetrahidratat (Fluka, ref. 09880)
 Metanol (SDS, ref. 64.56.1)
 Mercaptoetanol (Sigma, ref. M-6250)
 Metilglioal solució al 40%(Sigma, M0252)
 β -nicotinamida adenin dinucleòtid reduït sal disòdica hidratada (Fluka, ref. 43420)
 Ninhidrina (Sigma, ref. N-4876)
 Oxone® (peroximonosulfato de potassi) (Sigma, ref. 228036)
 Periodat de sodi, NaIO_4 (Sigma, ref. S-1878)
 Persulfat amònic (GE Healthcare, ref. 7-1311-41)
 Reïna Dowex 1 x 8 (Fluka, ref. 44324)
 Reïna Dowex 50w x 8 (Fluka, ref. 44504)
 Reïna Ni-NTA Superflow (Qiagen, ref. 30410)
 Reïna Ni-IDA (GE Healthcare, ref. 17-0575-01)
 (S)-Cbz-alaninal
 (S)-Cbz-alaninol
 Sulfat d'amoni, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Panreac, ref. PRS 141140)
 Sulfat de cesi (Fluka, ref. 22438)
 Sulfat de níquel, $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Panreac, ref. PRS 141445.1211)
 Sulfat de zenc, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck, ref. 8881.1000)
 Tetrabutilamoni (Sigma, ref. T-2761)
 D-treonina (Sigma, ref. T-8250)
 Tris(hidroximetil)aminometà (Merck, ref. 1.08387.0500)
 Vitamina B1(Sigma, ref. 95160)

3.2. Mètodes

3.2.1. Síntesi de fuculosa 1-fosfat (Fuc-1-P)

La fuculosa 1-fosfat se sintetitza en forma de sal de ciclohexilamina ($\text{Fuc-1-P}(\text{CHA})_2$) a partir de la condensació aldòlica entre L-lactalehid i dihidroxiacetona fosfat (DHAP) catalitzada per l'enzim fuculosa 1-fosfat aldolasa (FucA) (veure Fig. 3.1.). El procediment seguit es basa en el publicat per Fessner (1993) i conté algunes modificacions introduïdes en el transcurs de les diferents síntesis (Durany, O., Vidal, L., Suau, T.). El L-lactaldehid també se sintetitza al laboratori a partir de D-treonina i ninhidrina segons una modificació del procediment publicat (Zagalak *et al*, 1966) posada a punt per Durany (2000) (Figura 3.2 i 3.3).

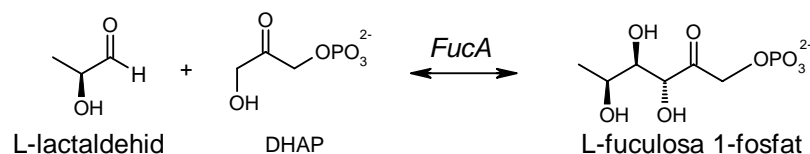


Figura 3.1. Síntesi enzimàtica de L-fuculosa-1-fosfat a partir de L-lactaldehid i DHAP.

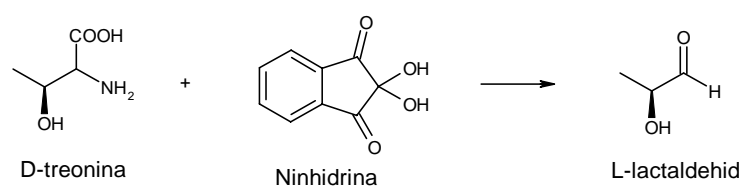


Figura 3.2. Síntesi de L-lactaldehid a partir de D-treonina i ninhidrina.

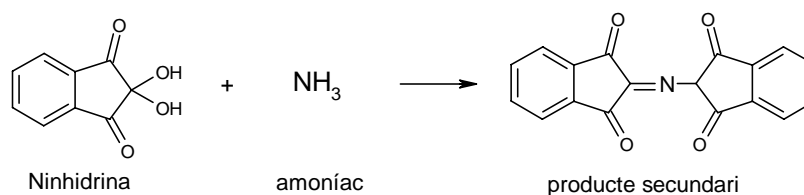


Figura 3.3. Reacció secundària en la síntesi de L-lactaldehid obtenint un producte secundari de color púrpura.

Primer, el L-lactaldehid se sintetitza per descarboxilació oxidativa de D-treonina amb ninhidrina. Per a preparar 25 mmol de L-lactaldehid, es dissolen 45 mmol de D-treonina i 92 mmol de ninhidrina en 500mL de solució tamponadora 50 mM citrat sòdic pH 5.4. Es manté la mescla a ebullició durant 15-20 minuts amb agitació vigorosa. Es refreda la mescla de reacció i es filtra al buit mitjançant un filtre Rosich de capa porosa n°3. El filtrat es purifica, per tal d'eliminar impureses com el producte secundari mostrat en la Figura 3.3., amb diferents etapes de bescanvi iònic amb reïna Dowex 1x8 en forma bicarbonat i reïna Dowex 50wx8 en forma àcida (H^+). Es concentra el filtrat al liofilitzador-concentrador HETO i es repeteix el procés de bescanvi iònic fins a aconseguir una solució incolora d'uns 25 mL a pH 6.5. Es conserva a pH 4 sota atmosfera inert a 4°C. Es quantifica el L-lactaldehid de forma indirecta mitjançant reducció amb borhidrur potàssic a 1,2-isopropanodiol i quantificació d'aquest amb anàlisi per HPLC (veure apartat 3.2.4.2)

La DHAP emprada en la síntesi de fuculosa 1-fosfat s'ha obtingut a partir de l'hidròlisi de la sal de sodi del dimer etilhemiacetal de DHAP (Effenberger i Straub, 1987), en canvi en els estudis de síntesi s'ha emprat la sal de liti de la DHAP comercial (Fluka).

Per a obtenir la fuculosa-1-fosfat es dissolen 10 mmol de DHAP i 10 mmol de L-lactaldehid en 250 mL i s'ajusta a pH 7.5 amb KOH 1N. Es du a terme la reacció a 25°C sota atmosfera inert un cop afegides 10 UA de FucA (tenint en compte els resultats presentats en l'apartat 4.2., les futures síntesis de fuculosa 1-fosfat es realitzaran a 4°C). Les mostres preses per fer el seguiment de reacció s'incuben durant 1 minut a 100°C per tal desactivar l'aldolasa. Es quantifica la DHAP per anàlisi espectrofotomètric i l'L-lactaldehid i la fuculosa 1-fosfat mitjançant HPLC. Es para la reacció desactivant la FucA quan s'ha consumit un percentatge proper al 100% de DHAP.

Per tal de purificar la mescla de reacció en un primer pas es filtra a través de carbó actiu. Seguidament, el filtrat resultant s'aplica a una columna de bescanvi iònic en forma bicarbonat (HCO_3^-) de 140 mL. Un cop aplicat el filtrat, es renta la columna amb aigua desionitzada, s'elueix la Fuc-1-P amb 0.2M NaHCO_3 i es realitza un rentat amb 0.8M NaHCO_3 . Se segueix la purificació mitjançant anàlisi per HPLC de les mostres d'elució i per cromatografia en capa fina. Les fraccions que contenen FucA es liofilitzen. El liofilitzat resultant es resuspèn en 100 mL d'aigua desionitzada i s'afegeix reïna Dowex 50wx8 per a eliminar les restes de bicarbonat per formació de diòxid de carboni fins arribar a pH àcid. Es filtra amb un filtre Rosich de placa porosa núm. 3 i es renta la reïna amb aigua desionitzada (2x20 mL). El filtrat es neutralitza amb ciclohexilamina i es liofilitza. Es conserva la Fuc-1-P (CHA)₂ a -20°C sota atmosfera inert. Es caracteritza l'estructura química i es realitza el control de puresa de la síntesi de Fuc-1-P per ^1H -RMN (250 MHz, D_2O) (veure assignació de senyals a l'apèndix A3).

3.2.2. Síntesi de (S)-Cbz-alaninal

L'aldehid (S)-Cbz-alaninal se sintetitza en el nostre laboratori a partir de l'oxidació de l'amino alcohol N-protegit amb àcid 2-iodoxibenzoic (IBX). Prèviament, l'alcohol (S)-alaninol es protegeix amb un grup Cbz (Espelt *et al*, 2003a) i l'agent oxidant es prepara segons el mètode descrit a la bibliografia (Frigerio, M *et al*, 1999) (veure Figures 3.4, 3.5 i 3.6).

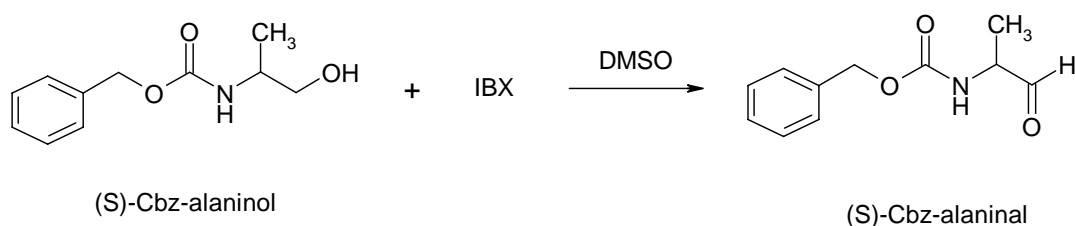


Figura 3.4. Síntesi de (S)-Cbz-alaninal

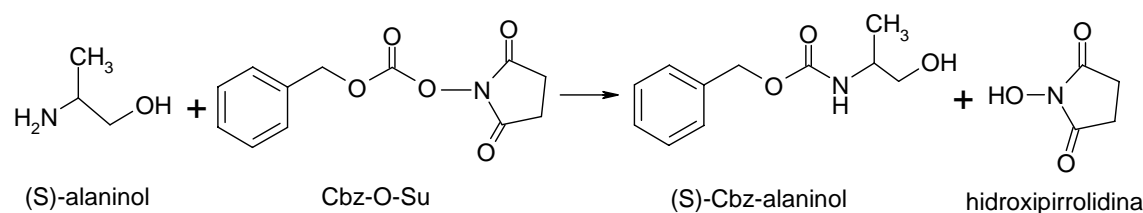


Figura 3.5. Protecció de l'(S)-alaninol

Per a protegir l'(S)-alaninol, es dissolen 5 g de (S)-alaninol en 75 mL d'una dissolució 4:1 de dioxà en aigua. Per separat, es dissolen 15.8 g de N-(benzoxicarboniloxi)succinimida (Cbz-O-Su) en 75 mL de la mateixa dissolució dioxà-aigua. La dissolució de Cbz-O-Su s'afegeix gota a gota amb un embut d'addició al (S)-alaninol. Es deixa agitant durant una nit. S'evapora el dioxà i el residu obtingut es dissol en 75 mL d'acetat d'etil. Es renta amb 5% àcid cítric (3x50mL), 5% NaHCO_3 (3x50mL), NaCl saturat (2x50mL). S'asseca amb Na_2SO_4 , es filtra, es rotavapora i

s'emmagatzema a 4°C. Es comprova que els espectres de ^1H -RMN i ^{13}C -RMN corresponen a l'(S)-Cbz-alaninol.

Per a obtenir l'IBX, es dissolen 280 g d'oxone en 1.5L d'aigua i es fan reaccionar amb 40.2 g d'àcid 2-iodobenzoic a 70°C durant 3 hores. Es filtra al buit amb un filtre Rosich número 4, es renta dos cops amb acetona, es liofilitza i el sòlid es guarda a 4°C. Es comprova que l'espectre de ^1H -RMN correspon a l'IBX.



Figura 3.6. Síntesi de l'oxidant IBX (àcid 2-iodoxibenzoic)

Per a oxidar l'(S)-Cbz-alaninol a (S)-Cbz-alaninal, es dissolen 24 mmol de Cbz-(S)-alaninol en 65 mL de dimetilsulfòxid (DMSO) sota atmosfera inert d'argó. S'inicia la reacció a l'afegir 60 mmol d'IBX. Se segueix l'avenç de la reacció mesurant l'aparició de (S)-Cbz-alaninal per HPLC. Després de 2 hores d'agitació, s'afegeixen 70 mL d'etilacetat i 70 mL d'aigua. La mescla de reacció es filtra a través d'un embut Büchner, i el sòlid es renta amb acetat d'etil (4x50 mL). La fase orgànica es renta amb NaHCO_3 5% (w/v) (5 x 40 mL), i amb solució NaCl saturat (5 x 40 mL). Després s'asseca amb Na_2SO_4 i es rotavapora. Es comprova que els espectres de ^1H -RMN i ^{13}C -RMN corresponen a l'(S)-Cbz-alaninal i que s'obté un únic producte. L'assignació de senyals es pot veure en l'apèndix A3.

3.2.3. Producció de Fuculosa-1-fosfat aldolasa recombinant

La FucA recombinant es produeix amb un cultiu fed-batch de la soca *E. Coli* XL1 blue MRF' (pTrefuc) (Durany i col, 2004a) emprant un perfil exponencial d'alimentació per tal de mantenir la velocitat de creixement específica constant (Durany i col, 2004b). El brou de cultiu obtingut es centrifuga (Centrikon H-401 ZK401 Kontron Hermle, 10 000g, 20 min, 4°C) i les cèl·lules es resuspenen en solució tamponadora de lisi (50 mM fosfat sòdic 300 mM clorur sòdic 20 mM imidazol pH 8.0). El trencament cel·lular es produeix per ultrasons (Sonicator Labsonic 200B, BRAUN S.A.) seguint-ho per absorbància a 550 nm. Les restes cel·lulars s'eliminen per centrifugació (Centrikon H-401 ZK401 Kontron Hermle, 10 000g, 20 min, 4°C) i el sobrenadant o lisat cel·lular es carrega a una columna d'afinitat a metall quelat (200 mL de reïna Ni-IDA). La FucA es purifica en condicions naturalitzants i s'elueix per competició amb imidazole. El pic d'elució a 300mM d'imidazole, s'incuba 30 minuts d'incubació amb 10 mM ZnSO_4 i es precipita amb 37% w/v $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Després, les sals de la solució tamponadora de purificació s'eliminen per centrifugació i el precipitat, que conté una activitat mitjana de 10 UA/mg, es conserva amb 37% w/v $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 4°C.

3.2.4. Mètodes analítics

3.2.4.1. Anàlisi de fuculosa-1-fosfat

Per al seguiment i control de la puresa de la fuculosa-1-fosfat s'empren 3 mètodes: cromatografia en capa fina, cromatografia líquida d'alta eficàcia (HPLC) i ressonància magnètica nuclear (RMN).

Cromatografia en capa fina

La fase estacionària utilitzada és gel de sílice 60 de 0.0630-0.20 mm, 70-230 mesh i la fase mòbil butanol:àcid acètic:aigua (5:3:1).

S'empren dos reveladors, un específic per sucres i un per a compostos orgànics. El revelador específic per sucres reacciona amb compostos amb diols veïns. Es prepara mesclant 180 mL d'etanol, 100 mL d'àcid acètic glacial, 3 mL d'àcid sulfúric 98% i 1 g de difenilamina. En canvi, el revelador per compostos orgànics es prepara a partir de 450 ml aigua, 50 ml d'àcid sulfúric 98%, 25 g de molibdat d'amoni tetrahidratat i 0.5 g de sulfat de cesi. El procés de revelat és per immersió de la capa seca de sílice en el revelador corresponent i posterior escalfament a 100°C fins a visualització de les taques. Els factors de retenció de la DHAP, el L-lactaldehid i la Fuc-1-P són 0.38, 0.89 i 0.27 respectivament.

Cromatografia líquida d'alta eficàcia (HPLC)

S'empra el mètode de Tijoe (Tijoe *et al.*, 1985) per a la determinació de sucres fosforilats basat en parells iònics cromatogràfics (PIC) per a separar compostos en columna de fase reversa C₁₈. En aquest cas, el tetrabutilamoni és el catió lipofílic que es combinarà amb la fuculosa-1-fosfat formant un compost de càrrega neutra que interactuarà amb la fase estacionària de C₁₈.

La columna emprada és la C₁₈ Lichrospher 100 RP-18 (Merck) 5 µm, 250x4 mm i les condicions cromatogràfiques són les següents: flux 0.6 mL/min, eluent 10 mM tetrabutilamoni pH 2.0 ajustat amb H₂SO₄, detector d'índex de refracció, volum d'injecció 20 µL (les mostres es dilueixen 1/3 amb fase mòbil), temperatura 25°C.

Ressonància magnètica nuclear (RMN)

La caracterització de l'estructura química i el control de puresa de la síntesi de Fuc-1-P es realitza per ¹H-RMN (250 MHz, D₂O) (veure l'assignació de senyals a l'apèndix A3).

3.2.4.2. Anàlisi de L-lactaldehid

La concentració de L-lactaldehid s'ha determinat qualitativament i quantitativament tant pel seguiment de la seva síntesi com per la síntesi de Fuc-1-P. En el primer cas, les mostres s'han analitzat directament a l'HPLC i en el segon, les mostres s'han reduït específicament amb KBH₄ a 1,2-isopropanodiol abans d'analitzar-les a l'HPLC (Zagalak *et al.*, 1966).

Determinació qualitativa del L-lactaldehid

S'ha emprat una columna Aminex® HPX-87H (Biorad) i les condicions cromatogràfiques són les següents: flux 0.6 mL/min, eluent aigua tipus MilliQ 18.2 MΩcm 5mM H₂SO₄, volum d'injecció: 20μL, 25°C, detector d'IR.

Determinació quantitativa del L-lactaldehid

Reducció del L-lactaldehid a 1,2-isopropanodiol amb KBH₄: Es fan reaccionar 2 mL de mostra amb la quantitat d'agent reductor necessària estequiomètricament per a la reducció total de la mostra suposant un rendiment en la síntesi de L-lactaldehid del 100 %. La mescla de reducció es manté sota agitació magnètica a temperatura ambient un mínim de 3h. Es repeteix la reducció emprant un excés d'agent reductor (menor al doble per evitar interferències). Es determina la concentració en L-lactaldehid a partir de la quantificació del 1,2-isopropanodiol com el valor mitjà de les dues determinacions.

Per a quantificar el 1,2-isopropanodiol s'empra una columna Aminex® HPX-87H (Biorad) a les següents condicions cromatogràfiques: flux 0.6 mL/min, eluent aigua tipus MilliQ 18,2 MΩcm 5mM H₂SO₄, volum d'injecció: 20μL, 25°C, detector d'UV. Es preparen patrons de diferents dissolucions 1,2-isopropanodiol en aigua tipus MilliQ 18,2 MΩcm; 50, 100, 200, 500, 1000 mM. Un exemple de calibratge del mètode es pot consultar a l'apèndix A2.

3.2.4.3. Anàlisi de fosfat inorgànic

El fosfat inorgànic s'ha determinat emprant l'electroforesi capil·lar (Quanta 4000E CE de WATERS). Amb aquest mètode els ions de la mostra se separen gràcies a la diferent mobilitat al sotmetre'ls a un camp elèctric de 15 kV.

El volum de mostra emprat ha estat de 10 μL, l'electròlit "Ionselect High Mobility Anion Electrolite" (Waters), temperatura ambient, voltatge 15kV amb la font d'alimentació negativa, detecció UV indirecta a 254 nm. Es preparen patrons a 5, 10, 20, 40 i 100 mg/mL a partir d'un estoc de 200 mg K₂HPO₄/mL en alíquotes estèrils de 3 mL. A l'apèndix A2 es pot consultar un exemple de recta de calibratge.

3.2.4.4. Anàlisi de dihidroxiacetona fosfat (DHAP)

La DHAP es mesura espectrofotomètricament a partir de la seva reducció emprant glicerol 3-fosfat deshidrogenasa de múscul de conill (GDH) i nicotina adenina dinucleòtid reduït (NADH).



Figura 3.7. Assaig enzimàtic per a la quantificació de DHAP.

Els següents reactius es mesclen en una cubeta d'un mil·lilitre i es mantenen a 25°C: 10 µL de 20 mM NADH, 10 µL de mostra i 970 µL de 100 mM Tris·HCl pH 7.5. L'assaig s'inicia a l'afegir 10 µL de GDH (50 UA/mL). La reacció se segueix mesurant la disminució de l'absorbància a 340 nm del NADH abans (Abs_1) i després (Abs_2) de l'addició de la GDH en un espectrofotòmetre de UV-Visible ($\epsilon = 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La concentració de DHAP s'obté amb la següent equació per a concentracions inferiors a 15 mM:

$$[DHAP](mM) = \frac{(Abs_1 - Abs_2)}{6.22} \cdot 100$$

3.2.4.5. Anàlisi de (S)-Cbz-alaninal i producte de síntesi

Per al seguiment i control de la puresa en la síntesi de (S)-Cbz-alaninal s'empren 2 mètodes: cromatografia líquida d'alta eficàcia (HPLC) i ressonància magnètica nuclear (RMN). El mateix mètode per HPLC s'emptra per al seguiment de les addicions aldòliques per a la quantificació del reactiu (S)-Cbz-alaninal i pel producte de síntesi.

Ressonància magnètica nuclear (RMN)

La caracterització de l'estructura química i el control de puresa de la síntesi de (S)-Cbz-alaninal es realitza per ^1H -RMN i ^{13}C -RMN. Els espectres obtinguts es comparen amb uns espectres patrons (veure l'assignació de senyals a l'apèndix A3).

Cromatografia líquida d'alta eficàcia (HPLC)

Els anàlisis es duen a terme en un sistema HPLC (WatersTMLC Module I plus) amb una columna de 250x4 mm empacada amb Lichrosphere® 100, RP-18, 5µm (Merck). El sistema de solvents és el següent: solvent A, 0,1% v/v àcid trifluoroacètic (TFA) en aigua, solvent B: 0,095% v/v TFA en aigua:acetonitril 1:4 v/v; gradient d'elució de 10 a 70% de B en 30 minuts, cabal 1 mL/min, detecció a 215 nm. Les mostres es dilueixen en metanol (com a mínim 1/3 fins a 1/60). L'anàlisi quantitatiu del (S)-Cbz-alaninal i el producte es realitza per àrees de pic amb el mètode d'estàndard extern. Partint de que tenen el mateix coeficient d'extinció molar, es preparen patrons de (S)-Cbz-alaninal a les concentracions següents 0.5, 0.8, 1.0, 1.3, 1.6, 1.9, 2.1, 2.4, 2.6 mM.

3.2.4.6. Anàlisi de proteïna total. Mètode Bradford

S'utilitza un mètode colorimètric per a la quantificació de proteïna total, a 595 nm i temperatura ambient, que consisteix en una modificació del mètode Bradford proposat per la casa comercial Pierce. El Coomassie® G-250 s'adsorbeix als aminoàcids formant un complex proteïna-tint que absorbeix a 595 nm en medi àcid.

S'empren dos protocols diferents segons si s'utilitzen tubs o microplate. Quan s'emptra el protocol tubs es mesclen 50 µL de mostra amb 2.5 mL del reactiu Coomassie; en canvi, quan s'emptra el protocol microplate, es mesclen 6 µL de mostra amb 0.3 mL del reactiu Coomassie. Es prepara la recta de calibratge amb patrons de BSA (Bovine Serum Albumine) a 50, 100, 200, 300, 400 i 600 µg/mL a partir de l'estoc de BSA 2000 µg/mL en solució 0.9% salina i 0.05 % azida sòdica (els patrons són estables 3 dies a 4°C). Cal

tenir en compte que l'imidazol emprat en la purificació de FucA interfereix a partir de 200 mM.

3.2.4.7. Assajos enzimàtics per a la determinació de l'activitat aldolàsica

En general, s'empren mètodes espectrofotomètrics cinètics on la disminució de l'absorbància del NADH a 340 nm és directament proporcional a la quantitat d'aldolasa a la mostra segons la següent equació:

$$UA / mL = \frac{(\Delta A_{340nm} / \text{min}) \cdot V_t (mL) \cdot (df)}{\varepsilon (mM^{-1} \cdot cm^{-1}) \cdot V_e (mL)}$$

on,

$\Delta A_{340 \text{ nm}} / \text{min}$ test, velocitat inicial de consum de β -NADH a 340 nm

V_t , Volum total de l'assaig (1 mL).

df , Factor de dilució de la mostra aldolàsica original a quantificar.

ε , Quoefficient d'extinció molar $\varepsilon_{\beta\text{-NADH } 340 \text{ nm}} = 6.22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

V_e , Volum de la solució enzimàtica utilitzada a l'assaig (mL)

Anàlisi de l'activitat fuculosa-1-fosfat aldolasa (FucA)

L'activitat fuculosa-1-fosfat aldolasa (FucA) es mesura amb un assaig enzimàtic acoblat (Durany, 2000). En el primer pas, la fuculosa-1-fosfat (Fuc-1-P) es trenca a L-lactaldehid i dihidroxiacetona fosfat (DHAP) catalitzat per la FucA; en el segon pas, la DHAP es redueix emprant glicerol-3-fosfat deshidrogenasa de múscul de conill (GDH) i dinucleòtid adenina nicotina reduït (NADH).

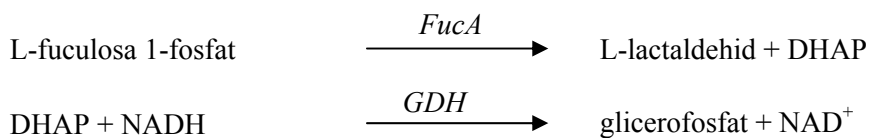


Figura 3.8. Assaig enzimàtic per a la quantificació de FucA

En 1 mL de volum total, es mesclen 864 μL solució tamponadora, 34 μL Fuc-1-P 58mM, 34 μL NADH 4 mM i 34 μL GDH 50 UA/mL. Les concentracions finals a la cuveta són 2 mM de fuculosa-1-fosfat, 0.14 mM NADH i 1.7 unitats d'activitat de GDH en solució tamponadora 100 mM TrisHCl 150 mM KCl pH 7.5 a 25°C. Es comprova que l'absorbància a 340 nm és constant i igual a 0.8. L'assaig s'inicia amb l'addició de 34 μL de mostra per a determinar la seva activitat enzimàtica. L'evolució de la reacció se segueix mesurant la disminució en absorbància a 340 nm del NADH en un espectrofotòmetre UV-Visible (Cary, Varian).

Quan s'analitza l'activitat FucA d'un derivat immobilitzat o una suspensió d'immobilització es dupliquen totes les quantitats per tal de treballar amb una cuveta de 2 mL amb agitació magnètica.

Una unitat d'activitat (UA) de FucA es defineix com la quantitat d'enzim que converteix 1 μmol de fuculosa-1-fosfat a DHAP i L-lactaldehid per minut a 25°C i pH 7.5. El rang lineal de l'assaig és entre 0.19 i 0.60 UA/mL (Durany i col, 2004a).

Anàlisi de l'activitat ramnulosa-1-fosfat aldolasa (*RhuA*)

L'activitat ramnulosa-1-fosfat aldolasa es mesura amb un assaig enzimàtic acoblat (Chiu i Feingold, 1969). En el primer pas, la ramnulosa-1-fosfat es trenca a L-lactaldehid i DHAP catalitzat per la *RhuA*; en el segon pas, la DHAP es redueix emprant glicerol-3-fosfat deshidrogenasa de múscul de conill (GDH) i dinucleòtid adenina nicotina reduït (NADH).

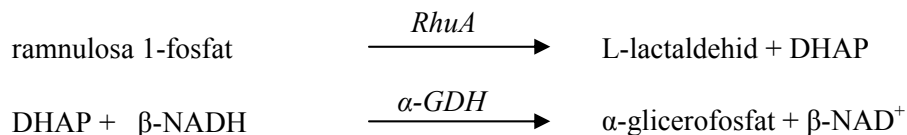


Figura 3.9. Assaig enzimàtic per a la quantificació de *RhuA*

En una cubeta de 1 mL, es mesclen 500 μL Tris 100mM KCl 200 mM pH 7.5, 340 μL aigua, 50 μL de ramnulosa 1-P 40 mM, 50 μL NADH 3mM, 50 μL de GDH 40 UA/mL. Les concentracions finals a la cubeta són: 2 mM de ramnulosa-1-fosfat, 0.15 mM NADH i 2 UA/mL de GDH. L'assaig es du a terme a 25°C i s'inicia amb l'addició de 10 μL de mostra per a determinar la seva activitat enzimàtica. L'evolució de la reacció se segueix mesurant la disminució en absorbància a 340 nm del NADH en un espectrofotòmetre UV-Visible (Cary, Varian).

Una unitat d'activitat (UA) de ramnulosa-1-fosfat aldolasa es defineix com la quantitat d'enzim que converteix 1 μmol de ramnulosa-1-fosfat a DHAP i L-lactaldehid per minut a 25°C i pH 7.5 El rang lineal de l'assaig és entre 0.048 i 1.27 UA/mL (Vidal, 2006).

Anàlisi de l'activitat fructosa 1,6-difosfat aldolasa (*FruA* i *RAMA*)

L'activitat fructosa 1,6-difosfat aldolasa es mesura amb una modificació del mètode publicat per Berry (Berry i Marshall, 1993). El mètode consisteix en un assaig acoblat (veure Figura 3. 10). En el primer pas, la fructosa 1,6-difosfat es trenca a D-gliceraldehid 3-fosfat i DHAP catalitzat per la fructosa 1,6-difosfat aldolasa recombinant (*FruA*) o bé la Fructosa 1,6-difosfat aldolasa de múscul de conill (*RAMA*); en el segon pas, el D-gliceraldehid 3-fosfat s'isomeritza a DHAP catalitzat per la triosa fosfat isomerasa (*TPI*); i la DHAP es redueix emprant glicerol-3-fosfat deshidrogenasa de múscul de conill (GDH) i dinucleòtid adenina nicotina reduït (NADH).

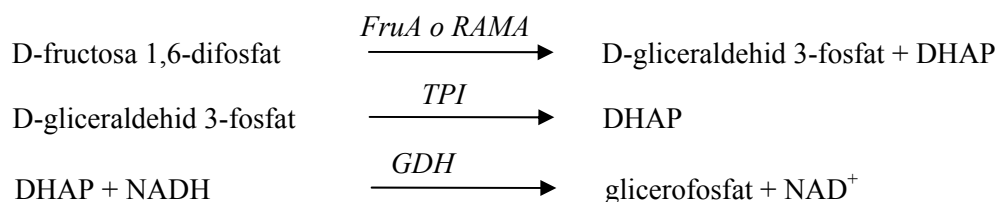


Figura 3.10. Assaig enzimàtic per a la quantificació de *FruA* i *RAMA*

En una cubeta de 1 mL, es mesclen 500 μL Tris 100mM pH 7.5, 378 μL aigua, 50 μL de fructosa 1,6-difosfat 60 mM, 50 μL NADH 3mM, 2 μL de GDH/TPI (suspensió).

Les concentracions finals a la cuveta són: 2 mM de fructosa 1,6-difosfat, 0.15 mM NADH i 2 UA/mL de GDH. L'assaig es du a terme a 30°C i s'inicia amb l'addició de 20 µL de mostra per a determinar la seva activitat enzimàtica. L'evolució de la reacció se segueix mesurant la disminució en absorbància a 340 nm del NADH en un espectrofotòmetre UV-Visible (Cary, Varian).

Una unitat d'activitat (UA) de fructosa 1,6-difosfat aldolasa es defineix com la quantitat d'enzim que converteix 1 µmol de fructosa 1,6-difosfat a DHAP i L-lactaldehid per minut a 30°C i pH 8.

3.2.5. Immobilització de FucA

Les immobilitzacions es realitzen a partir de mantenir en contacte una solució enzimàtica de FucA amb el suport corresponent en les condicions d'immobilització. Es preparen 10 mL de solució enzimàtica dels quals 9 mL es posen en contacte amb el suport i el mil·lilitre restant s'empra com a referència o blanc. La mescla d'immobilització es manté amb agitació i es realitza el seguiment de la immobilització mitjançant la determinació de l'activitat FucA al blanc, la suspensió i el sobrenadant. Així, l'activitat del blanc indica l'estabilitat de l'enzim a les condicions d'immobilització mentre que l'activitat del sobrenadant indica l'activitat en fase líquida i per tant el que resta sense immobilitzar. A partir d'aquestes dos mesures es pot calcular el rendiment d'immobilització per diferència (veure Figura 3.11). L'activitat de la suspensió és una mesura de l'activitat tant en fase líquida com en fase sòlida. Així, si l'enzim manté l'activitat un cop immobilitzat l'activitat de la suspensió correspon a la del blanc, en canvi, si minva l'activitat al immobilitzar-se el perfil de suspensió disminueix. A partir de la diferència entre la suspensió i el sobrenadant es pot obtenir el rendiment d'enzim retingut en forma activa (percentatge d'activitat retinguda).

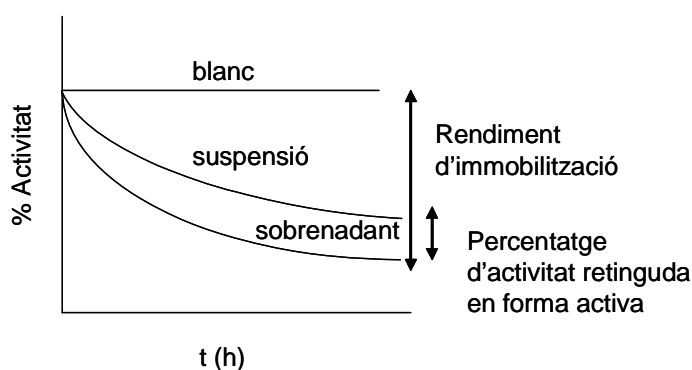


Figura 3.11. Perfils d'activitat del blanc, la suspensió i el sobrenadant en una immobilització.

3.2.5.1. Immobilització a suports d'afinitat (Ni-NTA i Ni-IDA)

Primer es prepara una solució de FucA a partir de FucA pura o a partir d'un lisat cel·lular segons s'especifiqui. Quan es parteix de FucA pura, es centrifuga la FucA pura, emmagatzemada en sulfat amònic a 4°C, a 12000 rpm, 4°C durant 2 minuts; es descarta el sobrenadant i es dissol l'aldolasa en la solució corresponent. Quan es parteix de lisat cel·lular, aquest s'obté de la mateixa manera que en la seva purificació (veure apartat 3.2.3).

Es preparen 10 mL de solució FucA a la concentració desitjada dissolta en 50 mM fosfat sòdic 300 mM NaCl pH 8. Es mesclen 9 mL d'aquesta amb 0.7 mL de suport d'afinitat (Ni-IDA o Ni-NTA), i la resta s'empra com a referència (blanc) per a determinar l'estabilitat enzimàtica sota les condicions d'immobilització. La mescla d'immobilització s'agita. S'analitza l'activitat FucA de mostres homogènies del sobrenadant, la suspensió i el blanc a mesura que avança el procés.

3.2.5.2. Immobilització en forma de CLEA

Es preparen 10 mL de solució FucA a 10 UA/mL 0.1 M fosfat sòdic 2.7 M sulfat amònic pH 7.0 a partir de la FucA emmagatzemada amb sulfat amònic centrifugant-ne el volum necessari a 4°C i 12000 rpm durant 2 minuts; es descarta el sobrenadant i es dissol l'aldolasa en la solució esmentada. En el cas de treballar a diferents pHs, se substitueix per 0.1 M acetat sòdic 2.7 M sulfat amònic pH 5.0 o bé 0.1 M glicina 2.7 M sulfat amònic pH 9.0. Se separa una part de solució FucA com a blanc i s'addiciona la quantitat necessària de glutaraldehid 0.25 M per assolir la concentració final desitjada. La mescla s'agita mecànicament. Se segueix l'evolució de la immobilització mesurant l'activitat FucA del blanc, la suspensió i del sobrenadant. Les mostres d'immobilització es centrifuguen i el precipitat resultant es resuspèn en solució tamponadora 0.1M fosfat sòdic pH 7.0 per tal d'eliminar el sulfat amònic.

3.2.5.3. Immobilització a suports d'agarosa

Activació d'agarosa amb grups aldehid

Els gels glioxal-agarosa (agarosa-O-CH₂-CHO) es preparen per esterificació amb glicidol (2,3-epoxypropanol) i després s'oxiden amb periodat sòdic (Guisán, 1988). L'activació desitjada s'obté de 30 a 300 µmol RCHO/ mL suport) variant la quantitat de periodat durant el pas d'oxidació del suport.

Immobilització de FucA a suports d'agarosa

Es preparen 10 mL de solució FucA a la concentració desitjada (1.7 UA/mL excepte quan s'especifica), a temperatura i pH apropiats emprant 55 mM NaHCO₃ (rang 8 < pH < 10). Es mesclen 9 mL d'aquesta solució amb 0.7 mL d'agarosa activada amb grups aldehids, i la resta s'empra com a referència (blanc) per a determinar l'estabilitat enzimàtica baix les condicions d'immobilització. La mescla d'immobilització s'agita. S'analitza l'activitat FucA de mostres homogènies del blanc, sobrenadant i la suspensió a mesura que avança el procés. Després d'aquesta etapa es realitza l'etapa de reducció amb NaBH₄ a 1 mg/mL durant 30 minuts. Finalment, el derivat FucA-agarosa se separa del sobrenadant per filtració, es renta amb aigua i es guarda a 4°C.

3.2.5.4. Immobilització covalent en suport Eupergit C

Activació de l'Eupergit C

L'Eupergit C s'empra activat amb grups epòxid i amb grups aldehid. L'Eupergit C comercial està activat amb grups epòxid, així, per a emprar-lo amb grups aldehid cal activar-lo amb aquests grups i per tant, s'ha de sotmetre a diferents processos. Primer s'hidrolitzen els grups epòxids mantenint el suport en solució 10 mM H₂SO₄ a raó de 50 mL solució per 5 grams de suport durant 24 hores. Es renta el suport amb aigua,

s'activa amb glicidol i s'oxida amb periodat sòdic seguint el mateix protocol que per a agarosa (Guisán, 1988).

Immobilització de FucA a suport Eupergit C

La immobilització amb grups epòxid a pH 8 es realitza mesclant 9 mL de FucA a 12 UA/mL a 0.5M de fosfat sòdic pH 8.0 amb 1 mL de suport. Es manté en contacte amb agitació suau. Se segueix la immobilització mitjançant la mesura de l'activitat FucA al sobrenadant, la suspensió i el blanc. Es redueixen els enllaços formats durant 2 h a 0.1M fosfat sòdic 0.1M etanolamina pH 8.0. El derivat obtingut es renta amb aigua i s'emmagatzema a 4°C.

La immobilització amb grups aldehid es realitza a partir de 9 mL de solució de FucA a 12 UA/mL dissolta en solució tamponadora 200 mM NaHCO₃ pH 10 i 0.7 mL de suport. S'agita la mescla d'immobilització i se segueix la immobilització amb el test enzimàtic de la FucA. Un cop finalitzat, es redueix l'enllaç format entre el suport i l'enzim amb 10 mg NaBH₄/mL durant 30 minuts. El derivat obtingut es renta abundantment amb aigua i s'emmagatzema.

3.2.5.5. Trencament del derivat FucA

En els estudis de la càrrega enzimàtica de la immobilització de FucA per adsorció a reïnes d'afinitat i per formació d'enllaç covalent a agarosa, els derivats FucA obtinguts se sotmeten a un procés de trencament. Concretament, es mesclen 0.29 mL de derivat FucA amb 1 mL de 50 mM Tris·HCl 150 mM KCl pH 7.5 i s'agita vigorosament per a trencar el derivat en trossos de mida menor. Se segueix el trencament analitzant l'activitat FucA de la suspensió fins a assolir un valor constant.

3.2.6. Incubació del derivat FucA-agarosa en presència de Zn²⁺

Es mesclen 0.29 mL de derivat FucA amb 1 mL de 50 mM Tris·HCl 150 mM KCl pH 7.5 S'analitza l'activitat FucA i s'afegeix 20 µL de 0.5M ZnSO₄ per a obtenir una concentració final de 32 mM ZnSO₄. La suspensió s'agita vigorosament durant 45 minuts. Després el derivat FucA-agarosa es filtra amb un filtre Rosich número 2, es renta amb aigua i es mescla amb 1 mL de 50 mM Tris·HCl 150 mM KCl pH 7.5 i s'analitza l'activitat FucA del final del procés.

3.2.7. Reaccions de DHAP

3.2.7.1. Consum de DHAP en dimetilformamida/aigua

Es dissolen 0.08 mmol de DHAPLi₂ en solució aquosa i 0.5 mL de dimetilformamida per a obtenir un volum de reacció final de 2.5 mL a 50 mM TrisHCl 150 mM KCl pH 7.0. Se segueix l'evolució de la DHAP a les diferents temperatures (-1, 4, 10, 25 i 40°C).

3.2.7.2. Consum de DHAP en presència d'aldolases en dimetilformamida/aigua

Es dissolen 0.08 mmol de DHAPLi₂ en solució aquosa i 0.5 mL de dimetilformamida per a obtenir un volum de reacció final de 2.5 mL a 50 mM TrisHCl 150 mM KCl pH 7.0. Després, s'afegeix 7.5 UA FucA i se segueix l'evolució de la DHAP a les diferents

temperatures (-1, 4, 10, 25 i 40°C). El mateix procediment se segueix per a: FucA-Co²⁺ (fuculosa 1-fosfat aldolasa purificada amb reïna d'afinitat amb Co²⁺), RhuA, FruA d'*E.coli* i FruA de múscul de conill (RAMA) a 4°C.

Per a l'estudi de la inhibició del fosfat es preparen 2.5 mL de reacció a concentració 40 mM de DHAP. Per assegurar que el pH es manté neutre tot i treballar a concentracions elevades de fosfat, se substitueix el TrisHCl per solucions tamponadores de fosfat a pH 7 a diferents concentracions 13, 33, 70, 109, 174 i 268 mM fosfat, mantenint el 20% de DMF.

Per a l'estudi de la inhibició del metilglixal es preparen 2.5mL de reacció a concentració de DHAP 40 mM i s'afegeix metilglixal per assolir una concentració final al medi de reacció de 50, 120 i 200 mM.

Per a la determinació dels paràmetres de la reacció secundària o de degradació de DHAP en l'estudi del model cinètic (apartat 5), es preparen 2.5mL de reacció a diferents concentracions inicials de DHAP i se segueix el consum de substrat a 4°C.

3.2.8. Addicions aldòliques

3.2.8.1. Reaccions d'addició aldòlica en DMF/aigua

L'aldehid (S)-Cbz-alaninal es dissol en 1 mL de dimetilformamida (DMF) i s'afegeix la DHAPLi₂ dissolta en 4 mL de solució tamponadora per assolir la concentració final dels reactius desitjada i la concentració final del medi de reacció (50mM TrisHCl 150 mM KCl 20% DMF pH 7.0). Llavors, per començar la reacció s'afegeixen 15 UA de FucA i es manté el medi amb agitació constant i a la temperatura de treball. El progrés de la reacció se segueix mesurant la DHAP, l'(S)-Cbz-alaninal i el producte de condensació aldòlica pels mètodes analítics explicats en aquest apartat.

En la reacció amb addició discreta de DHAP catalitzada per FucA soluble de l'apartat 4.4, s'afegeix 0.16 mmol de DHAP en 5 addicions de 0.032 mmol.

En la reacció catalitzada pel derivat FucA-agarosa de l'apartat 7.3 i 7.4, es mesclen 0.7 mL de derivat FucA-agarosa amb 4 mL de medi de reacció amb la quantitat necessària de reactius per assolir les concentracions desitjades.

En les reaccions amb addició discreta de DHAP dels apartats 5.4.4 i 7.5, s'afegeix 0.13 mmol de DHAP en 5 addicions de 0.027 mmol. Les reaccions es duen a terme a les concentracions indicades en els apartats esmentats. Quan s'empra el derivat FucA-agarosa, es mesclen 0.7 mL de derivat FucA-agarosa amb 5 mL de medi de reacció; s'agafa 1 mL d'aquesta mescla FucA-agarosa i es mescla amb 4 mL de reacció amb el (S)-Cbz-alaninal dissolt assolint 5 mL de reacció finals.

3.2.8.2. Reaccions d'addició aldòlica en gel emulsió

Es preparen 5 mL d'emulsió mesclant solució tamponadora 50 mM Tris·HCl (90% w/w); surfactant èter tetra(etilenglicol)tetradecil, C₁₄H₂₉(OCH₂-CH₂)₄OH (C₁₄E₄) (4% w/w), a una relació de 4:1 (mols d'òxid etilè / surfactant); i un hidrocarbur alifàtic,

hexadecà (C_{16}) (6% w/w). L'oli, el surfactant i l'aldehid corresponent (Cbz-amino-propanal, (S)-Cbz-alaninal, Cbz-(R)-alaninal) es mesclen vigorosament. Després la solució de DHAP en solució tamponadora a pH 6.9 s'afegeix gota a gota amb un vortex (Espelt *et al*, 2003; Espelt *et al* 2005). Finalment, la FucA soluble (15 UA) s'afegeix i es mescla vigorosament. Es manté en agitació horitzontal i a temperatura constant (4°C). Les mostres de reacció 0.050 mL es mesclen amb 0.5 mL d'aigua per tal de trencar l'emulsió. S'analitza el progrés de la reacció mesurant la DHAP, l'aldehid i el producte de condensació aldòlica pels mètodes analítics explicats en aquest apartat.

3.2.9. Estudi de les limitacions de transferència de matèria interna en el derivat FucA-agarosa

Es mesclen 0.7 mL de derivat FucA amb 5 mL de medi aquós 20% v/v DMF i s'agita mecànicament i vigorosament. S'analitza l'activitat FucA mitjançant el test enzimàtic de la FucA i la reacció de síntesi entre la DHAP i el (S)-Cbz-alaninal en medi aquós 20% v/v DMF. L'addició aldòlica es du a terme en 5 mL totals on 1 mL correspon a la mescla FucA-agarosa en el medi de reacció esmentat.

3.2.10. Estabilitat tèrmica de la FucA en el medi de reacció

Per l'estudi d'estabilitat de la FucA soluble en medi aquós 20% v/v DMF, es dissolen 15 UA en 5 mL de medi de reacció 50 mM Tris·HCl, 150 mM KCl, 20% v/v DMF pH 7 i s'incuba a diferents temperatures (4, 25 i 40°C). Es mesura l'activitat FucA a diferents temps d'incubació.

Els estudis d'estabilitat del derivat FucA-agarosa en medi aquós 20% v/v DMF, es realitzen mesclant 0.7 mL de derivat (1.04 g/mL suport, 3 UA/mL suport) amb 3 mL de 50 mM Tris·HCl, 150 mM KCl, 20% DMF pH 7 a 25°C. Es mesura l'activitat FucA a diferents temps del derivat FucA-agarosa i de FucA soluble com a referència a les mateixes condicions.

En els estudis en medi d'emulsió concentrada aigua en oli, es preparen 5 mL d'emulsió i la FucA soluble s'afegeix a la concentració desitjada. L'emulsió es formula amb solució tamponadora 50 mM Tris·HCl (90% w/w), surfactant èter tetra(etilenglicol)tetradecil, $C_{14}H_{29}(OCH_2-CH_2)_4OH$ ($C_{14}E_4$) (4% w/w), a una relació de 4:1 (mols d'òxid etilè / surfactant) i un hidrocarbur alifàtic, hexadecà (C_{16}) (6% w/w). L'oli i el surfactant es mesclen vigorosament. Després la solució tamponadora a pH 7.0 s'afegeix gota a gota amb un vortex (Espelt *et al*, 2003; Espelt *et al* 2005). Finalment, la FucA soluble (30 UA, 0.18mL) s'afegeix i es mescla vigorosament. El medi final té un volum de 5.18mL. Es manté en agitació horitzontal i a temperatura constant (25°C). S'analitza l'activitat FucA a diferents temps de les mostres d'emulsió que es trenca afegint 0.5mL d'aigua a 0.050 mL de mostra.

3.2.11. Model cinètic per a l'addició aldòlica entre DHAP i Cbz-S-alaninal catalitzada per FucA

3.2.11.1. Deducció de les equacions de les velocitats de reacció. Mètode de King-Altman

El mètode de King-Altman permet obtenir equacions de les velocitats de reacció en estat pseudoestacionari. Es basa en la consideració de les reaccions involucrades com un sistema cíclic que relaciona les diferents formes enzimàtiques.

Plantejant l'equació de la velocitat de reacció i multiplicant i dividint per la concentració inicial d'enzim (E_0) s'obté una relació de concentracions enzimàtiques. Aquesta relació és la que es dedueix a partir de l'esquema cíclic de les formes enzimàtiques del sistema de reacció.

Així, en general,

$$r = k[ES] = k[E]_0 \frac{[ES]}{[E]_0} = r_m \frac{[ES]}{[E]_0}$$

En qualsevol moment la concentració dels diferents complexos enzimàtics és igual a la concentració inicial enzimàtica.

$$[E]_0 = [E] + [EA] + [EAB] + [EP]$$

Segons el mètode de King-Altman aquestes concentracions enzimàtiques són proporcionals a les combinacions de vies d'obtenció de cada una d'aquestes espècies, essent vàlides les combinacions que uneixen a tots els complexos enzimàtics involucrats. Així cada una d'aquestes combinacions és un producte de constants cinètiques i, la relació de concentracions enzimàtiques esdevé:

$$\frac{[E]_i}{[E]_0} = \frac{\text{suma de productes de constants cinètiques per } E_i}{\text{suma de productes de constants cinètiques per } E_0}$$

3.2.11.2. Ajust dels paràmetres cinètics amb el software gPROMS.

gPROMS és un sistema de modelització de procés general (PROcess Modelling System) per a simular, optimitzar i estimar paràmetres de processos complexos. El mòdul d'estimació determina els paràmetres del model que ajusta a les dades experimentals minimitzant la funció objectiu que té en compte la suma dels errors al quadrat de totes les mesures i la variança de cada variable segons es pot veure en la següent equació:

$$\phi = \frac{N}{2} \ln(2\pi) + \frac{1}{2} \min_{\theta} \left\{ \sum_{i=1}^{NE} \sum_{j=1}^{NV_i} \sum_{k=1}^{NM_{ij}} \left[\ln(\sigma_{ijk}^2 + \frac{(\tilde{z}_{ijk} - z_{ijk})^2}{\sigma_{ijk}^2}) \right] \right\}$$

On,

Φ , funció objectiu

N , número total de mesures en tots els experiments

θ , conjunt de paràmetres a estimar

NE , número d'experiments realitzats

NV_i , número de variables mesurades en l'experiment i

NM_{ij} , número de mesures de la variable j en l'experiment i

σ_{ijk}^2 , variança de la mesura k de la variable j en l'experiment i

z_{ijk} , mesura k de la variable j en l'experiment i

Z_{ijk} , mesura k predita pel model de la variable j en l'experiment i

El criteri de convergència s'assoleix quan

$$\frac{1}{|\phi^*| + 1.0} \left(\left| \sum_j \frac{\partial \phi^*}{\partial \theta_j} \delta \theta_j \right| + \sum_j |\mu_j| \max(0, \theta_j^L - \theta_j^*, \theta_j^* - \theta_j^U) \right) \sum_j \max(0, \theta_j^L - \theta_j^*, \theta_j^* - \theta_j^U) \leq OptTol$$

essent,

$OptTol = 10^{-3}$

θ_j , paràmetre j a estimar

θ_j^* , valor final del paràmetre j

θ_j^L , límit inferior imposat del paràmetre j

θ_j^U , límit superior imposat del paràmetre j

Φ^* , valor final de la funció objectiu

$\delta \theta_j$, últim pas agafat en el paràmetre j en la última iteració del càlcul d'estimació del paràmetre

μ_j , 'multiplicador de Lagrange que correspon a les restriccions de contorn imposades en el paràmetre θ_j

CAPÍTOL 4

ADDICIÓ ALDÒLICA ENTRE DIHIDROXIACETONA FOSFAT (DHAP) I (S)-CBZ-ALANINAL CATALITZADA PER FUCULOSA 1-FOSFAT ALDOLASA (FucA) SOLUBLE

4.1. Addició aldòlica entre DHAP i (S)-Cbz-alaninal catalitzada per FucA soluble

La reacció model del present estudi és l'addició aldòlica entre la dihidroxiacetona fosfat (DHAP) i l'aldehid (S)-Cbz-alaninal que dona l'aminopoliol mostrat en la Figura 4.1. Com s'ha esmentat a l'apartat d'introducció, les aldolases depenents de DHAP són molt específiques per aquest substrat, en canvi, es pot emprar un rang ampli d'aldehids com a substrat acceptor.

El (S)-Cbz-alaninal s'ha seleccionat com a substrat acceptor en la síntesi aldòlica model per diferents raons: és un cas d'aldehid hidròfob, el producte d'addició aldòlica resultant s'obté amb el 100% d'estereoselectivitat (Espelt *et al*, 2005) i a partir d'aquest es pot obtenir un antitumoral potencial ja que ho indiquen els resultats del test d'activitat biològica. La protecció de l'aldehid amb un grup Cbz a més de protegir el grup amino permet una anàlisi senzilla per HPLC de fase reversa tant de l'aldehid com del producte d'addició aldòlica.

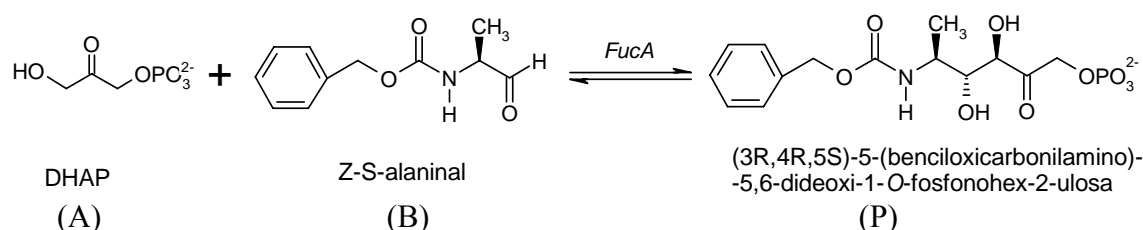


Figura 4.1. Reacció model: síntesi aldòlica entre (S)-Cbz-alaninal i dihidroxiacetona fosfat (DHAP) catalitzada per fuculosa 1-fosfat aldolasa (FucA).

La reacció de síntesi entre la DHAP i el (S)-Cbz-alaninal es du a terme en medi aquós amb 20% DMF com a cosolvent a pH 7 per tal d'assegurar la solubilitat d'ambdós substrats. S'empra com a biocatalitzador la FucA recombinant soluble sobreexpressada en *E. Coli* amb 6 histidines com a cua de fusió produïda en el nostre laboratori segons els processos descrits (Durany *et al*, 2004b). La DHAP és el reactiu limitant, i s'empra un excés de 1.75 d'aldehid (Espelt i col, 2005) (veure materials i mètodes).

Es realitza una primera addició aldòlica catalitzada per FucA soluble a 25°C a concentració inicial de substrats 28 mM DHAP i 48 mM (S)-Cbz-alaninal i 11 UA/mL reacció. En la Figura 4.2 es presenten els perfils dels reactius i el producte de síntesi. Es pot observar que tot i que, els mols d'aldehid reaccionats coincideixen amb els mols de

producte obtinguts segons indica l'estequiometria, s'obté un rendiment moderat del 44.1% i la selectivitat és del 46.3% (definida com a mol de producte format per mol de substrat limitant convertit). Segons aquestes dades, més d'un 50% de la DHAP reaccionada no condueix a producte, per tant, aquest substrat no només desapareix per la via d'addició aldòlica si no que desapareix per reaccions secundàries no desitjades que es produeixen en paral·lel i competeixen pel mateix substrat DHAP.

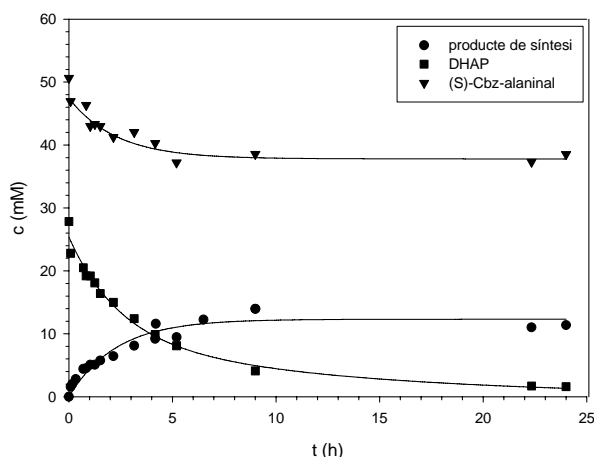


Figura 4.2. Evolució de l'addició aldòlica de (S)-Cbz-alaninal a DHAP catalitzat per FucA en DMF/aigua (1/4) a 25°C, pH 7. Perfils de concentració del producte de síntesi (●), DHAP (■) i (S)-Cbz-alaninal (▼).

S'han trobat referenciades en diferents fonts (Fessner *et al*, 1996, Phillips *et al*, 1993; Richard, 1984, 1993) la reacció d'isomerització i la reacció de degradació de la DHAP en medi aquós. Es descriu que ambdues reaccions tenen un pas intermedi de formació d'un enediolat, aquest pas es presenta esquematitzat en la Figura 4.3. Un cop la DHAP es desprotona per formar l'enediolat aquest dona productes de descomposició ja sigui per la via d'isomerització o la via de degradació (Richard, 1993). La via d'isomerització condueix a gliceraldehid fosfat, essent aquest pas reversible. En canvi, la via de degradació és irreversible obtenint-se dos productes de degradació: metilglioxal i fosfat inorgànic. Ara bé, s'ha descrit que al medi de reacció només hi ha presents dos productes: fosfat inorgànic a proporció estequiomètrica i una petita quantitat de metilglioxal perquè aquest reacciona ràpidament formant un polímer groc (Richard, 1993). La descomposició irreversible de la DHAP s'ha postulat de primer ordre respecte la DHAP a pH neutre entre 7 i 9 (Phillips *et al*, 1993; Richard, 1984).

De fet, l'evidència d'una conversió no-sintètica significativa de la DHAP a pH 7 i el color groc de la solució de la reacció aldòlica, fa postular la presència d'aquestes reaccions paral·leles que involucren el substrat DHAP.

Així, un cop identificades les reaccions secundàries caldrà estudiar en quines condicions es duen a terme aquestes reaccions i, a més a més, realitzar diferents estratègies per a millorar el rendiment i la selectivitat de la reacció de síntesi.

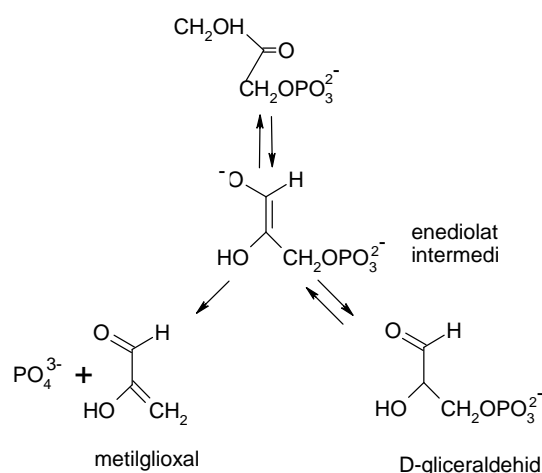


Figura 4.3. Mecanismes d'isomerització i de descomposició de DHAP.

Per una banda, si la reacció de síntesi i les reaccions secundàries tenen diferent ordre de reacció es pot maximitzar la reacció de síntesi augmentant o disminuint la concentració de DHAP en funció de si l'ordre de reacció de la síntesi és major o menor a l'ordre de reacció de la secundària respectivament. Com es veurà més endavant en l'elaboració del model cinètic (capítol 5), l'ordre respecte de la DHAP d'ambdues reaccions és similar. Llavors, l'efecte de la concentració vindrà donat per la relació molar dels reactius o més concretament per l'excés de l'(S)-Cbz-alaninal que farà augmentar la reacció de síntesi.

Per altra banda, es poden modificar les velocitats de reacció aprofitant la diferent energia d'activació de les reaccions i per tant, la diferent influència de la temperatura de treball. Així, si l'energia d'activació de la reacció de síntesi és menor a l'energia d'activació de la reacció secundària, convindrà treballar a la mínima temperatura possible ja que la velocitat de reacció secundària disminuirà més ràpidament amb la temperatura que la velocitat de reacció de síntesi. En el cas contrari, la temperatura òptima serà la màxima.

4.2. Efecte de la temperatura en l'addició aldòlica

Per tal d'estudiar l'efecte de la temperatura en l'addició aldòlica es duen a terme diferents experiments a -1, 4 i 40 °C a les mateixes condicions que la reacció de síntesi a 25°C presentada anteriorment. La temperatura mínima de treball (-1°C) ve determinada pel rang de solubilitat dels substrats i la màxima té en compte l'estabilitat de la FucA en el medi de reacció.

Els resultats dels perfils dels substrats i el producte de síntesi a cadascuna d'aquestes temperatures es mostren a la Figura 4.4. La velocitat de reacció és funció de la temperatura de treball, essent la reacció a -1°C tan lenta que calen 100h per a assolir el rendiment final. En canvi, la concentració final de producte i en conseqüència el rendiment de síntesi és funció inversa de la temperatura de treball. Aquest resultat indica que l'energia d'activació de la reacció de síntesi és menor a l'energia d'activació de la reacció secundària, afavorint-se la reacció de síntesi a temperatures baixes.

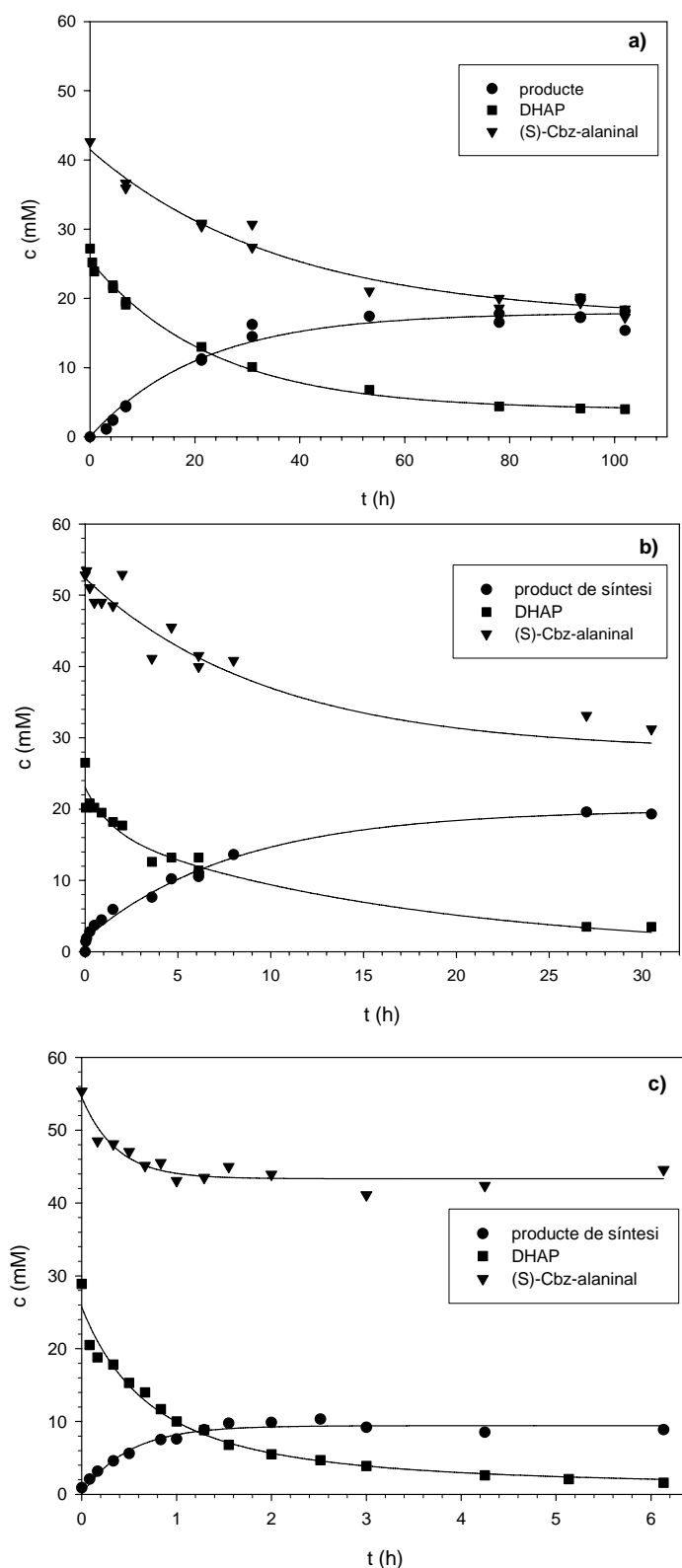


Figura 4.4. Evolució de l'addició aldòlica de (S)-Cbz-alaninal a DHAP catalitzat per FucA en DMF/aigua (1/4), pH 7 i temperatura variable: a) -1°C ; b) 4°C ; c) 40°C . Perfils de concentració del producte de síntesi (●), DHAP (■) i (S)-Cbz-alaninal (▼).

A la Taula 4.1 es presenten el rendiment i la selectivitat de la síntesi en funció de la temperatura de treball. Es pot observar que la velocitat relativa de la síntesi del producte i les reaccions secundàries està fortament influenciada per la temperatura, afavorint-se la reacció desitjada al disminuir la temperatura. Els resultats finals a les dues temperatures menors són molt semblants però, com s'ha esmentat anteriorment, a -1°C la velocitat de reacció és molt menor, de forma que es considera 4°C com a la temperatura òptima de treball.

Taula 4.1. Rendiment i selectivitat de les reaccions d'addició aldòlica de (S)-Cbz-alaninal a DHAP catalitzades per FucA en DMF/aigua a diferents temperatures.

T (°C)	Rendiment (%)	Selectivitat (%)
-1	73.2	86.1
4	73.6	82.0
25	44.1	46.3
40	31.5	35.1

La comparació de les velocitats de reacció es pot fer gràficament amb els resultats de les reaccions a 4, 25 i 40°C. Així, en la Figura 4.5. es presenta el gràfic d'Arrhenius de les velocitats inicials observades de la formació de producte i la desaparició de DHAP (aquesta última inclou totes les reaccions en la que la DHAP és el substrat). S'observa que la variació de les velocitats inicials és diferent, tenint major pendent la velocitat de degradació de DHAP; de forma que a mesura que augmenta $1/T$ i per tant, disminueix la temperatura, els valors d'ambdues velocitats s'apropen, indicant que es minimitzen les reaccions secundàries de degradació de DHAP i s'afavoreix la reacció de síntesi.

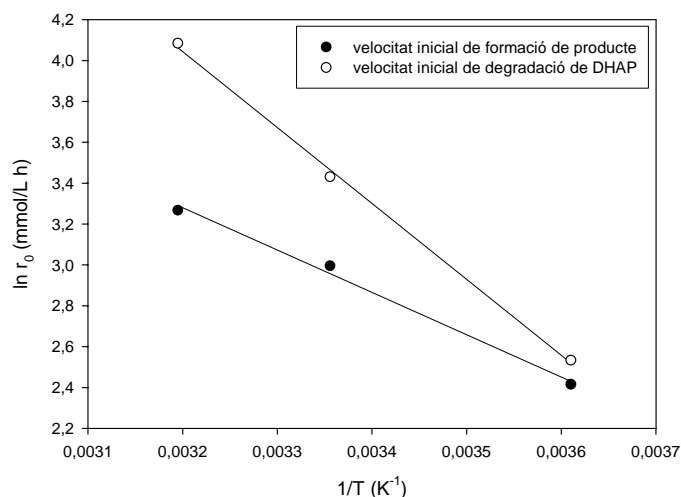


Figura 4.5. Gràfic d'Arrhenius de les velocitats inicials observades de formació de producte de síntesi (●) i de degradació de DHAP (○) en la síntesi entre DHAP i (S)-Cbz-alaninal catalitzada per FucA.

En quant a la desactivació de la FucA en medi DMF/aigua (1/4 v/v) és prou diferent dins del rang de temperatures de treball. A la Figura 4.6. es pot veure el percentatge d'activitat romanent al llarg del temps. Es pot determinar el valor que correspon al final de la reacció de síntesi per les diferents temperatures i mentre que a 25°C i 40°C resta un 75% (8h) i un 41% (2h) de l'activitat inicial respectivament, a 4°C es pot considerar que l'enzim és estable.

Així, treballant a temperatura ambient, diverses fonts bibliogràfiques (Fessner *et al*, 1991; von der Osten *et al*, 1989) esmenten la necessitat d'estabilitzar l'aldolasa, p.ex. amb l'addició de 0.3mM ZnCl₂ en que la vida mitjana augmenta de 3 a 60 dies a pH 7.5, fet que esdevindria innecessari si es treballés a baixa temperatura.

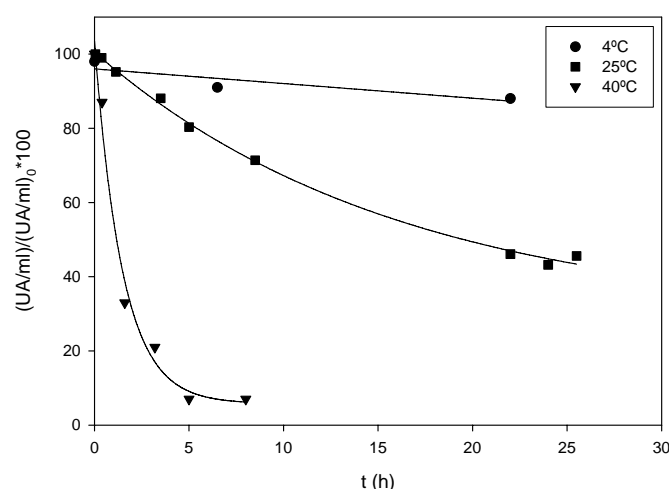


Figura 4.6. Desactivació de FucA a diferents temperatures en medi DMF/aigua (1/4), pH 7.

Amb l'estudi de l'efecte de la temperatura en la reacció de síntesi es conclou que convé treballar a 4°C, temperatura a la qual la FucA és estable, es minimitzen les reaccions secundàries de degradació de DHAP i s'obté un rendiment i selectivitat elevats (74% i 82%) amb un temps de reacció raonable.

4.3. Estudi de les reaccions secundàries.

Com s'ha esmentat anteriorment, les reaccions secundàries proposades es duen a terme a través d'un intermedi enediolat (Figura 4.3.). Aquest intermedi coincideix amb el que es forma segons el mecanisme catalític proposat per les aldolases dependents de DHAP de tipus II, és a dir, per les aldolases de bacteris i fongs que contenen un metall divalent en el seu centre actiu. En la Figura 4.7. es mostra el mecanisme per al cas de la RhuA i de la FucA.

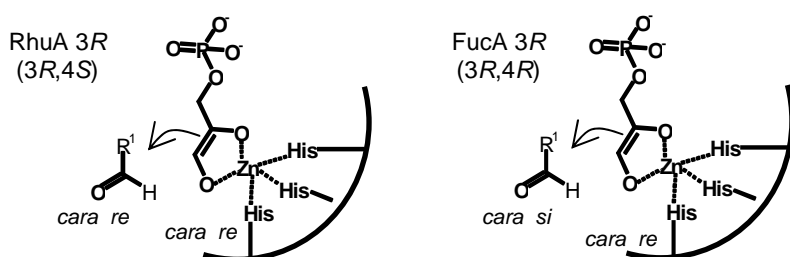


Figura 4.7. Mecanisme de tipus II de les aldolases ramnulosa 1-fosfat aldolasa (RhuA) i fuculosa 1-fosfat aldolasa (FucA).

Es podria formular la hipòtesi de que les reaccions secundàries no desitjades poden ser a més de la degradació de la DHAP química també la degradació de la DHAP catalitzada enzimàticament per la FucA. De fet, s'han descrit algunes activitats no usuals per a aldolases de tipus II via l'intermedi enediolat (Hixon et al, 1996).

Per tal d'elucidar aquest punt, s'estudien les possibles reaccions de la DHAP en absència de l'acceptor aldehid per tal d'observar només les reaccions secundàries en absència i presència de FucA a diferents temperatures (Figura 4.8a i b). Com es pot observar, a totes les temperatures de treball, la conversió de DHAP és major quan la FucA és present en el medi de reacció, de forma que la contribució de la FucA a la degradació de DHAP esdevé evident.

En els experiments que contenen FucA (Fig 4.8b) coexisteixen ambdues vies de degradació de DHAP: les vies enzimàtiques i les vies químiques. A temperatures baixes, on només l'efecte de la catàlisi enzimàtica és significant, la concentració de DHAP decreix fins a arribar un valor quasi constant. En canvi, a temperatures majors ambdós mecanismes condueixen a una disminució progressiva. Cal tenir en compte el possible efecte inhibitori del metilglioxal i del fosfat inorgànic en l'activitat aldolàsica (Fessner *et al*, 1996), que podria parar la conversió de la DHAP a temperatures baixes de treball. D'altra banda, el progrés de la reacció a temperatures elevades podria ser degut a la significant degradació química de la DHAP que tindria lloc malgrat la degradació enzimàtica s'hagués aturat per la inactivació de la FucA.

En la Figura 4.9. es presenta el gràfic d'Arrhenius per a la degradació no-enzimàtica de la DHAP obtingut a partir del càlcul de les velocitats de reacció de primer ordre de les dades experimentals presentades en el gràfic 4.8 a). Es pot observar que la dependència de la temperatura obtinguda concorda amb les dades experimentals de la literatura (Phillips *et al*, 1993; Richard *et al*, 1984). L'energia d'activació es pot determinar per a la degradació no-enzimàtica de la DHAP, obtenint un valor de 66.2 kJ/mol. Des d'un punt de vista pràctic, la degradació de la DHAP en el medi de reacció sense enzim és molt baix a temperatures iguals o menors a 10°C, essent menyspreable en front de la degradació enzimàtica.

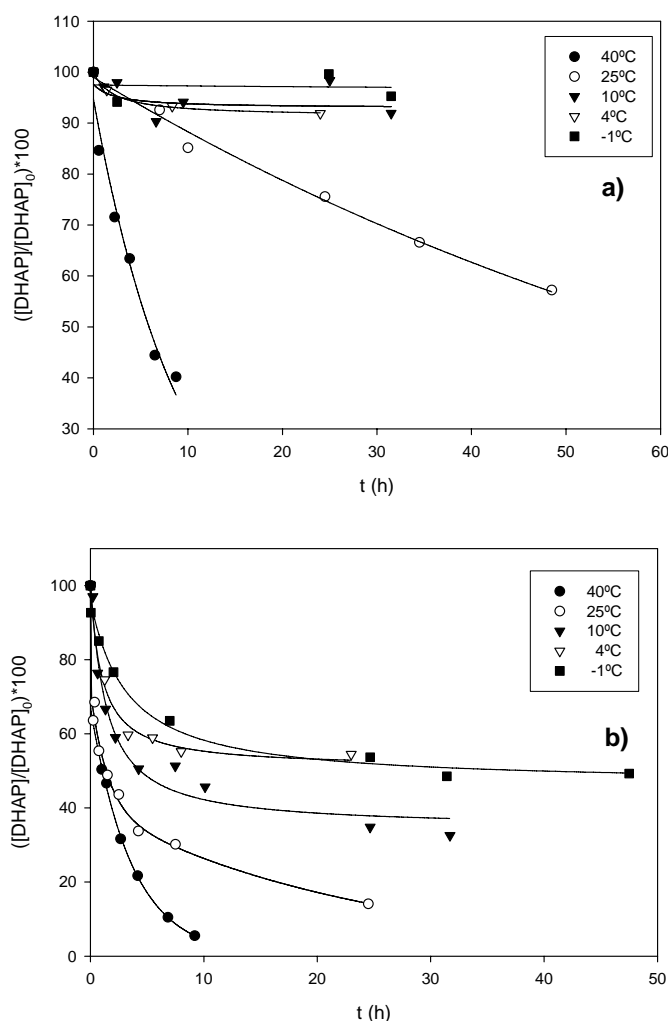


Figura 4.8. Degradació de la DHAP en absència de FucA (a) i degradació de la DHAP en presència de FucA (b) en DMF/aigua (1/4), pH 7, a diferents temperatures, expressades com a evolució de la concentració de DHAP respecte de la concentració inicial amb el temps.

Segons els resultats, esdevé evident la importància de la ruta enzimàtica de consum de DHAP. Si es du a terme via l'intermedi enediolat, la desaparició de la DHAP també ocorrerà amb les altres aldolases de tipus II i, només amb aquestes perquè segons el mecanisme de les aldolases de tipus I no es forma un enediolat, si no que es forma una base de Schiff. Per tal de confirmar aquesta hipòtesi, s'estudia el comportament de la degradació de DHAP en presència d'altres aldolases depenents de DHAP, ramnulosa 1-fosfat aldolasa (RhuA) i fructosa 1,6-difosfat (RAMA o FruA, de tipus I i tipus II respectivament). Els experiments es duen a terme a 4°C per tal de seguir només l'efecte de la catàlisi enzimàtica ja que a aquesta temperatura es pot menysprear la reacció química.

Els resultats obtinguts amb la RhuA de tipus II són molt semblants als de la FucA. Respecte a la fructosa 1,6-difosfat aldolasa, s'estudia la desaparició de la DHAP en presència de l'enzim recombinant d'*E. Coli* de tipus II (FruA) i l'enzim de múscul de conill de tipus I (RAMA). Com es pot veure a la Figura 4.10, la concentració de DHAP es manté constant en presència de RAMA, en canvi, disminueix en presència de FruA.

Aquest resultat confirma que només les aldolases de tipus II catalitzen la conversió de DHAP i que es du a terme via l'intermedi enediolat segons el mecanisme proposat per aquestes aldolases.

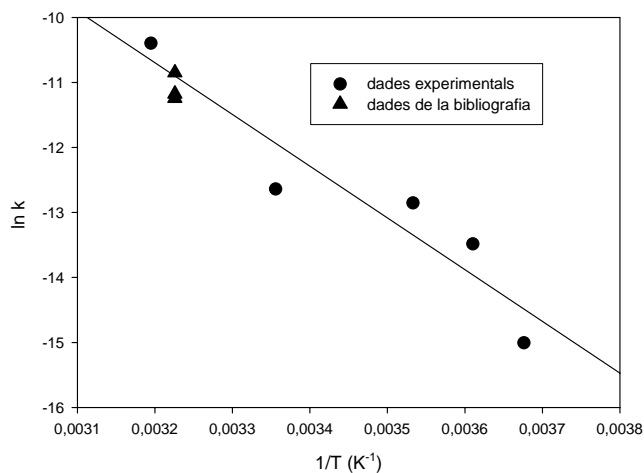


Figura 4.9. Gràfic d'Arrhenius de la constant de primer ordre de la degradació química de DHAP (calculada i referenciada). Regressió lineal de les dades experimentals d'aquest treball.

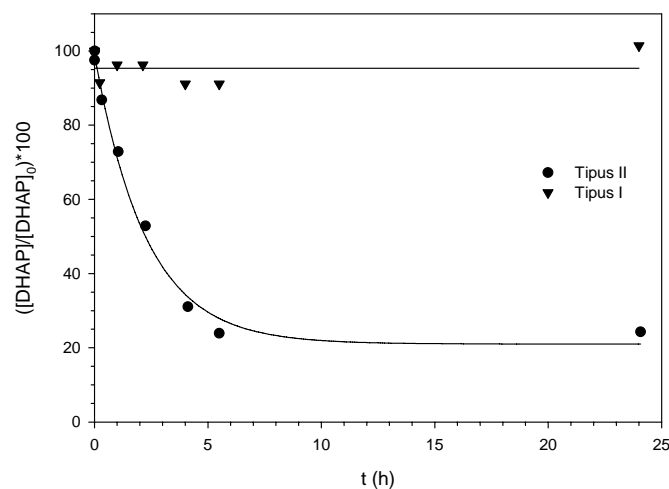


Figura 4.10. Degradació enzimàtica de DHAP catalitzada per FruA de tipus I (▼) i tipus II (●) en medi DMF/aigua (1/4), pH 7, a 4°C, expressades com a evolució de la concentració de DHAP respecte de la concentració inicial amb el temps.

4.4. Efecte de les concentracions de DHAP i (S)-Cbz-alaninal en l'addició aldòlica

Per tal d'estudiar l'efecte de les concentracions dels substrats DHAP i (S)-Cbz-alaninal es planteja dur a terme una operació en discontinu alimentat, és a dir, amb addicions discretes de DHAP. Aquest mètode d'operació s'implementa emprant la mateixa concentració inicial de (S)-Cbz-alaninal que en les reaccions en discontinu i distribuint la concentració final de DHAP en 5 addicions. La reacció es du a terme a la temperatura òptima, 4°C. A la Figura 4.11 es presenten els resultats del rendiment acumulat en les 5 addicions. Es pot observar que el rendiment acumulat (calculat sobre la quantitat final

de DHAP alimentada) segueix un increment més o manco lineal amb el número d'addicions arribant a un valor molt elevat del 96% i superior a l'aconseguit amb una sola addició, 74%. Aquest resultat concorda amb el fet de que la selectivitat de cada addició és propera al 100%. Així, la concentració baixa de DHAP en el reactor amb l'elevat excés d'aldehid permet una conversió quasi total de la DHAP al producte de síntesi, reduint quasi a zero l'efecte de les reaccions secundàries.

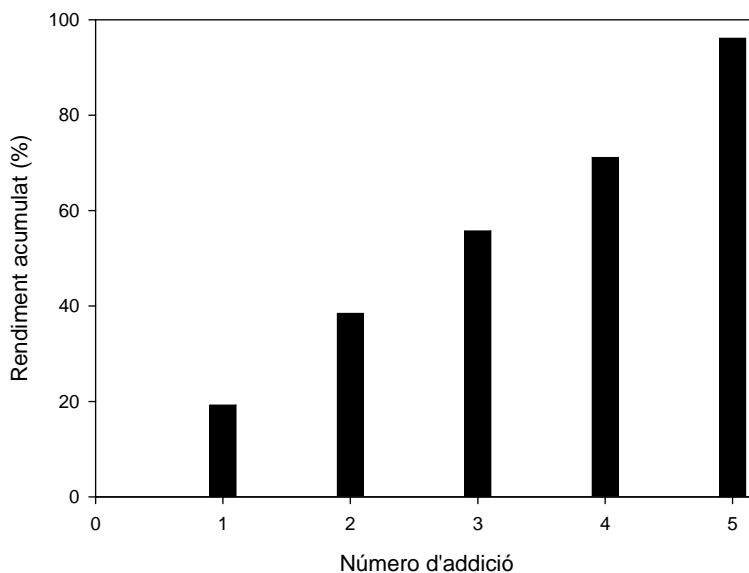


Figura 4.11. Rendiment acumulat de l'operació en discontinu alimentat amb 5 addicions de DHAP en la síntesi entre DHAP i (S)-Cbz-alaninal catalitzada per FucA en DMF/aigua (1/4), pH 7 i a 4°C.

4.5. Conclusions

En les addicions aldòliques catalitzades per aldolases depenents de DHAP de tipus II, a més a més de la degradació química de la DHAP també es produeix la degradació enzimàtica de la DHAP, donant metilglioxal i fosfat inorgànic. Aquestes reaccions no desitjades es poden minimitzar treballant a 4°C (la degradació química esdevé negligible i la degradació enzimàtica mínima) i operant en discontinu alimentat amb addicions discretes de DHAP.

La degradació enzimàtica de la DHAP involucra un intermedi enediolat produït només al treballar amb les aldolases depenents de DHAP de tipus II.

CAPÍTOL 5

AJUST D'UN MODEL CINÈTIC A L'ADDICIÓ ALDÒLICA ENTRE DHAP I (S)-CBZ-ALANINAL CATALITZADA PER FucA

5.1. Introducció

La reacció d'addició aldòlica entre DHAP i (S)-Cbz-alaninal catalitzada per FucA inclou dues reaccions tal com s'ha detallat a l'apartat 4.1: la síntesi en si i la degradació de DHAP (veure Figura 5.1). Per tal de minimitzar la degradació de la DHAP i així augmentar la selectivitat de la reacció desitjada (la síntesi) es treballarà a 4 °C, temperatura a la que es pot negligir la degradació química de la DHAP. Així, a 4°C la degradació enzimàtica serà la única reacció secundària considerada.

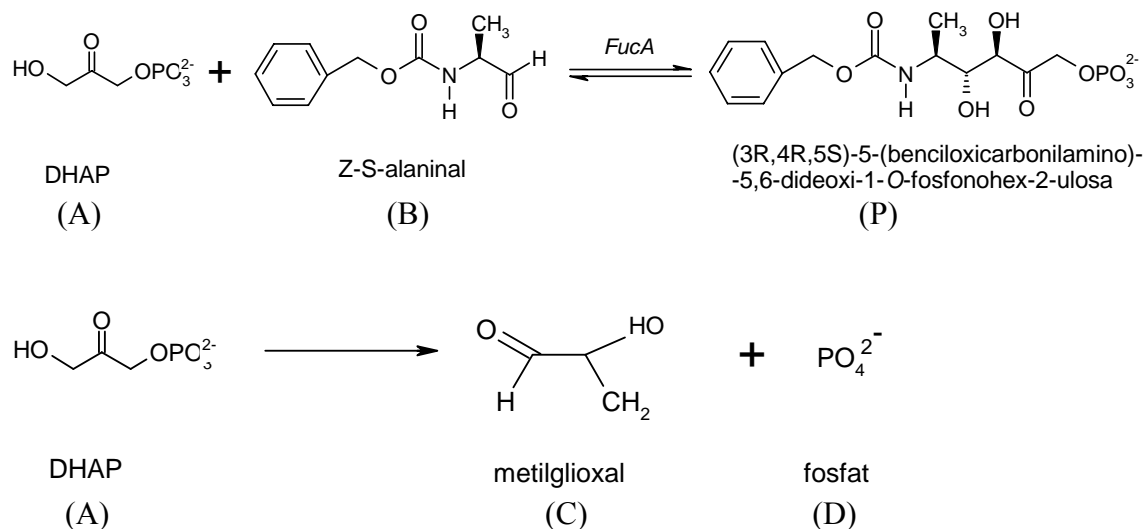


Figura 5.1. Esquema de les reaccions involucrades en la síntesi aldòlica.

La reacció secundària es considera només com la reacció irreversible de descomposició de DHAP, és a dir, s'ha negligit la via d'isomerització a D-gliceraldehid fosfat (veure Figura 4.3. capítol 4). Aquesta simplificació té en compte que s'ha descrit que un cop que la DHAP s'ha degradat a metilglioxal i fosfat, aquest primer compost polimeritza donant un compost groc, que s'ha pogut evidenciar experimentalment, de forma que es desplaça la desaparició de DHAP cap a la via de degradació (Fessner *et al*, 1993; Richard, 1993).

En quan a la reacció de síntesi es considera que és irreversible perquè si fos reversible el producte de síntesi aniria desapareixent perquè tota la DHAP acabaria en forma de fosfat i metilglioxal i per tant, polímer de metilglioxal. Experimentalment s'evidencia que el producte és estable, per tant, a les condicions de treball la reacció està prou desplaçada cap a la síntesi. Es considera un mecanisme ordenat ja descrit a la literatura (Dreyer *et al*, 1996) en què primer s'enllaça la DHAP a l'aldolasa formant-se un intermedi enediolat i després s'enllaça l'aldehid. Llavors es transforma a producte, s'allibera aquest i es retorna a la forma lliure de l'aldolasa.

La FucA és força estable a 4°C, com s'ha vist al gràfic de l'evolució de l'activitat aldolàsica a 4°C (Figura 4.6. capítol 4), concretament, es manté constant l'activitat FucA durant el procés de síntesi.

5.2. Deducció de les equacions de les velocitats de reacció. Mètode de King-Altman.

A partir del mecanisme enzimàtic proposat, el mètode de King-Altman permet obtenir les equacions de les velocitats de reacció en estat pseudoestacionari. Es basa en la consideració de les reaccions involucrades com un sistema cíclic que relaciona les diferents formes enzimàtiques (King i Altman, 1956; veure apartat 3.2.11).

A l'hora d'aplicar el procediment de King-Altman cal tenir present que en aquest mètode es consideren totes les reaccions de pseudoprimer ordre i l'estat pseudoestacionari per a les diferents espècies enzimàtiques sempre que la concentració de substrat sigui molt major a la d'enzim, de l'ordre de $[S]_0 / [E]_0 > 1000$. En el cas de treballar amb FucA com que és un tetràmer i té 4 centres actius, es considera el monòmer per calcular el pes molecular i que la relació es du a terme amb una molècula de substrat per monòmer. Com es veurà més endavant, les reaccions emprades en l'ajust del model es realitzen amb 3 UA /mL de FucA pura. Donat que la seva activitat específica és 10 UA/mg i el pes molecular del monòmer de FucA és 24000mg/mmol, llavors es calcula $[E]_0$ com:

$$3 \frac{UA}{ml \text{ reacció}} \cdot \frac{mg}{10 UA} \cdot \frac{1 \text{ mmol}}{24000mg} \cdot \frac{1000ml}{1 \text{ litre}} = 0.0125 \text{ mM}$$

Així, per complir $[S]_0/[E]_0 > 1000$ cal que $[S]_0 > 12.5 \text{ mM}$, essent el substrat S tant DHAP com (S)-Cbz-alaninal.

A l'esquema de la Figura 5.2. es representen tots els processos involucrats en la reacció de síntesi, incloent la reacció secundària de constant cinètica k_s . Les 4 espècies referents a l'aldolasa són doncs: l'enzim lliure (E), 2 complexes binaris (EA, EP) i un complex ternari (EAB).

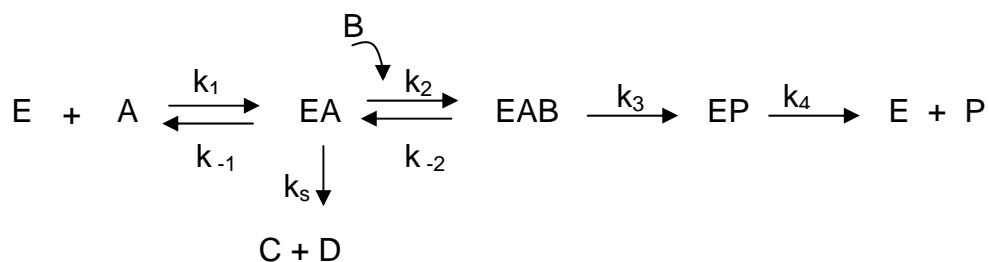


Figura 5.2. Esquema dels processos de la reacció de síntesi aldòlica.

Així mateix en la Figura 5.3. es presenta l'esquema plantejat com un sistema cíclic seguint el procediment de King-Altman.

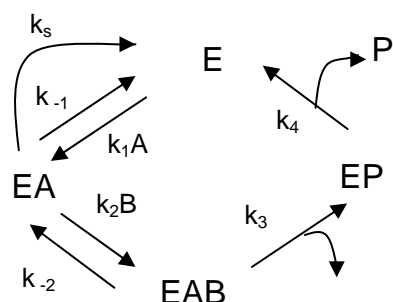


Figura 5.3. Esquema de la reacció de síntesi per a la deducció de la velocitat de reacció segons el mètode de King-Altman. On, E, enzim lliure; A, DHAP, B, (S)-Cbz-alaninal; EA, complex binari enzim-DHAP; EAB, complex ternari enzim-DHAP-Cbz(S)-alaninal.

Un cop plantejat l'esquema de reacció es formulen els balanços de matèria en operació en discontinu,

$$\frac{d[A]}{dt} = -k_s[EA] - k_3[EAB] = -r_s - r$$

$$\frac{d[B]}{dt} = -k_3[EAB] = -r$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_3[EAB] = r$$

$$\frac{d[C]}{dt} = k_s[EA] = r_s$$

$$\frac{d[D]}{dt} = k_s[EA] = r_s$$

On A, DHAP; B, (S)-Cbz-alaninal; E, FucA; C, metilglioxal; D, fosfat; r, reacció de síntesi; r_s , reacció secundària; k_3 , constant cinètica de la reacció d'obtenció de producte

a partir del complexe EAB; k_s , constant cinètica de la reacció de degradació de DHAP a fosfat i metilglioxal.

A partir de l'esquema de la Figura 5.3 per a la reacció de síntesi aldòlica s'obté l'equació de la velocitat de reacció de síntesi, r , seguint el mètode proposat per King-Altman sabent que la concentració inicial aldolàsica és la suma de les 4 possibles formes enzimàtiques:

$$[E]_0 = [E] + [EA] + [EAB] + [EP]$$

Les combinacions per a obtenir cada espècie s'especifiquen en la Figura 5.4. en forma de camins o recorreguts fins a la forma enzimàtica corresponent.

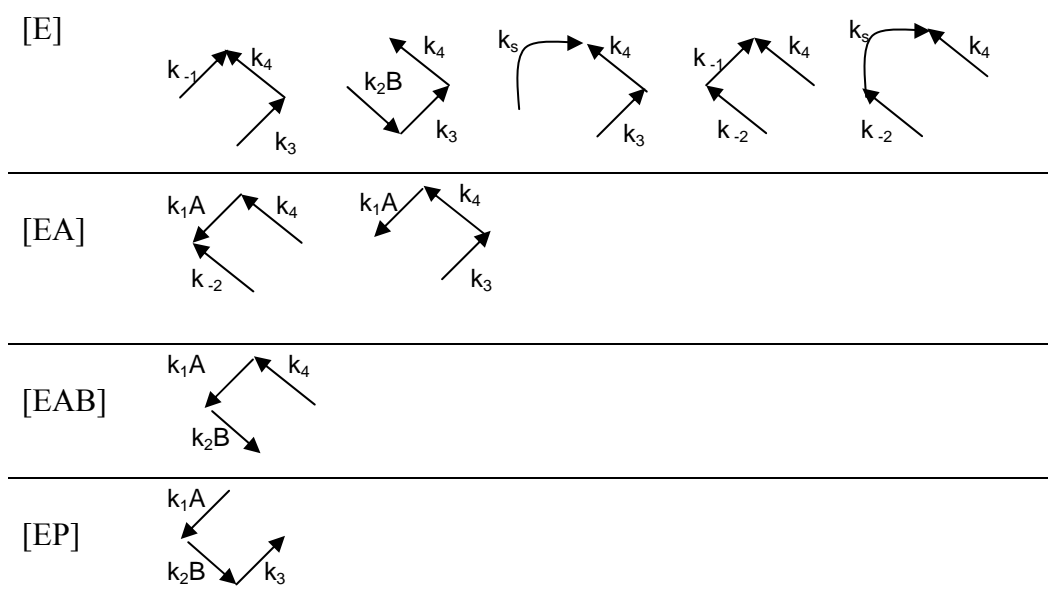


Figura 5.4. Combinacions de camins per a cadascuna de les formes enzimàtiques en la reacció de síntesi aldòlica.

Així, les concentracions de les espècies enzimàtiques són proporcionals a la suma d'aquestes combinacions:

$$[E] \propto k_{-1} k_4 k_3 + k_4 k_2 [B] k_3 + k_s k_4 k_3 + k_{-2} k_{-1} k_4 + k_{-2} k_s k_4$$

$$[EA] \propto k_{-2} k_1 [A] k_4 + k_1 [A] k_4 k_3$$

$$[EAB] \propto k_4 k_1 [A] k_2 [B]$$

$$[EP] \propto k_1 A k_2 [B] k_3$$

Llavors, si la velocitat de reacció de síntesi és el producte entre k_3 i la concentració de l'espècie enzimàtica EAB (equació 5.1); i, es multiplica i divideix aquesta equació per la concentració enzimàtica inicial $[E]_0$ i se substitueix cada concentració de les espècies enzimàtiques per les combinacions trobades anteriorment s'obté l'equació de la velocitat de reacció (equació 5.2).

$$r = k_3[EAB] \quad (5.1)$$

$$r = k_3[E]_0 \frac{[EAB]}{[E]_0}$$

$$\frac{[EAB]}{[E]_0} = \frac{[EAB]}{[E] + [EA] + [EAB] + [EP]}$$

$$r = \frac{k_1 k_2 k_3 k_4 [A] \cdot [B] \cdot [E]_0}{k_4(k_{-1}k_3 + k_{-1}k_{-2} + k_s k_3 + k_s k_{-2}) + k_1 k_4(k_{-2} + k_3)[A] + k_2 k_3 k_4 [B] + k_1 k_2(k_3 + k_4)[A] \cdot [B]} \quad (5.2)$$

Ara reorganitzant els termes per tal d'obtenir una equació més senzilla, s'arriba a l'expressió de l'equació (5.3).

$$r = \frac{k_1 k_2 k_3 k_4 [A] \cdot [B] \cdot [E]_0}{k_4[k_{-1}(k_{-2} + k_3) + k_s(k_3 + k_{-2})] + k_1 k_4(k_{-2} + k_3)[A] + k_2 k_3 k_4 [B] + k_1 k_2(k_3 + k_4)[A] \cdot [B]}$$

$$r = \frac{\frac{k_3 k_4}{k_3 + k_4} [A] \cdot [B] \cdot [E]_0}{\frac{k_{-1}}{k_1} \left[\frac{k_4(k_{-2} + k_3)}{k_2(k_3 + k_4)} \right] + \frac{k_s}{k_1} \left[\frac{k_4(k_{-2} + k_3)}{k_2(k_3 + k_4)} \right] + \frac{k_4(k_{-2} + k_3)}{k_2(k_3 + k_4)} [A] + \frac{k_3 k_4}{k_1(k_3 + k_4)} [B] + [A] \cdot [B]}$$

Si es defineix,

$$r_m = \frac{k_3 k_4}{k_3 + k_4} [E]_0$$

$$K_{A'} = \frac{k_{-1}}{k_1}$$

$$K_{A''} = \frac{k_s}{k_1}$$

$$K_B = \frac{k_4(k_{-2} + k_3)}{k_2(k_3 + k_4)}$$

$$K_A = \frac{k_3 k_4}{k_1(k_3 + k_4)}$$

$$K_M = K_{A'} + K_{A''}$$

Llavors,

$$r = \frac{r_m [A] \cdot [B]}{K_M K_B + K_B [A] + K_A [B] + [A] \cdot [B]} \quad (5.3)$$

Seguint el mateix procés i a partir de l'esquema de la Figura 5.5 de la reacció de degradació de DHAP, s'obté l'equació de la velocitat de reacció secundària r_s .

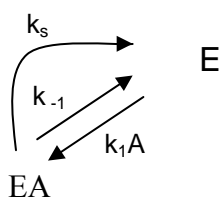
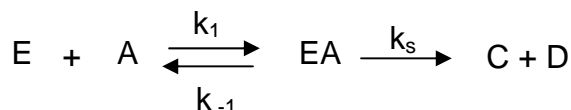


Figura 5.5. Esquema proposat per a la reacció de degradació enzimàtica de DHAP per a la determinació de les equacions de la velocitat de reacció segons el mètode de King-Altman, on A, E i EA corresponen a la DHAP, l'enzim lliure i el complex enzim-DHAP respectivament.

Sabent que en aquest cas la concentració inicial enzimàtica es defineix com:

$$[E]_0 = [E] + [EA]$$

I les concentracions $[E]$ i $[EA]$ segueixen les proporcionalitats amb les constants cinètiques especificades a la Figura 5.6.

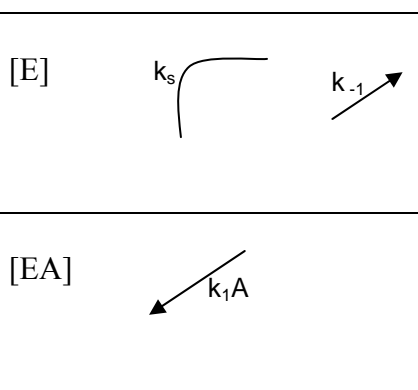


Figura 5.6. Combinacions de camins per a cadascuna de les formes enzimàtiques en la reacció de degradació enzimàtica de DHAP.

És a dir,

$$\begin{aligned} [E] &\propto k_{-1} + k_s \\ [EA] &\propto k_1 [A] \end{aligned}$$

Llavors,

$$r_s = k_s [EA] = k_s [E_0] \frac{[EA]}{[E_0]} = k_s [E_0] \frac{k_1 [A]}{k_{-1} + k_s + k_1 [A]} = \frac{k_s [E_0] \cdot [A]}{\frac{k_{-1} + k_s}{k_1} + [A]} = \frac{r_{ms} [A]}{K_M + [A]}$$

Si es defineix com a velocitat màxima de reacció r_{ms} ($r_{ms} = k_{ms}[E]_0$) i com a constant tipus Michaelis-Menten K_M , (on $K_M = (k_{-1} + k_s)/k_1$), llavors

$$r_s = \frac{r_{ms} [A]}{K_M + [A]} \quad (5.4)$$

S'observa com la constant de Michaelis-Menten és la mateixa per a la reacció de síntesi i per a la reacció de degradació, el que és lògic ja que en ambdós mecanismes de reacció es forma el mateix intermedi enediolat o complex EA.

5.3. Estudi d'inhibició de l'activitat enzimàtica de la FucA.

És conegut que els productes de descomposició química de la dihidroxiacetona fosfat, metilglioxal i fosfat són substàncies inhibidores de les aldolases (Fessner *et al*, 1996, Schoevaart *et al*, 2001). S'ha descrit que el metilglioxal s'uneix als grups sulfidril de les proteïnes de membrana (Randel *et al*, 2005).

Així, es procedeix a estudiar la inhibició per metilglioxal i per fosfat en la reacció de degradació enzimàtica de la DHAP, considerant que la inhibició serà igual en la reacció de síntesi aldòlica ja que ambdues estan catalitzades per la FucA i es forma el mateix intermedi enediolat.

Es realitzen diferents experiments a 3 UA/mL mantenint constant la concentració inicial de DHAP a 40 mM i variant la concentració inicial dels diferents inhibidors potencials. Aquests experiments es realitzen en medi 20% DMF, pH 7 i 4°C.

En els següents gràfics (Figures 5.7 i 5.8) es presenta la velocitat inicial de degradació de DHAP en funció de diferents concentracions dels inhibidors.

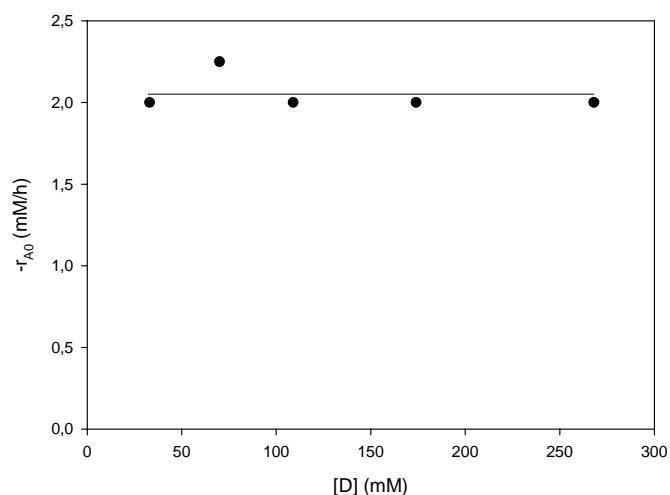


Figura 5.7. Velocitat inicial de degradació de DHAP en funció de la concentració de fosfat. Reaccions en medi 20% DMF, pH 7 i 4°C.

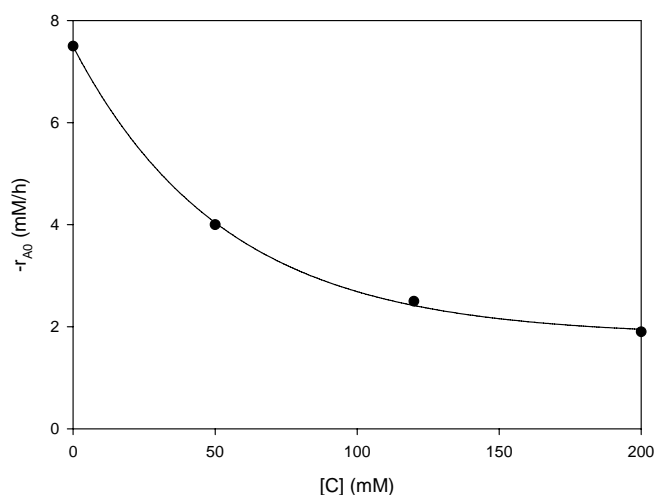


Figura 5.8. Velocitat inicial de degradació de DHAP en funció de la concentració de metilglioxal. Reaccions en medi 20% DMF, pH 7 i 4°C.

Com es pot observar en les Figures 5.7 i 5.8., en el cas de les reaccions en presència de fosfat no hi ha diferència apreciable al variar la concentració de fosfat; en canvi, a l'augmentar la concentració de metilglioxal s'observa com s'alenteix la degradació de DHAP en augmentar la concentració d'inhibidor. Es dedueix, per tant, que en les condicions assajades el fosfat no actua com a inhibidor de la FucA i, en canvi si que ho fa el metilglioxal.

Seguidament, s'estudia el possible efecte inhibidor dels substrats. Com es pot veure en el següent gràfic (Figura 5.9) en la reacció de degradació de DHAP no s'aprecia inhibició per aquest substrat.

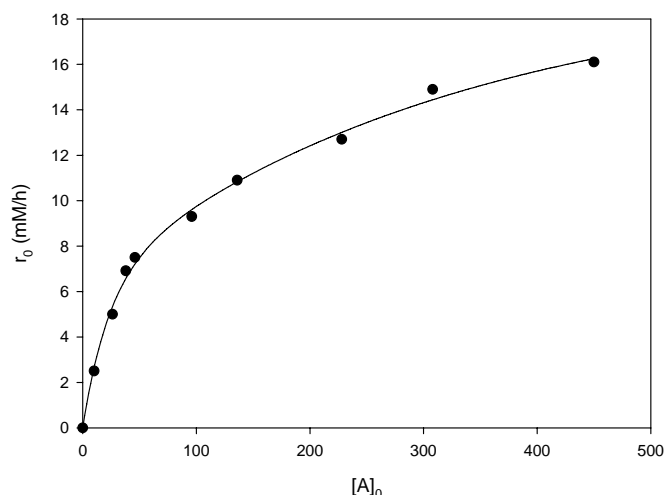


Figura 5.9. Velocitat inicial de degradació de DHAP en funció de la concentració de dihidroxiacetona fosfat inicial. Reaccions en medi 20% DMF, pH 7 i 4°C.

En quant al substrat acceptor o aldehyd, (S)-Cbz-alaninal s'ha observat un efecte inhibitori. Per a realitzar aquest estudi de la inhibició del (S)-Cbz-alaninal es manté la concentració de DHAP constant a 12 mM i es varia la concentració del (S)-Cbz-alaninal. S'elegeix una concentració baixa de DHAP per tal de tenir un rang prou ampli de la relació de concentracions de substrats ja que la solubilitat del (S)-Cbz-alaninal és baixa (concentració màxima soluble en aquest medi propera a 90mM) i a més, tenir excés de substrat acceptor per a afavorir la síntesi aldòlica. A continuació, es representa la velocitat inicial de reacció de síntesi aldòlica en front de la concentració del (S)-Cbz-alaninal (Fig. 5.10).

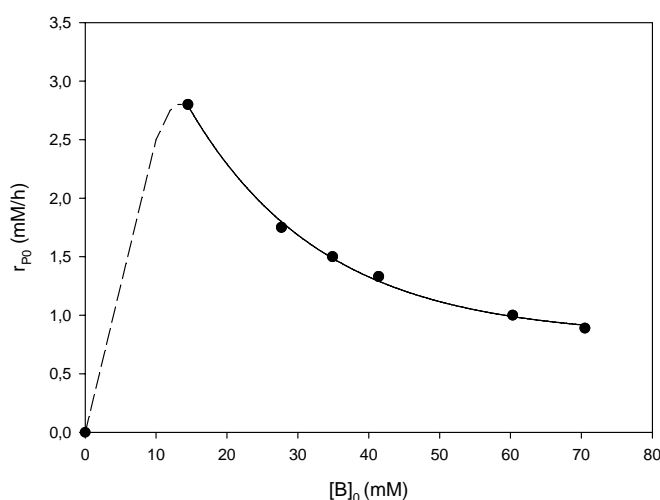


Figura 5.10. Velocitats inicials de la reacció de síntesi segons la concentració inicial de (S)-Cbz-alaninal (B). Reaccions en medi 20% DMF, pH 7 i 4°C.

Encara que no s'ha determinat la concentració a la que la velocitat inicial seria màxima, es veu clarament l'efecte inhibitori que exerceix l'alaninal fins i tot a concentracions força baixes.

En aquest punt es veu com concentracions elevades de (S)-Cbz-alaninal inhibeixen la reacció de síntesi però caldrà que la relació de substrats permeti un excés de (S)-Cbz-alaninal front a la de DHAP tal com s'apuntava a l'apartat 4.4. per afavorir la reacció de síntesi front la de degradació.

D'altra banda, l'efecte inhibitori del (S)-Cbz-alaninal s'observa al representar la velocitat inicial de consum de DHAP, essent els valors de velocitat majors que els corresponents a la síntesi ja que la DHAP es consumeix per la via de síntesi i la de degradació (veure Fig. 5.11, valors experimentals (●)). Ara bé, si es compara el valor de la velocitat inicial de consum de DHAP experimental amb el valor estimat com la suma de les dues velocitats inicials involucrades es podrà concloure que l'aldehid (S)-Cbz-alaninal també inhibeix la reacció secundària. Així, es representa aquest valor estimat a la Figura 5.11 (amb el símbol (o)) tenint en compte que per a una concentració de 12 mM de DHAP, la velocitat inicial de la degradació de DHAP en absència d'aldehid és 3 mM/h (veure Figura 5.9) i la velocitat inicial de la reacció de síntesi amb 12 mM de DHAP en funció de la concentració d'aldehid correspon als valors experimentals presentats en la Figura 5.10. Es pot observar que per a tots els punts es compleix que el valor experimental del consum de DHAP és inferior al valor estimat. Llavors, es pot concloure que l'aldehid (S)-Cbz-alaninal també inhibeix la reacció secundària.

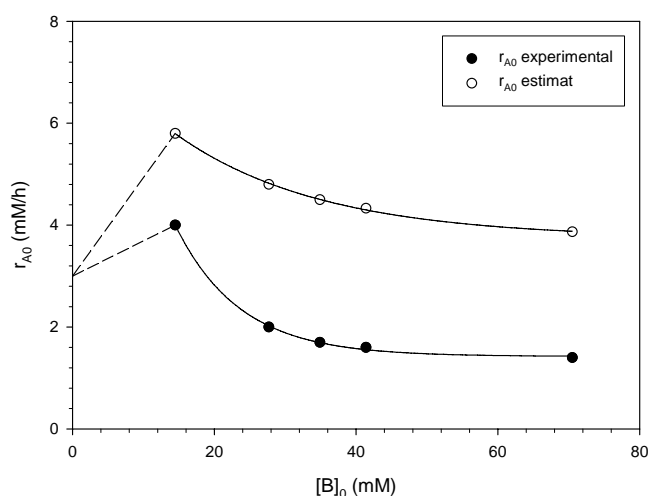


Figura 5.11. Velocitats inicials de la reacció de consum de DHAP segons la concentració inicial de (S)-Cbz-alaninal (B). Reaccions en medi 20% DMF, pH 7 i 4°C.

Així doncs, pel que fa als substrats considerarem que si bé la DHAP no és inhibitori, el substrat acceptor, (S)-Cbz-alaninal, inhibeix tant la reacció de síntesi com la reacció de degradació de DHAP.

La inhibició per producte es descarta ja que estudis preliminars d'ajust del model cinètic a les dades experimentals van mostrar que no podia descriure la distribució observada de concentracions de reactius i productes.

5.4. Determinació dels paràmetres del model cinètic de reacció.

5.4.1. Determinació dels paràmetres r_{ms} i K_M de la reacció secundària.

Per tal de trobar els paràmetres cinètics de la reacció secundària, r_{ms} i K_M , s'empren les dades dels experiments de degradació enzimàtica de DHAP a 3 UA/mL reacció presentats en la Figura 5.9. L'expressió de la velocitat inicial de reacció correspon a l'equació 5.5 on no es considera cap efecte inhibitori ja que a l'inici de la reacció la concentració de metilglioxal és nul·la.

$$r_{s0} = \frac{r_{ms} [A]_0}{K_M + [A]_0} \quad (5.5)$$

Linealitzant l'expressió anterior, es podran obtenir els paràmetres a partir de l'ordenada a l'origen i el pendent:

$$\frac{1}{r_{s0}} = \frac{1}{r_{ms}} + \frac{K_M}{r_{ms}} \frac{1}{[A]_0}$$

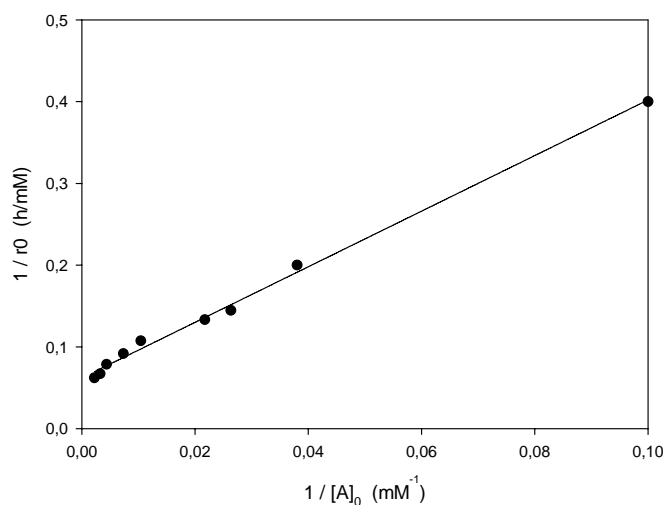


Figura 5.12. Determinació de r_{ms} i K_M amb les dades de reaccions de degradació de DHAP a concentració 10, 26.3, 38, 46, 96, 136, 228, 308 i 450 mM.

Recta de l'ajust, $y = 0.0621 + 3.399 x$, $r = 0.996$

Segons l'ajust obtingut que es pot observar a la Figura 5.12 els valors dels paràmetres de la reacció secundària són:

$r_{ms} = 16.1 \text{ mM / h}$ $K_M = 54.7 \text{ mM}$

5.4.2. Determinació de la constant d'inhibició per metilglixal

Per tal de trobar el valor del paràmetre d'inhibició per metilglixal es treballa amb els perfils de les reaccions de degradació de DHAP a 3 UA/(mL reacció) ajustant-se numèricament a l'equació de la velocitat de reacció contenint un terme d'inhibició. Tal com s'ha comentat a la introducció s'empra el software gPROMS amb funció objectiu el mínim de la suma de l'error entre cada punt experimental i el predit pel model (veure apartat 3.2.12).

De fet es treballa plantejant els balanços de matèria considerant la cinètica plantejada, obtenint unes equacions com les que es presenten a continuació per al cas d'inhibició competitiva per metilglixal en un reactor discontinu:

$$\frac{d[A]}{dt} = -r_s = -\frac{r_{ms}[A]}{(K_M \cdot (1 + k_{iC}[C]) + [A])}$$

$$\frac{d[D]}{dt} = r_s = \frac{r_{ms}[A]}{(K_M \cdot (1 + k_{iC}[C]) + [A])}$$

$$\frac{d[C]}{dt} = r_s = \frac{r_{ms}[A]}{(K_M \cdot (1 + k_{iC}[C]) + [A])}$$

Treballant amb els valors cinètics trobats anteriorment $r_{ms} = 16.1 \text{ mM/h}$ i $K_M = 54.7 \text{ mM}$ i considerant els tres tipus d'inhibició s'aconsegueixen diferents ajustos (veure Taula 5.1.). El valor mínim de la funció objectiu s'obté amb inhibició competitiva amb un valor de:

$$k_{iC} = 0.30 \text{ mM}^{-1}$$

Taula 5.1. Resum de l'equació de la velocitat de reacció secundària considerant els tres tipus d'inhibició.

Tipus inhibició	
Competitiva	$r_s = \frac{r_{ms}[A]}{(K_M \cdot (1 + k_{iC}[C]) + [A])}$
No competitiva	$r_s = \frac{r_{ms}[A]}{(K_M + [A]) \cdot (1 + k_{iC}[C])}$
Anticompetitiva	$r_s = \frac{r_{ms}[A]}{(K_M + [A]) \cdot (1 + k_{iC}[C])}$

Es presenten els ajustos obtinguts per aquest cas en la Figura 5.13 S'observa que el model de degradació enzimàtica de DHAP ajusta bé els valors experimentals, sobretot a concentracions elevades de substrat, on la hipòtesi d'estat pseudoestacionari serà més

correcta. Tot i que el software gPROMS considera com a funció objectiu l'error absolut, l'error relatiu mitjà entre els valors experimentals i els predits pel model és del 6.6%.

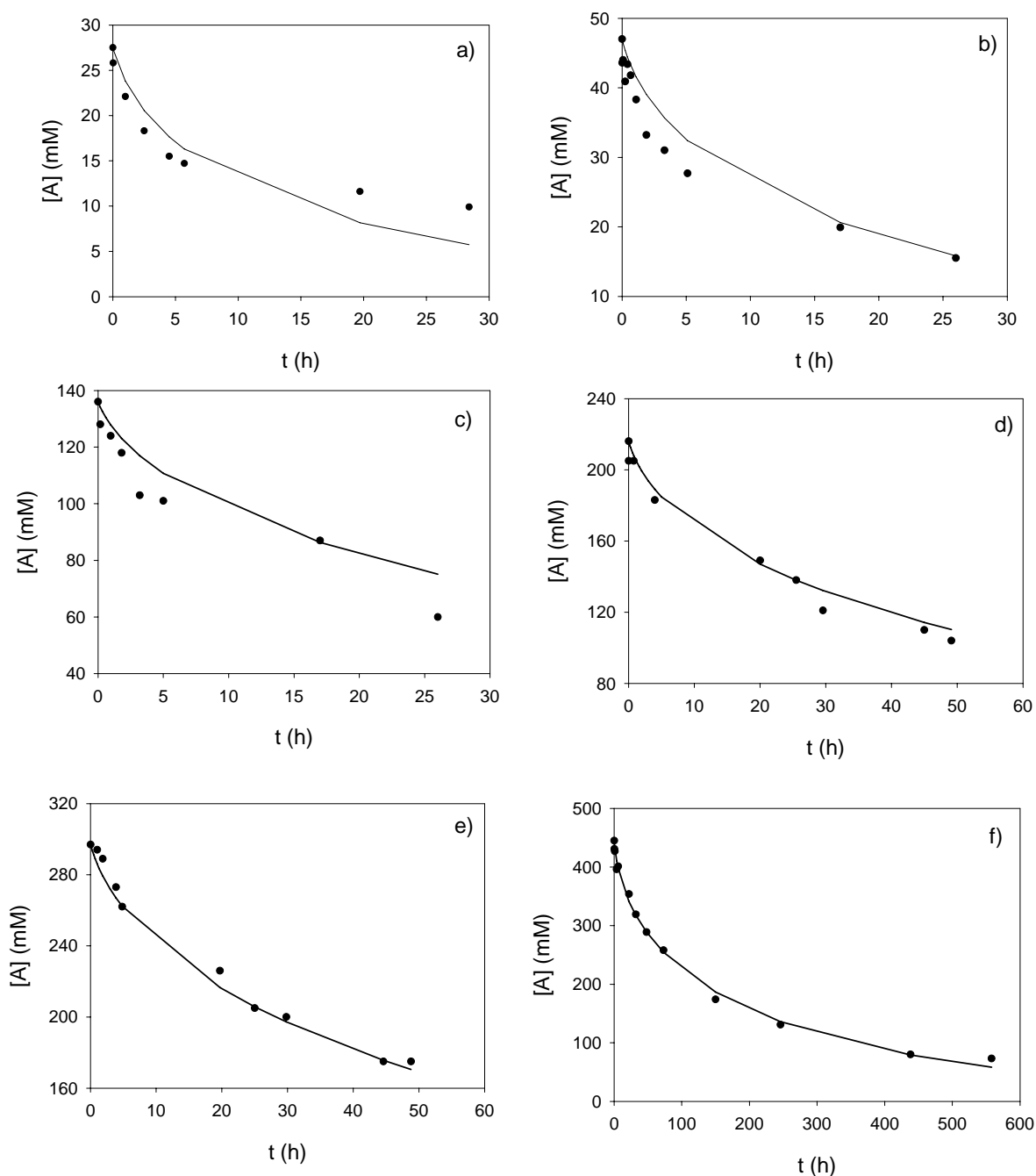


Figura 5.13. Evolució de la concentració de substrat en la reacció de degradació enzimàtica de DHAP en medi 20% DMF, pH 7 i 4°C, amb concentració inicial (a) 26, (b) 46, (c) 136, (d) 228, (e) 308 i (f) 450 mM (●, valor experimental; —, valor del model).

L'expressió de la velocitat de reacció secundària (r_s) per a qualsevol concentració enzimàtica es pot obtenir tenint en compte la relació entre la velocitat màxima i aquesta concentració ($[E]_0 = 3 \text{ UA/mL} = 0.0125 \text{ mM}$).

$$r_{m_s} = k_s \cdot [E]_0 = 16.1 \text{ mM/h}$$

Llavors es pot obtenir el valor de k_s aïllant-lo de l'equació anterior. En aquest cas k_s coincideix amb el paràmetre k_{cat} o *turnover number* ja que s'ha expressat la concentració d'enzim com a concentració de monòmer. El paràmetre k_{cat} representa la màxima velocitat per mol de centre actiu o monòmer i per a la reacció secundària s'anomenarà $k_{\text{cat},s}$.

$$k_s = k_{\text{cat},s} = 1288 \text{ h}^{-1}$$

Finalment l'equació de la velocitat de reacció secundària, r_s en unitats mM/h, per a una concentració donada d'enzim inicial queda recollida per la següent expressió:

$$r_s = \frac{1288 \cdot [E]_0 [A]}{(54.7 \cdot (1 + 0.30[C]) + [A])} \quad (5.6)$$

5.4.3. Determinació dels paràmetres cinètics de la reacció de síntesi

Un cop fixats els 3 paràmetres de la reacció secundària, es procedeix a determinar la resta de paràmetres del model corresponents a la reacció de síntesi emprant el software gPROMS i les dades experimentals d'obtenció de producte de diferents síntesis en medi 20% DMF, a pH 7 i a 4°C i 3 UA / (mL reacció). Les concentracions inicials de substrats s'han variat segons es pot veure a la Taula 5.2. Per la funció objectiu, que també és el mínim de la suma dels errors entre cada punt experimental i el predit pel model, s'han emprat els perfils de producte per ser els que tenen menys dispersió de dades.

Taula 5.2. Concentracions inicials dels experiments de síntesi emprats en la determinació dels paràmetres K_A , K_B , k_{iB} , k_{iC} , r_m

Experiment	a	b	c	d	e	f	g	h
[A] (mM)	12	12	12	12	12	25.5	11.2	22
[B] (mM)	14.5	27.7	34.9	41.4	60.3	92.9	70.5	52.8

En aquest punt cal esmentar que es treballa amb els experiments de síntesi aldòlica a concentració semblant de substrats. En el cas de treballar amb concentració molt elevada d'un o altre reactiu, la velocitat de reacció se simplifica essent de tipus Michaelis-Menten respecte d'un o altre reactiu. Aquest procediment tot i que disminueix les possibilitats de conjunts de paràmetres del model s'ha descartat degut a que el límit de solubilitat del (S)-Cbz-alaninal no ho permet.

En aquest cas el model comprendrà els balanços de matèria per a DHAP, (S)-Cbz-alaninal, producte de síntesi, fosfat i metilglioxal (veure apartat 5.2) considerant les mateixes constants d'inhibició per a la reacció de síntesi i per la de degradació quedant unes equacions com les que es presenten pel cas d'inhibició no competitiva per (S)-Cbz-alaninal i competitiva per metilglioxal.

$$\frac{d[A]}{dt} = -r_s - r \quad ; \quad \frac{d[B]}{dt} = -r \quad ; \quad \frac{d[P]}{dt} = r \quad ; \quad \frac{d[C]}{dt} = r_s \quad ; \quad \frac{d[D]}{dt} = r_s$$

$$r_s = \frac{16.1 \cdot [A]}{(54.7 \cdot (1 + 0.30[C]) + [A])(1 + k_{iB}[B])}$$

$$r = \frac{r_m [A] \cdot [B]}{(54.7 \cdot K_B (1 + 0.30[C]) + K_B [A] + K_A [B] + [A] \cdot [B])(1 + k_{iB}[B])}$$

A la Taula 5.3. es comparen diversos models amb diferents termes d'inhibició.

El primer model assajat (veure model 1 a la taula 5.3) compren inhibició per metilglioxal competitiva a ambdues reaccions i inhibició no competitiva per (S)-Cbz-alaninal a ambdues reaccions. Malgrat obtenir-se un ajust prou bo, s'observa que es pot millorar substancialment prenent un valor d'inhibició per metilglioxal k_{iC} diferent al de la reacció secundària (model 4) ja que la funció objectiu disminueix. Aquest model es pot justificar pel fet de que durant la síntesi el metilglioxal també pot inhibir al complex EAB o el complex EP.

A la taula 5.3 també es presenten els altres dos tipus d'inhibició possibles per (S)-Cbz-alaninal: inhibició competitiva (model 2) i anticompetitiva (model 3). En aquests dos casos, la funció objectiu obtinguda no millora el resultat anterior.

Taula 5.3. Taula resum dels diferents models proposats, en cada fila es presenta l'equació de la velocitat de la reacció de síntesi, l'equació de la velocitat de la reacció secundària considerades en el model (A, DHAP; B, (S)-Cbz-alaninal, C, metilglioxal).

Model	Equació de la velocitat de la reacció de síntesi	Eq. de la velocitat de la r. secundària
1	Inhibició per C competitiva a la reacció de síntesi i inhibició per B no competitiva $r = \frac{r_m [A] \cdot [B]}{(K_M K_B (1 + k_{iC} [C]) + K_B [A] + K_A [B] + [A] \cdot [B]) (1 + k_{iB} [B])}$	Inhibició per C competitiva i inhibició per B no competitiva $r_s = \frac{r_{ms} [A]}{(K_M (1 + k_{iC} [C]) + [A]) \cdot (1 + k_{iB} [B])}$
2	Inhibició per C competitiva i inhibició per B competitiva $r = \frac{r_m [A] \cdot [B]}{(K_M K_B (1 + k_{iC} [C]) (1 + k_{iB} [B]) + K_B [A] + K_A [B] + [A] \cdot [B])}$	Inhibició per C competitiva i inhibició per B competitiva $r_s = \frac{r_{ms} [A]}{K_M (1 + k_{iC} [C]) (1 + k_{iB} [B]) + [A]}$
3	Inhibició per C competitiva i inhibició per B anticompetitiva $r = \frac{r_m [A] \cdot [B]}{(K_M K_B (1 + k_{iC} [C]) + K_B [A] (1 + k_{iB} [B]) + K_A [B] + [A] \cdot [B] (1 + k_{iB} [B]))}$	Inhibició per C competitiva i inhibició per B anticompetitiva $r_s = \frac{r_{ms} [A]}{K_M (1 + k_{iC} [C]) + [A] \cdot (1 + k_{iB} [B])}$
4	Inhibició per C competitiva a la reacció de síntesi i inhibició per B no competitiva $r = \frac{r_m [A] \cdot [B]}{(K_M K_B (1 + k_{iC} [C]) + K_B [A] + K_A [B] + [A] \cdot [B]) (1 + k_{iB} [B])}$	Inhibició per C competitiva i inhibició per B no competitiva $r_s = \frac{r_{ms} [A]}{(K_M (1 + k_{iC} [C]) + [A]) \cdot (1 + k_{iB} [B])}$

Un cop fetes aquestes consideracions, a la Figura 5.14 es presenten els ajustos dels perfils d'obtenció de producte amb el model cinètic amb inhibició competitiva per metilglixal amb diferent valor de la constant d'inhibició per a la reacció de síntesi i per la de degradació de DHAP i inhibició no competitiva per alaninal a ambdues reaccions (model 4). S'observa que el model proposat reproduïx acuradament els perfils de producte de tots els experiments en el rang de concentracions considerat. Així mateix, els perfils de concentració dels substrats són reproduïts pel model proposat obtenint-se un error relatiu mitjà entre els valors experimentals i els predits pel model del 5.0%. Els valors dels paràmetres cinètics obtinguts són els següents:

$K_A = 2.56 \text{ mM}$ $K_B = 0.262 \text{ mM}$ $k_{iB} = 0.257 \text{ mM}^{-1}$ $k_{iC} = 35.8 \text{ mM}^{-1}$ $r_m = 20.4 \text{ mM} \cdot \text{h}^{-1}$

Així, l'equació de la velocitat de reacció de síntesi per a qualsevol concentració enzimàtica s'obté a partir dels valors trobats dels paràmetres de síntesi i, considerant la relació entre la velocitat màxima i la concentració enzimàtica ($[E]_0 = 3 \text{ UA/mL} = 0.0125 \text{ mM}$), es pot obtenir el paràmetre k_{cat} de la reacció de síntesi:

$$r_m = k_{cat} \cdot [E]_0 = 20.4 \text{ mM/h}$$

$k_{cat} = 1632 \text{ h}^{-1}$

Finalment l'equació de la velocitat de reacció de síntesi i de la reacció secundària per a una concentració donada d'enzim inicial es poden recollir en les expressions següents:

$$r = \frac{1632 \cdot [E]_0 [A] \cdot [B]}{(14.3 \cdot (1 + 35.8 \cdot [C]) + 0.262 \cdot [A] + 2.56 \cdot [B] + [A] \cdot [B])(1 + 0.257 \cdot [B])} \quad (5.7)$$

$$r_s = \frac{1288 \cdot [E]_0 [A]}{(54.7 \cdot (1 + 0.30[C]) + [A])(1 + 0.257 \cdot [B])} \quad (5.8)$$

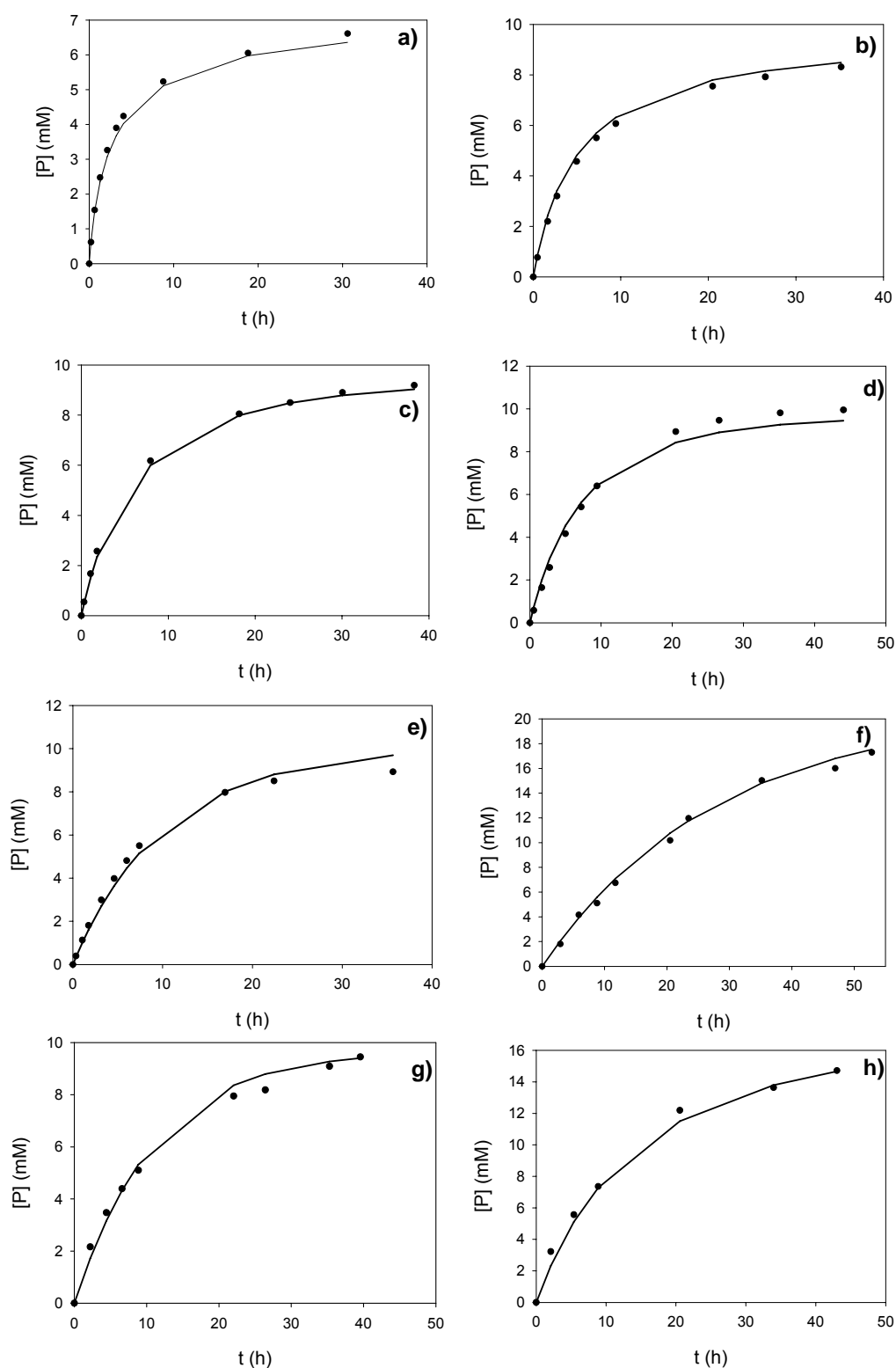


Figura 5.14. Ajustos dels experiments de síntesi aldòlica en medi 20% DMF, pH 7 i 4°C i concentració de substrats variable (a) 12 mM A i 14.5 mM B; (b) 12 mM A 27.7 mM B; (c) 12 mM A 34.9 mM B; (d) 12 mM A 41.4 mM B; (e) 12 mM A 60.3 mM B; (f) 25.5 mM A 92.9 mM B ; (g) 11.2 mM A 70.5 mM B; (h) 22.0 mM A 52.8 mM B. Perfils de concentració de producte de síntesi (P) (●, valor experimental; —, valor del model)

5.4.4. Validació del model cinètic proposat.

La validació del model cinètic proposat es du a terme amb reaccions aldòliques amb FucA soluble amb major concentració enzimàtica que els experiments emprats en l'ajust del model, treballant o bé en discontinu o bé en discontinu alimentat.

Realitzant un experiment de síntesi en discontinu a concentració inicial 27.8 mM A i 42.9 mM B i 12 UA/mL de FucA es pot observar en la Fig. 5.15 que el model prediu bé les tendències dels perfils de concentracions dels compostos involucrats en la reacció de condensació aldòlica.

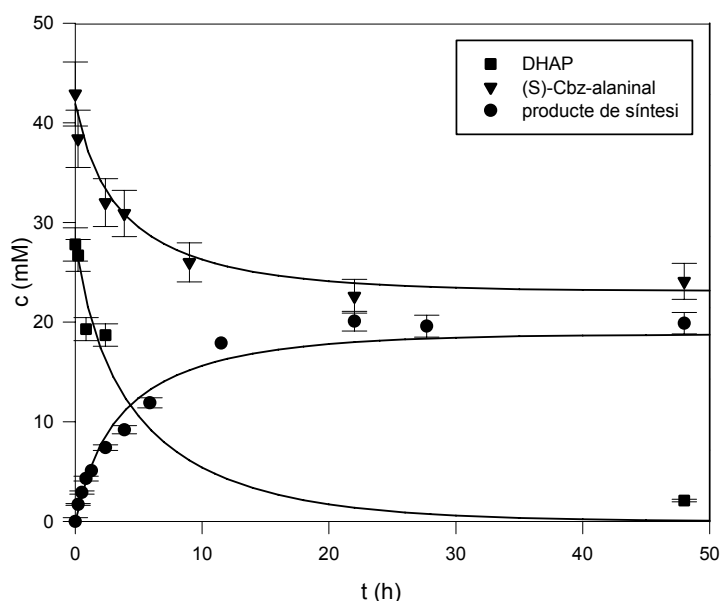


Figura 5.15. Experiment de síntesi a concentració inicial 27.8 mM DHAP (A) i 42.9 mM (S)-Cbz-alaninal (B) i 12 UA/mL de reacció de FucA soluble. Símbols: DHAP (■), (S)-Cbz-alaninal (▼), producte de síntesi (●), model (—).

En discontinu alimentat, cal modificar el balanç de matèria de DHAP per a tenir en compte les 5 addicions de DHAP. Així, cadascuna de les 5 addicions puntuals és com un discontinu amb la concentració inicial de DHAP calculada a partir de la concentració de la solució d'addició de substrat i la de DHAP que restava sense reaccionar.

$$\frac{d[A]}{dt} = -r_s - r \quad (5.9)$$

A continuació, en la Figura 5.16., es presenta el perfil de concentracions de producte i substrats i el predit pel model. S'observa que tot i treballar a concentracions baixes de substrat el model prediu prou bé l'evolució dels compostos en l'experiment realitzat en discontinu alimentat.

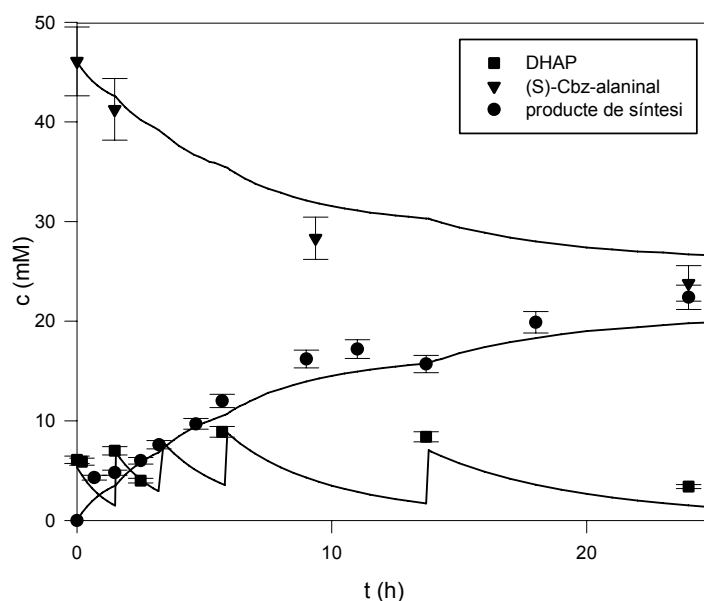


Figura 5.16. Perfils de la concentració de DHAP de l'experiment de reacció de síntesi aldòlica en discontinu alimentat en medi 20% DMF, pH 7 i 4°C catalitzada amb FucA soluble. Es realitzen 5 addicions de 5.4 mM de DHAP (A) i una addició de 46 mM (S)-Cbz-alaninal (B). Es catalitza amb 12 UA/mL de reacció de FucA soluble. Símbols: DHAP (■), (S)-Cbz-alaninal (▼), producte de síntesi (●), model (—).

5.5. Conclusions

En l'estudi de la inhibició de la FucA es conclou que la DHAP i el fosfat inorgànic no inhibeixen l'activitat aldolàsica, en canvi, tant el (S)-Cbz-alaninal com el metilglioxal produït en la reacció secundària si que actuen com a inhibidors de la FucA, el primer com a inhibidor no competitiu i el segon com a inhibidor competitiu.

El model cinètic que millor descriu l'addició aldòlica entre la DHAP i el (S)-Cbz-alaninal catalitzada per FucA soluble és el que inclou la inhibició competitiva del metilglioxal i la inhibició no competitiva del (S)-Cbz-alaninal en ambdues reaccions. Aquest model contempla la inhibició per metilglioxal diferent en cadascuna de les reaccions involucrades en l'addició aldòlica. Així, les equacions de la velocitat de reacció de síntesi (r) i de la velocitat de reacció secundària (r_s) obtingudes són les següents:

$$r = \frac{1632 \cdot [E]_0 [A] \cdot [B]}{(14.3 \cdot (1 + 35.8 \cdot [C]) + 0.262 \cdot [A] + 2.56 \cdot [B] + [A] \cdot [B])(1 + 0.257 \cdot [B])} \quad (5.10)$$

$$r_s = \frac{1288 \cdot [E]_0 [A]}{(54.7 \cdot (1 + 0.30[C]) + [A])(1 + 0.257 \cdot [B])} \quad (5.11)$$

Aquest model cinètic ha estat validat a major concentració enzimàtica amb èxit amb una síntesi en discontinu i amb una síntesi amb 5 addicions discretes de DHAP.

CAPÍTOL 6

ESTUDIS D'IMMOBILITZACIÓ DE FucA

6.1. Introducció

L'objectiu dels estudis d'aquest apartat és l'obtenció de FucA immobilitzada per a ser emprada en biocatàlisi.

S'empren diferents mètodes en els què s'immobilitza l'aldolasa per formació d'un enllaç covalent o per adsorció. La immobilització covalent es du a terme amb agarosa i Eupergit C com a suports, i per entrecreuament amb formació de CLEA (Cross-Linked Enzyme Aggregates). L'enllaç covalent es forma entre els residus amino de l'aldolasa i els residus aldehid del suport o de l'agent entrecreuant. En el cas de l'adsorció a suports d'afinitat s'aprofita l'expressió de l'aldolasa recombinant amb una cua d'histidines afi pel metall immobilitzat en les reïnes o suports d'afinitat.

6.2. Adsorció. Immobilització de FucA a suports d'afinitat a metall quelat

Es du a terme una primera immobilització amb FucA pura per tal de comprovar que la immobilització correspon a l'adsorció de l'aldolasa a 20°C i pH 8.0. A tall d'exemple, es presenta l'evolució d'una immobilització amb 28 UA inicials per mil·lilitre de suport Ni-IDA (veure Figura 6.1) a partir del seguiment de l'activitat al blanc (enzim soluble), a la suspensió (enzim en fase líquida i en fase sòlida) i al sobrenadant (enzim en fase líquida).

En termes generals, l'activitat del blanc indica l'estabilitat de l'enzim a les condicions de treball; l'activitat del sobrenadant indica l'activitat sense immobilitzar i l'activitat de la suspensió indica l'activitat tant en fase líquida com sòlida. Així, es pot calcular el rendiment d'immobilització a partir de la diferència entre l'activitat al blanc i la del sobrenadant; i, el percentatge d'activitat retinguda en forma activa amb la diferència entre l'activitat a la suspensió i l'activitat al sobrenadant.

A la Figura 6.1. s'observa que l'activitat del blanc es manté constant, indicant l'estabilitat de la FucA a les condicions d'immobilització. L'activitat al sobrenadant disminueix a mesura que avança el procés indicant que la FucA s'està immobilitzant, fins a obtenir un rendiment del 100% a les 3h de treball. L'activitat de la suspensió

disminueix a mesura que avança la immobilització, indicant que part de l'enzim que s'immobilitza es desactiva. S'ha realitzat també l'anàlisi de la proteïna total del sobrenadant per a assegurar que la disminució de l'activitat és deguda a l'adsorció al suport i efectivament, els perfils d'activitat FucA i proteïna total del sobrenadant se solapen. Al final del procés s'obté un valor del percentatge d'activitat retinguda del 40% a partir de la diferència entre l'activitat de la suspensió i la del sobrenadant. Aquest valor és relativament bo i coincideix amb l'obtingut en la purificació de FucA amb suport d'afinitat Ni-IDA i elució per competència amb imidazole.

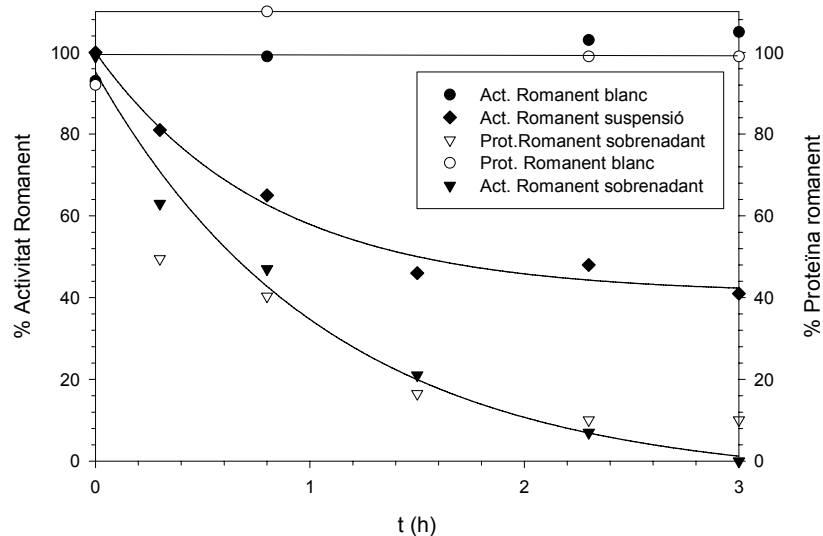


Figura 6.1 Immobilització de FucA en suport Ni-IDA a 28 UA/ mL suport, 20°C, pH 8.

6.2.1. Estudi de la càrrega enzimàtica

Per tal d'observar possibles diferències provocades per limitacions de transferència de matèria interna i determinar la màxima càrrega enzimàtica sense limitacions difusionals, es realitzen diferents immobilitzacions de FucA a les reïnes Ni-NTA i Ni-IDA a pH 8.0 i temperatura ambient. Es parteix d'un lisat cel·lular ja que d'aquesta manera es pot realitzar en una sola etapa la purificació i immobilització de la FucA.

En les següents taules (6.1 i 6.2) es presenten els resultats finals de les corbes d'activitat emprant les reïnes d'afinitat Ni-NTA i Ni-IDA: rendiment d'immobilització i percentatge d'activitat retinguda. Així mateix es determina l'activitat del derivat treballant directament amb el suport amb l'enzim immobilitzat al final del procés d'immobilització (Activitat Derivat) i també després de sotmetre'l al procés de trencament per agitació vigorosa (Activitat Trencat). Amb aquest trencament s'aconsegueix reduir la mida de partícula del suport de forma que es mesura l'activitat en absència de limitacions de transferència de matèria interna.

Taula 6.1. Immobilitzacions en reïna Ni-NTA a pH 8.0 i 20°C. Volum de suport 0.6 mL, volum de solució enzimàtica 9 mL.

Activitat FucA oferta (UA/mL suport)	Rendiment immobilització (%)	Activitat retinguda (%)	Activitat Derivat (UA/mL suport)	Activitat Trencat (UA/mL suport)
14	98	56	7,9	5,9
25	87	40	10	8,1
32	82	38	12	14
87	98	17	15	31
121	84	20	24	55
382	91	7,8	30	86
476	94	4,4	21	55

Taula 6.2. Immobilitzacions en reïna Ni-IDA a pH 8.0 i 20°C. Volum de suport 0.6 mL, volum de solució enzimàtica 9 mL.

Activitat FucA oferta (UA/mL suport)	Rendiment immobilització (%)	Activitat retinguda (%)	Activitat Derivat (UA/mL suport)	Activitat Trencat (UA/mL suport)
31	89	35	11	13
54	91	31	17	-
149	88	13	19	-
320	95	11	35	96
347	99	7,8	27	40

S'aconsegueixen percentatges d'immobilització propers al 100% emprant ambdues reïnes. En canvi, tot i augmentar la quantitat inicial de FucA oferta al suport, l'activitat del derivat augmenta lleugerament, essent el percentatge d'activitat FucA immobilitzada activa cada vegada més baix respecte l'activitat oferta. Fent el trencament del derivat obtingut a càrregues elevades es veu que hi ha limitacions difusionals ja que s'observen valors més elevats d'activitats quan les partícules de suport són més petites. La transferència de matèria interna deixa de limitar quan la càrrega és al voltant de 30 UA/(mL suport).

D'altra banda, per les dos reïnes es pot correlacionar bé l'activitat adsorbida o activitat del derivat amb la concentració en equilibri en el líquid. Així, s'ajusten isoterms d'adsorció de tipus Langmuir (veure Equació 6.1) considerant les dades experimentals d'activitat adsorbida o retinguda (y) i activitat en fase líquida o del sobrenadant (x) a l'equilibri d'adsorció (veure Figures 6.2 i 6.3). S'observa que l'adsorció és de tipus favorable i que el comportament és semblant en l'adsorció en ambdues reïnes Ni-NTA i Ni-IDA.

$$y = \frac{B_{\max} \cdot x}{K_d + x} \quad (6.1)$$

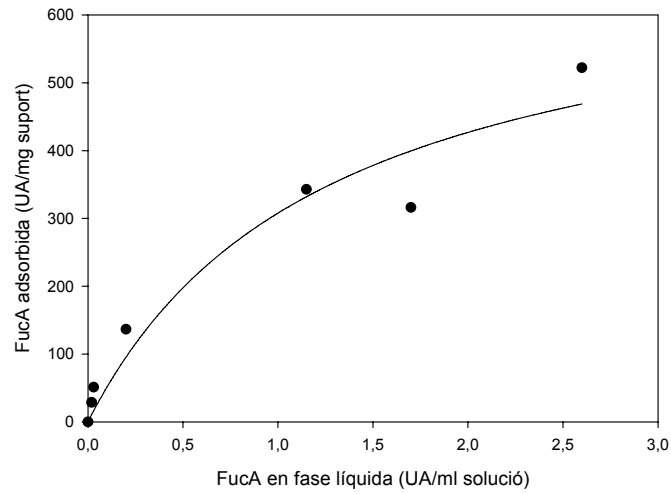


Figura 6.2. Isoterma d'adsorció per Ni-IDA, tipus Langmuir ($K_d = 0.64$ UA / mL solució, $B_{\max} = 531$ UA / mg suport, $r = 0.97$)

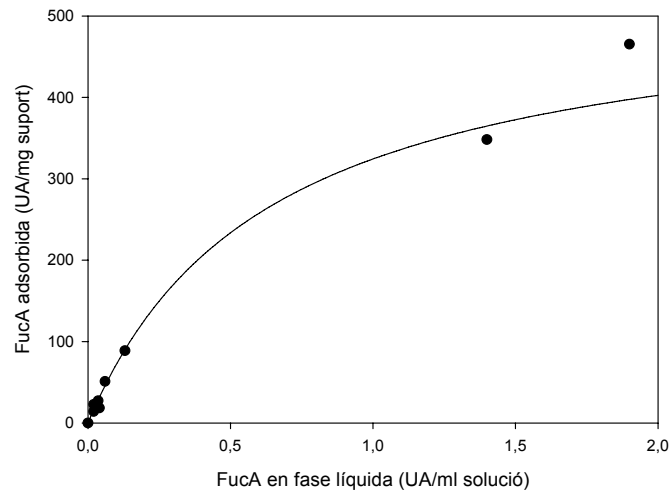


Figura 6.3. Isoterma d'adsorció per Ni-NTA tipus Langmuir ($K_d = 0.13$ UA / mL solució, $B_{\max} = 696$ UA/ mg suport, $r = 0.94$)

6.2.2. Efecte dels diferents metalls en l'activitat catalítica

En estudis d'adsorció a reïnes d'afinitat realitzats amb diferents metalls divalents Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} (Ardao, 2006), s'observa que l'enzim purificat amb aquestes reïnes conté un percentatge de metall diferent a l'inicial, fet que indica un bescanvi entre el Zn^{2+} , que és el cofactor de l'enzim, i el metall de la reïna. Com que els estudis cinètics realitzats per tal de determinar els paràmetres cinètics estan fets amb enzim purificat amb reïna d'afinitat carregada amb Ni^{2+} , per a que els paràmetres cinètics determinats puguin emprar-se per el model cinètic amb l'enzim immobilitzat aquest ha de ser el mateix holoenzim, és a dir, enzim amb el mateix percentatge de metalls en la seva estructura. Així, la utilització d'aquests suports d'afinitat per immobilització són molt prometedors però impliquen un bescanvi de cations que canviarien l'holoenzim que s'utilitzés i per tant, no coincidirien els paràmetres cinètics determinats.

Tot i l'esmentat anteriorment, es presenten uns estudis preliminars de degradació enzimàtica de DHAP emprant FucA- Ni^{2+} i FucA- Co^{2+} , és a dir, FucA purificada amb reïna d'afinitat carregada amb Ni^{2+} i amb Co^{2+} respectivament.

Comparant ambdues formes de la FucA soluble en la reacció de degradació enzimàtica de DHAP (veure Figura 6.4.) a concentració inicial 27 mM DHAP i 3 UA/mL reacció, s'observa que la forma FucA- Co^{2+} també produeix la degradació enzimàtica de la DHAP. El que cal destacar és que és molt menys important que quan s'empra FucA- Ni^{2+} .

Aquests resultats indiquen que un cop caracteritzat el derivat obtingut per immobilització en suport d'afinitat de la FucA- Co^{2+} es podrien obtenir bons resultats en síntesi. A més, a diferència amb la RhuA amb Co^{2+} com a cofactor, la FucA no presenta activitat oxigenasa, fet interessant si s'empra com a biocatalitzador amb activitat aldolàsica (Hixon et al, 1996). Un avantatge d'aquest derivat és l'obtenció del derivat en un sol pas, és a dir, purificació i immobilització alhora en un suport apte per a emprar-la en síntesi.

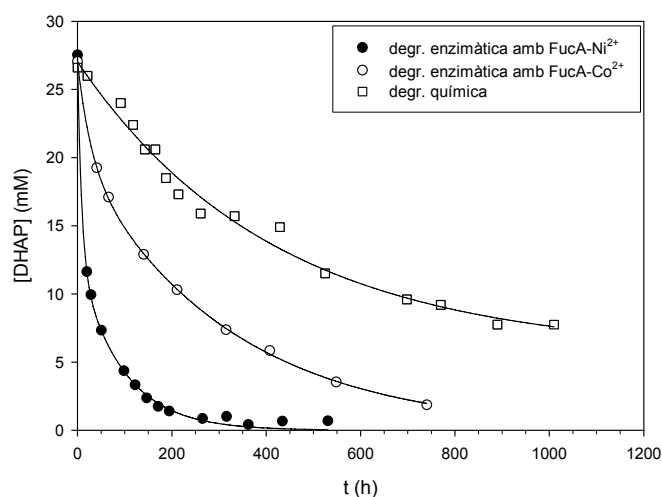


Figura 6.4. Evolució de la concentració de DHAP (A) en la seva degradació química o enzimàtica emprant FucA- Co^{2+} i FucA- Ni^{2+} .

6.3. Immobilització per enllaç covalent.

Com s'ha esmentat en la introducció d'aquest apartat, es realitzen dos mètodes d'immobilització per enllaç covalent: l'entrecreuament i l'enllaç multipuntual amb dos suports diferents, l'Eupergit C i l'agarosa. L'enllaç covalent es forma entre els grups actius del suport com a aldehyd o grups epòxid i els grups amino no protonats de l'enzim.

6.3.1. Immobilització de FucA per entrecreuament. Formació de CLEA (Cross-linked Enzyme Agregated)

Tal com s'ha comentat a la introducció, els CLEA es poden formar en una o dues etapes, és a dir, entrecreuament i agregació alhora o entrecreuament posterior a l'agregació de l'enzim. S'elegeix la immobilització en CLEA mitjançant glutaraldehyd ja que és l'agent entrecreuant més conegut (Gerrard *et al*, 2002) i es coneix que els CLECs de RAMA milloren l'estabilitat de l'enzim minimitzant la inactivació irreversible deguda al medi de reacció (Sobolov *et al*, 1994). Ja que l'aldolasa es precipita amb sulfat amònic en l'últim pas de la seva purificació es pot sotmetre amb facilitat a l'entrecreuament amb glutaraldehyd per tal d'obtenir els CLEA al formar-se enllaços covalents entre el grups amino de l'aldolasa i els grups aldehyds de l'agent entrecreuant.

Els paràmetres que controlen aquest tipus d'immobilització són a més a més de la naturalesa i concentració de l'agent entrecreuant, el pH i la temperatura del medi i el temps d'immobilització.

Es realitza una primera immobilització amb 50 mM de glutaraldehyd, valor contingut dins el rang referenciat: 1 a 250 mM (Cornell, 1989; López-Serrano *et al*, 2002; Oyrton *et al*, 1999). Amb aquesta concentració el procés és tan ràpid que en 30 minuts s'ha immobilitzat tot l'enzim, ja que l'activitat al sobrenadant és nul·la, de forma que no es pot realitzar correctament el seguiment del procés. Per això, es treballarà a concentracions menors: 5, 1 i 0.5 mM de glutaraldehyd.

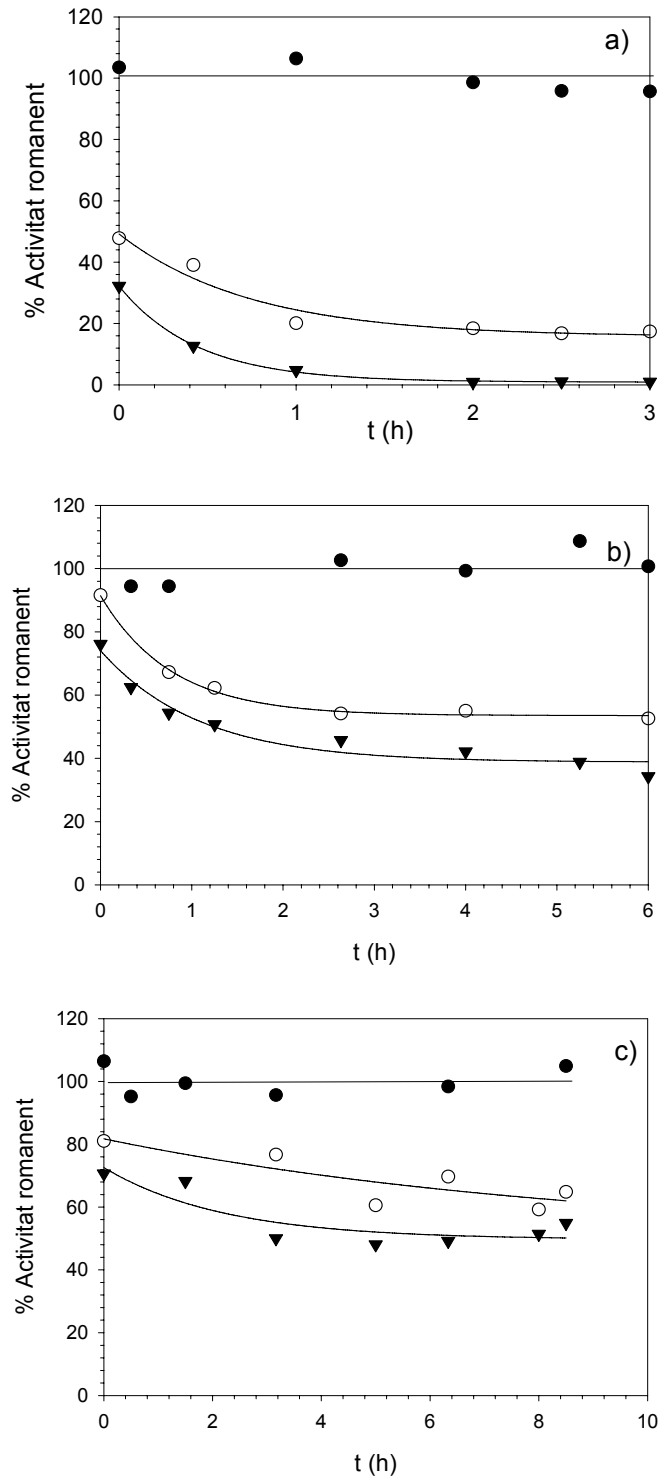


Figura 6.5. Evolució de la formació dels CLEA amb 5, 1 i 0.5 mM glutaraldehyd; a), b) i c) respectivament. 90 UA inicials, pH 7. Símbols: blanc o enzim soluble (●), suspensió (○), sobrenadant (▼).

En la Figura 6.5, s'observa com la velocitat de formació dels CLEA és proporcional a la quantitat d'agent entrecreuant. A 5 mM de glutaraldehyd s'aconsegueix la immobilització total de l'activitat oferta, en canvi, amb 1 i 0.5 mM de glutaraldehyd amb

6h de procés s'ha immobilitzat un 66 % i un 51 % de l'activitat oferta respectivament. Tot i les diferències cinètiques, amb aquestes concentracions d'agent entrecreuant no hi ha variacions apreciables del percentatge de FucA activa en els CLEA ja que en qualsevol cas els valors obtinguts són de l'ordre d'un 10-15% del valor inicial d'activitat. A més a més, s'observa que al inici de la immobilització s'assoleix aquest percentatge d'activitat retinguda que no augmenta amb l'avenç del procés.

La formació dels CLEA pot veure's afectada pel pH (Monteiro *et al*, 1999), llavors, per tal de millorar tant el percentatge d'immobilització com el percentatge d'activitat retinguda s'estudia la formació dels CLEA en funció del pH a 1mM de glutaraldehyd. Considerant que el protocol inicial és a pH 7.0 (figura 6.5. b), s'assaja pH 5.0 i 9.0 (veure figura 6.6). En principi, a l'augmentar el pH, els grups amino de l'enzim susceptibles a reaccionar amb els grups aldehyd augmenten. Així, el pH defineix les possibilitats de la immobilització de l'enzim així com la formació d'enllaç multipuntual entre l'enzim i el suport activat (Blanco *et al*, 1989). En aquest cas, dins de l'interval de treball de pH 5.0 a pH 9.0 no hi ha grans diferències, p.ex. si es compara a les 6h d'experiment en els 3 casos s'obté al voltant del 60% d'activitat a la suspensió. En quant a l'activitat retinguda, sembla que el pH 7.0 és el més favorable, obtenint un 18% de FucA immobilitzada activa en front d'un 10% en els altres dos casos.

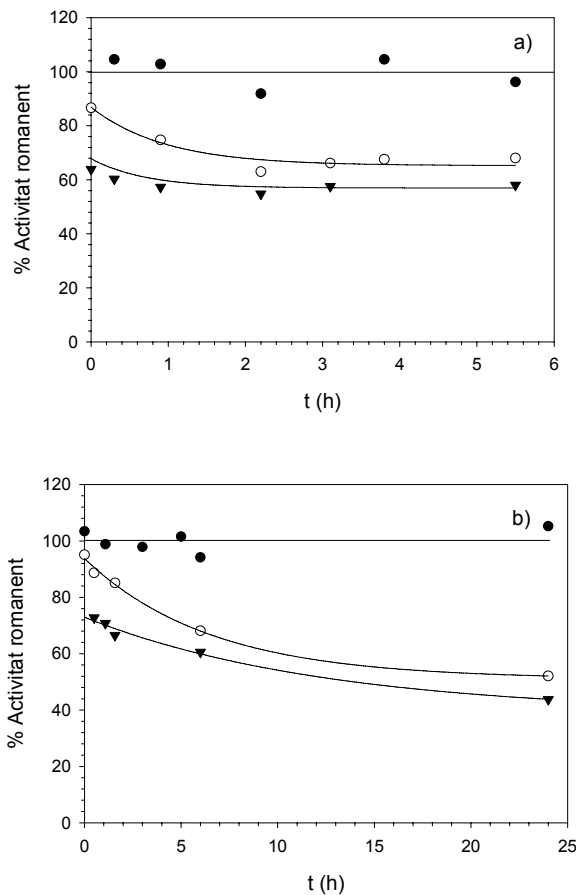


Figura 6.6. Evolució de la formació dels CLEA a 1mM glutaraldehyd, 100 UA inicial i pH 9.0 (a) i pH 5.0 (b). Símbols: blanc o enzim soluble (●), suspensió (○), sobrenadant (▼).

La baixa recuperació d'activitat es pot relacionar amb les limitacions difusionals en els CLEAs (Cao *et al*, 2001; Pollak *et al*, 1980). De fet, l'etapa de formació dels agregats és determinant en la qualitat dels CLEA obtinguts. Per tant, per millorar els resultats obtinguts s'hauria d'estudiar ambdues etapes del procés: la formació dels agregats i l'entrecreuament. D'altra banda, la modificació química deguda a l'entrecreuament pot desactivar l'enzim en un percentatge elevat: p.ex., en el cas de la penicilina acilasa es recupera de l'ordre del 40% (Cao *et al*, 2001) i en el cas de la fosfocolina citidililtransferasa s'inactiva totalment emprant glutaraldehyd (Cornell, 1989).

6.3.2. Immobilització de FucA en suport Eupergit C

El suport Eupergit C consisteix en una xarxa de cadenes macromoleculares lineals, que en referència a l'enzim es poden considerar una línia en comptes d'una superfície (Álvaro, 1990). La utilització de suports amb diferent morfologia interna és una de les diferents estratègies per a reduir els impediments estèrics associats a enzims immobilitzats.

Els grups epòxid de l'Eupergit C reaccionen en un rang ampli de pH (Martín *et al*, 2003) i el percentatge de retenció enzimàtica en forma activa és depenent del pH de la immobilització trobant-se el pH òptim en un rang petit (Hernaiz *et al*, 2000). S'estudia l'efecte del pH en la immobilització de la FucA als grups epòxids de l'Eupergit C a pH 8 i pH 10 ja que és estable en aquests dos valors. A la Figura 6.7, es pot observar que en ambdós pH l'activitat de la FucA soluble (blanc) es manté constant i l'activitat del sobrenadant disminueix amb el temps el que indica la immobilització de la FucA. L'activitat de la suspensió també disminueix essent el perfil molt semblant al del sobrenadant. La diferència principal entre la immobilització a pH 8 i la de pH 10 és la cinètica, essent la primera més lenta. En ambdós pHs treballats, un percentatge petit de la FucA que s'immobilitza es reté en forma activa (3-9%). Aquest baix rendiment d'activitat retinguda podria estar relacionat amb la formació d'enllaços multicovalents que és directament proporcional a la quantitat de grups aldehid susceptibles a reaccionar amb l'enzim. Així la formació de nous enllaços enzim-suport millora l'estabilitat però sol afectar negativament a l'activitat (Hernaiz *et al*, 2000).

Cal esmentar que s'ha observat el mateix comportament que en la immobilització per enllaç covalent per formació de CLEA: s'obté un baix rendiment d'activitat retinguda que s'assoleix al principi de la immobilització i malgrat avanci la immobilització no augmenta el percentatge d'activitat retinguda.

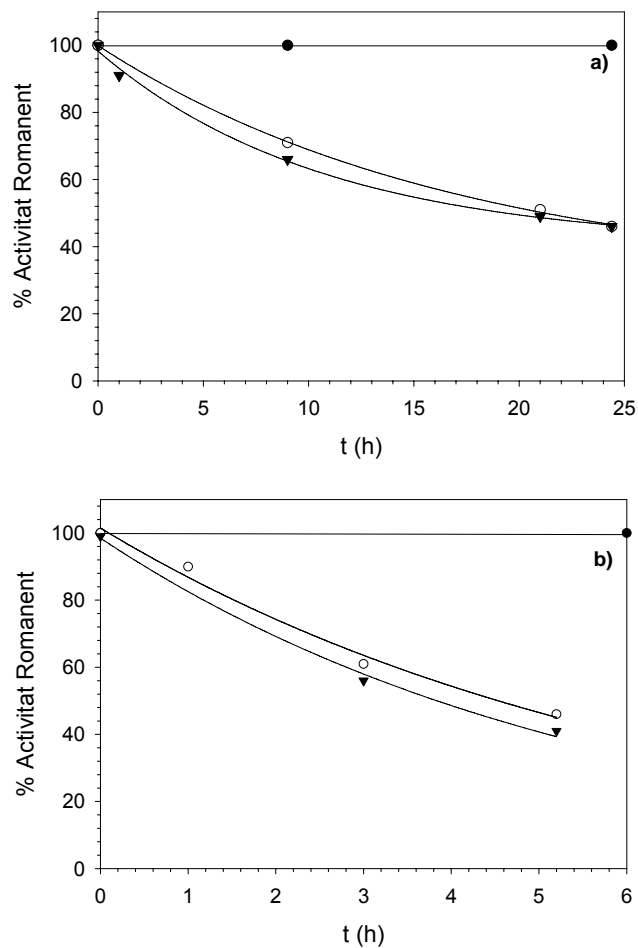


Figura 6.7. Efecte del pH en la immobilització a pH 8 (a), pH 10 (b). La immobilització es du a terme a concentració inicial 12 UA/mL FucA a 20°C a través dels grups epòxid de l'EupergitC. Es realitzen assajos d'activitat FucA a la suspensió suport-enzim (○), sobrenadant (▼) i enzim lliure (blanc, ●)

La utilització del suport Eupergit C també permet la immobilització a través de grups aldehids si s'oxiden els grups epòxid del suport. Així, s'immobilitza la FucA al suport EupergitC activat a 238 μ equivalents RCHO / (mL de suport) a pH 10 (veure figura 6.8). Aquesta immobilització és molt semblant a la realitzada a l'immobilitzar la FucA a pH 10 als grups epòxid del suport (Figura 6.7): a mesura que avança el procés, l'activitat al sobrenadant disminueix, indicant la immobilització de la FucA però el derivat obtingut no té activitat apreciable (els perfils de suspensió i activitat se solapen). Aquests dos experiments només es diferencien en la cinètica d'immobilització, essent el cas d'immobilització de FucA al suport a través de grups aldehids una mica més ràpida: a les 6 hores d'immobilització s'ha immobilitzat un 82% de l'activitat oferta mentre que a l'emprar els grups epòxid només s'assoleix un 56%.

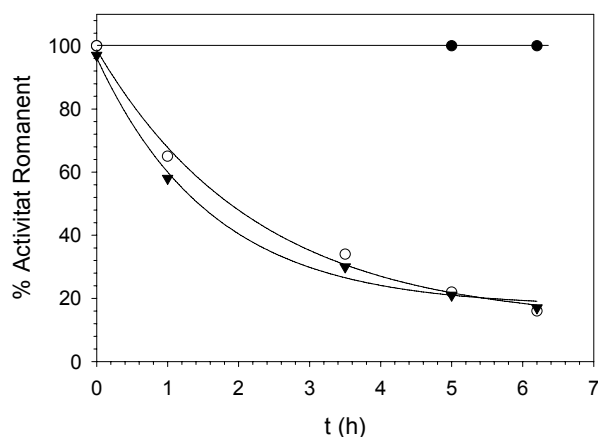


Figura 6.8. Immobilització de FucA a través dels grups aldehid de l'Eupergit C a 238 μ equivallents RCHO / mL de suport. La immobilització es du a terme a concentració inicial 12 UA/mL a 20°C pH 10. Es realitzen assajos d'activitat FucA a la suspensió suport-enzim (\circ), sobrenadant (\blacktriangledown) i enzim lliure (blanc, \bullet)

6.3.3. Immobilització de FucA a agarosa

L'agarosa, que és un suport que es pot considerar una superfície respecte de l'enzim, s'activa amb grups aldehid que es podran enllaçar als grups amino de l'enzim. Com ja s'ha comentat en els altres mètodes d'enllaç covalent, el pH pot tenir un efecte important perquè a mesura que el pH augmenta, la densitat d'amines superficials no protonades augmenta, i per tant, augmenten els grups susceptibles a reaccionar.

6.3.3.1. Efecte del pH en la immobilització de FucA

L'estudi de l'efecte del pH s'ha dut a terme a 20°C emprant agarosa activada a la màxima densitat de grups aldehid per agarosa 10BCL (300 μ mol grups aldehid/mL).

La Figura 6.9 presenta l'evolució de la immobilització de FucA a diferents pH (8, 9 i 10). És evident que la cinètica d'immobilització a pH 8 és més lenta que a pH 9 i 10. Després de 6 hores, el rendiment d'immobilització és de 80% a pH 9 i 10, i, de 45% a pH 8. Aquest resultat pot ser degut a que el percentatge de grups amino reactius sigui menor a pH 8. En quan a la FucA soluble (blanc) s'ha observat que és estable en les condicions d'immobilització i per tant, als pH de treball la pèrdua d'activitat observada a la suspensió és només deguda al procés d'immobilització.

Pel que fa a l'activitat retinguda és molt similar (al voltant de 10-20%) als pH assajats. Com ja s'ha vist també en les altres dos immobilitzacions per enllaç covalent, el percentatge d'activitat retinguda en el derivat immobilitzat no varia substancialment a mesura que augmenta el percentatge d'activitat FucA immobilitzada, és a dir, quan avança el procés.

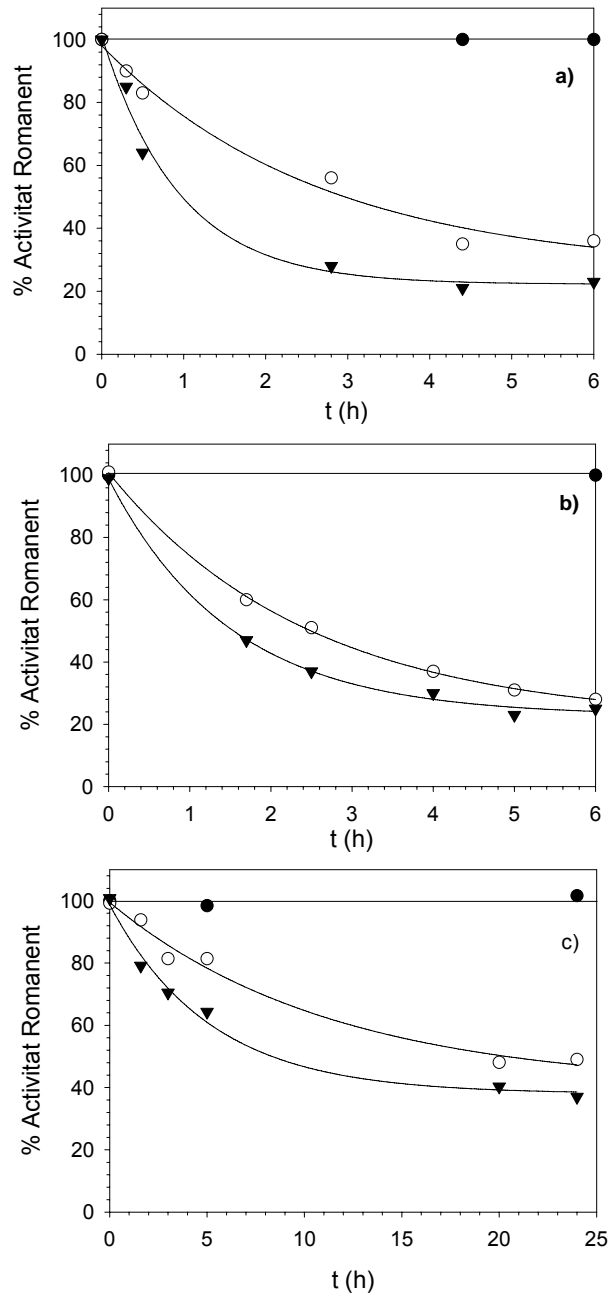


Figura 6.9. Efecte del pH en la immobilització covalent de FucA a agarosa a pH 10 (a), pH 9 (b), pH 8 (c). La immobilització es du a terme a 20°C emprant agarosa activada a 300 μmol grups aldehid/mL, a una activitat inicial de 1.2 UA/mL. Es realitzen assajos d'activitat FucA a la suspensió agarosa-enzim (\circ), sobrenadant (\blacktriangledown) i enzim lliure (blanc, \bullet)

Per acabar d'estudiar el procés d'immobilització per enllaç covalent en aquest estudi amb agarosa es consideraran altres paràmetres que també poden influenciar, com són: la temperatura, la càrrega enzimàtica o l'activitat oferta al suport i el grau d'activació del suport, és a dir, la quantitat de grups aldehid susceptibles de reaccionar amb els residus amino de l'enzim (Alvaro *et al*, 1990).

6.3.3.2. Efecte de l'activació de l'agarosa en la immobilització de FucA

L'activació de l'agarosa, és a dir, la concentració de grups aldehid que contingui, està directament lligat al número d'enllaços multicovalents que s'hi produeixin. Així, per tal d'avaluar l'efecte de l'enllaç multicovalent en l'activitat retinguda en el derivat immobilitzat de FucA, s'empra agarosa activada a 30 μmol grups aldehid/mL. S'observa una cinètica d'immobilització més lenta (veure Figura 6.10) respecte la cinètica al emprar agarosa activada a 300 μmol grups aldehid/mL (Figura 6.9.a). Després de 6 hores d'immobilització el rendiment és de 60% enlloc de 80%. Tot i això, s'observen les mateixes pèrdues d'activitat (es manté un 10-20% d'activitat retinguda durant tot el procés) independentment del grau d'activació emprat. En conclusió, el grau d'activació de l'agarosa afecta només a la cinètica d'immobilització de la FucA, no afecta a l'activitat retinguda del derivat immobilitzat.

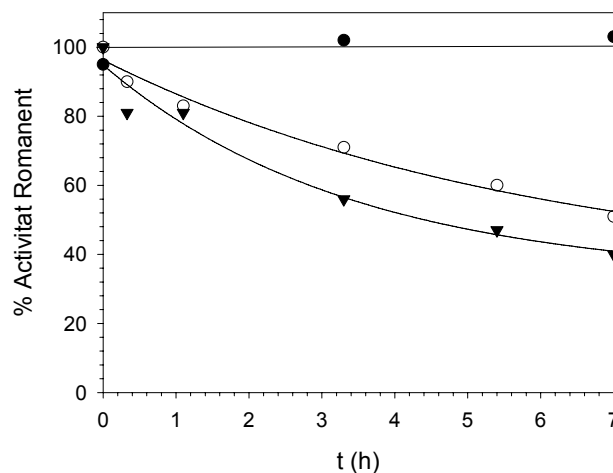


Figura 6.10. Evolució del procés d'immobilització de FucA a pH 10, 20°C, emprant agarosa activada a 30 μmol grups aldehid/mL i amb concentració inicial 1.2 UA/mL. Es duen a terme assajos d'activitat FucA a la suspensió agarosa-enzim (○), sobrenadant (▼) i enzim lliure (●).

6.3.3.3. Efecte de la temperatura en la immobilització de FucA

La Taula 6.3. mostra l'efecte de la temperatura en la immobilització de FucA. Emprant l'agarosa activada a la màxima densitat de grups aldehid (300 μmol grups aldehid / (mL suport)), s'obtenen rendiments d'immobilització i d'activitat retinguda semblants per a 4 i 20°C. En canvi, emprant agarosa activada a un grau d'activació menor (74 μmol grups aldehid/mL), la cinètica d'immobilització a 4°C és més lenta que a 20°C. Així, per exemple, després de 6 hores d'immobilització s'obtenen rendiments d'immobilització de 79% i 42% per a 20 i 4°C respectivament. Encara que s'observa una major influència de la temperatura en la immobilització de FucA emprant agarosa a un grau d'activació menor, s'obtenen percentatges d'activitat retinguda als derivats enzimàtics semblants (10-20%).

Taula 6.3. Influència de la temperatura en la immobilització de FucA en agarosa activada a 300 μmol grups aldehid / (mL suport) i 74 μmol grups aldehid / (mL suport). La immobilització es du a terme a concentració inicial 1.2 UA/mL i a pH 10. Es calculen els valors tabulats a les 6 h d'immobilització.

Temperatura (°C)	Activació de l'agarosa (μmol grups aldehid/mL)	Rend. immobilització (%)	Activitat retinguda (%)
20	300	77	14
4	300	78	16
20	74	79	20
4	74	42	10

6.3.3.4. Estudi de la càrrega enzimàtica

Es duen a terme experiments amb diferent activitat oferta al suport variant entre 7.6 i 469 UA/mL suport i emprant l'activació màxima de l'agarosa (300 μmol grups aldehid/mL) fins a assolir un rendiment d'immobilització del 80-90%. En la taula 6.4. es presenten els resultats obtinguts al final de la immobilització. Es pot observar que l'activitat del derivat obtingut augmenta a mesura que augmenta l'activitat enzimàtica oferta.

Taula 6.4. Estudi de la càrrega enzimàtica en la immobilització de FucA. Les condicions experimentals són: agarosa activada a 300 μmol grups aldehid/mL, pH 10, 20°C.

Activitat oferta a l'agarosa activada (UA/mL suport)	Rendiment d'immobilització (%)	Activitat retinguda (%)	Activitat FucA del derivat d'agarosa (UA/ mL suport)
7.6	90	13	1.0
17.3	84	14	2.4
39	91	15	6.0
167	79	5	8.4
469	84	11	50

Per tal de determinar la màxima càrrega enzimàtica sense limitacions de transferència de matèria interna es duen a terme una sèrie d'experiments. El derivat obtingut un cop reduït l'enllaç format entre l'enzim i el suport, per tal de fer irreversible l'enllaç, se sotmet a un procés de trencament per a disminuir la mida de partícula i per tant reduir les limitacions difusionals i determinar en quin valor d'activitat es presenten les limitacions de transferència de matèria interna.

Taula 6.5. Estudi de l'activitat del derivat FucA-agarosa variant la càrrega enzimàtica. Es presenten les activitats dels derivats a diferents etapes del procés: al final de la immobilització, al final de la reducció i al final del trencament. Les condicions experimentals són: agarosa activada a 300 μmol grups aldehyd/mL, pH 10, 20°C.

Activitat oferta a l'agarosa activada (UA/mL suport)	Activitat FucA del derivat d'agarosa (UA/ mL suport)		
	immobilització	reducció	trencament
7.6	1.0	0.65	0.56
17.3	2.4	1.7	1.6
39	6.0	3.0	2.8
167	8.4	4.9	7.7
469	50	22	47

Es pot observar com l'etapa de reducció amb borhidrur sòdic en l'activitat enzimàtica immobilitzada causa una important pèrdua addicional d'activitat enzimàtica en el procés d'immobilització (Taula 6.5). Per a tots els derivats preparats es perd al voltant del 50% d'activitat després de la reducció. Tot i ser un valor elevat, en el cas de la 2-deoxiribosa 5-fosfat aldolasa (DERA) s'arriba al voltant d'un 70% de pèrdues en aquesta etapa (Pla, 2006).

Com es pot observar en la Taula 6.5 per a activitats ofertes menors a 39 UA/mL suport no es detecten limitacions difusionals ja que l'activitat del derivat abans i després del procés de trencament és molt similar.

6.3.3.5. Incubació del derivat en presència de Zn^{2+}

Les pèrdues d'activitat enzimàtica observades durant el procés d'immobilització podrien ser degudes (totalment o parcialment) a la pèrdua de Zn^{2+} que és el cofactor d'aquest metaloenzim. En experiments previs de purificació de FucA, la incubació de l'enzim pur soluble en 10 mM ZnSO_4 després de la precipitació amb sulfat amònic donava un augment en la recuperació d'activitat. Per tant, els derivats FucA-agarosa s'incuben en 32 mM Zn^{2+} durant 45 minuts per tal de determinar si la incubació en Zn^{2+} permet la recuperació de l'activitat enzimàtica. Tanmateix, no s'observa cap augment de l'activitat, fet que indica que les pèrdues d'activitat durant la immobilització no són degudes a la pèrdua de Zn^{2+} o que l'enzim immobilitzat no pot enllaçar Zn^{2+} de la solució durant la incubació.

6.3.3.6. Estudi del progrés de l'activitat FucA immobilitzada

En els tres mètodes d'immobilització per enllaç covalent assajats s'ha observat que el percentatge d'activitat retinguda s'assoleix al principi de la immobilització i no varia a l'avançar el procés ni variant els principals paràmetres que influeixen en la immobilització. Així, aquest comportament sembla ser degut al tipus d'enllaç format. Per això, es decideix realitzar un experiment de seguiment, treballant amb agarosa com a cas representatiu.

L'experiment es du a terme en dues etapes a les millors condicions determinades prèviament: agarosa activada a 300 μmol grups aldehyd/mL, pH 10 i 20°C. En la primera etapa, s'ofereix FucA soluble a agarosa durant 0.5 hores. Després, quan s'assoleix un 35% d'immobilització, el derivat FucA-agarosa (D1) se separa del sobrenadant (SN1). La segona etapa de l'experiment comença quan ambdós D1 i SN1 es posen per separat en les anteriors condicions d'immobilització. Així, el derivat FucA-agarosa (D1) es resuspèn en solució tamponadora fresca de bicarbonat pH 10 (sense enzim) i el sobrenadant (SN1) s'ofereix a agarosa fresca obtenint una nova suspensió d'immobilització (S2). Finalment, el derivat FucA-agarosa (D2) provinent d'aquesta segona immobilització, s'obté per separació del sobrenadant (SN2) (Figura 6.11).

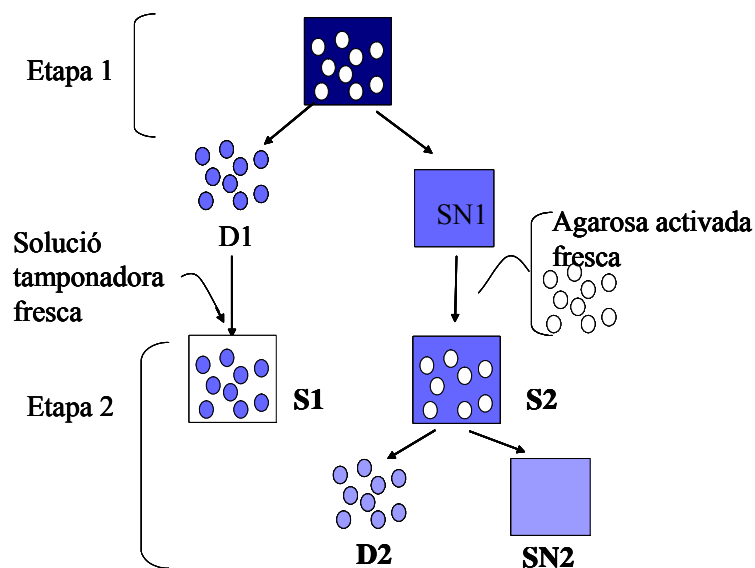


Figura 6.11. Esquema de l'estudi de l'enllaç multicovalent de FucA en gels d'agarosa. D1, derivat 1; D2, derivat 2; SN1, sobrenadant 1; S1, suspensió 1; SN2, sobrenadant 2; S2, suspensió 2.

L'evolució de l'activitat romanent al derivat D1 i de la FucA soluble (blanc) es presenta a la Figura 6.12. La FucA soluble és completament estable en les condicions experimentals. Així, la disminució observada de l'activitat de D1 és exclusivament deguda a la formació de nous enllaços covalents (multipuntual) entre el suport i la FucA, que ja estava immobilitzada en el primer pas de l'experiment. Llavors, la formació d'enllaços addicionals entre l'enzim i el suport té un efecte negatiu en l'activitat enzimàtica immobilitzada.

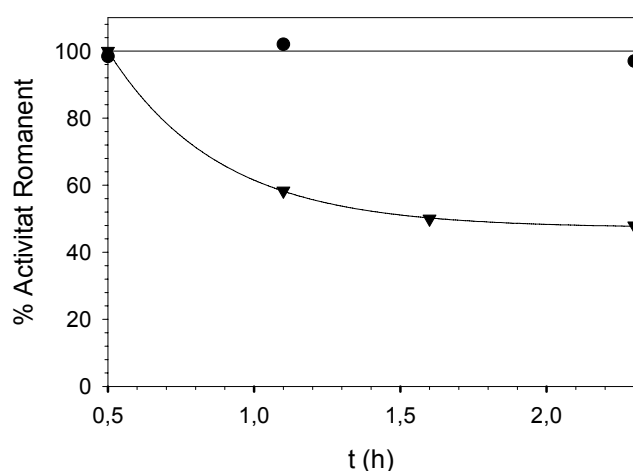


Figura 6.12. Formació del derivat FucA-agarosa D1 (▼), enzim lliure (blanc, ●) en les condicions d'immobilització. El derivat FucA-agarosa D1 s'obté després de 0,5 h d'experiment a pH 10, 20°C, emprant agarosa activada a 300 μmol grups aldehyd/mL.

L'enzim en el sobrenadant (SN1) subjecte a la nova etapa d'immobilització segueix un comportament similar a la immobilització en la primera etapa: l'activitat FucA en fase líquida (sobrenadant) disminueix degut a la immobilització en suport fresc, obtenint-se un derivat D2.

La Taula 6.6. presenta l'evolució de l'activitat dels derivats D1 i D2 durant la segona etapa de l'experiment i l'activitat FucA obtinguda per l'addició de les dues columnes que és el que s'obtindria si no s'hagués separat SN1 i D1. El derivat D1 perd activitat degut a la formació de nous enllaços. L'activitat retinguda en D2 reflexa tant l'augment de l'activitat deguda a la immobilització com la disminució d'activitat FucA deguda a la formació de nous enllaços covalents. L'activitat retinguda neta en el derivat D2 equilibra les pèrdues d'activitat del derivat D1 bastant bé com es pot observar en la columna d'addició de la Taula 6.6.

Taula 6.6. Retenció de l'activitat FucA en els derivats D1 i D2 i activitat enzimàtica obtinguda per addició d'ambdós derivats. A 0,5 h d'immobilització, el derivat FucA (2,4 UA, D1) se separa de la FucA soluble (sobrenadant SN1) i es porten separatament a les condicions d'immobilització. Es determina l'activitat de D1 i del derivat D2 obtinguts del sobrenadant (SN1) amb nova agarosa. Les condicions d'immobilització són: 300 μmol grups aldehyd/mL, pH 10, 20°C.

Temps d'immobilització acumulat (h)	Activitat retinguda al derivat D1 (UA)	Activitat retinguda al derivat D2 (UA)	Addició de l'activitat retinguda als derivats D1 i D2 (UA)
0,5	2,40	-	2,40
1,1	1,40	0,90	2,30
1,6	1,20	1,30	2,50
2,3	1,15	0,80	2,25

Així, la immobilització de FucA per enllaç covalent és un procés complex, on el percentatge d'enzim actiu assolit al principi del procés no augmenta amb el temps degut a que els dos efectes involucrats en la immobilització tenen cinètiques semblants (retenció de l'enzim i desactivació de l'enzim immobilitzat). En conseqüència, la relació de FucA retinguda activa respecte el total de FucA retinguda disminueix amb el temps. Així, temps curts d'immobilització són convenients en termes de rendiment i a més per a un millor aprofitament de l'enzim, l'activitat de FucA romanent en el sobrenadant es podrà emprar en següents immobilitzacions.

6.4. Conclusions

L'adsorció de FucA a suports d'afinitat és el mètode assajat que permet obtenir els percentatges més elevats de FucA retinguda en forma activa. S'ha observat que es produeix un bescanvi iònic entre el metall del suport i el cofactor de la FucA implicant un canvi en l'holoenzim.

Els diferents mètodes d'immobilització de FucA per formació d'enllaç covalent (CLEA, en suport Eupergit, en suport agarosa) i per adsorció a reïnes d'afinitat donen rendiments d'immobilització elevats propers al 100% però la FucA retinguda en forma activa és un percentatge baix en tots els casos (10-20 % a l'immobilitzar per enllaç covalent i 40 % per adsorció). Aquest resultat pot estar relacionat amb la complexitat de la FucA que és una aldolasa tetramèrica amb Zn^{2+} com a cofactor en cada subunitat, donat que per exemple, l'immobilització a agarosa de la DERA (dímer que no conté cofactor metàl·lic) dona percentatges de retenció d'enzim en forma activa força elevats, de l'ordre del 60% (Pla, 2007).

Encara que la formació de CLEA permetria obtenir derivats amb elevada activitat específica, caldria aprofundir l'estudi de la precipitació de FucA per a millorar la qualitat dels derivats obtinguts. Ara bé, partint del procediment de purificació de la FucA establert, la immobilització de FucA a agarosa és el mètode més adient en el moment de dur a terme aquest estudi.

CAPÍTOL 7

REACCIONS DE SÍNTESI CATALITZADES PER FucA IMMOBILITZADA EN AGAROSA

7.1. Preparació del derivat FucA-agarosa

El derivat FucA-agarosa es prepara a les millors condicions determinades en l'estudi d'immobilització que corresponen a: pH 10, agarosa activada a 300 μmol de grups aldehid per mil·lilitre de suport i 20°C. Es du a terme el procés en un temps curt d'immobilització per assolir una millor relació de l'enzim actiu respecte el total d'enzim immobilitzat com ja s'havia indicat. S'ofereix el màxim d'activitat possible, tot i que es coneix que hi haurà limitacions de transferència de matèria interna, per a aconseguir un derivat més actiu i assolir velocitats de reacció majors. Amb un derivat preparat amb un suport de diàmetre menor es podrien reduir les limitacions de transferència de matèria interna. Aquesta opció es descarta ja que aquest suport no és comercial i perquè la seva preparació per trencament mecànic implica problemes de manipulació al formar-se una pasta difícil de separar per filtració. Així, s'ofereix 2157 UA/(mL suport) que és el màxim que permet la solubilitat de la FucA. El procés d'immobilització es finalitza després de 15 minuts quan el rendiment d'immobilització és del 14.4%, de manera que la FucA restant en el sobrenadant es podrà emprar en immobilitzacions posteriors.

La quantificació de l'activitat total del derivat esdevé complicada ja que quan es prepara el derivat a elevada càrrega enzimàtica es parteix d'una solució enzimàtica saturada, de forma que la quantitat de FucA immobilitzada és baixa en relació al total en solució. Llavors, la determinació de l'activitat FucA immobilitzada a partir de l'activitat inicial, la del sobrenadant i la suspensió no és representativa degut a que la variació d'activitat en solució està dins l'error experimental comés en la mesura d'activitat. Així, la càrrega enzimàtica es pot determinar a partir del trencament del derivat FucA-agarosa per agitació vigorosa del derivat en solució aquosa de forma que es disminueix la mida de partícula del suport i s'eliminen les possibles limitacions difusionals.

A la Figura 7.1 es presenta el seguiment del procés mitjançant l'activitat del derivat. Es pot observar que a mesura que avança el trencament augmenten les UA de FucA per mil·lilitre d'agarosa fins a les 7 hores en que comença a disminuir. Per tant, l'agitació vigorosa continuada arriba a inactivar la FucA immobilitzada i encara que a partir d'aquests resultats no es pot deduir el valor màxim d'activitat enzimàtica del derivat, la disminució de la grandària de les partícules disminueix de forma evident les limitacions difusionals augmentant la activitat observada del derivat immobilitzat. De fet l'activitat passa d'un valor de càrrega aparent de 14.7 UA/(mL suport) al valor màxim determinat de 91.0 UA/(mL suport).

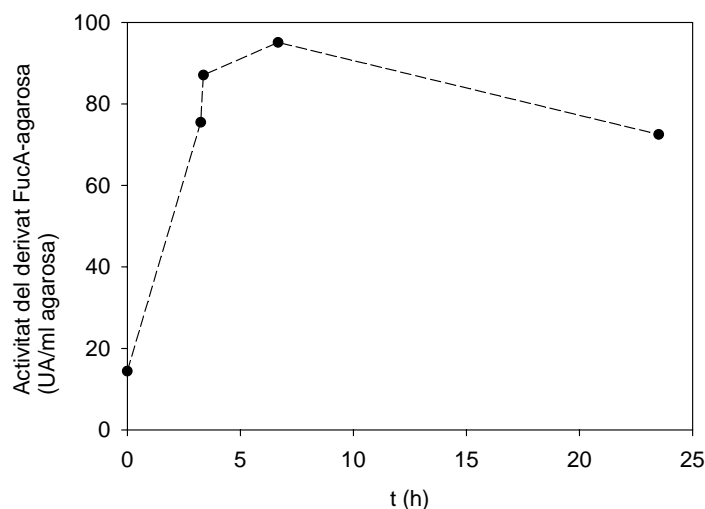


Figura 7.1. Evolució de l'activitat FucA del derivat (UA/mL agarosa) durant el seu trencament. Seguiment amb la reacció del test enzimàtic.

7.2. Avaluació de les limitacions de transferència de matèria en la utilització del derivat FucA-agarosa

Les limitacions de transferència de matèria poden ser o bé en el medi extern o intern del biocatalitzador. L'efecte de la transferència de matèria externa es pot negligir al treballar amb una bona agitació (Álvaro, 1990). Llavors, l'objectiu d'aquest apartat serà avaluar l'existència de limitacions de transferència de matèria interna quan s'empra el derivat FucA-agarosa tant en la reacció del test enzimàtic com en la reacció d'addició aldòlica de forma experimental i estimant el factor d'eficàcia a partir del mòdul de Weisz-Prater.

7.2.1. Avaluació experimental de l'efecte de les limitacions difusionals

En l'apartat anterior s'ha comentat que el derivat FucA-agarosa preparat amb alta càrrega enzimàtica té limitacions de transferència de matèria interna quan es determina l'activitat del derivat amb el test enzimàtic de la FucA. Ara bé, també s'ha de determinar l'existència d'aquestes limitacions en síntesi aldòlica. Així treballant amb derivat enzimàtic de diferent grandària com a conseqüència de sotmetre'l a trencament per períodes diferents de temps s'avalua la velocitat de reacció inicial tant per la reacció de síntesi aldòlica com per la reacció del test enzimàtic. En la Figura 7.2., on es presenta l'evolució del trencament, s'observa que, efectivament, la velocitat inicial de reacció del test enzimàtic augmenta a l'avançar el trencament del derivat FucA-agarosa (ja s'havia vist en la Fig. 7.1. expressat el resultat en unitats d'activitat); en canvi, per a la reacció de síntesi el comportament és diferent, no canvia la velocitat de reacció a mesura que es trenca el suport.

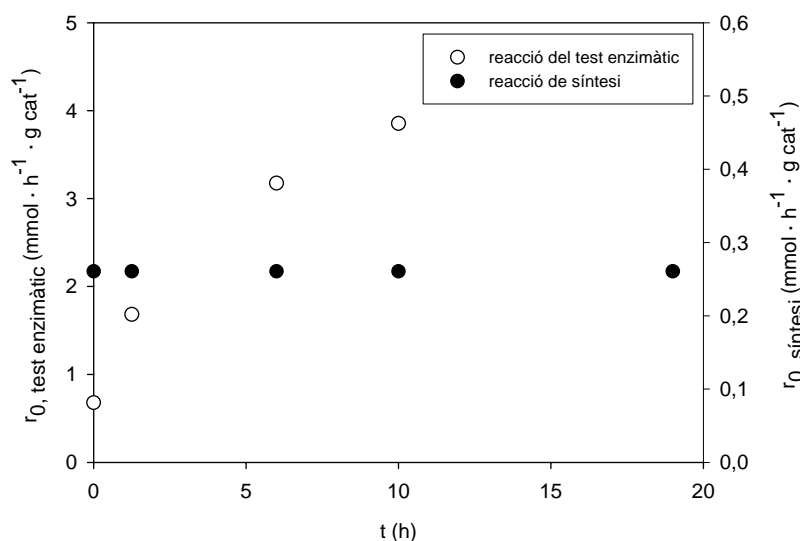


Figura 7.2. Trencament del derivat FucA-agarosa. Seguiment amb la reacció del test enzimàtic (o) i amb la reacció de síntesi (●).

Llavors, es pot afirmar que a les condicions de la reacció de síntesi no hi ha limitacions de transferència de matèria interna en el derivat FucA-agarosa, en canvi, n'hi ha en les condicions de la reacció del test enzimàtic. Cal esmentar el diferent ordre de magnitud de les velocitats de reacció pel que no ha d'estranyar el diferent efecte de l'etapa de transferència de matèria interna.

D'aquesta manera es pot veure que si es pren el valor de la càrrega enzimàtica aparent que s'obté amb el test enzimàtic per a calcular la concentració enzimàtica per a dur a terme la reacció de síntesi ens conduiria a un valor erroni per la diferent influència que té l'etapa de transferència de matèria interna en el test enzimàtic i en la reacció de síntesi.

Tanmateix es podria calcular la concentració enzimàtica sense limitacions de transferència de matèria interna amb el test enzimàtic treballant amb un suport de grandària prou petit. Ara bé, com a conseqüència de les pèrdues d'activitat causades en el procés de trencament tal com es pot apreciar a la Figura 7.1, la concentració enzimàtica real caldrà calcular-la per comparació amb una reacció de síntesi realitzada amb enzim lliure un cop se sap que l'enzim immobilitzat no té problemes difusionals catalitzant la reacció de síntesi.

D'altra banda, si en les condicions d'addició aldòlica treballant amb l'enzim immobilitzat no hi ha limitació de transferència de matèria interna, es podrà emprar el model cinètic proposat en l'apartat 5.4.3. per l'enzim soluble.

7.2.2. Estimació de l'efecte de les limitacions difusionals

Per tal de contrastar la diferent influència de les limitacions difusionals trobades experimentalment sobre la reacció del test enzimàtic i la reacció de síntesi es procedeix a estimar de forma teòrica el factor d'eficàcia de les dues reaccions.

Així s'estimarà el valor del factor d'eficàcia a partir del mòdul de Weisz-Prater i la relació entre ambdós paràmetres representada a la Figura 1.8, d'on s'extreu que per a una cinètica tipus Michaelis-Menten no hi ha limitacions de transferència de matèria interna ($\eta=1$) quan $\phi \leq 0.3$ (Asenjo i Merchuck, 1995).

L'estimació del mòdul de Weisz-Prater (ϕ_{wp}) per a una partícula esfèrica es pot calcular amb l'expressió següent:

$$\phi_{wp} = \left(\frac{R}{3}\right)^2 \frac{r_{obs} \cdot \rho_c}{D_{ef} \cdot S} \quad (7.1)$$

On,

r_{obs} , velocitat de reacció observada (mmol / (h · g catalitzador))

ρ_c , densitat del catalitzador (g catalitzador / m³ solució)

D_{ef} , difusivitat efectiva (m³ solució / h · m catalitzador)

S , concentració de substrat (mmol / m³ solució)

R , radi de la partícula (m catalitzador)

En el cas que ens ocupa la FucA està immobilitzada en suport agarosa que és esfèric amb un radi de 85 µm i densitat 1 g/mL.

La difusivitat efectiva s'estima a partir de l'Equació 7.2.

$$D_{ef} = \frac{D_{AB} \cdot \varepsilon_p \cdot \sigma}{\tau} \quad (7.2)$$

On,

D_{ef} , difusivitat efectiva (m³ solució / h · m catalitzador)

D_{AB} , coeficient de difusió del solut A en el dissolvent B per a concentracions diluïdes d'A (cm²/s)

ε_p , porositat

τ , tortuositat

σ , factor de constricció

Es considera que la tortuositat és la inversa de la porositat ($\tau \sim 1/\varepsilon$), la porositat de l'agarosa és $\varepsilon_p = 0.80$, i el factor de constricció $\sigma \sim 1$.

S'estima la difusivitat dels substrats en aigua a partir de l'equació de Wilke i Chang per a difusivitat en líquids per a solucions de no electròlits (veure Equació 7.3. i Taula 7.1).

$$D_{AB} = 7.4 \cdot 10^{-8} \frac{(\phi \cdot M_B)^{0.5} T}{\mu_B \cdot V_A^{0.6}} \quad (7.3)$$

On,

D_{AB} , coeficient de difusió del solut A en el dissolvent B per a concentracions diluïdes d'A (cm²/s)

ϕ , paràmetre d'associació del dissolvent, ($\phi_{\text{aigua}}=2.26$)
 M_B , pes molecular del dissolvent ($M_{\text{Baigua}} = 18 \text{ g/mol}$)
 T , temperatura (277 K)
 μ_B , viscositat del dissolvent ($\mu_{\text{aigua}} = 1.567 \text{ cp}$ a 277 K; $\mu_{\text{aigua}} = 0.89$ a 298 K)
 V_A , volum molar del solut en el seu punt normal d'ebullició (cm^3/mol)

Així, tenint en compte que la reacció de síntesi es du a terme a 4°C i el test enzimàtic a 25°C, es determina la difusivitat efectiva del (S)-Cbz-alaninal i la de la fuculosa 1-fosfat a aquestes temperatures. Per la reacció de síntesi el substrat representatiu és el (S)-Cbz-alaninal ja que cada mol desaparegut representa un mol de producte de síntesi. Els valors tant de la difusivitat com la difusivitat efectiva es resumeixen en la Taula 7.1.

Taula 7.1. Estimació de la difusivitat en aigua segons l'equació de Wilke i Chang (Eq. 7.3) i estimació de la difusivitat efectiva (Eq. 7.2) a la temperatura de treball.

Reacció	Substrat	T (K)	V_A (cm^3/mol)	D_{AB} (cm^2/s)	D_{ef} (cm^2/s)
Test enzimàtic	Fuculosa-1-P	298	983	$2,5 \cdot 10^{-06}$	$1,6 \cdot 10^{-06}$
Síntesi	(S)-Cbz-alaninal	277	773	$1,5 \cdot 10^{-06}$	$9,9 \cdot 10^{-07}$

Per tal de determinar el mòdul de Weisz-Prater es calculen les velocitats de reacció observada tant per la reacció de síntesi com per la reacció del test enzimàtic, obtenint $0.261 \text{ mmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}_c^{-1}$ i $0.679 \text{ mmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}_c^{-1}$ respectivament. Amb aquests valors, les propietats de l'agarosa i les difusivitats efectives i concentracions dels substrats es pot calcular el mòdul de Weisz-Prater per ambdues reaccions (Eq 7.1). Seguidament, amb el mòdul de Weisz-Prater es pot estimar el factor d'eficàcia per ambdues reaccions a partir de la Figura 1.8 (Asenjo i Merchuk, 1995). En la Taula 7.2 on es resumeixen aquests valors, es pot observar que mentre per la reacció de síntesi s'obté un factor d'eficàcia igual a la unitat, per a la reacció del test enzimàtic s'obté un factor d'eficàcia que implica limitacions de transferència de matèria. Per tant, s'arriba a la mateixa conclusió que experimentalment: quan s'empra el derivat FucA-agarosa, hi ha limitacions de transferència de matèria interna amb la reacció del test enzimàtic de la FucA, en canvi, no n'hi ha amb la reacció de síntesi.

Taula 7.2. Estimació del mòdul de Weisz-Prater i del factor d'eficàcia per a la reacció del test enzimàtic i la reacció de síntesi emprant el derivat FucA-agarosa.

Reacció	Substrat	r_{obs} (mmol/h.g)	$[S]_0$ (mmol/l)	D_{ef} (cm^2/s)	ϕ	η
Test enzimàtic	Fuculosa-1-P	0.679	1.97	$1.6 \cdot 10^{-06}$	0.475	0.8
Síntesi	(S)-Cbz-alaninal	0.261	48	$9.9 \cdot 10^{-07}$	0.012	1.0

En l'estudi de la càrrega enzimàtica en la immobilització a agarosa (apartat 6.3), s'apuntava que les limitacions difusionals es presentaven a l'oferir entre 39 i 167 UA/mL de FucA, en què un cop realitzat el trencament del derivat es determinava una càrrega enzimàtica de 2.8 i 7.7 UA/mL respectivament. A partir d'aquestes activitats i tenint en compte les condicions de reacció del test enzimàtic de la FucA ($[S]_0 = 1.97 \text{ mM}$, $D_{\text{eff}} = 1.6 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ a 25°C) es pot calcular la velocitat de reacció observada i determinar el mòdul de Weisz-Prater, obtenint-se uns valors de 0.117 i 0.323 respectivament que corresponen a uns factors d'eficàcia de 1 i 0.9 respectivament

(veure Taula 7.3.). Per tant, es comprova que, efectivament, les càrregues enzimàtiques marquen el límit en el que comencen a presentar-se les limitacions difusionals.

Taula 7.3. Estimació del mòdul de Weisz-Prater per als derivats FucA-agarosa en la reacció del test enzimàtic de la FucA.

Activ. Oferida (UA /mL suport)	r_{obs} (mmol/h.g)	ϕ	η
39	0.168	0.117	1
167	0.462	0.323	0.9

7.3. Determinació de la càrrega enzimàtica del derivat FucA-agarosa

Es realitza una addició aldòlica amb derivat FucA-agarosa calculant l'activitat enzimàtica al medi de reacció considerant la càrrega enzimàtica aparent determinada en l'apartat 7.2 (14.7 UA/mL agarosa) i tenint en compte que hi ha 0.7 mL suport en 4.7 mL totals en el medi de reacció.

En la Figura 7.3. es representa el perfil de producte en l'addició aldòlica entre 31.3 mM DHAP i 47.7 mM (S)-Cbz-alaninal emprant el derivat FucA-agarosa (■) i emprant FucA soluble (●) amb una concentració enzimàtica semblant a la calculada pel derivat FucA-agarosa.

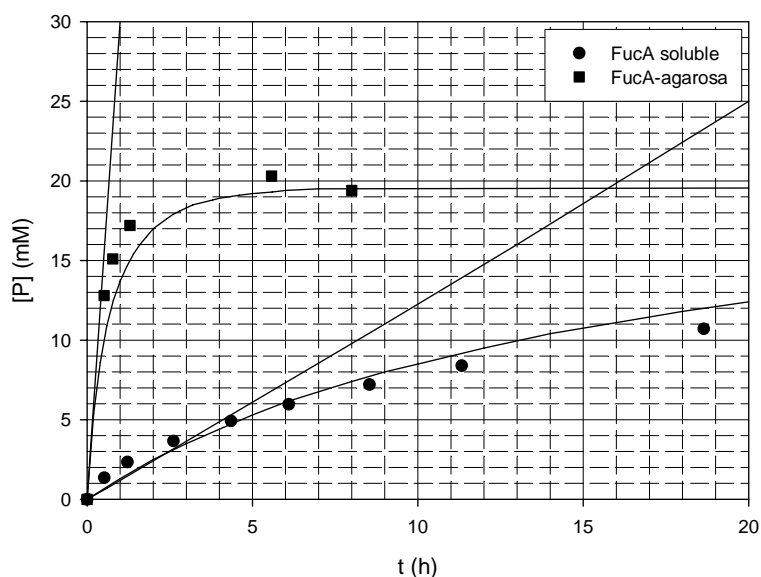


Figura 7.3. Perfils d'obtenció de producte de la síntesi amb derivat FucA-agarosa (■) FucA soluble (●) en medi 20% DMF, pH 7 i 4°C. Determinació de les velocitats inicials de reacció.

S'observa que el perfil d'obtenció de producte quan s'empra el catalitzador immobilitzat és molt més ràpid que quan s'empra en forma soluble. Com que es coneix que no hi ha limitacions de transferència de matèria interna a l'emprar el derivat FucA-agarosa en síntesi, aquesta gran diferència només pot reflexar que la càrrega enzimàtica del derivat és molt més alta que l'apparent. En realitat, realitzant el trencament del suport ja s'havia observat que l'activitat era major però no es podia trobar el valor real degut

als problemes trobats de desactivació provocats per l'agitació elevada del procés de trencament (Figura 7.1).

Així, a partir dels perfils d'obtenció de producte es determinen les velocitats de reacció inicials de 1.25 i 30 mM/h per a l'experiment amb FucA soluble i l'experiment amb derivat FucA-agarosa respectivament i, tenint en compte que el primer s'ha realitzat a 3 UA/mL reacció es pot deduir que el valor de la càrrega enzimàtica del derivat emprat és de 483 UA/mL agarosa.

La càrrega enzimàtica del derivat FucA-agarosa també es pot estimar a partir de l'ajust del model cinètic a les dades experimentals d'obtenció de producte de la síntesi presentada a la Figura 7.3. A partir dels valors cinètics es determina la concentració enzimàtica inicial ($[E]_0$) i sabent que hi ha 0.7 mL de suport en 4.7 mL de reacció, s'obté una càrrega enzimàtica de 450 UA/mL agarosa, valor que difereix només en un 6% respecte l'anterior determinació.

Així com s'ha pogut observar, els valors de la concentració enzimàtica determinada a partir del test difereixen molt del valor que es dedueix a partir de la reacció de síntesi, en les que l'efecte de la transferència de matèria interna és negligible. Quan es treballa amb enzim immobilitzat la transferència de matèria interna podrà arribar a limitar la cinètica de manera diferent en les condicions del test enzimàtic que quan es treballa en les reaccions d'interès. De fet, en el cas d'estudi la velocitat inicial de reacció del test enzimàtic és el triple que la corresponent de síntesi i per tant la difusió que esdevé negligible en aquestes condicions esdevé l'etapa limitant en les condicions del test enzimàtic.

Normalment, les condicions del test enzimàtic són les que permeten una determinació de l'activitat enzimàtica prou ràpida treballant amb el substrat natural de l'enzim però caldrà tenir en compte les possibles diferències amb les reaccions de síntesi per treure'n extrapolacions com la determinació de la càrrega del biocatalitzador, paràmetre molt important en catàlisi heterogènia en el disseny dels reactors.

7.4. Reaccions de síntesi catalitzades pel derivat FucA-agarosa en discontinu

Un cop determinada la càrrega real del derivat FucA-agarosa, es presenta la reacció de síntesi catalitzada a 67 UA/(mL reacció) amb el derivat FucA-agarosa a elevada càrrega enzimàtica en medi DMF/aigua (1/4 v/v), pH 7 i 4°C. També es presenten els perfils predits pel model cinètic de reacció (veure Figura 7.4).

Es parteix inicialment de 31.3 mM de DHAP i 47.7 mM de (S)-Cbz-alaninal, assolint un rendiment del 78%. Aquest rendiment coincideix amb els resultats obtinguts a aquestes concentracions inicials i a 4°C en medi DMF/aigua (1/4 v/v) treballant amb l'enzim lliure a 3 UA/mL reacció (veure apartat 7.2), però, evidentment la cinètica és més ràpida degut a la major quantitat de catalitzador en el medi de reacció. Així, es pot concloure que l'aplicació del derivat FucA-agarosa en síntesi és factible i recomanable en termes de productivitat i rendibilitat del procés.

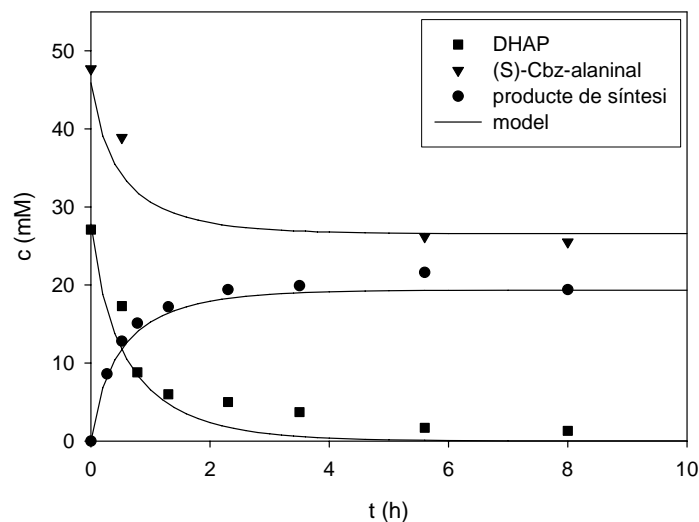


Figura 7.4. Evolució de l'addició aldòlica de Cbz-S-alaninal a DHAP catalitzat pel derivat FucA-agarosa en DMF/aigua (1/4), pH 7 i 4°C. Perfils de concentració experimentals del producte de síntesi (●), DHAP (■) i (S)-Cbz-alaninal (▼). Perfils de concentració predits pel model (-).

Per estendre l'estudi de l'ús d'aquest enzim immobilitzat s'ha emprat en un altre medi (gel emulsió) que és una emulsió concentrada formada per tres fases (dos líquides i una sòlida) (Suau *et al*, 2005). Els substrats es troben repartits en les diferents fases líquides degut a que tenen diferent solubilitat. Mentre el substrat donador (DHAP) es localitza en la fase aquosa (fase dispersa), els substrats acceptors o aldehids es troben principalment en la fase oli (fase contínua) (Espelt *et al*, 2003). Tot i ser un medi complex, s'ha descrit que les gels emulsions mantenen les partícules sòlides en suspensió, evitant la seva sedimentació i augmentant la mescla del medi (Hoffman, 1990; Clapés *et al*, 2001).

Es van realitzar tres addicions aldòliques emprant diferents aldehids (Cbz-amino-propanal, (S)-Cbz-alaninal Cbz-(R)-alaninal) a 25°C obtenint rendiments del 40 %, 29% i 25% respectivament. De fet, el rendiment obtingut amb (S)-Cbz-alaninal és lleugerament inferior però de l'ordre de l'obtingut en medi 20% v/v DMF (44%). Per tant, a partir dels resultats obtinguts es pot deduir que el derivat FucA-agarosa també és un bon catalitzador per a les addicions aldòliques en medi gel emulsió.

Prèviament a l'estudi de reacció es va determinar l'estabilitat del derivat FucA-agarosa. A 4°C en medi aquós 20% v/v DMF el derivat FucA-agarosa és totalment estable durant el temps d'operació així com ho és també la FucA soluble. En canvi, quan es treballa a 25°C, el derivat FucA-agarosa presenta una estabilitat major que la FucA soluble, tenint un temps de vida mitjana el doble que la FucA soluble a la mateixa temperatura (veure Figura 7.5). En medi emulsió concentrada a 25°C, tant el biocatalitzador en forma soluble com l'immobilitzat en agarosa són completament estables en les condicions de

reacció dins el període de reacció (30h). Així, la immobilització de la FucA no confereix més estabilitat, encara que ofereix la possibilitat de reutilització del biocatalitzador.

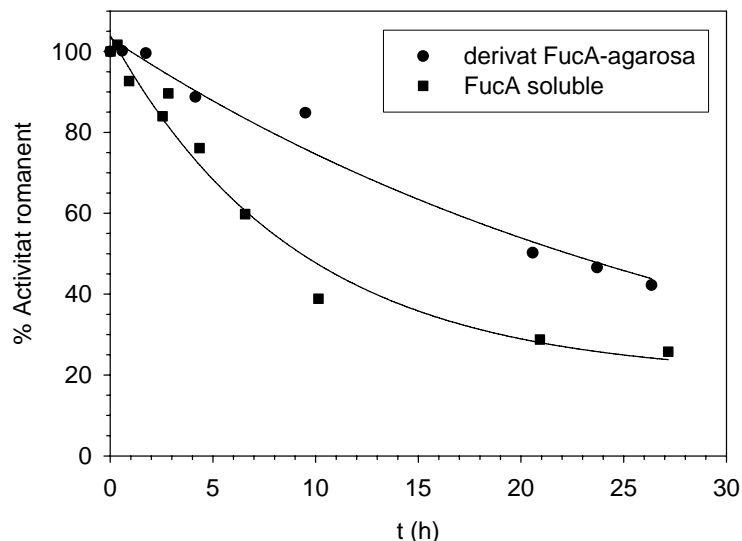


Figura 7.5. Estabilitat del derivat FucA-agarosa (●) i la FucA soluble (■) en medi DMF:aigua (1/4 v/v), pH 7 i 25°C.

7.5. Addició aldòlica catalitzada per FucA-agarosa en discontinu alimentat

En l'apartat 4.1. ja s'ha vist que per tal d'augmentar el rendiment de la reacció de síntesi convé minimitzar el consum de DHAP per la reacció de degradació enzimàtica. Així, a més a més de la disminució de la temperatura de treball també s'ha estudiat l'efecte de la disminució de la relació de concentració de DHAP front (S)-Cbz-alaninal treballant en un procés discontinu alimentat.

En aquest apartat es presenten dos síntesis amb 5 addicions discretes de DHAP treballant amb enzim en forma soluble o amb enzim immobilitzat a 12 UA/mL. L'experiment amb FucA soluble és el mateix experiment que s'ha utilitzat per a la validació del model cinètic. Ambdues síntesis es realitzen amb 5 addicions discretes de DHAP que corresponen a una quantitat total de 0.135 mmol que equival en els experiments en una sola addició de 27 mM de DHAP.

En la Figura 7.6 es presenta l'evolució dels reactius i del producte en la reacció catalitzada pel derivat FucA-agarosa (●) i el producte obtingut a l'emprar FucA soluble (○) seguint les mateixes condicions d'addició de DHAP. Cadascuna de les addicions de DHAP s'ha assenyalat amb una línia vertical en la Figura 7.6.

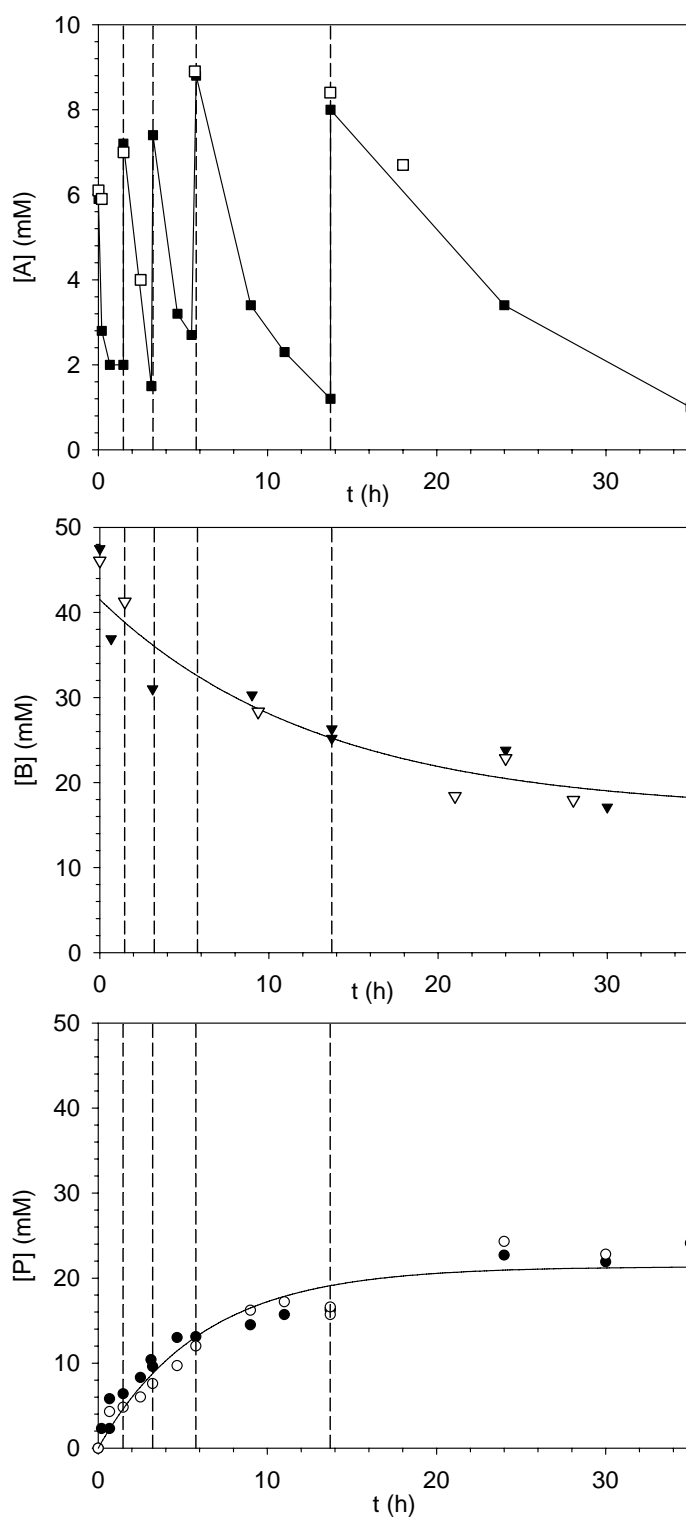


Figura 7.6. Evolució de l'addició aldòlica de Cbz-S-alaninal a DHAP catalitzat pel derivat FucA-agarosa en DMF/aigua (1/4), pH 7 i a 4°C realitzada amb 5 addicions de DHAP. Perfils de concentració experimental del producte de síntesi (●), DHAP (■) i (S)-Cbz-alaninal (▼). Perfils de concentració predits pel model (-).

Es pot observar que els perfils obtinguts amb el biocatalitzador soluble o immobilitzat se solapen. Aquest resultat concorda amb el fet que la transferència de matèria interna no limita en aquestes condicions de síntesi i, a més a més, indica que les inhibicions de la FucA no varien degut a la immobilització de l'aldolasa com ocorre en alguns casos descrits (Ladero, 2001).

En la Taula 7.4 es comparen 4 experiments realitzats amb les mateixes concentracions inicials de reactius i diferent presentació del biocatalitzador (soluble o derivat FucA-agarosa) i diferent estratègia d'addició de DHAP (1 addició o 5 addicions) a 12 UA/mL.

Taula 7.4 Comparació de les reaccions de síntesi amb FucA soluble i derivat FucA-agarosa amb 1 o 5 addicions de DHAP. Ai, DHAP inicial; Bi, (S)-Cbz-alaninal; P, producte de síntesi; Ac, DHAP consumida; R, rendiment ($R=P/Ai*100$); S, selectivitat ($S=P/Ac*100$).

Experiment	Ai (mM)	Bi (mM)	P (mM)	Ac (mM)	R (%)	S (%)
1 addició FucA soluble	26.5	54.2	19.3	23.0	73	84
1 addició FucA-agarosa	27.0	48.0	20.3	24.2	75	84
5 addicions FucA soluble	26.9	46.0	23.7	26.1	88	91
5 addicions FucA-agarosa	26.7	43.3	24.1	26.5	89	91

Com ja s'havia esmentat anteriorment, fer un canvi de una a cinc addicions de DHAP comporta un augment tant del rendiment com de la selectivitat ja que a l'augmentar la relació de concentracions entre (S)-Cbz-alaninal i DHAP s'afavoreix la via sintètica front la de degradació de DHAP. Aquest resultat queda també demostrat experimentalment al treballar amb el derivat FucA-agarosa.

La utilització de la FucA en forma soluble o immobilitzada en agarosa no suposa una variació en el rendiment o en la selectivitat. Aquest resultat era d'esperar ja que s'ha determinat anteriorment que en aquestes condicions no hi ha limitacions de transferència de matèria interna i en aquests termes és equivalent treballar amb enzim lliure que amb enzim immobilitzat.

7.6. Conclusions

El derivat FucA-agarosa a elevada càrrega enzimàtica té limitacions de transferència de matèria interna en les condicions de l'assaig enzimàtic de la FucA. El mètode tradicional d'avaluació de la càrrega enzimàtica trencant el suport per no tenir limitacions difusionals no és aplicable degut a la inactivació de l'enzim durant el procés de trencament. La càrrega enzimàtica real s'ha determinat per equivalència amb una síntesi catalitzada amb aldolasa soluble (483 UA/mL suport) o amb el model cinètic (450 UA/mL suport).

El derivat FucA-agarosa a elevada càrrega enzimàtica no té limitacions de transferència de matèria interna en les condicions de síntesi aldòlica. Llavors, el model cinètic proposat per a l'aldolasa en forma soluble també es pot aplicar a les reaccions catalitzades amb el derivat FucA-agarosa.

S'ha demostrat experimentalment la validesa de l'aplicació del derivat FucA-agarosa en síntesi tant en medi aquós 20% DMF com en gel emulsió, és a dir, en un medi trifàsic.

Les addicions discretes de la DHAP també augmenten tant el rendiment com la selectivitat de la reacció de síntesi al treballar amb derivat FucA-agarosa. Una variació de 1 a 5 addicions de DHAP, millora el rendiment del 73% al 88% i la selectivitat del 84% al 91%.

CAPÍTOL 8:

CONCLUSIONS I PERSPECTIVES FUTURES DE TREBALL

Les conclusions, ja esmentades en cada capítol de resultats, es poden resumir en:

- En les addicions aldòliques catalitzades per aldolases depenents de DHAP de tipus II es produeixen reaccions secundàries no desitjades de degradació de DHAP: degradació química i enzimàtica de DHAP. Aquestes reaccions es poden minimitzar treballant a 4°C i operant en semicontinu amb addicions discretes de DHAP, en les que es millora el rendiment i la selectivitat.
- La degradació enzimàtica de la DHAP involucra un intermedi enediolat produït només al treballar amb les aldolases depenents de DHAP de tipus II.
- El (S)-Cbz-alaninal i el metilglioxal produït en la reacció secundària actuen com a inhibidors de la FucA. El primer com a inhibidor no competitiu i el segon com a inhibidor competitiu.
- El model cinètic proposat contempla les inhibicions anomenades anteriorment amb un paràmetre d'inhibició diferent per metilglioxal per cadascuna de les reaccions involucrades. El model ha estat validat a major concentració enzimàtica amb èxit amb una síntesi en discontinu i amb una síntesi amb 5 addicions discretes de DHAP.
- Els diferents mètodes d'immobilització de FucA per formació d'enllaç covalent (CLEA, en suport Eupergit, en suport agarosa) i per adsorció a reïnes d'afinitat donen rendiments d'immobilització elevats propers al 100% però la FucA retinguda en forma activa és un percentatge baix en tots els casos (10-20 % al immobilitzar per enllaç covalent i 40 % per adsorció). Aquest resultat pot estar relacionat amb la complexitat de la FucA que és una aldolasa tetramèrica amb Zn^{2+} com a cofactor en cada subunitat.
- El derivat FucA-agarosa a elevada càrrega enzimàtica preparat per a dur a terme les addicions aldòliques presenta limitacions de transferència de matèria avaluant-se a partir del test enzimàtic i no en presenta per la reacció de síntesi. Llavors, el model cinètic proposat per a l'aldolasa en forma soluble també es pot aplicar a les reaccions catalitzades amb el derivat FucA-agarosa.

- S'ha demostrat experimentalment la validesa de l'aplicació del derivat FucA-agarosa en síntesi tant en medi aquós 20% DMF com en gel emulsió, és a dir, en un medi trifàsic.

A partir del treball presentat es podria continuar l'estudi de les addicions aldòliques en diferents punts:

- Estudi de la recuperació del producte de síntesi.
- Estudi de la reutilització de l'enzim immobilitzat.
- Estudi de la viabilitat econòmica del procés.
- Estudi de diferents medis de reacció, p.ex. altres cosolvents, líquids iònics per tal de millorar la solubilitat del (S)-Cbz-alaninal en el medi de reacció.
- Estudi d'altres estratègies de retenció de l'activitat, com per exemple l'ús de reactors de membrana o les reïnes d'afinitat i el bescanvi que comporta entre el metall de la reïna i el cofactor de l'enzim.
- Optimitzar les condicions de reacció en quant a concentracions inicials de reactius i perfil d'addició d'aquests segons el model cinètic proposat.
- Escalat i automatització de l'addició de substrats en la reacció de síntesi.
- Generalitzar l'estudi de l'addició aldòlica a les altres aldolases depenents de DHAP per tal d'obtenir unes condicions òptimes de reacció i un model cinètic de reacció.

CAPÍTOL 9:

BIBLIOGRAFIA

Álvaro, G., Fernández-Lafuente, R., Blanco, R.M., Guisán, J.M. (1990) Immobilization-stabilization of penicillin G acylase from *E.coli* *Appl Biochem & Biotech* 26: 181-195.

Álvaro, G., Feliu, J.A., Caminal, G., López-Santín, J. Clapés, P. (2000) A novel activity of immobilized penicillin G acylase: removal of benzyloxycarbonyl amino protecting group *Biocat & Biotransf* 18:253-258.

Ardao, I. (2006) Inmovilización de fuculosa-1-fosfato aldolasa en resinas de afinidad a metales. Memòria de Mestratge. Universitat Autònoma de Barcelona.

Ardao, I., Benaiges, M.D., Caminal, G., Alvaro, G. (2006) One step purification-immobilization of fucose 1-phosphate aldolase, a class II DHAP dependent aldolase, by using metal-chelate supports *Enz & Microb Tech* 39: 22-27.

Asenjo, J.A., Merchuck, J.C. (1995) Bioreactor system design. Marcel Dekker, N.Y.

Bednarski, M.D. (1991) Applications of enzymic aldol reactions in organic synthesis. *Appl Biocat* 1: 87-116.

Berry, A., Marshall, K.E. (1993) Identification of Zinc-Binding Ligands in the Class-II Fructose-1,6-Bisphosphate Aldolase of *Escherichia coli*. *FEBS Lett* 318(1):11-16.

Blanco, R.M., Calvete, J.J., Guisán, J.M. (1989) Immobilization-stabilization of enzymes; variables that control the intensity of the trypsin (amine)-agarose (aldehyde) multipoint attachment. *Enz & Microb Tech* 11: 353-359.

Blom, N. i Sygusch, J. (1997) Product binding and role of the C-terminal region in class I D-fructose-1,6-bisphosphate aldolase. *Nat of Struct Biol* 4, 36-39.

Budde, C.L., Khmelnitsky, Y.L. (1999) Aldolase stability in the presence of organic solvents. *Biotech Lett* 21: 77-80.

Cao, L., van Rantwijk, F., Sheldon, R.A. (2000) Cross-Linked Enzyme Aggregates: A Simple and Effective Method for the Immobilization of Penicillin Acylase. *Org Lett*, 2 (10) 1361-1364.

- Cao, L., van Langen, L.M., van Rantwijk, F., Sheldon, R.A. (2001) Cross-linked aggregates of penicillin acylase: robust catalysts for the synthesis of β -lactam antibiotics. *J Mol Cat B Enz* 11: 665-670.
- Castillo, J.A., Calveras, J., Casas, J., Mitjans, M., Vinardell, M. P., Parella, T., Inoue, T., Sprenger, G.A., Joglar, J., Clapés, P. (2006) Fructose 6-phosphate aldolase in organic synthesis: preparation of D-fagomine, N-alkylated derivatives and preliminary biological assays. *Org Lett* 8 (26):6067-6070.
- Chiu T.H., Feingold, D.S. (1969) L-Rhamnulose 1-Phosphate Aldolase from *Escherichia coli*. Crystallization and Properties. *Biochem* 8 (1):98-99.
- Clapés, P., Espelt, L., Navarro, M.A., Solans, C. (2001) Highly concentrated water-in-oil emulsions as novel reaction media for protease-catalysed kinetically controlled peptide synthesis *J Chem Soc, Perkin Trans* 2:1394-1399.
- Cornell, R. (1989) Chemical Cross-linking Reveals a Dimeric Structure for CTP: Phosphocholine Cytidylyltransferase *J Biol Chem*, Vol. 264, 15, 9077-9082.
- Dreyer, M. K., Schulz G. E. (1993) The Spatial Structure of the Class II L-Fucose-1-phosphate Aldolase from *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 231: 549-553.
- Dreyer, M. K., Schulz G. E. (1996a) Catalytic Mechanism of the Metal-dependent Fucose Aldolase from *Escherichia coli* as Derived from the Structure. *J Mol Biol* 259: 458-466.
- Dreyer, M. K., Schulz G. E. (1996b) Refined High-Resolution Structure of the Metal-Ion Dependent l-Fucose-1-phosphate Aldolase (Class II) from *Escherichia coli*. *Acta Cryst D*52: 1082-1091.
- Durany, O. (2000). Desenvolupament de Metodologia per la producció de fuculosa 1-fosfat aldolasa. Memòria de Mestratge. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Durany, O., Caminal, G., de Mas, C., López-Santín, J. (2004a) Studies on the expression of recombinant fucose-1-phosphate aldolase in *E.coli*. *Process Biochem* 39:1677-1684.
- Durany, O., de Mas, C., López-Santín, J. (2004b) Fed-batch production of recombinant fucose-1-phosphate aldolase in *E.coli*. *Process Biochem* 40: 707-716.
- Effenberger, F., Straub, A. (1987) A Novel Convenient Preparation of Dihydroxyacetone Phosphate and Its Use in Enzymatic Aldol Reactions. *Tetrahedron Lett* 28(15):1641-1644.
- El Blidi, L., Crestia, D., Gallienne, E., Demuynck, C., Bolte, J., Lemaire, M. (2004) A straightforward synthesis of an aminocyclitol based on an enzymatic aldol reaction and a highly stereoselective intramolecular Henry reaction. *Tetrahedron Asymm* 15: 2951-2954.

- Espelt, L.; Parella, T.; Bujons, J.; Solans, C.; Joglar, J.; Delgado, A.; Clapés, P. (2003a) Stereoselective Aldol additions Catalyzed by Dihydroxyacetone Phosphate Dependent aldolases in Emulsion Systems: Preparation and Structural Characterization of Linear and Cyclic Aminopolyols from Aminoaldehydes. *Chem Eur J* 9: 4887-4899.
- Espelt, L.; Clapes, P.; Esquena, J.; Manich, A.; Solans, C. (2003b) Enzymatic Carbon-Carbon Bond Formation in Water-in-Oil Highly Concentrated Emulsions (Gel Emulsions). *Langmuir* 19: 1337-1346.
- Espelt, L., Bujons, J., Parella, T., Calveras, J., Joglar, J., Delgado, A., Clapés, P. (2005) Aldol additions of dihydroxyacetone phosphate to N-Cbz-amino aldehydes catalyzed by L-fuculose 1-phosphate aldolase in emulsion systems: inversion of stereoselectivity as a function of the acceptor aldehyde. *Chem Eur J* 11: 1392-1401.
- Eyrisch, O., Keller, M., Fessner, W.D. (1994) Higher-carbon sugars by enzymatic chain extension. Oxidative generation of aldol precursors in situ. *Tetrahedron Lett* 35: 9013-9016.
- Fessner, W.D.; Sinerius, G.; Schneider, A.; Dreyer, M.; Schulz, G.G.; Badia, J.; Aguilar, J. (1991) Diastereoselective enzymatic aldol additions: L-rhamnulose and L-fuculose-1-phosphate aldolases from *E.coli*. *Angew Chem Int Ed.* 30: 555-558.
- Fessner, W.D., Schneider, A., Eyrisch, O., Sinerius, G., Badia, J. (1993) 6-Deoxy-L-lyxo- and 6-deoxy-L-arabino-hexulose 1 -phosphates. Enzymic synthesis by antagonistic metabolic pathways. *Tetrahedron Asymm* 41: 781-790.
- Fessner, W.D., Walter, C. (1996) Enzymatic C-C bond formation in asymmetric synthesis. *Top Curr Chem* 184: 97-194.
- Fessner, W.D (1998) Enzyme mediated C-C bond formation. *Curr Opin Chem Biol* 2:85-97.
- Fessner, W.D., Helaine, V. (2001) Biocatalytic synthesis of hydroxylated natural products using aldolases and related enzymes *Curr Opin Biotech* 12:574-586.
- Fechter, m.H., Stutz, A.E., Tauss, A. (1999) Chemical and chemo-enzymatic approaches to unnatural ketoses and glycosidase inhibitors with basic nitrogen in the sugar ring. *Curr Org Chem* 3: 269-285.
- Frigerio, M., Santagostino, M., Sputore, S. (1999) A User-Friendly Entry to 2-Iodoxybenzoic Acid (IBX) *J Org Chem* 64: 4537-4538.
- Garcia-Junceda, E., shen, G., Sugai, T. i Wong, C. (1995) A new strategy for the cloning, overexpression and one step purification of the three DHAP-dependent aldolases: Rhamnulose-1-phosphate aldolase, Fuculose-1-phosphate aldolase and Tagatose-1,6-diphosphate aldolase. *Bioorg & Med Chem* 3(7), 945-953.
- Gefflaut, T., Blonski, C., Perie, J., Wilson, M. (1995) Class I aldolases: substrate specificity, mechanism, inhibitors and structural aspects. *Prog Biophys Mol Biol* 63: 301-340.

- Gerrard, J.A., Brown, P. K., Fayle, S. E. (2002) Maillard crosslinking of food proteins I: the reaction of glutaraldehyde, formaldehyde and glyderaldehyde with ribonuclease. *Food Chem*, 79: 343-349.
- Ghalambor, M. A. i Heath, E. C. (1962) L-Fuculose 1-Phosphate aldolase. *Meth Enz* 9, 538-542.
- Guisán, J.M. (1988) Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. *Enz & Microb Tech* 10:375-382.
- Hamilton, C.J. (2004) Enzymes in preparative mono- and oligo-saccharide synthesis *Nat Prod Rep* 21:365-385.
- Henderson, I., Garcia-Junceda, e., Liu, K. K. C., Chen, Y. L., Shen, G. J., i Wong, C. H. (1994) Cloning, overexpresion and isolation of the tupe II FDP Aldolase from *E. coli* for specificity study and synthetic application. *Bioorg & Med Chem* 2(8): 837-843.
- Hernaiz, M. J., Crout, D. H. G. (2000) Immobilization/stabilization on Eupergit C of β -galactosidase from *B. Ciculans* and an α -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Enz & Microb Tech* 27: 26-32.
- Hixon, M., Sinerius, G., Schneider, A., Walter, C., Fessner, W-D., Schloss, J.V. (1996) Quo vadis photorespiration: A tale of two aldolases. *FEBS Lett* 392: 281-284.
- Hoffman, H. A. (1990) *Adv Colloid Interface Sci* 32:123.
- Illanes, A., Wilson, L. (2003) Enzyme reactor design under thermal deactivation *Critic Rev Biotech* 23:61-93.
- Joerger, A.C., Gosse, C., Fessner, W.D., Schulz, G.E. (2000) Catalytic Action of Fuculose 1-Phosphate Aldolase (Class II) As Derived from Structure-Directed Mutagenesis. *Biochem* 39: 6033-6041.
- King, E.L., Altman, C. (1956) A schematic method of deriving the rate laws for enzyme-catalyzed reaction. *J Phys Chem* 60:1375-1378.
- Koeller, K.M., Wong, C.H. (2000) Complex carbohydrate synthesis tools for glycobiologists: Enzyme-based approach and programmable one-pot strategies. *Glycobiol* 10:1157-1169.
- Ladero, M., Santos, A., García, J.L., García-Ochoa, F. (2001) Activity over lactose and ONPG of a genetically engineered β -galactosidase from *Escherichia coli* in solution and immobilized: Kinetic modelling. *Enz & Microb Tech* 29: 181-193.
- Laidler, J. K & Bunting P. S. The Chemical Kinetics of Enzyme Action. Clarendon Press Oxford, 1973, 2ond edition, Vol 1, pàg 80.
- Lapolla, A., Flamini, R., Dalla Vedova, A., Senesi, A., Reitano, R., Fedele, D., Basso, E., Seraglia, R., Traldi, P. (2003) Glyoxal and methylglyoxal levels in diabetic patients:

- quantitative determination by a new GC/MS method. *Clin Chem Lab Med* 41, 9: 1166-1173.
- López-Serrano, P., Cao, L., van Rantwijk, F., Sheldon, R.A. (2002) Cross-linked enzyme aggregates with enhanced activity: application to lipases. *Biotech Lett* 24: 1379-1382.
- Machajewski, T.D., Wong, C.H. (2000) The catalytic asymmetric aldol reaction. *Angew Chem Int Ed* 39:1353-1374.
- Martín, M. T., Plou, F. J., Alcalde, M., Ballesteros, A. (2003) Immobilization on Eupergit C of cyclodextrin glucosyltransferase (CGTase) and properties of the immobilized biocatalyst. *J Mol Cat B Enz* 21: 299-308.
- Oyrton, A.C., Monteiro, J., Airoldi, C. (1999) Some studies of crosslinking chitosan-glutaraldehyde interaction in a homogeneous system. *Int J Biol Macromolec* 26: 119-128.
- Ozaki, A., Toone, e. J., von der Osten, C. H., Sinskey, A. J. S. i Whitesides, G. M. (1990) Overproduction and substrate specificity of a bacterial Fuculose-1-phosphate aldolase: a new enzymatic catalyst for stereocontrolled aldol condensation. *J Am Chem Soc* 112: 4970-4971.
- Page, P., Blonski, C., Périé, J. (1998) Interaction of phosphonomethyl analog of dihydroxyacetone phosphate with rabbit muscle aldolase. *Biochim Biophys Acta* 1386: 59-64.
- Phillips, S.; Thornalley, P.J. (1993) The formation of methylglyoxal from triose phosphates. *Eur Biochem J* 212: 101-105.
- Pla, A. (2007) Inmobilització i estabilització de l'enzim 2-Deoxiribosa 5-fosfat aldolasa mitjançant unió covalent multipuntual a suports d'agarosa. Memòria de Mestratge. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Pollak, A., Blumenfeld, H., Wax, M., Baughn, R.L., Whitesides, G. M. (1980) Enzyme Immobilization by Condensation Copolymerization into Cross-Linked Polyacrylamide Gels *J Am Chem Soc* 102: 6324-6336
- Randel EW., Vasdev, S., Gill, U.(2005) Measurement of methylglyoxal in rat tissues by electrospray ionization mass spectrometry and liquid chromatography. *J Pharmacol Toxicol Meth* 51, 2: 153-157.
- Rasor, J. P. (1995) Enzymes in asymmetric synthesis: formation of C-C bonds by aldolases. *Chimica Oggi*
- Richard J.P. (1984) Acid-base catalysis for the elimination and isomerization reactions of triose phosphates. *J Am Chem Soc.* 106: 4926-4936
- Richard, J.P. (1993) Mechanism for the formation of methylglyoxal from triosephosphates. *Biochem Soc Trans* 21: 549-553.

- Rios, S.D. (2007) Comunicació personal.
- Samland, A.K., Sprenger, G.A. (2006) Microbial aldolases as C-C bonding enzymes-unknown treasures and new developments *Appl Microbiol Biotech* 71:253-264.
- Schoevaart, R., vanRatwijk, F., Sheldon, R.A. (2001) Stereochemistry of Nonnatural Aldol Reactions Catalyzed by DHAP Aldolases. *J Org Chem* 66: 4559-4562.
- Schürmann, M., Sprenger, G.A. (2001) Fructose 6-phosphate aldolase is a novel class I aldolase from *Escherichia coli* and is related to a novel group of bacterial transaldolases. *J Biol Chem* 276:11055-11061.
- Schürmann, M., Sprenger, G.A. (2002) Fructose 6-phosphate aldolase and 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase from *Escherichia coli* as tools in enzymatic synthesis of 1-deoxy sugars. *J Mol Cat B Enz* 19-20:247-252.
- Segel, I. H. (1993) Enzyme Kinetics. Behaviour and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems. John Wiley & Sons, Inc. New York.
- Shelhaas, M., Waldmann, H. (1996) Protecting group strategies in organic synthesis. *Angew Chem Int Ed Engl* 35:2056-2083.
- Sobolov , S.B. Bartoszko-Malik, A., Oeschger., T.R., Montalbano, M.M. (1994) Crosslinked enzyme crystals of fructose diphosphate aldolase: development as a catalyst for synthesis. *Tetrahedron Lett* 35: 7751-7754.
- Solomons, T. W. G. (1982) Química orgánica. Ed. LIMUSAS, Mexico D. F.
- Suau, T., Àlvaro, G., Benaiges, M.D., López-Santín, J. (2006) Influence of Secondary Reactions on the Synthetic Efficiency of DHAP-Aldolases. *Biotech & Bioeng* 93: 48-55.
- Sukumaran, J., Hanefeld, U. (2005) Enantioselective C-C bond synthesis catalysed by enzymes *Chem Soc Rev* 34:530-542.
- Takayama, s., McGarvey, G.J. Wong, C.H. (1997) Microbial aldolases and transketolases: New biocatalytic approaches to simple and complex sugars. *Annu Rev Microbiol* 51:285-310.
- Tijoe, T.T., Vanderwiel, J.P., Stikkelman, R.m., Straathof, A.J., Vanrantwijk, F. (1985) High-Performance Liquid-Chromatographic Determination of Glucose-1-Phosphate and Glucuronic Acid 1-Phosphate. *J Chromatogr* 330 (2):412-414.
- van der Werf, M. J., van den Tweel, W. J. J. Kamphuis, J. Hartmans, S. i de Bont, J. A. M. (1994) The potential of lyases for the industrial production of optically active compounds. *Tibtech* 12: 95-103.

van der Werf., M.J.; van den Tweel, W.J.J.; Kamphuis, J.; Hartmans, S.; de Bont, J.A.M. (1994) The potential of lyases for the industrial production of optically active compounds *Tibtech* 12:95-103.

Vidal, L. (2006) Producció de aldolasas recombinantes: de la biología molecular al desarrollo de procesos. Memòria de Tesis Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.

von der Osten, C.H., Sinskey, A.J., Barbas III C.F., Pederson, R.L., Wang, Y.-F., Wong, C.H. (1989). Use of a recombinant bacterial fructose-1,6-diphosphate aldolase in aldol reactions: preparative syntheses of 1-deoxynojirimycin, 1-deoxymannojirimycin, 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol, and fagomine. *J Am Chem Soc* 111:3924-3927.

Wehmeier, U.F. (2001) Molecular cloning, nucleotide sequence and structural analysis of the *Streptomyces galbus* DSM40480 *fda* gene: the *S. galbus* fructose-1,6-bisphosphate aldolase is a member of the class II aldolases. *FEMS Microbiol Lett* 197:53-58.

Wymer, M., Toone, E.J. (2000) Enzyme-catalyzed synthesis of carbohydrates. *Curr Opin Chem Biol* 4:110-119.

Wong, J.F.T. i Hanes, C.S. (1962) *Can J Biochem Physiol* 40:763.

Wong, C.H., Whitesides, G.M. (1994) Enzymes in synthetic organic chemistry. Vol 12. Kidlington, Oxford: UK Elsevier Science Ltd.

Zagalak, B., Frey, P.A., Karabats, G.I., Abeles, R.H. (1966) Stereochemistry of Conversion of D and L 1,2-Propanediols to Propionaldehyde. *J Biol Chem* 241(13):3028-3035.

APÈNDIX A1. Llistat d'abreviacions

A, dihidroxiacetona fosfat (DHAP)

B, Cbz-(S)-alaninal o Z-(S)-alaninal

C, metilglioxal

Cbz-O-Su, N-(benziloxycarboniloxi)succinimida

CLE, Enzim entrecreuat a partir d'enzim soluble (Cross-Linked Enzyme)

CLECs, Enzim entrecreuat a partir d'enzim cristal·litzat (Cross-Linked Enzyme Crystals)

CLEA, Enzim entrecreuat a partir d'agregats d'enzim (Cross-Linked Enzyme Aggregates)

ρ_c , densitat del catalitzador (g catalitzador / m³ solució)

D, fosfat

D_{AB} , coeficient de difusió del solut A en el dissolvent B (cm²/s)

D_{ef} , difusivitat efectiva (m³ solució / h · m catalitzador)

DMF, dimetilformamida

ϵ_p , porositat

E, FucA

EA, complexe enzimàtic binari FucA-DHAP

EAB, complexe enzimàtic ternari FucA - DHAP - Cbz-(S)-alaninal

EP, complexe enzimàtic binari FucA-producte de síntesi

FucA, fuculosa-1-fosfat aldolasa

Fuc-1-P, fuculosa 1-fosfat

FruA, fructosa 1,6-difosfat aldolasa

g_{cat} , grams de catalitzador

GDH, glicerol 3-fosfat deshidrogenasa

k_3 , constant cinètica de la reacció d'obtenció de producte a partir del complexe EAB

k_s , constant cinètica de la reacció de degradació de DHAP a fosfat i metilglioxal

μ_B , viscositat del dissolvent ($\mu_{aigua} = 1.567$ cp a 277 K)

M_B , pes molecular del dissolvent ($M_{Baigua} = 18$ g/mol)

NADH, nicotina adenina dinucleòtid reduït

P, producte de síntesi

RAMA, fructosa 1,6-difosfat aldolasa de múscul de conill

r_1 , reacció de síntesi

r_2 , reacció secundària

R, radi de la partícula (m catalitzador)

r_{obs} , velocitat de reacció observada (mmol / (h · g catalitzador))

RhuA, ramnulosa 1-fosfat aldolasa recombinant

σ , factor de constricció

S, concentració de substrat (mmol / m³ solució)

τ , tortuositat

T, temperatura (K)

TagA, tagatosa 1,6-difosfat aldolasa

V_A , volum molar del solut en el seu punt normal d'ebullició (cm^3/mol)

Φ_{wp} , mòdul de Weisz-Prater

Φ , paràmetre d'associació del dissolvent, ($\Phi_{\text{aigua}}=2.26$)

APÈNDIX A2. Rectes de calibratge.

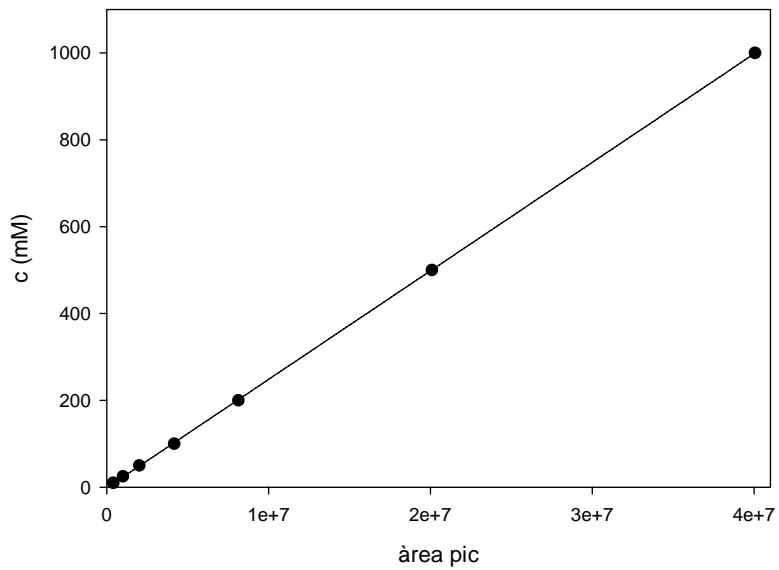


Figura A2.1. Recta de calibratge de 1,2-isopropanodiol
 $c(\text{mM}) = 2.5 \cdot 10^{-5} \text{ àrea pic}$ ($r = 0.999$)

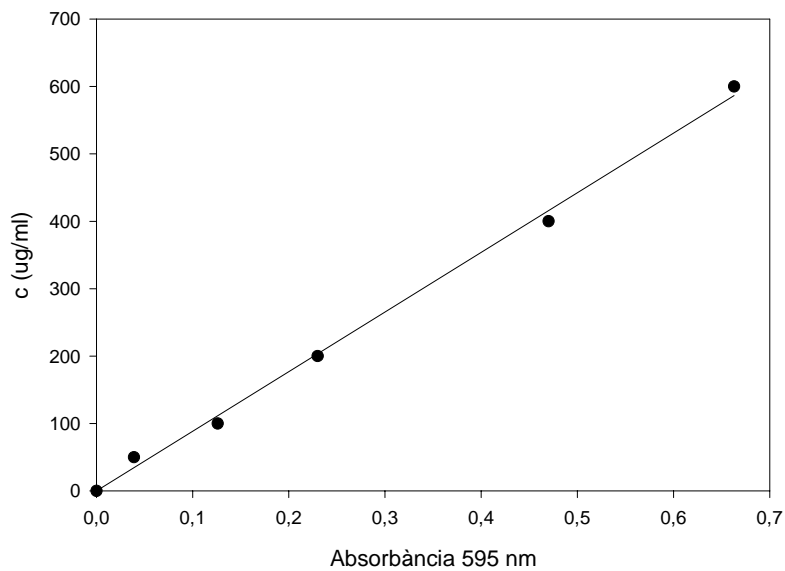


Figura A2.2. Recta de calibratge de proteïna total
 $c(\mu\text{g/mL}) = 885.6 \text{ Abs}_{595 \text{ nm}}$ ($r = 0.997$)

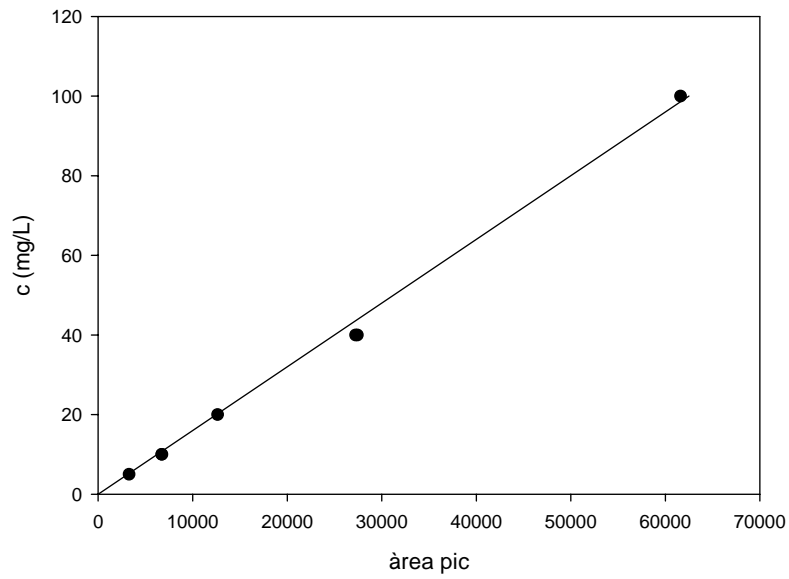


Figura A2.3. Recta de calibratge de fosfat inorgànic
 $C(\text{mg/L}) = 0.0016 (\text{àrea pic})$ ($r = 0.997$)

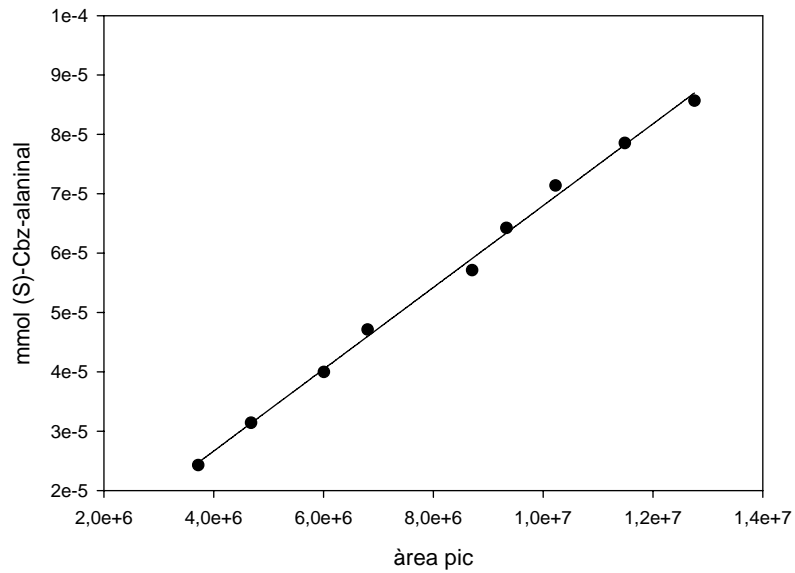
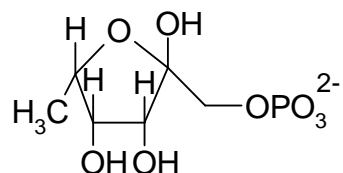


Figura A2.4. Recta de calibratge de (S)-Cbz-alaninal
 $\text{mmol (S)-Cbz-alaninal} = 7 \cdot 10^{-12} \text{ àrea pic}$ ($r=0.997$)

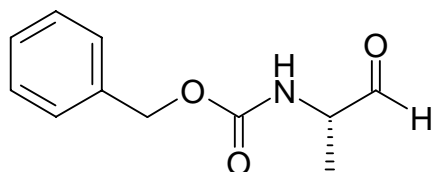
APÈNDIX 3. CARACTERITZACIÓ DELS PRODUCTES DE SÍNTESI

Fuculosa 1-fosfat



- Estat físic: sòlid incolor
- Rendiment: 2.6g, 60%
- ^1H -RMN (250 MHz, D_2O , ppm): δ 3.57-4.23 (5H, m, Fuc1P), 1.5-1.9 (10H, m, CHA), 0.95-1.32 (3H, m, CH_3).

(S)-Cbz-alaninal



- Estat físic: oli incolor
- Rendiment: 0.45 g, 90 %, 99.5% de puresa per HPLC.
- $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -16.3$ (c=1, MeOH)
- ^1H -RMN (300 MHz, d_6 -DMSO, ppm): δ 9.5 (1H, s, CHO), 7.3 (5H, s, Ph), 5.0 (2H, s, CH_2O), 4.0 (1H, m, CH), 1.2 (3H, d, CH_3).
- ^{13}C -RMN (50 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 199.0 (CHO), 156.1 (OCONH), 136.1 (C ar), 128.5 (CH ar), 128.2 (CH ar), 128.1 (CH ar), 67.0 (CH_2O), 55.8 (CH), 13.8 (CH_3).

APÈNDIX A4. Determinació dels paràmetres cinètics del model de reacció.

En aquest apèndix es resumeixen els valors inicials, límit inferior i superior presos en cada estimació i també els paràmetres cinètics determinats i la seva funció objectiu.

A4.1) Reacció secundària

Es pren 0.5 com a valor inicial de k_{iC} , 0 com a límit inferior i 100 com a límit superior en els ajustos per als tres tipus d'inhibició.

Taula A4.1. dels paràmetres cinètics de la reacció secundària considerant els tres tipus d'inhibició.

Tipus inhibició		k_{iC}	f. objectiu
Competitiva	$r_S = \frac{r_{ms} [A]}{(K_M \cdot (1 + k_{iC} [C]) + [A])}$	0.30	277
No competitiva	$r_S = \frac{r_{ms} [A]}{(K_M + [A]) \cdot (1 + k_{iC} [C])}$	0.71	384
Anticompetitiva	$r_S = \frac{r_{ms} [A]}{(K_M + [A]) \cdot (1 + k_{iC} [C])}$	0.10	510

A4.2) Reacció de síntesi

Taula A4.2. Valor inicial, límit inferior i superior dels paràmetres cinètics de síntesi presos en la seva determinació.

Paràmetre	Valor inicial	Límit inferior	Límit superior
k_A	2	0	100
k_B	2	0	100
k_{iB}	0.2	0	10
k_{iC}	0.2	0	50
r_m	20	16	50

Quan s'empren els models 1 i 2, el valor de r_m convergeix al límit inferior encara que es disminueixi respecte del valor tabulat (Taula A4.2). En canvi, amb els models 3 i 4 s'obtenen valors dels paràmetres dins els rangs establerts, essent el model 4 el que assoleix un valor de la funció objectiu menor.

Taula A4.3. Taula resum dels diferents models proposats, en cada fila es presenta l'equació de la velocitat de la reacció de síntesi, l'equació de la velocitat de la reacció secundària considerades en el model i els paràmetres K_A , K_B , k_{iB} , k_{iMe} , r_m i la funció objectiu obtinguts.

Model	Equació de la velocitat de la reacció de síntesi	Eq. de la velocitat de la r. secundària	K_A	K_B	k_{iB}	k_{iC}	r_m	f.obj
1	Inhibició per Me competitiva a la reacció de síntesi i inhibició per B no competitiva $r = \frac{r_m [A] \cdot [B]}{(K_M K_B (1 + k_{iC} [C]) + K_B [A] + K_A [B] + [A] \cdot [B]) (1 + k_{iB} [B])}$	Inhibició per Me competitiva i inhibició per B no competitiva $r_s = \frac{r_{ms} [A]}{(K_M (1 + k_{iC} [C]) + [A]) \cdot (1 + k_{iB} [B])}$	9.9	4.1	0.13	-	16	168
2	Inhibició per Me competitiva i inhibició per B competitiva $r = \frac{r_m [A] \cdot [B]}{(K_M K_B (1 + k_{iC} [C]) (1 + k_{iB} [B]) + K_B [A] + K_A [B] + [A] \cdot [B])}$	Inhibició per Me competitiva i inhibició per B competitiva $r_s = \frac{r_{ms} [A]}{(K_M (1 + k_{iC} [C]) (1 + k_{iB} [B]) + [A])}$	83.6	0.188	10	34.2	16	212
3	Inhibició per Me competitiva i inhibició per B anticompelitiva $r = \frac{r_m [A] \cdot [B]}{(K_M K_B (1 + k_{iC} [C]) + K_B [A] (1 + k_{iB} [B]) + K_A [B] + [A] \cdot [B]) (1 + k_{iB} [B])}$	Inhibició per Me competitiva i inhibició per B anticompelitiva $r_s = \frac{r_{ms} [A]}{K_M (1 + k_{iC} [C]) + [A] \cdot (1 + k_{iB} [B])}$	1.50	1.44	0.70	25.9	42.8	292
4	Inhibició per Me competitiva a la reacció de síntesi i inhibició per B no competitiva $r = \frac{r_m [A] \cdot [B]}{(K_M K_B (1 + k_{iC} [C]) + K_B [A] + K_A [B] + [A] \cdot [B]) (1 + k_{iB} [B])}$	Inhibició per Me competitiva i inhibició per B no competitiva $r_s = \frac{r_{ms} [A]}{(K_M (1 + k_{iC} [C]) + [A]) \cdot (1 + k_{iB} [B])}$	2.56	0.262	0.257	35.8	20.4	107

APÈNDIX A5. PUBLICACIONS VINCULADES AL PRESENT TREBALL

Suau, T., Calveras, J., Clapés, P., Benaiges, M.D., Álvaro, G. (2005) Immobilization of fucose-1-phosphate aldolase from *Escherichia coli* to glyoxal-agarose gels by multipoint covalent attachment. *Biocat and Biotransf* 23:241-250.

Suau, T., Álvaro, G., Benaiges, M.D., López-Santín, J. (2006) Influence of Secondary Reactions on the Synthetic Efficiency of DHAP-Aldolases. *Biotech and Bioeng* 93: 48-55.

Suau, T., Álvaro, G., Benaiges, M.D., López-Santín, J. Kinetic modeling of aldolase-catalyzed addition between DHAP and (S)-Cbz-alaninal. *AICHE J. Enviat*

Suau, T., Álvaro, G., Benaiges, M.D., López-Santín, J. On the calculation of specific activity of immobilization enzymes in synthesis: an aldolase example. *Biotech and Biotechnol. Enviat*